HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヒト・ツベルクリンアレルギーにおけるMigration Inhibition Test
Author(s)	崎山, 幸雄; 山中, 樹; 実藤, 誠
Description	
Citation	結核の研究, 33, 14-17
Issue Date	1973
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26823
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_P14-17.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

ヒト・ツベルクリンアレルギーにおける Migration Inhibition Test

崎山幸雄* 山中 樹** 実藤 誠***

(北海道大学結核研究所病理部 主任 森川和雄教授)

(昭和47年 9 月30日受付)

遅延型過敏性反応を呈する動物のマクロファージが特異抗原と共に培養されるとその遊走が阻止される現象即ち Migration Inhibition にもとずく Migration Inhibition Test は George and Vaughan[1] による Capillary Tube Migration の紹介により遅延型過敏性反応の in vitro assay として広く用いられている。臨床においても結核を含む細菌感染症，ウィルス感染症，自己免疫疾患，移植免疫，腫瘍免疫等における遅延型反応の関与はとみに重要視されており，本法の応用は今後さらに追求されるものと考えられる。今度私達はツベルクリン・アレルギーを対称にヒトにおける Migration Inhibition Test について検討を加えたのでその試験方法を中心に報告する。

実験方法

結核患者の末梢血よりリンパ球を分離しこれと正常モルモット腹腔滲出細胞を混合して毛細管につめて PPD 添加培養液と無添加培養液とで24時間培養し，その遊走面積を比較した。対称はツベルクリン反応陽性のヒト19名（全て結核患者），ツベルクリン反応陰性のヒト4名（1人はサルコイドーシス）である。

リンパ球分離： Conray-Ficoll による比重遠沈法[2] によりコンラキシン-L 又はアンギオコンレイを使用した。あらかじめ 64.9% コンラキシン-L を蒸溜水で稀釈して 33% コンラキシンを作成し，次いで 9% Ficoll 蒸溜水溶液と 10 容：24 容の比率でよく混和し滅菌しておく。ヘパリン加注射器に 10 mℓ 末梢静脈血を採血し，直ちに，これに 20 mℓ の 0.9% 生理食塩水を加えて良く混和し，Conray-Ficoll 溶液 15 mℓ に静かに重層する。（注意して液層が乱れないようにすることが必要。）次に，これを室温にて 1,550 rpm 30分遠沈しリンパ球の液層を新しい試験管に移し，等量の 0.9% 生理食塩水を加えて混和し，更に 1550 rpm 5分遠沈する。上清を捨て沈渣に Hanks 液を加えてリンパ球を浮遊させる。赤血球の明らかな混

