



Title	遅延型アレルギー反応の発現機序に関する研究：2. 抗原処理細胞培養上清の分画
Author(s)	奥山, 春枝; OKUYAMA, Harue; 森川, 和雄 他
Description	
Citation	結核の研究, 31, 31-37
Issue Date	1971
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26811
Type	departmental bulletin paper
File Information	31_P31-37.pdf



遅延型アレルギー反応の発現機序に関する研究

2. 抗原処理細胞培養上清の分画

奥山 春枝・森川 和雄・菊地 由生子

(北海道大学結核研究所病理部)

遅延型反応に関与する細胞性因子として、単核細胞がとりあげられているが、反応発現の場でどのように働らくのかまだわかっていない。我々は発赤反応に焦点を絞り、単核細胞のうち特に大食細胞について検討し前報¹⁾で報告した。結核兎腹腔大食細胞を *in vitro* で抗原を作用させ、その培養上清の正常皮膚刺激活性をしらべた。抗原処理大食細胞上清は、抗原処理リンパ球上清よりも正常皮膚刺激活性が強く、この活性は耐熱性であることを報告した。この論文では、培養上清から活性物質の分離を試み、上清及び分画々分について発赤をおこさせる強さ Macrophage migration inhibition factor との関係、血管透過性の点、及び組織学的に検索した。

実験材料及び実験方法

1. 動物

結核加熱死菌 H37Rv 株10mg/ml を Arlacel-Drackeol adjuvant と等量に混合したものを、各後肢足背に0.5ml ずつ注射して感作し、4週間以上経過後、ツベルクリン反応強陽性を示すものを結核兎として大食細胞採取のために用いた。

2. 腹腔細胞採取

滅菌 Drackeol 40ml を結核兎腹腔内に注入し、4日後全採血により屠殺し、heparin 8u/ml の割に加えた冷 Hanks 液約 200 ml で腹腔内を洗滌して腹腔細胞を採取した。これを更に2回冷 Hanks 液で洗滌し、最後に Eagle 培養液に 5×10^6 細胞/ml の割に浮遊させて、5ml ずつ直径 9 cm のシャーレに入れて37°C 1時間静置した。その後上清を捨て、Hanks 液で十分に洗滌し、ガラス面に附着した細胞のみを得て、これを腹腔大食細胞として試験に供した。

3. 培養方法

ガラス面に附着した大食細胞に、ツベルクリン蛋白(以下 Tpt と略)100 μ g/ml 液5ml を加え、37°C 1時間静置した。その後 Hanks 液で十分に洗滌し、新たに10%の自家血清を加えた Eagle 培養液5ml を加え、37°C、5%CO₂条件下で24時間培養した。そのあと、上清を集めて2,500廻転20分0°Cで遠心し上清を得た。これを抗原

処理大食細胞培養上清 TMT として用いた。なお Tpt 処理を行わない対照の上清も作り、これは TM と称した。又、TMT と同様に、抗原処理正常兎大食細胞の培養上清を作り、これを NMT と称した。これらの上清は使用まで-20°Cに凍結して保存した。

4. 分画方法

上記の TMT を collodion bag を用いた減圧濃縮で10倍に濃縮し、その3~5 ml を1回に分画した。(図1) 2.5×45cm の column に Sephadex G-200をつめて、

