



Title	細胞浮游培養法による結核アレルギーの研究
Author(s)	山本, 健一; YAMAMOTO, Ken-ichi; 有馬, 純 他
Description	
Citation	結核の研究, 17-18, 1-6
Issue Date	1963-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26729
Type	departmental bulletin paper
File Information	17_18_P1-6.pdf



細胞浮遊培養法による結核アレルギーの研究

山本健一・有馬 純・佐々木昭雄・高橋義夫

(北海道大学結核研究所予防部)

(昭和37年11月20日受付)

緒 言

結核におけるアレルギーの問題は極めて複雑多岐にわたり、未解決の問題をいくつも残して今日に至っている。結核アレルギーの1つの典型的な示標とされているツベルクリン皮膚反応が抗原・抗体反応であることに勿論異論はない。その抗原側ではツベルクリン蛋白の生化学的研究の進歩に従って Seibert¹⁾らの PPD-s から、更には山村²⁾らによって菌体ツベルクリン活性ペプチドが得られている。これに対し、抗体側では、Rich³⁾、Aronson⁴⁾以来、試験管内の実験が多数行なわれ、抗体が組織鈣着性であろうとの傍証が固められているが、今後、蛍光抗体法などの新しい研究法の導入により、この組織レアギンの解明の緒口が把握されるであろう。

私達はツベルクリン・アレルギー（以下ツ・アレルギー）の機序の一端を明らかにするため、このツ・アレルギー抗体の組織鈣着性と云う点を考慮して、生体外にとり出した感作細胞を直接対象とし得る細胞浮遊液培養法を用い、試験管内の抗原・抗体反応である細胞融解現象に関与する抗原、特に結核菌体およびツベルクリンの各種画分の態度、又、この反応に影響をおよぼす諸因子の検討を行なった。

実験材料および実験方法

1) 使用動物：体重400g前後のモルモット。

2) 感作方法：ヒト型仲野株小川培地2乃至3週培養の菌苔を型の如く蒸溜水浮遊液とし、100°C 30分間加熱後、これに Adjuvant として Arlacel, Drackeol 1:9の混合液を同量加え、10 mg/mlの乳剤とした。これをモルモットの左右股部筋肉内に0.5mlずつ接種した。感作後6乃至10週の間実験に用いた。

2) 脾細胞浮遊液調製法：大凡、勝田⁵⁾の組織培養法に従って次の如く行なった。エーテル麻酔致死モルモットの脾を取り出し、容量50mlの遠心管に約0.5gをタイロード液で洗滌後移し、子宮剪刀で細切、Difco製1:200トリプシン1%液をMgおよびCaを除いたタイロード液で5倍に稀釈したもの10mlを加え37°Cで30分間

作用させ、その間5分毎に振盪した。その後、これを小遠心管に移し2,000回転5分間遠沈。その中間層約0.5mlをピペットで他の遠心管に取り、これをタイロード液で2回遠沈洗滌。最後に5ml内外のタイロードに再浮遊後、組織片を除去するため80および150メッシュの金網を通した。このような細胞浮遊液は60~80%が小単核球と一部大単核球であった。

4) 細胞融解の術式：非働化ウマ血清、型の如く調製したニワトリ胎児2倍液およびタイロード液を3:3:4の割合に混合した培養液1ml宛を目盛付小試験管(15×90mm)に分注、これに細胞浮遊液0.5mlを加え、次に抗原をタイロード液0.1mlに含ませ添加後、37°Cに立てたまま静置培養した。培養48時間目に1,500回転15分間遠沈、0.5mlを残して上清を捨て、これにクエン酸クリスタル紫液⁵⁾4mlを加え、37°Cフラン器中で1乃至2時間振盪しつつ脾細胞の核染色を行なった。そして再び1,500回転15分間遠沈後、1mlを残して上清を捨て残りを充分混和し、このものの核数を血球計算盤上で計算した。この際、抗原非添加対照試験管についても同様にして核数をしらべ、この両者を対比し、対照に対する百分率を求めて細胞融解の程度を示した。

