



Title	細胞浮游液培養法によるツベルクリンアレルギーの実験的研究：第4報 ツベルクリン添加培養時の細胞の種類とその推移
Author(s)	伊藤, 幹夫; ITO, Mikio
Description	
Citation	結核の研究, 12, 131-135
Issue Date	1960-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26694">https://hdl.handle.net/2115/26694</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_P131-135.pdf



# 細胞浮游液培養法によるツベルクリン アレルギーの実験的研究

## 第4報 ツベルクリン添加培養時の細胞の種類とその推移

伊藤 幹 夫

(北海道大学結核研究所病理部 主任 森川和雄教授)

(昭和34年11月30日受付)

現今新しい組織培養法が各方面に多大な研究の促進をうながしている事実は注目し得るものであり、生体内における種々の現象の *in vitro* における観察を可能にしてくれている。

著者は細胞浮游液培養法により家兎の脾細胞について組織培養を行い、結核菌脾細胞に対しツベルクリンは傷害性に働らく事を報告した<sup>1)</sup>が、その際増殖又は増殖を抑制される細胞の種類に関する研究は不充分であつた。今回その細胞の形態について観察したのでここに報告する。

脾臓組織を組織培養し、その形態学的観察を行つたものは必ずしも多くはなく、本邦に於ては木村<sup>2)</sup>等十指を数えるのみで、しかも著者の実験と異なり増殖帯及び遊出帯の面積を以て観察しており、それらの成績も個々の点で多少の差異はあるが殆んど同様なるものである。即ち、培養後数時間で広い發育帯を認め、それは主として小淋巴球であり、一昼夜後小淋巴球等は変性の徴候を示し、顆粒細胞、好エオジン性白血球、次いで組織球、網状細胞及び結合織母細胞の出現があり、2~3日後に結合織細胞の出現を見ると述べている。

又一方、特異抗原による細胞壊死の問題も色々報告され、Waksman<sup>3)</sup>は増殖抑制は大食細胞、線維芽細胞等に見られ、細胞壊死は淋巴球、多核球にだけ見られるといつており、これについて Rich, Lewis<sup>4)</sup>等はモルモットの脾臓で多核球は淋巴球よりも傷害の程度が多いと述べている。又 Heilman<sup>5)</sup>等もウサギの脾臓の組織培養に於て、大食細胞、線維芽細胞は顆粒白血球より著明に増殖が抑制され、又顆粒白血球は淋巴球よりも多く傷害されることを発表している。

そこで著者も今回正常脾細胞を培養した際の細胞の種類と、増殖時の推移及び BCG 免疫家兎の脾細胞にツベルクリンを添加した際の細胞の形態と数的推移を観察し

両者を比較すると同時に抗体の産生について考察した次第である。

### 実験材料及び方法

実験材料及び浮游液の調製、培養法等すべて前報<sup>6)1)</sup>と同様である。

尚動物は正常家兎及び BCG 免疫家兎の2種に大別し、次の各群について実験的に観察した。

第I群：正常家兎の脾細胞を1週間培養し、培養前、2日目、4日目及び7日目の液体培地各1ml中の細胞浮游液を塗沫、ギムザ染色により検鏡した。

第II群：BCG 免疫家兎の脾細胞を第I群と同様の方法で検鏡した。

第III群：BCG 免疫家兎の脾細胞を、培地にツベルクリンが100倍稀釈液になる様に加えて培養し、上記の方法で塗沫、染色し検鏡した。

### 成 績

#### 1. 培養前の細胞の種類及び百分率

全群を通じ培養前の脾細胞の種類及び百分率は表1の如くで、細胞の種類は主として淋巴球、組織球単球性細胞、結合織細胞、好中性白血球が多く、次いで好エオジン性白血球、プラズマ細胞等が少数見られ、表1の様にI、II群の平均値は殆んど同率であつた。

#### 2. 培養後2日目の第I群及び第II群の細胞の種類及び百分率の推移

細胞の種類は前記のものの外肥胖細胞が少数見られ、その百分率は表2の如くであつた。

以上第I群、第II群共に略々同様の百分率を示し、培養前と比較すると淋巴球が著明に減少し、次いで組織球単球性細胞の減少が見られ、一方結合織細胞の著明な増加が見られたが、他には著明な変化は見られなかつた。