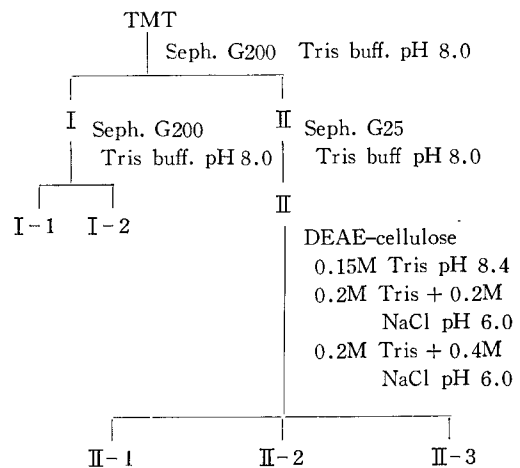


図1 Fractionation of TMT

0.02M Tris buffer, pH 8.0で溶出した。各溶出液を5ml ずつ集めて、230m μ の O. D. を測定した。この1回目の分画で2つの画分がえられた(図2)。これらを Fr. I 及び II と名づけた。Fr. I を更に同じく Sephadex G-200 column を Tris buffer, pH 8.0で溶出して、Fr. I-1 I-2のつの画分を得た。Fr. IIは更に Sephadex G-25 colmn を通してこの画分に伴っている培養液内の phenol red の色素をとり除こうと試みたが、この色素を伴った1つの peak が得られて、両者を分けることは出来なかった。これを更に、DEAE-cellulose column を通した。0.15M Tris buffer, pH8.4, 0.2M Tris buffer + 0.2M NaCl pH 6.0, 及び0.2M Tris

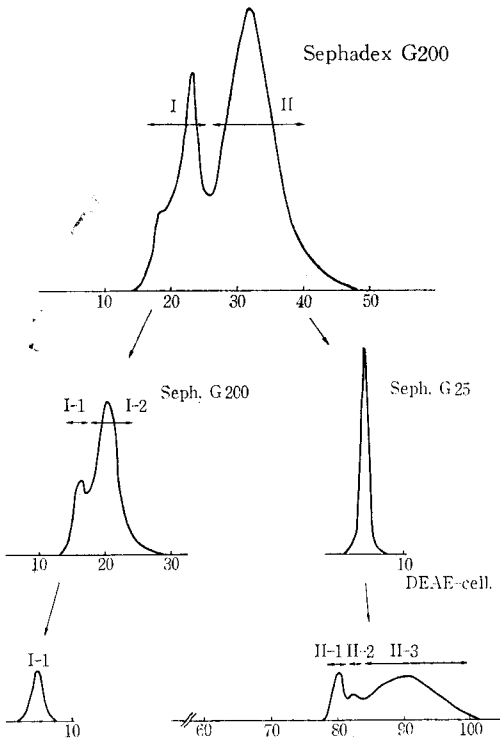


図 2 培養上清の分画

buffer + 0.4M NaCl, pH 6.0 の 3 種の緩衝液で溶出して, Fr. II-1, II-2, II-3 の 3 つの画分をえた。各画分の蛋白濃度を 0.5% に調節し, 0.22 μ pore size の millipore filter を通して滅菌した。

5. 皮内反応

培養上清及び各画分を蛋白濃度 0.5% に統一して, その 0.1ml を正常兎皮内に注射し, 1, 3, 6, 24 及び 48 時間後に注射部の発赤直径及び発赤の強さを測定した。

6. 血管透過性試験

上清及び分画画分の血管透過性を高める活性をみるために, 試験液を皮内に 0.1ml 注射後, 直ちに 1% Evans blue 3ml を静注した。その後, 1, 3, 6, 24, 48 時間後に注射部の青色斑の大きさと, 青みの強さを測定した。

7. 免疫電気泳動的検索

各分画画分を Cellulose acetate 膜に滴下し, Veronal buffer pH8.0, $\mu=0.045$ で, 0.1mA/cm, 40 分通電した。そのあと, 抗兎全血清抗体を用いて 48 時間反応させたのち, 未反応の蛋白成分を十分に洗い流して, 0.5% サイアジンレッド溶液で染色した。

8. 組織学的検索

培養上清及び分画々分を皮内に注射し, 3, 6, 24 時間後注射局所皮膚を摘出して, カルノア固定後, パラフィン切片を作製して, ヘマトキシリン, エオジン染色で観察した。

9. Macrophage migrationinhibition test

正常兎の肺胞細胞を採取して, これを毛細管につめ, 培養液の中に結核大食細胞培養上清 又はその分画々分 Fr. II 及び対照として結核兎リンパ球の抗原処理培養上清を入れて培養し, 大食細胞の遊走の程度を測定した。

