



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5報 全報に対する総括，考按及び結論
Author(s)	伊藤, 幹夫; ITO, Mikio
Description	
Citation	結核の研究, 12, 135-139
Issue Date	1960-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26695">https://hdl.handle.net/2115/26695</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	12_P135-139.pdf



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せら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

ると云う現象である。

さてこのような結核免疫細胞における2種の興味ある成績に対する追試は多数試みられているが、中にはこの様な考えに全面的な反対をする報告も認められる。つまりツベルクリンに増殖抑制を認めないもの<sup>9)</sup>、或いは特異性を認めないもの<sup>6)</sup>、更にはむしろ増殖促進的に働くとするもの<sup>7)</sup>と多様な反論が提出されている。

一体このような差を来す原因は何にあるのであろうか。この問題に答えるためには、先ず実験条件に対する検討が必要になつて来るのである。著者の成績を考按する前に、先人の行つた実験手技を見ると、組織細片の培養の場合には増殖抑制の程度を、増殖帯の面積を以て判定している。中には増殖帯と游出帯と区別している報告も見られるが、実際問題として、このような区別は不可能であり、又無意味でもある。つまり増殖抑制と游出抑制とは必ずしも一致しない場合もありうる。増殖が抑制された細胞は必ずしも游出が弱いとは限らない。ツベルクリン添加免疫組織の酸素消費或いは解糖作用は決して低下していないとの多くの報告<sup>9)10)</sup>はこのことを教えてくれる。それで増殖帯或いは游出帯の面積で比較するのは決して順当な判定方法とは考え難いのである。

次に Favour らの lympholysis の手技を考えると、この方法は反応前後の正確な数値的増減を知ることが出来る点は便利であるが、之は細胞の長生実験であつて、決して培養実験ではない。又ツベルクリンによる細胞障害は早急に現われるものでないとの考えから云えば実験の性質上短期間の観察だけでは不十分な感が深い。そこで著者は組織細胞の浮游液培養法の応用を思い立つたわけである。又細胞を提供する臓器としては、Favour の lympholysis を考へて、比較的リンパ球の多い脾を選んだ。

この方法はトリプシン消化によつて組織細胞間の結合をゆるめ、ばらばらにした細胞夫々の浮游状態における培養を行つたものであり、ツベルクリンの作用を量的に或いは質的に判断するには全く適当な方法と考えられる。しかしこの方法を以てしてもまだ不備な点は幾多ある。このことについては第1報<sup>11)</sup>の考按の項で述べたので重複記載をさけるが、現在の所、本方法はたしかに最も優秀な方法であると考えて差支えないであろう。

次に著者の4つの報告を総括しつつ、ツベルクリンによる結核免疫細胞の増殖抑制現象の本態について若干の考按を加えてみたい。

先ず第1報<sup>11)</sup>でえた成績からわかる通り、ツベルクリンの細胞障害作用には補体の参加が必要なが云える。之は Favour の患者白血球について、その lympho-