5) 使用抗原：ソートン培地約8週培養のヒト型結核菌仲野株、H37Rv、青山B株、あるいはBCGのアセトン致死菌体又は加熱死菌体、生或は加熱培養濾液を夫々三塩化酢酸法、フェノール法、又は硫酸法によつて分画した蛋白画分。メタル法によつて得た多糖体画分。高橋法⁶⁾によつて作った磷脂質画分などを抗原として用いた。これらの化学的性状についてはグルコースはアンスロン法、窒素はマイクロキェルダール法によつて分析値を示した。

6) 皮内反応検査法：これら抗原のツ型皮内反応惹起能を Adjuvant 加加熱死菌感作モルモットに夫々100r宛皮内注射を行なって24時間で反応を判定した。

その他の必要な細部については各実験毎に記載することにする。

実験成績

実験 1. 細胞融解現象に与る抗原の検討

第 1 表に示した結果の如く OT の示すような有意な免疫細胞残存率をもつて、同様に他の蛋白画分をも TR-2 除きすべて 100 r で細胞融解を起した。これに対して多糖体画分には Ts-2 を除き細胞融解能はなかつた。又磷脂質画分にも多糖体と同様に細胞融解能は見られなかつた。なお、これら抗原のツ皮膚反応惹起能と細胞融解能との間には何ら平行関係は見られなかつた。

更に、抗原の細胞融解に必要な濃度を検討するため、1 つの蛋白画分 R10 の種々の濃度についてしらべた成績を第 2 表に示した。これによると、1 r でも細胞融解を起すことが分つた。

実験 2. 細胞融解におよぼすアジマイシン、グリチロン、プレドニソロン、EDTA (Sodium ethylenediaminetetraacetate)、クエン酸ナトリウムの影響

従来アレルギー反応に影響を与えるとされている種々のものの中でアジマイシン、グリチロンおよびプレドニソロンがこの細胞融解現象にどのような影響を示すか、Favour らが Lympholysis に絶対必要とする補体に対して不活化作用をもつ EDTA およびクエン酸ナトリウムについても我々の細胞融解現象への影響をしらべた。

抗原には蛋白画分 R10、R-12ab および PPD-S (予研より分与されたもの) を用いた。アジマイシンは武田製薬研究製品で同所より分与を受けた。グリチロンはミノファーゲン製薬の市販品、プレドニソロンは三共製薬の市販品を夫々用いた。これらの被検薬剤は夫々 0.1 ml に所要濃度を含ませるようにタイロッド液で稀釈して、抗原と同時に反応系に加えた。

結果は第 3 表に示した。アジマイシンとグリチロンは夫々 10 r および 200 r で蛋白画分 R10 による細胞融解を阻止した。またプレドニソロン 100 r の添加によつても同様に細胞融解阻止が見られた。同様にして EDTA とクエン酸ナトリウムは夫々 3% 液 0.1 ml (0.005M) および 1 mg で矢張り阻止効果を示した。

実験 3. 結核多糖体あるいは磷脂質画分の細胞融解におよぼす影響

結核菌由来の多糖体あるいは磷脂質画分が本細胞融解現象にどのような影響を与えるかを in vitro 又は in vivo で蛋白画分添加前に又は添加と同時に反応系に与えて検討した。

使用多糖体はツ多糖体画分 S③、S④および Ts-1 と菌体多糖体画分 Bs-1 であつて、これらは実験 1 に示したように何れもそれ自身細胞融解能をもたないものであ

る。その他、実験の目的によつて非定型抗酸菌 100616 株、二宮株、非病原性抗酸性菌の M. Phlei などの菌体多糖体と磷脂質画分をも用いた。

in vitro の実験では細胞浮遊液培養開始と同時に多糖体 S③の 100 を 0.1 ml に含ませて添加、6, 24, 48 時間目に蛋白抗原 R-12ab を加え、更に 48 時間培養を続けてから核数をしらべた。

又、in vivo の実験では多糖体あるいは磷脂質画分の被検量を 0.5 ml に含ませて感作モルモットの後趾静脈より投与し、その後、時間を追つて、1, 24, 48 および 72 時間目に動物をエーテル致死せしめ、脾細胞浮遊液を調製し以下前と同様に細胞融解の程度をしらべた。