成 績

1. 培養上清及びその分画々分による皮内反応

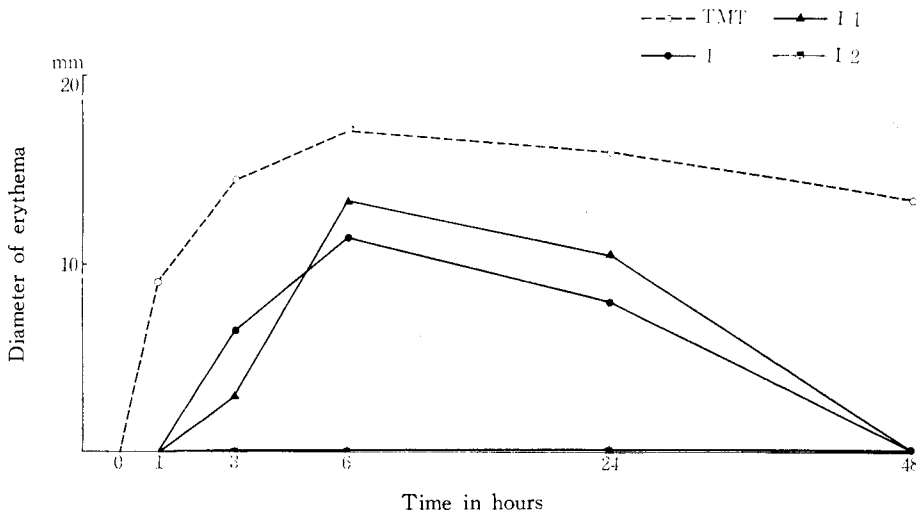


図 3 Skin reaction in normal rabbits induced by injection with TMT and its fractions

蛋白濃度を0.5%に統一した溶液0.1mlを正常兔皮内に接種した際の皮内反応の発赤の大きさを図3及び4に示した。図3には、Fr. Iによる反応を、分画前のTMTによる反応と比較した。Fr. Iの反応は、TMTと同様に、6時間を最高とする反応であるが、TMTより明ら

かに弱く、しかも48時間までには完全に消褪した。特にFr. I-2は全経過を通じ、全く反応をおこさなかった。これらとは対照的に、図4に示したFr. II及び更にその画分は、何れもTMTより大きな反応を示し、しかも24時間を最高とし、48時間でもまだ強い反応を示す遅

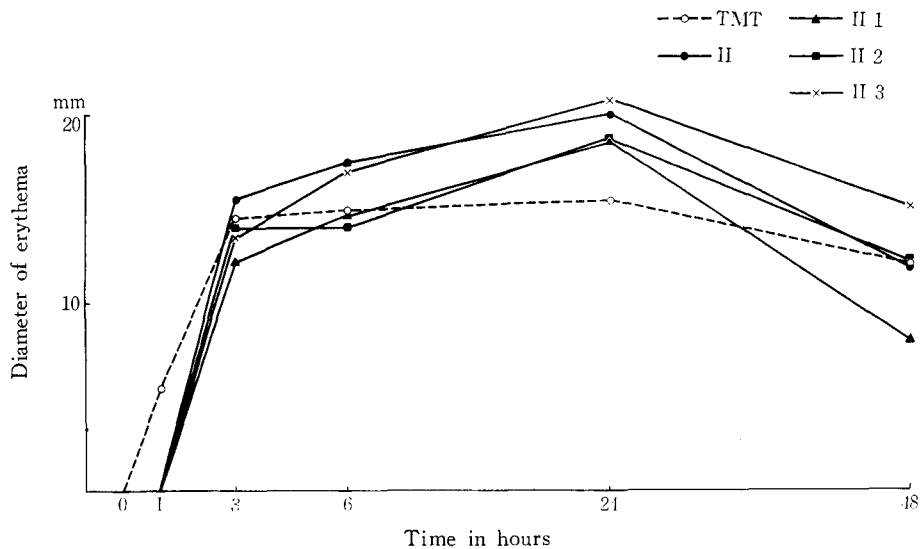


図4 Skin reactions in normal rabbits induced by injection with TMT and its fractions