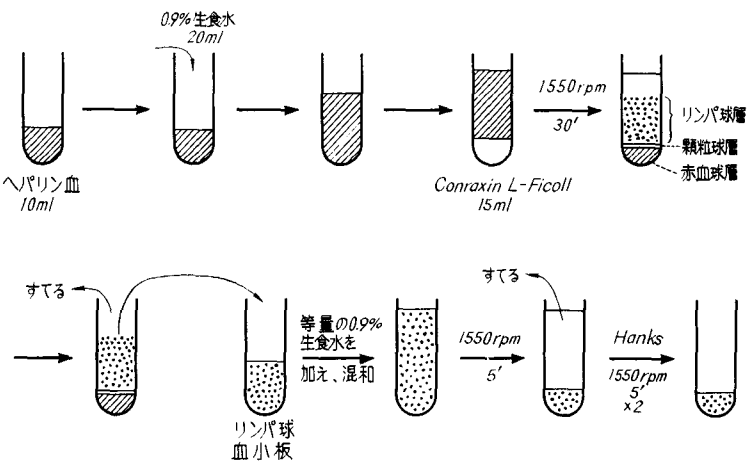


図1 比重遠沈法によるリンパ球の分離 Conraxin L-Ficoll 法

* 北海道大学結核研究所病理部（北海道大学医学部小児科）

** 〃 （札幌医科大学医学部小児科）

*** 〃 （北海道大学医学部眼科）

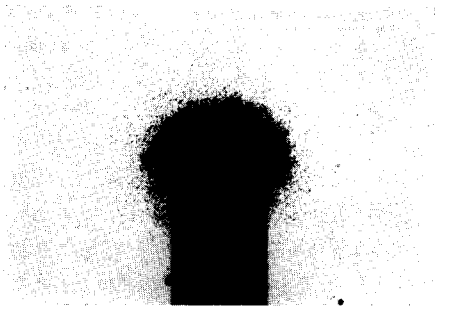
入を認める時には0.83% NH_4Cl 水溶液で，室温10分間作用させて赤血球を破壊し Hanks 液で洗って除く。リンパ球浮遊液の一部で細胞数，viability を測定し塗沫標本も同時に用意すると良い。この方法でおよそ 8×10^6～1×10^7/mℓ，97～100% viable，95～98% pure のリンパ球を得た。

モルモット腹腔滲出細胞採取：試験の2～3日前に10% Nutrose 15 mℓ を2匹の正常モルモット腹腔に注入しておく。（モルモット腹腔細胞は個体差があるので，常に2匹使用した。）麻酔下で頸動脈切開にて全採血後，腹部を正中線で3～4 cm 開腹しヘパリン加 Hanks 液100 mℓ で3～4回腹腔を洗浄し，これを4°C，1,500 rpm 10分間遠沈して上清をすてる。これに Hanks 液を加えてよく細胞を混和し，メッシュにて濾過後1,500 rpm 5分遠沈する。再度沈渣に Hanks 液を加えて混和し1500 rpm 5分遠沈する。沈渣を TCRM 1640培養液10 mℓ に浮遊し細胞数を測定する。赤血球の著明な混入を認める時は0.83% NH_4Cl 水溶液にて前記同様に処理する。

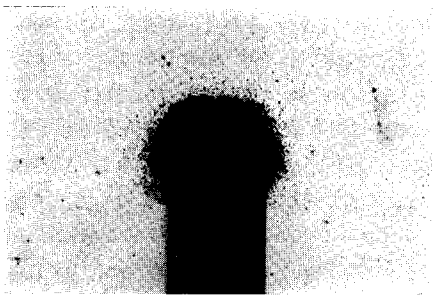
表1 *Migration inhibition of guinea.pig macrophages by sensitized and non-sensitized human lymphocytes in the presence of antigen*

Patient		Lym-phocpte (%)	Migration index (%) control	Antigen Doses (P. P. D. ug/mℓ) 25	50	100
1)	S. K.	7	9.26	81	60	50
2)	S. N.	5	9.52	78	74	64
3)	H. R.	5	7.32	62	54	50
4)	S. S.	5	5.85	86	89	55
5)	M. T.	6	9.47	73	80	70
6)	F. K.	5	5.25	82	122	76
7)	H. R.	14	29.10	81	66	56
8)	H. A.	18	25.39	98	72	64
9)	K. D.	10	24.76	92	75	72
10)	K. K.	10	41.77	96	87	77
11)	Z. K.	5	25.41	120	103	104
12)	N. G.	10	26.33	78	78	73
13)	K. M.	17	25.54		79	61
14)	T. U.	18	25.63		87	98
15)	A. B.	13	11.00		78	68
16)	H. M.	14			78	69
17)	T. K.	40	14.85	100	101	79
18)	M. T.	17	16.67	114	116	73
19)	M. N.	31	24.93	91	90	64
20)	O. T.	33	12.71	128	130	99
21)	U. K.	30	13.78	105	103	107
22)	K. K.	14	9.8	139	133	151
23)	Y. K.	7	9.75		121	127