さて、in vitro 多糖体画分添加の細胞融解に及ぼす影響は第 4 表(A)に示す如く、添加 6 時間培養では細胞融解に何らの影響もなかつたが、24 時間目ではじめて明らかな細胞融解阻止効果を示した。一方、in vivo ではその阻止効果が著しく、第 4 表(B)および第 5 表に示した如く、1 mg 乃至 1 r の静注投与 1 時間後に既に明らかとなった。また 1 mg 投与の場合は 48 時間迄阻止効果が見られた。また磷脂質にも第 6 表に見られるような明らかな阻止効果があった。

なお、このような多糖体あるいは磷脂質画分の阻止効果の菌株特異性を知る目的で、ヒト型菌で感作したモルモット脾細胞に対し非定型抗酸菌あるいは M. Phlei 由来の多糖体又は磷脂質画分を静注して、その阻止効果の有無を見た。成績は第 6 表に示す如く何れのものにも全く阻止効果はなかつた。

総括および考察

Rich⁹⁾ および Aronson⁴⁾ によつて認められた in vitro における結核感作動物細胞とツベルクリンの間にかかる細胞傷害の現象は、その後多くの人々^{7) 11)} によつて追試され、反対の報告^{12) 13)} もあるが、多くは抗原抗体反応としてのツ・アレルギーが細胞レベルで見られるものとしている。しかし、従来のこの種の実験方法では組織片を in vitro で培養するために幾つかの欠点があったわけであるが、この点、伊藤¹⁴⁾、沼田¹⁵⁾ によつて報告されているように、最近の組織培養法の進歩がもたらした細胞浮遊培養法を用いると、ある程度それらの欠点を避けることが出来るという。私達もこの方法を用いて、結核アレルギーの基本様式の一部を追究する目的で実験を行つたのである。

まず、この試験管内抗原抗体反応に与る抗原側の検討のため菌体あるいはツベルクリンより種々の分画法で得られた多糖体、磷脂質および蛋白画分についてしらべたところ、分画法にかかわらず大部分の蛋白画分に細胞

融解能がみられた。そして、これら画分の感作動物におけるツ反応惹起能と細胞融解能との間には特に関係がなかった。しかし、興味あるのは多糖体画分中にも Ts-2 の如く細胞融解を起すものがあった。ここで、このものの化学的性状を見ると窒素は 0.3% にすぎず、グルコースが他の多糖体画分に比して少く、ペントースが多いが、これらの点と細胞融解能とがどのような関係があるかは不明である。

既に Fabrizio¹⁶⁾ もツベルクリンの精製画分について組織培養による細胞遊走阻止作用をしらべ、旧ツ、PPD-S, Seabert の精製ツ蛋白 A, B, C および多糖体 I と II などのうち多糖体画分には全く阻止作用がないことを報告しているが、このことは私達の実験とは方法に違いはあっても本質的に同じ結果を示したと考えてよいであろう。

アズマイシンの *in vitro* および *in vivo* のツ・アレルギー抑制作用については土屋¹⁷⁾ が報告しているが、今回の我々の実験条件でもその細胞融解阻止が確認された。またアレルギー抑制効果をもつグリチロンは外松¹⁸⁾ らによってアルチニス反応に抑制的に働くことが知られているが、やはり私達の実験でも同様の効果を示した。しかし何れもその阻止の機序は不明である。ところで、高橋¹⁹⁾ および岩井²⁰⁾ はこのような結核感作細胞融解現象に抗結核剤の SM, INH などが抑制的に働くとして、その作用は抗原であるツベルクリンにこれら抗結核剤が直接働きかけるものと解しているが、アズマイシンの阻止機序をこれら抗結核剤のそれとは同一視出来ないかも知れない。

ブレドニソロンの細胞融解阻止効果については Leahy²¹⁾ のコーチゾンを用いた成績と同様の結果を得たが、この機序については彼等はコーチゾンが直接細胞に吸着し細胞の代謝を変化させて PPD による傷害作用を免れさせる可能性を考えている。