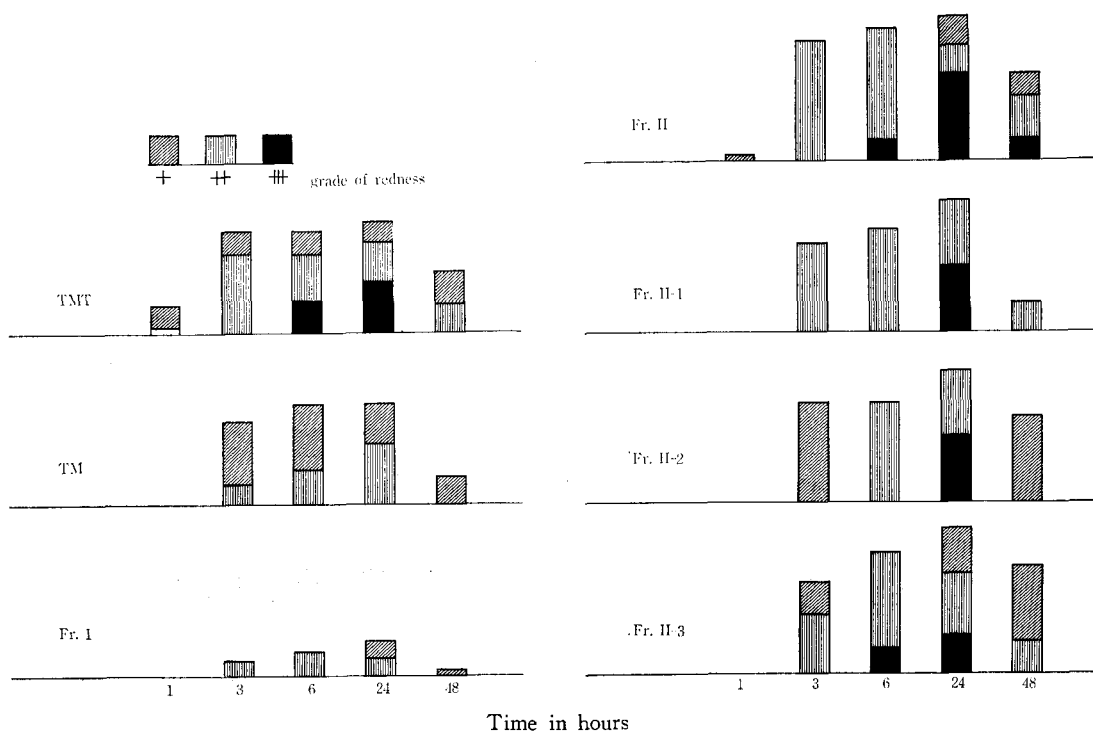


図5 Intensity of the skin reaction

延型反応であった。

次に発赤の大きさと強さを合わせて図5に示した。これでも明らかに、Fr. Iは弱く、Fr. IIで強い反応がみられた。抗原で処理しない結核大食細胞培養上清では、発赤の大きさは TMT に近い大きさを示したが、発赤の強さはあまり強くない反応であった。

2. 培養上清による大食細胞遊走阻止試験

TMT 及び発赤反応を強くおこしたFr. IIを培養液中に入れて、正常兎肺胞細胞の遊走阻止力をしらべ、それを結核兎リンパ節リンパ球の 抗原処理培養上清 (TLT)