lysis には補体の必要なことを認めている報告<sup>12)</sup>に一致するものである。

元來補体は生体内のアレルギー反応に深い関係を有するもので、Stavitsky らの報告<sup>13)</sup>にも知る通りショック惹起時に強い補体価の低下が起るし、又この低下の程度は shock 症状の強さと比例するとも述べられている。之は速時型のアレルギー反応の場合であるが、結核症におけるツベルクリン全身性反応において補体が関係していることは、Rice<sup>14)15)</sup> ら更には当研究室の奥山ら<sup>16)</sup> が実験的に証明している。奥山らによると BCG 免疫モルモットにツベルクリンを注射した場合に補体は著しい減量を示す。しかも補体価の時間的定量曲線を見ると注射後3時間と更に10時間目との2つの谷を示すことを認めている。そして、モルモットは所謂遅延性ショック状態で死亡するのであるが、剖検的には肺に強い細胞滲出及び脾に著明な細胞壊死が認められる<sup>17)</sup>。この種病変の最高の時期は補体価の最低の時期に一致しているのである。生体内におけるこのような現象を知る時、著者の *in vitro* の成績における補体の必要性が理解されるわけである。つまり担抗体細胞と抗原たるツベルクリンとの結合の為には補体の介入を必要とするわけである。且て Middlebrook & Dubos<sup>18)</sup> はツベルクリン感作赤血球における抗血清による血球凝集反応を見出し、今日 Middlebrook & Dubos test として臨床的にも広く用いられているが、この凝集反応の場に補体を加えると溶血が起ることも認められ<sup>19)</sup>、Middlebrook hemolysis として知られている。この溶血現象は云わば、著者の細胞融解に類似していると見てもよいであろう。殊に第4報<sup>20)</sup>で理解された如く、脾を構成している細胞種の内、ツベルクリンに強く障害されるのはリンパ球と結合織細胞であり、リンパ球は Favour の lympholysis に相当するとしても、結合織細胞については、抗体の細胞表面への単なる附着によるとしか考えられないのである。血球感作は抗原によるものであるが、この場合は抗体の云わば被動性感作に相当するわけで、溶血反応に相当する細胞の崩壊が細胞表面における補体の参加した抗原抗体反応の結果として惹起されたものとするのである。その意味で cytotoxin 反応とはその機作を異にすると考えてよいであろう。尚 Waksman<sup>21)</sup> は Rich, Aronson らの組織培養の成績と Favour の lympholysis とは全く異つた機構に属する反応であると述べているが、著者の実験条件における成績では両者の間に差があるとは思われないのである。

次にアレルギー反応の型、即ち Arthus 型アレルギーとツベルクリン型アレルギーの差について考按してみよ

う。

先ずツベルクリンによる免疫細胞障害に関する報告を見ると若干は先述したが細胞融解乃至は細胞増殖抑制の面では Rich & Lewis<sup>1)</sup> の報告は必ずしも賛同をえていない。Cruickshank<sup>22)</sup> とか Jacoby & Marks<sup>23)</sup> は免疫動物皮膚の培養の際に、大量のツベルクリンによつても障害が認められないといい、又 Warburg 法による研究でも免疫細胞にツベルクリン感受性を認めていない<sup>9)10)22)24)</sup>。その他多くの反論が提出されている。とにかく陽性の成績をうるためには比較的少量のツベルクリン蛋白が使用されねばならないようで、旧ツベルクリンでは正常の細胞にも非特異的に毒性となる程度迄高濃度のものを用いなければならない。且て Fabrizio<sup>25)</sup> は組織培養実験成績から、細胞の有するツベルクリン感受性は余り高いものでなく、対照との差は決して大きくないことを述べているのも注目すべき記載と思われる。Favour も位相差顕微鏡的にツベルクリン細胞障害を調べ、細胞内空泡形成及びその他の変性を来すのは決して免疫動物の全ての例に認められるのではないと記載している。

このようなツベルクリン型アレルギーにおいてさえ、実験成績に安定性が乏しい上に、更に Waksman 一派<sup>21)27)28)</sup> による Arthus 型アレルギーにも細胞障害が見られるとの報告が提出されたわけで、本邦においても単細胞アレルギーとして、腹水細胞に関して Arthus 型にも細胞障害が見られる報告が出されている<sup>29)30)</sup>。つまりツベルクリン型、Arthus 型には細胞障害の上では差が接近したと見るべきであろう。

さて著者の成績を見ると先ず第 1 報<sup>11)</sup> の成績でわかる通り、自家血清を用うると、培養成績では両型の間に差を認めえなかつた。しかし第 2<sup>11)</sup>、3 報<sup>32)</sup> の成績から見ると、両型の間には若干の相異点が見られる。つまり細胞増殖抑制に対する抗体の細胞性及び体液性因子の参与の程度に差があるようである。その詳細は第 3 報の考按の部で記載したので再記をさけるが、要は、増殖抑制現象においては細胞性及び体液性因子の両者が深い関係を持っているが、その中ではツベルクリン型では細胞性因子が Arthus 型では体液性因子が重要な役を占めていると云うことである。そこで、一体この様な差は何に由来するかとの疑問が生じて来る。之は抗体の被吸着性の差とか、ツベルクリン抗体は細胞の何かの成分と結合して始めて抗体の特性を現わすものなのか、或いは抗体の種類が全く相異なるものなのであるか、と色々の推察が出来る。第 4 報<sup>30)</sup> でわかる通り、ツベルクリンに対する感受性は細胞の種類によつて非常に異っている。このよう