次に、EDTA あるいはクエン酸ナトリウムは補体作用に必要な Ca 又は Mg イオンをキレートとか置換によって補体作用を不活化するものであるが、これらが細胞融解現象を抑制したことは興味深い。私達の実験でも、また私達と同様な実験条件の沼田¹⁵⁾ の報告によっても、本実験の反応系には特別に補体の添加を必要としないことは明らかであるが、しかも補体不活化作用をもつこれら EDTA とクエン酸ナトリウムが細胞融解阻止を示すことは本実験反応系にやはり何らかの形で補体作用をもつものの存在の可能性を示唆するものと解すべきであろうか。元来、私達の細胞融解現象は Favour²²⁾ の lympholysis とは反応時間の長いこと、補体を必要とし

ないことなどから明らかに機序の異なるものと思われるが、この点は Waksmau²³⁾ も指摘していることである。従って本実験では補体の存在を考えなくてもよいと思う。しかしながら、伊藤¹⁴⁾ は BCG 感作ウサギ脾細胞を用いた実験で、この点について血清因子も細胞性因子も共に細胞融解に関与する。しかし後者の占める割合がより大きいと述べて私達と多少見解を異にしている。又、O'Neil²⁴⁾ らの指摘するように、私達の実験で行なった細胞の洗滌を以てしても除去されずに、補体が反応に関与することは否定出来ないが、この点は今後更に検討が必要である。

多糖体を予め *in vitro* あるいは *in vivo* で脾細胞に作用させると蛋白による細胞融解が阻止されることは Meier²⁵⁾ の報告と関連して興味がある。Meier²⁵⁾ は Proteus から分離した多糖体がアレルギー性現象を抑制することを知り、その機序については従来知られている抗アレルギー剤とは異つたものであって明確な説明をなし得ないが、アレルギーに関与する細胞の一部に変化を与えたり、又は細胞に固着される何らかの因子を遊離することに、その多糖体の抗アレルギー作用を想定している。さて私達の実験では、多糖体の細胞融解阻止効果は *in vitro* では一定時間、即ち 6 時間以上の細胞との接触を要するが、*in vivo* では僅か 1 時間でもこの作用が認められたのであって、このことは多糖体が *in vivo* では *in vitro* よりも速かに細胞と交渉をもつことを裏書していると思われる。

また、多糖体のこの作用が抗酸性菌型間である程度特異的に見られることは、ヒト型感作脾細胞にはヒト型由来の多糖体のみ作用を示し、非定型抗酸菌あるいは M. Phlei のそれには全く阻止作用がないことから窺われよう。

ところで、私達の用いた多糖体画分中には必然的に蛋白が混在するわけで、このものが多糖体画分静注の際、脱感作的に働き得る可能性が考えられる。しかし私達²⁶⁾ の報告した如く結核感作モルモットに対する結核抗原画分静注による一過性脱感作現象では多糖体には全くその作用を欠いていること、又、少くとも *in vitro* では用いた多糖体画分に全然細胞融解能もなく、更に感作動物におけるツ反応惹起能もないことから一応混在する蛋白による脱感作の可能性を否定し得るものと考えられる。しかし、なおこの点を確めるため、多糖体、蛋白画分の静注による細胞融解阻止作用を量的に検討したところ、蛋白画分では多糖体画分の 100 倍量を必要とした。このことは多糖体の細胞融解阻止作用が蛋白画分の静注によって予め細胞が脱感作作用を受け、*in vitro* では最

早や抗原に反応しなくなった見かけ上の細胞融解阻止とは質的に異なるものと思われる。なお、また同様なことが磷脂質画分でも見られたわけであるが、両者の細胞融解阻止作用の機序は蛋白質画分が感作細胞に対して傷害的に働く原因をなす抗原抗体反応に関与するある種の因子を多糖体あるいは磷脂質画分が競り合の結果、奪い去り、後に働く蛋白質画分の細胞融解を阻止するものと説明出来よう。しかし、そのある種の因子とは補体様のものであるかどうかは全く不明である。ここにもツベルクリン・アレルギー機構のむづかしい断面がうかがわれる。