表 1 Assay for MIF activity of the supernates

	% inhibition at	
	24 hours	48 hours
TLT	83.6	80.3
TMT	18.9	0
Fr. II	29.4	0

の阻止力と比較した(表1)。24時間の判定では TLT は 83.6%の抑制を示すのに対し、TLT 及び Fr. II は

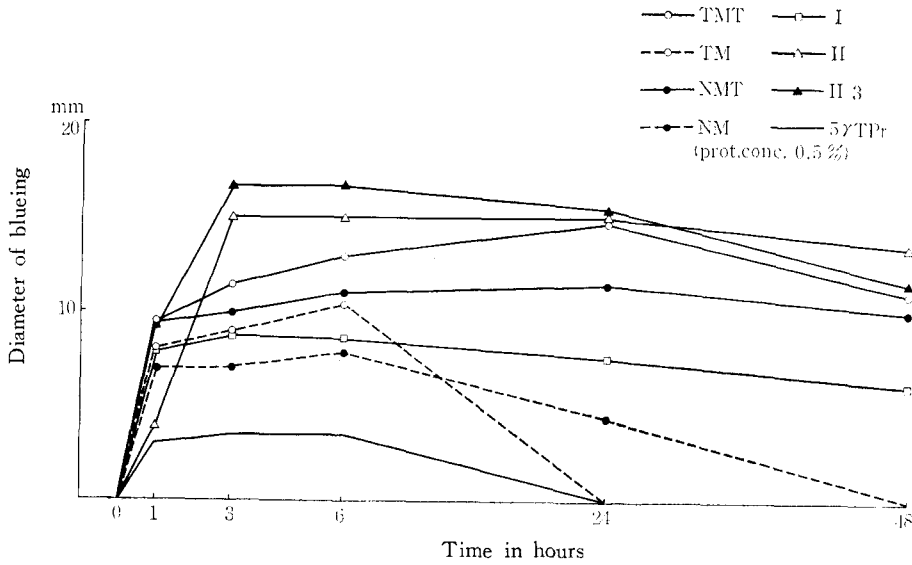


図 6 Blueing test of the supernates and its fractions

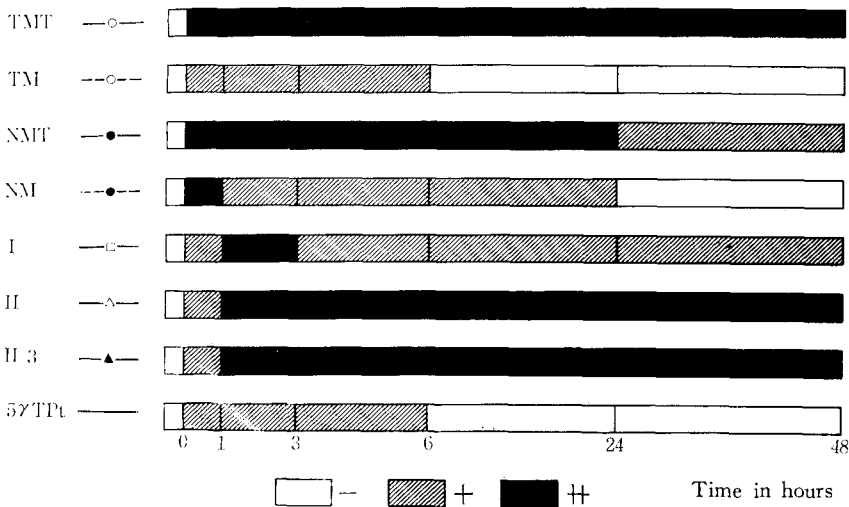


図 7 Intensity of blueing

18.9 及び 29.4 % で非常に弱く、48 時間には TLT は 80.3% と依然強いが、TMT, Fr. II では全く抑制はみられなかった。

3. 血管透過性試験

培養上清及び各画分を皮内に注射した時の血管透過性の昂進を Evans blue を静注することによりしらべた(図 6)。TMT, Fr. II 及びその画分は、何れも大きな青色斑を示し、又正常兎大食細胞を抗原処理した培養上清(NMT) もはっきりした青色斑を示した。特にこのうち Fr. II 及び II-3 は 3 時間ですでに最高となる速やかな反応を示した。この反応を青みの強さで示したのが図 7 である。TMT, Fr. II, II-3 は初期から 48 時間の判定終了時間まで一貫して強い青色を示した。しかし NMT は、初期は強い青色を示したが 24 時間以後は次第に褪色した。その他の抗原処理をしなかった TM, NM, 及び Fr. I, TPt のみでは直径が小さいと共に弱い青色しかみられなかった。