表 1 正常細胞及び BCG 免疫兎脾細胞の百分率

	正 常 兎 脾				BCG 免疫兎脾			
	1	2	3	平 均	1	2	3	平 均
淋 巴 球	35.0	38.0	32.0	35.0	31.0	37.0	39.0	35.7
組織球単球性細胞	30.0	32.0	36.0	32.7	38.0	31.0	27.0	32.0
結合織細胞	18.0	16.0	19.0	17.7	16.0	14.0	21.0	17.0
好中性白血球	12.0	10.0	9.0	10.3	13.0	14.0	9.0	12.0
好酸性白血球	3.0	4.0	3.0	3.3	2.0	3.0	3.0	2.7
プラズマ細胞	2.0	0	1.0	1.0	0	1.0	1.0	0.7

表 2 培養 2 日目の両群の細胞の種類及び百分率

		1	2	3	4	平均
第 I 群	淋 巴 球	23.0	27.0	24.0	28.0	25.5
	組織球単球性細胞	35.0	30.0	32.0	23.0	30.0
	結合織細胞	26.0	24.0	25.0	30.0	26.2
	好中性白血球	9.0	10.0	15.0	13.0	11.7
	好エオジン白血球	0	6.0	3.0	5.0	3.5
	プラズマ細胞	2.0	2.0	0	1.0	1.3
	肥胖細胞	5.0	1.0	1.0	0	1.8
第 II 群	淋 巴 球	32.0	27.0	26.0	32.0	26.8
	組織球単球性細胞	30.0	28.0	25.0	23.0	29.1
	結合織細胞	24.0	21.0	27.0	25.0	24.3
	好中性白血球	11.0	17.0	10.0	13.0	12.7
	好エオジン白血球	2.0	5.0	7.0	4.0	4.5
	プラズマ細胞	0	0	2.0	1.0	0.8
	肥胖細胞	0	2.0	4.0	2.0	2.0

### 3. 培養後 4 日目の推移

次の表 3 の如き結果を得た。

以上の如く、リン巴球及び組織球単球性細胞の減少と結合織細胞の増加が見られた。

### 4. 培養後 1 週目の推移

次の表 4 に示す如く、リン巴球、組織球単球性細胞の減少及び結合織細胞の増加が見られた。

### 5. 第 III 群の培養後の推移

表 5 に示す如く、リン巴球の減少と組織球単球性細胞及び結合織細胞の増加が主な変化で、他は殆んど変化は見られなかつた。

表 3 培養 4 日目両群細胞の種類及び百分率

		1	2	3	4	平均
第 I 群	淋 巴 球	18.0	16.0	15.0	19.0	17.0
	組織球単球性細胞	27.0	23.0	24.0	25.0	24.8
	結合織細胞	39.0	38.0	42.0	44.0	40.5
	好中性白血球	10.0	17.0	13.0	9.0	12.3
	好酸性白血球	4.0	5.0	6.0	3.0	4.5
	プラズマ細胞	2.0	1.0	0	0	0.8
	球 巴 球	21.0	15.0	14.0		16.7
第 II 群	組織球単球性細胞	27.0	23.0	24.0		24.7
	結合織細胞	37.0	39.0	39.0		38.3
	好中性白血球	9.0	15.0	17.0		13.3
	好酸性白血球	4.0	7.0	5.0		5.3
	プラズマ細胞	2.0	1.0	1.0		1.3

以上各群について述べたが、全群を総括し比較すると表 6 の如く、第 I 群及び第 II 群は殆んど同様の変化を示し、特に結合織細胞の増殖とリン巴球及び組織球単球性細胞の減少が目立っていた。又一方、第 III 群では組織球単球性細胞の高度の増加が見られ、リン巴球及び結合織細胞の減少が目立っていた。

### 6. 変性を示した細胞と正常細胞との百分率

3 つの群の培養日数に比例して変性を示した細胞と然らざる細胞との百分率は表 7 の如し。

以上 3 群を比較すると、第 I 群及び第 II 群は殆んど同率で、変性を示した細胞は主として大型単核細胞の様に思われた。

III 群では前 2 群に比し、変性を示した細胞が多く見られ、主として小型の単核細胞に変性細胞が多く見られ

表 4 培養 1 週後の両群細胞の種類及び百分率

		1	2	3	4	平均
第 I 群	淋 巴 球	14.0	15.0	17.0	16.0	15.5
	組織球単球性細胞	21.0	22.0	24.0	22.0	22.3
	結合織細胞	50.0	45.0	43.0	45.0	45.8
	好中性白血球	11.0	14.0	13.0	12.0	12.8
	好酸性白血球	4.0	4.0	3.0	5.0	4.0
	プラズマ細胞	0	0	0	0	0
第 II 群	淋 巴 球	19.0	13.0	14.0		15.3
	組織球単球性細胞	23.0	20.0	19.0		20.7
	結合織細胞	41.0	47.0	50.0		46.0
	好中性白血球	13.0	16.0	12.0		13.6
	好酸性白血球	4.0	3.0	5.0		4.3
	プラズマ細胞	0	1.0	0		0.3