な結果から見ると、細胞による抗体の吸着性にはたしかに差があると見ることが出来よう。すると Arthus 型とツベルクリン型との差は細胞の抗体親和性における相違がもたらすものであろうか。之に関連して興味あるのは、Favour<sup>26)</sup> は両型の差を抗体産生細胞の差に求めていることで、即ち Arthus 型抗体は形質細胞によつて産生され、ツベルクリン型抗体はリンパ球によつて産生されると考えたわけである。この理由としてはリンパ球が一番よく細胞融解を起され易いこと、又リンパ球が最も良い遅延型感受性の被動性移行をさせる細胞であること、更に形質細胞に乏しい agammaglobulinemia の患者にも遅延型アレルギー性を賦与出来ること等をあげている。リンパ球による抗体産生の問題についての具体的証明としては、1942 年 Ehrlich & Harris<sup>33)</sup> の報告を始めとし、主としてアメリカにおいて研究され、今日においてもまだその意見を保持している学者がいるようであるが、現在の抗体科学の趨勢は抗体産生細胞として形質細胞説に偏つていると見てよく、定量的測定が出来ないような抗体様物質と云う表現ならともかく、立派なツベルクリン抗体として、多種類の面から定量的に追求されている現況から見ると、ツベルクリン型抗体のみを特別にあつかうことに不合理があるし、又著者の研究室の抗体  $\gamma$  グロブリンに関する多数の実験成績<sup>34)</sup> にも反するわけである。もつともその所在の全くわかつていない抗菌免疫抗体とリンパ球を結びつける分には一向に差支えない。たとえば低  $\gamma$  グロブリン血症患者では麻疹、流行性耳下腺炎、或いは BCG 感染に対し、正常人と殆んど同様の治癒が見られることを、之等患者がほぼ正常のリンパ組織を持つていることに連絡させてもよいであろう。之は古く Virchow 時代から生体における防衛機構にリンパ装置が重要な役をしているとの考えにも一致する。とにかく Favour のリンパ球説は興味ある仮説と受けとられるだけで、之に対する反論も又賛同も著者の成績からは出来ない。しかし一般に通用することであるが、細胞が抗体を産生すると云うことと抗体を持つていることとは決して同じでないことと云うことを銘記すべきであろう。結局両アレルギー型における抗体因子の差は抗体そのものの免疫学的特異性の差における単なる量的変動と見るべきではないか。つまり特異性細胞障害は細胞性、体液性抗体因子の総和によつて決定されるもので、細胞性抗体のみを重視して来た従来の考えにはたしかに反省を必要とすると思われる。なお、この抗体特異性の差については結核の感染免疫における抗原が、複合性抗原であること、及びツベルクリン蛋白質には比較的大きな分子量のものが見出されてはいるが、それにしても他の蛋

白質とは分子量に大きな差があることが関係していることも重要である。

最後に著者の観察したアレルギー性細胞障害と生体における結核病変の成立との関係についてふれてみたい。結核症は最も破壊的な伝染病と見なしうるだけに結核性病変に壊死の占める割合は非常に大きい。しかし結核菌そのものの化学的成分の研究では正常組織に壊死を起すに足る成分は現在の所何一つ見出されていない。結核菌体成分の研究に最も大きな貢献をした研究者の1人である Sabin ら<sup>35)</sup> は 2, 3 個の乾酪性結節を作るのに、菌体磷脂質を 1g も用いなければならなかつたし、彼女らが最も毒性の強い物質と認めた脂肪酸でさえ、19g の結核菌からとつた 960mg の磷脂質からえた全量を腹腔内に注入しても壊死は認めることが出来なかつたと述べている。このような所から、結核感染症に起る壊死は、その大部分がアレルギー状態にあるために起るもので、菌体成分の単独使用では毒性が弱いにもかかわらず、アレルギー反応によつて強い破壊的な病変が起ると考えられるわけである。そしてここに著者の研究主題である特異的細胞障害研究の意義が出て来ると思われるのである。