4. 免疫電気泳動的分析

各画分々分を電気泳動的に分析したが、培養液中の血清成分と共に泳動して、単一な線を得ることが出来なかったが、特に強く反応を惹起する II 画分、そのうちでも II-2, II-3 画分では α -globulin 及び albumin 領域のみに沈降線が認められた。

5. 培養上清及び画分々分接種部の組織学的所見

TMT, TM, NMT 及び Fr. II と II-3 画分の接種部反応を組織学的に検索し、表 2 に示した。

TMT : 3 時間では、深層の血管周囲に多核核白血球の浸潤が強く、単核細胞は少なかった。6 時間には更に多核核白血球のびまん性の浸潤がふえ、又血管周囲に単核細胞が増加してきた。24 時間になると、反応はやや弱まり、多核核白血球のこわれたのがみえ始め、単核細胞がふえているが、しかしまだ多核核白血球と単核細胞の割合は半々であった。毛嚢周囲の単核細胞浸潤がみられた。

TM : TMT による反応より一般的に弱かった。3 時間では、多核核白血球を主とした浸潤で、単核細胞はほとんどみられなかった。6 時間には、深層結合織間にびまん性に、又、血管周囲に強く多核核白血球の浸潤があり、単核細胞が出現し始めていた。24 時間後には反応は全体的に弱くなり、多核核白血球と単核細胞が同程度の割合で集団状にみられた。

NMT : 3 時間では、多核核白血球を主とした反応が血管周囲に多くみられた。6 時間後は反応が強く、多核核白血球が特に強く浸潤していた。結合織間の滲出液内に単核細胞が沢山みられた。24 時間になると、反応は急激に

表 2 皮内接種部組織所見

	時 間	浅 層			深 層		
		浮腫	多核 白血球	単核 細胞	浮腫	多核 白血球	単核 細胞
TMT	3	-	++	+	-	++	+
	6	-	++	+	-	++	++
	24	-	++	++	-	++	++
TM	3	-	++	+	-	++	±
	6	-	++	+	-	++	+
	24	-	+	+	-	+	+
NMT	3	±	++	+	+	++	+
	6	+	++	++	+	++	++
	24	-	+	+	-	++	+
II	3	±	++	+	++	++	++
	6	+	+	++	++	++	++
	24	±	++	++	+	++	++
II-3	3	±	++	+	++	++	++
	6	+	++	+	++	++	++
	24	+	+	++	+	++	++
TPt (5 μ g)	3	-	-	±	-	-	±
	6	-	-	±	-	-	+
	24	-	-	+	-	±	+

弱まり、多核核白血球の多い浸潤が少しみられた。

Fr. II : 全体的に反応が強く、3 時間後、多核核白血球の浸潤と共に、単核細胞もかなり出現し始めていた。特に血管周囲の単核細胞の豊富な浸潤が印象的であった。又浮腫が強く、好酸球の浸潤もみられた。6 時間後は、多核核白血球の増加が強くみられ、単核細胞浸潤がかくされる様にみられた。浮腫が強くみられた。24 時間には多核核白血球の浸潤が、やや減退し、単核細胞の集団状の浸潤が強くみとめられた。

Fr. II-3 : 3 時間は、Fr. II と同様に、深層血管周囲の単核細胞の浸潤が特長的であるが、多核核白血球の浸潤も強くみられた。6 時間には、多核核白血球の浸潤が増加するが、血管周囲には依然単核細胞が多くみられた。24 時間後、多核核白血球はやや減少しこわれかけているが、単核細胞と共にまだ強い反応が残っていた。