た。

考 按

1. 正常脾細胞の形態

従来脾臓組織の培養は、主として網内系の機能を明らかにせんために行われたものが多く、詳細な形態学的研究を行つたものは必ずしも多くはない。しかもこれらはすべて発育帯における細胞について観察したものである。そこで著者はこれと趣を異にし細胞浮游液培養法を用いて実験し個々の細胞について観察をこころみた。

著者の実験成績は一言にしていえば、淋巴球、組織球単球性細胞の著明な減少と結合織細胞の増殖であり、これを前述せる木村<sup>2)</sup>等の成績と比較して見ると（これは著

表 6 全実験を通じて各群細胞の種類及び百分率

		日	リンパ球	組織球単球性細胞	結合織細胞	好中性白血球	好酸性白血球	プラズマ細胞	肥 胖 細胞
第 I 群	正常免脾	前	35.0	32.7	17.7	10.3	3.3	1.0	0
		2	25.5	30.0	26.2	11.7	3.5	1.3	1.8
		4	17.0	24.8	40.5	12.3	4.5	0.8	0
		7	15.5	22.3	45.8	12.8	4.0	0	0
第 II 群	BCG 免疫免脾	前	35.7	32.0	17.0	12.0	2.7	0.7	0
		2	26.8	29.1	24.3	12.7	4.5	0.8	2.0
		4	16.7	24.7	38.3	13.3	5.3	1.3	0
		7	15.3	20.7	46.0	13.6	4.3	0.3	0
第 III 群	BCG 免脾「ソ」	前	35.7	32.0	17.0	12.0	2.7	0.7	0
		2	26.7	33.6	24.7	11.0	2.3	1.7	0
		4	17.3	35.7	31.3	11.3	3.3	1.0	0
		7	14.3	36.6	33.0	12.7	1.7	1.7	0

者の実験とは実験方法や観察の方法が異なり、一概に比較することは出来ないと思われるが) 木村等は 24 時間で淋巴球は変性の徴候を示し、好エオジン性白血球、組織球性細胞等の出現を見、2~3 日で結合織細胞の出現を見ると述べている。著者の実験では、たしかに 2 日目には淋巴球は減少しており、結合織細胞は増加の徴候を示しているが、組織球性細胞はむしろ減少している。これは木村等は発育帯で観察しているため実数においては増加しているのか、減少しているのかは不明であり、これのみでは増加とは断定できない。何れにしる結合織細

表 5 BCG 免疫免脾浮游液培養にツベルクリン添加の場合の細胞の種類及び百分率

	培 平 養 前 均	2 日 目				4 日 目				7 日 目			
		1	2	3	平均	1	2	3	平均	1	2	3	平均
淋 巴 球	35.7	27.0	23.0	30.0	26.7	16.0	21.0	15.0	17.3	14.0	16.0	13.0	14.3
組織球単球性細胞	32.0	34.0	36.0	31.0	33.6	38.0	32.0	37.0	35.7	39.0	36.0	36.0	36.6
結合織細胞	17.0	23.0	24.0	27.0	24.7	32.0	31.0	31.0	31.3	29.0	31.0	36.0	33.0
好中性白血球	12.0	11.0	13.0	9.0	11.0	10.0	12.0	12.0	11.3	12.0	14.0	11.0	12.7
好酸性白血球	2.7	3.0	2.0	2.0	2.3	2.0	4.0	4.0	3.3	2.0	2.0	1.0	1.7
プラズマ細胞	0.7	2.0	2.0	1.0	1.7	2.0	0	1.0	1.0	4.0	1.0	0	1.7

表 7 変性細胞の百分率

		2 日 目		4 日 目		7 日 目	
		正常細胞	変性細胞	正常細胞	変性細胞	正常細胞	変性細胞
第 I 群	1	93.0	7.0	91.0	9.0	86.0	14.0
	2	91.0	9.0	87.0	13.0	88.0	12.0
	平均	92.0	8.0	89.0	11.0	87.0	13.0
第 II 群	1	94.0	6.0	92.0	8.0	89.0	11.0
	2	91.0	9.0	96.0	4.0	87.0	13.0
	平均	92.5	7.5	94.0	6.0	88.0	12.0
第 III 群	1	84.0	16.0	82.0	18.0	76.0	24.0
	2	85.0	15.0	83.0	17.0	74.0	26.0
	平均	84.5	15.5	82.5	17.5	75.0	25.0