む す び

ツベルクリン・アレルギーの本態を明らかにするため細胞浮遊液培養法を用いて、結核抗原による結核死菌感作モルモット肺細胞融解現象に関する因子を検討して次の結果を得た。

1. この特異的細胞融解に関与する抗原は主として菌体およびツ蛋白画分であつて、多糖体と磷脂質画分にはこの作用が見られない。

2. この細胞融解は抗アレルギー作用をもつアシドマイシン、グリチロンおよびブレドニソロンにより、またEDTA、クエン酸ナトリウムなど補体不活化作用をもつものによって阻止される。

3. 多糖体画分あるいは磷脂質画分を予め *in vitro* 又は *in vivo* で感作細胞に作用させることによつてもこの細胞融解は阻止される。この際、ヒト型感作細胞融解阻止にはヒト型由来の多糖体あるいは磷脂質画分のみ有効で、非定型抗酸菌あるいは *M. Phlei* 由来のそれらには、その作用が見られない。

稿を終るに当り組織培養法並に培養肺細胞所見につき御教示をいただいた本研究所病理部森川教授に謝意を表します。

文 献

1) Seibert, F. B. & Glenn, J. T.: *Am. Rev. Tbc.*, 44, 9, 1941

2) Yamamura, U. et al.: *Biochem. Biophysica acta*, 35, 295, 1959
 3) Rich, A. R. & Lewis, M. R.: *Bull. Johns Hopkins*, 50, 115, 1932
 4) Aronson, J. D.: *J. Immunol.*, 25, 1, 1933
 5) 勝田 甫: *組織培養法* (納谷書店) 昭30
 6) 高橋義夫: *日本細菌学雑誌*, 15, 935, 昭35
 7) Heilman, D. H. et al.: *Am. Rev. Tbc.*, 50, 344, 1944
 8) Heilman, D. H. & Seibert, F. B.: *Am. Rev. Tbc.*, 53, 71, 1946
 9) Moen, J. K. & Swift, H. F.: *J. Exp. Med.*, 64, 339, 1936
 10) Buckley, J. J. et al.: *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 89, 303, 1951
 11) Gangarosa, E. J. et al.: *J. Exp. Med.*, 102, 425, 1955
 12) Baldrige, G. D. & Kligman, A. M.: *Am. Rev. Tbc.*, 63, 674, 1951
 13) Lasfargues, E. et al.: *Ann. l'inst. Pasteur*, 73, 169, 1947
 14) 伊藤幹夫: *結核の研究*, 第10集, 50, 昭33
 15) 沼田達夫: *結核の研究*, 第12集, 41, 昭34
 16) Fabrizio, A. M.: *Am. Rev. Tbc.*, 65, 250, 1952
 17) 土屋院司: *結核*, 35, 362, 昭36
 18) 外松茂太郎 他: *皮膚と泌尿*, 21, 138, 昭34
 19) 高橋文雄: *結核*, 30, 324, 昭30
 20) 岩井昭一: *新潟医学会雑誌*, 73, 1295, 昭34
 21) Leahy, R. H. & Morgan, H. R.: *J. Exp. Med.*, 96, 549, 1952
 22) Favour, C. B. et al.: *Am. Rev. Tbc.*, 60, 212, 1949
 23) Waksman, B. H.: *Cellular and Humoral Aspects of Hypersensitive States*, p. 189, 1959
 24) O'Neil, E. F. & Favour, C. B.: *Am. Rev. Tbc.*, 72, 577, 1955
 25) Meier, R. et al.: *Int. Arch. Allergy*, 11, 101, 1957
 26) Arima, J. et al.: *Compt. Rend. Soc. Biol.*, 156, 195, 1962