TPt : 全体的に弱い反応で、多核核白血球の出現はほ

とんどみられず、わずかの単核細胞のみがみとめられた。

総括及び考案

遅延型反応の組織学的特徴は、単核細胞を主役とした反応であることである。そのことから、反応惹起に関与するものとして単核細胞が重要と考えられる。単核細胞とは、単球ないし大食細胞と、リンパ球から構成されており、これらが遅延型反応発現に重要なことはすでに多数の人によってみとめられている。我々はこれらの細胞のうち、直接皮内反応、特にその発赤発現に役割を果している細胞をきめようとして、前報¹⁾において、結核菌腹腔大食細胞或いはリンパ節リンパ球を抗原処理下で培養した上清を、正常兔皮内に注射すると明らかな発赤反応がおこることを報告した。しかしこの反応経過は6時間を peak とする速い反応型であった。Dumonde²⁾ からも BCG 又は他の蛋白で、Freund's complete adjuvant と共にモルモットを感作し、そのリンパ節リンパ球及び腹腔リンパ球を抗原と共に培養した上清を正常皮内に注射すると炎症反応をおこすことをのべている。Krejci³⁾ からは同様にモルモットを卵白アルブミンの Freund's complete adjuvant 乳濁液で感作したリンパ節細胞を抗原と共に培養した上清が、炎症を惹起することを述べている。また、Heise⁴⁾ ら、Pick⁵⁾ ら、Bennett⁶⁾ からも同様の所見をえているが、その反応 peak は16時間或いは3～6時間といている。この様な早い時間に peak となる理由として、Hill⁷⁾ が定型的な遅延型反応がおこるためには、その局所に十分量の単核細胞の集積をおこす時間が必要であるために遅い反応となるといっている。従って、in vitro で作られた反応惹起物質を直接皮内に注射した際には速い反応がおこるのは当然とも考えられる。しかし、我々の Sephadex G-200 及び DEAE-cellulose column chromatography の分画でえた Fr. II を正常皮内に注射すると、24時間を最強とし、48時間でもはっきりとした反応を残す遅延型の傾向を強く示す反応がえられた。又この画分では、発赤の直径が大きのみでなく、赤みの強さによる比率でも最も強い反応を示した。Pick ら⁸⁾ は腹腔細胞の中のリンパ球と大食細胞を分離して、それぞれの抗原処理培養上清で皮膚反応性をしらべた。発赤の大きさ、赤みにおいては大食細胞培養上清が一番強いが、リンパ球培養上清ではツベルクリン反応に特徴的な硬結が最も強いと報告している。我々の実験では、これに反し、リンパ節リンパ球培養上清よりも、大食細胞培養上清の方が発赤の大きさ、強さのみでなく、硬結も強くみとめられた。この点は、Pick ら

のリンパ球は腹腔滲出液由来のものであり、我々のものはリンパ節から分離したリンパ球であることの違いによる可能性がある。この論文では記載しなかったが、我々も腹腔滲出液から分離した大食細胞とリンパ球の培養上清が、同程度の反応を表わす成績をえている。

結核動物大食細胞培養上清の皮膚刺激活性が、我々の分画による Fr. II にあることがみとめられたが、この画分の免疫電気泳動的分析では α -globulin と albumin 領域に沈降線がみられた。同様な成績は Pick⁵⁾ からも報告しており、彼らは、Freund's complete adjuvant を注射したモルモットの所属リンパ節及び腹腔滲出液のリンパ球を PPD と共に培養した上清についてみているのであるが、反応惹起活性の最も強いのは、slow α -globulin 領域にあることをのべている。この事から、大食細胞培養上清の活性物質、リンパ球培養上清の活性物質が同じものである可能性が考えられる。しかし、現在のところ、電気泳動的易動度の一致のみで、結論はえられない。

皮膚刺激活性と Macrophage migration inhibition factor (MIF) との関係は、Bennett⁶⁾ によるとリンパ球培養上清の Sehadex G-100を用いた分画画分では、皮内反応活性と MIF が同じ画分にみられるといい、両活性が同じものであると示唆している。Heise ら⁴⁾ もリンパ球培養上清の Sephadex G-200による分画で、MIF と皮内反応惹起活性は同じ画分にあるとのべている。ただし彼らは γ -globulin 画分に活性があるといっている。これらとは対照的に、我々の大食細胞培養上清の分画々分による MI 試験の成績では、皮膚刺激活性のみられた TMT 及び Fr. II で全く MIF はみとめられなかった。Bloom ら⁹⁾ は、MIF はリンパ球から遊離され、大食細胞は遊走の indicator にすぎないといっていることから、我々の成績で MIF で陰性であることがうなずけると同時に、大食細胞培養上清の皮膚刺激性をみたことによって、両者は全く別のものであることを証明出来た。