胞は他の細胞に比し旺盛なる増殖力を有することは言えると思われる。

又一方、石橋<sup>7)</sup>は家兎の脾を培養すれば組織球性細胞の純培養を得ると述べているが、著者の実験では結合織細胞は増加の一途をたどり、7日目では殆んど50%近く迄増加しており、逆に組織球性細胞は1/3に近い所迄減少し、むしろ結合織細胞の純培養が予想される。これは石橋は組織球性細胞と結合織性細胞とを区別しておらず、著者の実験における組織球単球性細胞と結合織細胞とを組織球性細胞として一括しており、そこに著者の実験との相違点があると思われる。ただここに不思議に思われるのは、正常家兎脾における好中球の増量の事実である。本来この細胞は特別の場合を除き、造血臓器以外で増殖することは考え難いところであり、若干ながら脾の組織培養で増加したことは、本来兎の好中球は疑好酸球と呼ばれ成熟型ではエオジン好性の微細顆粒を有し、分類上容易な細胞種である。従つて局所的な成熟経過が疑好酸球のみかけの数的判断を増加したものではないかと考えられるのである。同様なことは今回の実験のリンパ球についても言えるかも知れない。幼弱な単球とリンパ球との区別は、殊に脾の細胞浮游液培養では鑑別に苦勞するものであつて、若干の誤つた判断はやむをえないところであると考えられる。何れにしろ培養の条件、即ち養分の減少、pHの変化等により増殖の程度は多少の差異はあると思われるが、以上の結果により結合織性細胞は他の細胞種に比し、正常な状態において増殖力が強く、特にこの細胞が最も早く純培養に成功している事実より見てこのことがうなずけると思われる。

## 2. ツベルクリン添加培養における脾細胞の形態

特異抗原による細胞増殖抑制及び壊死の問題は前述せる如く色々報告されてきているが、著者はBCG免疫家兎の脾細胞を用い抗原としてツベルクリンを添加し、その際の脾細胞の形態と数的推移を観察し、前述せる正常家兎のものと比較し若干の考按を加えたい。

先ず組織球単球性細胞であるが、ツベルクリン添加のない時のBCG免疫家兎の脾では培養日数の進むにしたがい百分率では減少しているが、ツベルクリンの添加により逆に培養日数の進むにしたがい増加している。

ここで考えねばならぬことは、これは百分率であつて実数ではないことである。第2報<sup>1)</sup>にのべた通り、BCG免疫脾細胞はツベルクリンの添加がないと1週間で約3.3倍に増加しているわけで、組織球単球性細胞の百分率における減少は実数においては必ずしも減少を示さず、むしろ増加即ち、増殖を示していると考えて差支えない。しかしツベルクリン添加時においては、1週間では約2.5倍に増加している。この数的関係から判断すると、やはり実数においてもツベルクリン添加時、組織球性細胞の増加はより著明と判断すべきであろう。これはツベルクリンが影響しているものとしか考えられず、組織球単球性細胞はツベルクリン即ち、特異抗原に敏感でその何等かの刺激により増殖が促進されるものと考えられ、一面現在網内系及びこれを多く含む臓器が抗体産生に関与するとの説が一般に信じられている事実より考え、抗原添加により組織球性細胞の増加を認める事は抗体産生という意味からも興味ある問題だと思われる。

特に前報において報告した如く、実験的に得た抗体産生と今回の組織球性細胞の増殖とが殆んど平行関係を示すことは注目し得る事実であり、この間の説明を与えてくれるものと思われる。

次に結合織細胞であるが、これは組織球性細胞とは反対にツベルクリン非添加例では日数に比例して高度に増加しており、ツベルクリン添加例では増加の傾向を示しているが、その程度は非添加例に比し遙かに及ばない。百分率の上では1週間目46%と33%、わずか13%の差であるが、ツベルクリン添加例では細胞数全体の増加抑制が見られる事実から判断して、両者の実数における差は非常に大きいと見るべきであろう。つまりツベルクリンは結合織細胞の増殖を著明に抑制し、或いは細胞に直接働いて壊死を起させている可能性もあると考えられ、結合織細胞における抗原抗体反応の惹起は否定出来ないところである。