当研究室の堀尾<sup>36)</sup> は再感染結核症の初期に壊死の起る事実を認め、之に対する組織化学的研究を行い、初期の滲出炎に伴う壊死と、結節形成後に出来る壊死更には乾酪巣とは若干の差があることを報告している。之には Schwartz<sup>37)</sup> も又武田ら<sup>38)</sup> も同様に考えている。たしかに初期の滲出炎に起る壊死は全てアレルギー反応がもたらしたものと考えてよいが、結節中心部に発生する壊死更には乾酪化にはやはり若干の反対はあるが凝固壊死として結節における体液供給の不充分さがたしかに参与していると考えられる。従つて著者の調べたアレルギー細胞障害は乾酪化の全てを説明するには不充分であろう。結節の有している物理的な特性或いは菌体のもつ化学的な作用がこの特異的細胞障害に加わっていることは推察に難くない。Rich<sup>3)</sup> はツベルクリンによる病巣反応に Schwartzman 現象の演ずる役割の可能性を述べているが時田<sup>17)</sup> は結核動物に起させたツベルクリンショック病変中、特に脾のリンパ濾胞或いは脾洞内に強い細胞融解或いは食細胞による多量の核片貧食像を認めている事実は、何よりも細胞障害が特異的に起つていることを証明するものと思われるのである。このような意味でアレルギー性細胞障害が結核病変に占める役割は相当高いものであると考えられる。

以上著者のえた実験成績から、特異的な細胞壊死の本質或いは結核病変の組織発生との関係について若干の考按を行つたが、著者のとりあげたこの方面の研究にとつ

ては新しい方法が今後の細胞アレルギーの研究更には結核免疫の研究に応用され、より輝かしい成果をもたらしてくれることを信ずるものである。

## 結 論

ツベルクリンによる特異的細胞障害の本態を究明するために、従来用いられていない細胞浮游液培養法を利用した実験を行い、次のような結論をえた。

1. 家兎の脾臓をこの方法で培養すると、各種細胞の増殖状態が正確に又容易に知ることが出来て、この方面の研究への応用価値の高い方法であることがわかつた。
2. 正常家兎脾細胞の自家血清中培養増殖に対し、障害のない程度の量のツベルクリンを、BCG 家兎脾細胞培養時に、免疫血清培養液に混入すると、強い増殖抑制現象が見られた。
3. この際組合せの異なる血清を液体培地に用うると、若干態度が異なり、正常細胞にも免疫血清培地では、ツベルクリンによる増殖抑制が若干認められるし、又免疫細胞は正常血清培地ではツベルクリンによる増殖障害が、免疫血清を用いた場合に若干劣る。
4. 卵白アルブミン感作家兎の脾臓について、同様に卵白アルブミン添加培養を行うと、ツベルクリンの場合同様増殖障害が認められる。
5. この場合細胞と培地の組合せを同様に違えて培養した場合、正常細胞は免疫血清中で、抗原添加により比較的著明な増殖抑制を示し、免疫細胞は正常血清中ではこの抑制現象が余り著明ではない。
6. 以上の成績から、特異的細胞障害には細胞性抗体及び体液性抗体の両者が一緒に関係しているもので、その中ツベルクリン型アレルギーでは細胞性因子がより重きをなし、Arthus 型では体液性因子がより大きな役を演じていることを知つた。
7. この両型アレルギーにおける細胞障害には補体の参加が必要であり、非働化血清を用いた時は、共に抗原の障害作用を認めえない。
8. 正常及び BCG 免疫家兎脾細胞培養時には結合織細胞の高度の増加と、リンパ球及び組織球、単球性細胞の減少が見られた。
9. BCG 免疫家兎の脾細胞培養時に ツベルクリン添加を行うと、結合織細胞の著明な増殖抑制、リンパ球の減少が見られ、組織球、単球性細胞には比較的増加傾向が認められた。