次に Willoughby ら¹⁰⁾ の報告した LNPF (lymph node cell permeability factor) との関連についてふれたい。

Willoughby ら¹⁰⁾ は、LNPF を皮内に注射すると、ツベルクリン反応と同様な組織学的変化がみられ、又ツベルクリン反応をおこしている皮膚の滲出液には、血管透過性を高める力があることをみており、遅延型反応惹起と LNPF の関連性を強く示唆している。大食細胞培養上清においても、皮膚刺激活性の強い上清及び分画々分では、血管透過性試験で直径が大きく、しかも青みの強い反応がみられた。LNPF はリンパ節リンパ球から作られたが、同じような物質が大食細胞からも遊離するこ

とは容易に考えられる。即ち抗原と反応したのがリンパ球であれ大食細胞であれ、それによって排出された、あるいは遊離された物質は同じものであると考えられる。これが生体内では全く同じ発赤反応をおこすのであろう。ただ抗原と特異的に反応する段階で関連しているものがリンパ球で産生されたものを貪食しているのか、大食細胞自体で作られるのかは明らかではない。

培養上清及び画分の皮内反応部の組織所見では、何れも、多核白血球の浸潤が強くみられ、ツベルクリン反応に定型的な単核細胞反応とはいわれない所見であった。しかし Fr. II 及び TMT における3時間の血管周囲の単核細胞の目立ちと、全経過を通しての単核細胞のやや優勢であることが NMT との差としてみとめられた。in vitro で作られた培養上清にはいろいろなものが含まれていて、遅延型反応の発現にあずかる因子のみを純粋にとり出すことは非常に困難であり、特に純系のえられない兎間でなう実験では不可能であると思われる。多核白血球浸潤が強くみられるのも、これらの所に原因があるのであろう。

結 論

1. 結核兎腹腔大食細胞を、抗原処理後24時間培養した上清を Sephadex G-200及び DEAE-cellulose column を用いて分画し、Fr. I-1, Fr. I-2, Fr. II-1, Fr. II-2 及び Fr. II-3 の5つの画分をえた。
2. 培養上清を正常兎皮内に接種すると、6時間を peak とする発赤反応がみられた。Fr. I は上清よりも弱い反応しかえられず、一方 Fr. II の全画分は上清よりも発赤の直径が大きく、発赤の程度も強い反応で、24時間 peak の反応を示した。
3. 発赤反応を強くおこした Fr. II の免疫電気泳動的分析では、 α -globulin と albumin の領域にのみ沈降線が得られた。
4. 培養上清及び Fr. II には MIF はみとめられなかった。
5. 皮膚刺激活性のみられる TMT 及び Fr. II による反応には血管透過性の昂進がみとめられた。
6. 組織学的に、TMT 及び Fr. II で、初期の血管周囲の単核細胞浸潤が目立った。

文 献

- 1) 奥山春枝他：結核の研究，30, 39(1970)
- 2) Dumonde, D. C., Wolstencroft, R. A., Panayi, G. S., Matthew, M., Morley, J. & Howson, W. T. : Nature, 224, October. 4, 38(1969)
- 3) Krejci, J., Pekárek, J., Johanovsky, J. & Svejcar, J. : Immunol. 16, 677(1969)
- 4) Heise, E. R. & Weiser, R. S. : J. Immunol., 103, 570(1969)
- 5) Pick, E., Krejci, J., Cech, K. & Turk, J., Immunol., 17, 74(1969)
- 6) Bennett, B. & Bloom, B. R. : Proc. N. A. S., 59, 756(1968)
- 7) Hill, W. C. : J. exper. Med., 129,363(1969)
- 8) Bloom, B. R. & Bennett, B. : Science, 153, 80(1966)
- 9) Willoughby, D. A., Boughton, B. & Schild, H. O. : Immunol., 6, 484(1963)
- 10) Willoughby, D.A., Spector, W. G. & Boughton, B. : J. Path. Bact., 87, 353(1964)