第3にリンパ球であるが、これは正常家兎でもBCG免疫家兎の脾細胞にツベルクリンを添加したものでも略々

一様な減少を示している。ここで前述の実数値を再び考へに入れると、ツベルクリン非添加ではリンパ球の増殖力は余り強いものではないというよりむしろ殆んど増加しないと判断される。それに比べ、ツベルクリン添加時は全細胞数の増加抑制がある。更に百分率における低値を示したことは、リンパ球実数の著明な減少を示すものと考えてよいであろう。殊に変性細胞に小型単核細胞の多かつた事実はこの推察を裏書きしてくれる。リンパ球におけるアレルギー壊死はどうしても考へに入れねばならないところであり、この事については Favour<sup>9)</sup> の「ツベルクリンによる細胞壊死はリンパ球に多く認められる」との報告に一致している。しかし、このようなリンパ球の態度を直ちにこの細胞の抗体産生能と結びつけて考へることには飛躍がありすぎるようで、アレルギー細胞壊死は単なる抗体の細胞表面への拘着だけによつても起ると考へてもよいであろう。事実結合組織細胞にも壊死が起ることを見てもわかることである。

第4に多核白血球であるが前述の如く Rich, Lewis<sup>4)</sup> はモルモットで, Waksman<sup>3)</sup> は兎で実験し, 多核白血球の方がリンパ球よりも著明に融解されると述べているが, 本邦の小谷<sup>9)</sup> 等はモルモットで追試の結果, ほとんどの例に融解は認められないと述べている。著者の実験では正常家兎ではわずかに増加の傾向を示しているが, ツベルクリン添加例では殆んど変化が認められなかつた。この様な事実を見ると, 小谷等の如くほとんど融解が認められないとの説には賛成できない。又 Waksman の説の如く著明な融解も認められず, この細胞に対してはむしろツベルクリンの不感受性を考へてよいのではないかと思われる。

## 第5報 全報に対する総括, 考按及び結論

免疫個体の細胞が抗原に対して特異的な反応態度を示すことは既に cytotoxin として古くから注目されているところである。そして iso-antibody 或いは auto-antibody と云う問題に関連して主として血液細胞における細胞融解の研究が進められ更に hetero-antibody として細胞を主役としたアレルギー反応の実態についても知見は次第にふえつつあるようである。今日溶血性黄疸或いは血小板減少性紫斑病, 更に赤芽球症にと臨床的にも細胞アレルギー現象は注目を呼んでいるし, 続々と提出される研究成果についても高い評価がおかれている現状である。

所で今日の細胞アレルギーの基礎的研究の発展は先ず 1932 年の結核動物細胞に対するツベルクリンの態度の

又, 以上の外の顆粒細胞もリンパ球より傷害の程度が多いと Heilman<sup>5)</sup> 等は述べているが著者の実験では著しい変化は見られなかつた。

## 結 論

細胞浮游液培養法を用いて, 正常家兎の脾細胞の形態とその百分率の推移及び BCG 免疫家兎の脾細胞にツベルクリンを添加した場合の形態とその百分率推移について実験的研究を行つた。

1. 正常家兎及び BCG 免疫家兎の脾細胞では培養日数の進むにしたがい, 結合組織細胞の高度な増加とリンパ球及び組織球性細胞の減少が見られた。

2. BCG 免疫家兎の脾細胞培養時に ツベルクリンを添加すると, 組織球性細胞の増加と, 結合組織細胞の著明な増殖抑制, リンパ球の壊死及び軽度ながら多核白血球の壊死が見られた。

3. 以上の成績について若干の考按を加えた。

## 引用文献

- 1) 伊藤幹夫: 結核の研究, 10, 50 (1958).
- 2) 木村 廉: 組織培養, 南条書店, 東京 (1947).
- 3) Waksman B.H.: J. Immunol., 70, 331 (1953).
- 4) Rich, A. R. and Lewis, M. R.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 50, 115 (1932).
- 5) Heilman, D.H. Feldman, W.H. & Mann F.C.: Amer. Rev. Tuberc. 50, 344 (1944).
- 6) 伊藤幹夫: 結核の研究, 7, 82 (1957).
- 7) 石橋: 日本病理学会会誌, 18, 2 (1928).
- 8) Favour, C. B.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 65, 269 (1947).

報告<sup>1)</sup> が大きな役割を演じていると考えられる。つまり結核菌性の一種の抗原であるツベルクリンが, 結核動物の培養組織の増殖を著明に抑制した事実である。これは今日のアレルギー反応の2つの大きな型を区別する有力な根拠となつた<sup>2)</sup>。つまりツベルクリン型アレルギーではこの様な抑制現象が認められるが Arthus 型では見られないと云う大きな差である<sup>3)</sup>。しかしこの様な現象に対して, その後の研究者による培養手技の進歩或いは改変は幾つかの新事実を認めさせている。その1つは Favour 一派による plasma factor の発見であろう<sup>4)</sup>。即ち免疫動物或いは結核患者の白血球がツベルクリンによつて融解されること更にこの細胞融解にあずかる因子は結核動物又は患者の血清中に免疫細胞から遊離せられ