以上の所見から、特異的細胞障害の本質及びそれが結核性病変に占める役割について考按を行つた。

## 引用文献

- 1) Rich, A.R. & Lewis, M.R.: Bull. Johns Hopkins Hosp., 50, 115 (1932).
- 2) Rich, A.R.: Pathogenesis of Tuberculosis, 2nd Ed., C.C. Thomas, Springfield, I 11 (1951).
- 3) Aronson, J.D.: J. Immunol., 25, 1 (1933).
- 4) Favour, C. B.: Advance in Tuberculosis Research, IV, p. 219 (1950).
- 5) Baldrige, G. D. & Kligman, A. M.: Amer. Rev. Tuberc., 63, 674 (1951).
- 6) Lasfargues, E., Boquet, P. & Delaunay, A.: Ann. Inst. Pasteur, 73, 169 (1947).
- 7) Juhasz-Schaffer, A.: Z. Immun Forsch., 56, 377 (1928).
- 8) Catel, W.: Klin Wschr., 31, 1009 (1953).
- 9) Morks, J. & James, D. M.: J. Hyg., 51, 340 (1953).
- 10) Cruickshank, C.N.D.: Brit. J. Exp. Path., 35, 609 (1954).
- 11) 伊藤幹夫: 結核の研究, 7, 82 (1957).
- 12) Miller, J.M., Vaughan, J.H. & Favour, C.B.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 71, 592 (1949).
- 13) Stavitsky, A.B., Stavitsky, R. & Ecker, E. E.: J. Immunol., 63, 389 (1949).
- 14) Rice, C.E., Boulanger, P. & Konst, H.: Canad. J. Comparat. Med., 18, 197 (1954).
- 15) Rice, C.E.: J. Immunol., 75, 85 (1955).
- 16) 奥山春枝他3名: 結核の研究, 6, 84 (1957).
- 17) 時田 広: 結核の研究, 4, 85 (1956).
- 18) Middlebrook, G. & Dubos, R.J.: J. Exp. Med., 88, 521 (1948).
- 19) Middlebrook, G.: J. Clin. Invest., 29, 1480 (1950).
- 20) 伊藤幹夫: 結核の研究, 第12集掲載予定.
- 21) Waksman, B.H.: J. Immunol., 70, 331 (1953).
- 22) Cruickshank, C. N. D.: Nature, Lond., 168, 206 (1951).
- 23) Jacoby, F. & Marks, J.: J. Hygiene, 51, 541 (1953).
- 24) Dittmar, C. & Sixel, J.: Beitr. Klin. Tbk., 112, 483 (1954).
- 25) Fabrizio, A.M.: Amer. Rev. Tuberc., 65, 250 (1952).
- 26) Favour, C.B.: Arch. Allergy, 10, 193 (1957).
- 27) Waksman, B. H.: Amer. Rev. Tuberc., 68, 746 (1953).
- 28) Waksman, B. H. & Bocking, D.: Am. Rev. Tuberc., 69, 1002 (1954).
- 29) 林 秀男他: 日病会誌, 41, Ed. Gen., 235 (1952).
- 30) 武田勝男他: 日病会誌, 42, Ed. Gen., 140 (1953).
- 31) 伊藤幹夫: 結核の研究, 10, 50 (1953).
- 32) 伊藤幹夫: 結核の研究, 11, 104 (1954).
- 33) Ehrich, W.E. & Harris, T.N.: J. Exp. Med., 76, 335 (1942).
- 34) 萩原昭男: 結核の研究, 9, 76 (1958); 11, 96 (1959).
- 35) Sabin, F.R., Doan, C.A. & Forkner, C.E.: J. Exp. Med., 52, Suppl. 3, 1 (1930).
- 36) 堀尾行彦: 結核の研究, 2, 121 (1955).
- 37) Schwartz, Ph.: Empfindlichkeit & Schwindsucht, Johann Ambrosius Barth., Leipzig (1935).
- 38) 武田勝男・新保幸太郎: 結核, 20, 208, 275, 472 (1942).