第1表 各種抗原の性状と細胞融解能

抗原	皮膚ツ 反応惹 起能	化学的性状		抗原添加後の 細胞残存率		
		N %	G %	正常 細胞 %	免疫 細胞 %	
濾液 OT 5X	+	17.1	/	109	63	
多糖体画分	BS-1 100r	-	0.1	96	101	90
	TS-1 100r	-	0.1	107	95	102
	TS-2 100r	+	0.3	40	103	59
	S ③ 1000r	+	0.16	81	109	108
	S ④ 100r	-	0.42	84	96	106
	S ⑤ 1005	+	/	/	90	78
	蛋白質画分	PPD-S 100r	+	13.6	3.2	100
TR-1a 100r		+	13.2	3.5	93	68
TR-1b 100r		+	13.3	1.8	90	64
TR-2 100r		+	12.3	6.0	100	100
PmPa 100r		+	14.3	1.8	95	71
BR-4a 100r		+	4.6	68.0	100	70
BR-4b 100r		+	4.4	33.0	97	65
R-12ab 100r		+	14.4	0.8	96	51
R ⑨ 100r		+	11.9	0.6	105	69
R ⑩ 100r		+	8.4	9.7	100	67
磷脂質画分 PdB	-	0.3	17	108	107	

* 結核死菌感作モルモットに 100 r 皮内反応 24 時間判定による。

第2表 抗原濃度と細胞融解能

抗原濃度	100 r	50 r	10 r	1 r	0.1 r
細胞残存率	67 %	66 %	67 %	69 %	110 %

抗原：R ⑩

第3表 各種物質添加の細胞融解に及ぼす影響

実験	添加物	細胞残存率
I	アソドマイシン 100 r	105(%)
	R ⑩ 100 r	60
	アソドマイシン 100 r + R ⑩ 100 r	97
	アソドマイシン 10 r + R ⑩ 100 r	102
	グリチロン 200 r	107
	グリチロン 200 r + R ⑩ 100 r	101
	グリチロン 20 r + R ⑩ 100 r	62
	ブレドニソロン 100 r	99
	ブレドニソロン 100 r + R ⑩ 100 r	105
	II	3 % EDTE 0.1 ml
R ⑩ 100 r		67
3 % EDTA 0.1 ml + R ⑩ 100 r		100
0.3 % EDTA 0.1 ml + R ⑩ 100 r		66
Na-Citrate 10 mg		102
III	R ⑩ 10 r	59
	Na-Citrate 10 mg + R ⑩ 100 r	87
	Na-Citrate 1 mg + R ⑩ 100 r	96
	Na-Citrate 100 r + R ⑩ 100 r	71

第4表 多糖体画分の細胞融解に及ぼす影響

(A) in vitro

添加培養時間	細胞残存率	
	添加	非添加
0 (時間)	58 %	62
6	59	56
24	93	64
48	97	53

多糖体画分 S ③ 100 r 添加。

(B) in vivo

多糖体静注後 脾切除迄の時間	細胞残存率	対照(非静注) 細胞残存率
1 (時間)	102	63
24	110	65

多糖体画分 S ③ 1 mg 感作モルモットに静注。

第5表 多糖体静注による細胞融解阻止効果の
時間的、量的関係

実験	静注多糖体分画		多糖体画分静注後 細胞切除迄の時間				対 照
			1	24	48	72	
I	BS-1	1 mg	(%) 92	113	110	74	72
		10 r	97				
II	BS-1	1 r	96				70
		0.1 r	75				
III	BS-1	1 mg	100				
		1 r	113	91			65
		0.1 r	76	78			
IV	TS-1	1 r	105				74
		0.1 r	64				

%は細胞残存率、蛋白抗原は実験I~IIIは R10 100 r, 実験IVのみ PPD-S 100 r 使用。

第6表 各種多糖体、燐脂質画分静注による
細胞融解阻止効果

画分	菌型	静注抗原	皮膚ツ 反応惹 起能*	細胞 残存率	対照 細胞 残存率
多	ヒト型	S (4)	-	(%) 103	60
		BS-1	-	92	60
糖	非定型 抗酸菌	100616 Bps	-	62	68
		二宮 Bps	-	70	72
体	非病原性 抗酸菌	M. Phei Tps	-	78	72
燐	ヒト型	Pd-nh	-	103	70
脂	非定型	100616 pd	-	75	60
質	非病原性	M. Phlei pd	-	72	60

* 結核死菌感作モルモットで各抗原 100 r 皮内反応
24 時間判定。