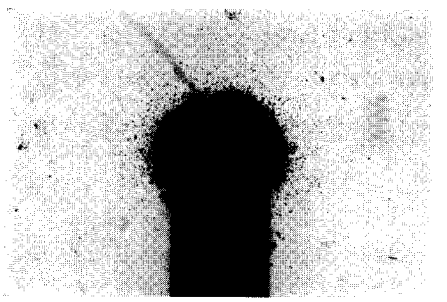
1)～19)：skin test positive
20)～23)：skin test negative
control：average area of migration



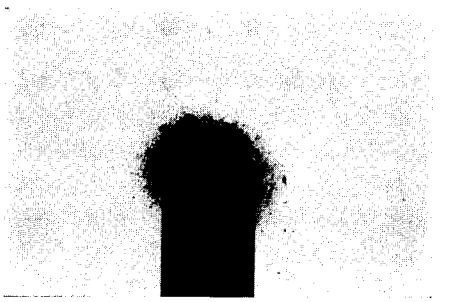
control



TPt 25 μg/mℓ，MI＝100%



TPt 50 μg/mℓ，MI＝101%



TPt 100 μg/mℓ，MI＝68%

表2　リンパ球の分離法

	ファイバーカラム法	コンラキシン-フィコール比重法
資料	テトロンファイバーカラムヘパリン血	コンキシン-フィコールヘパリン血
採取時間	2時間以上	2時間
操作	比較的複雑	簡単
採取リンパ球数	$6\times10^5\sim2\times16^6$	$7\times10^6\sim2\times10^7$
純度(%)	98～100	95～98%

培養法[3]：培養液はTCRM 1640でこれに20%正常ウサギ血清，抗生物質（ストレプトマイシン100 μg/mℓ，ペニシリン100単位/mℓ）を加えてpH 7.4～7.6に補正して使用した。血清加培養液で$3\sim5\times10^7$/mℓに調整したモルモット腹腔滲出細胞におよそ10～40%の比率でヒト・リンパ球を混合して毛細管に詰めた。これを900 rpm 4分間遠沈後，細胞と培養液との境界より1 mmほど細胞側よりで切断する。別に用意したカバーグラスに微量のグリースを中心につけて毛細管を固定し，これを培養液を山盛りにしたホールグラスの上に気泡が入らないように静かに重ねてパラフィンで固定する。培養液はあらかじめ真空ポンプにて気泡を除いておくと，培養後も気泡が生じないので良い。抗原は北大結研病理部製TPtを使用し，無添加群，25 γ/mℓ，50 γ/mℓ，100 γ/mℓ添加の4群に分け，炭酸ガス培養部にて24時間培養し，遊走面積を拡大機でtraceして測定した。

$$\text{Migration Index} = A/B$$

$$A = \text{ヒトリンパ球とマクロファージ群}\ \frac{\text{抗原添加}}{\text{抗原無添加}}$$

$$B = \text{マクロファージのみの群}\ \frac{\text{抗原添加}}{\text{抗原無添加}}$$

結　果

ツ反陽性の19うちTPt 25 γ/mℓで4名，50 γ/mℓで10名，100 γ/mℓで17名に遊走阻止を認めた。ツ反陽性の4名はいずれも遊走阻止を認めなかった。

考　按

ヒトリンパ球分離法については辻等[2),4)]によるFiber-Column法と比重遠沈法が手近かである。私達は両法を試みたがConray-Ficollによる比重遠沈法が操作が簡易で5～10 mℓの採血量で充分量のリンパ球を採取出来た。

1962年，George and Vaughan[1)]はBCG感作モルモットの腹腔滲出細胞を毛細管に詰めて培養すると，遊走して扇形に拡がるが，これに抗原PPDを添加して培養すると遊走面積が著しく減少し，遊走が阻止されたように見える。この遊走阻止現象は，非感作動物から得た細胞ではPPDを添加しても起らないので，細胞性免疫，遅延型過敏症の成立した動物にのみ特異的な現象であると報告した。その後David[5)]，Bloom[6)]等の研究者によりMigration Inhibition現象は遅延型過敏性反応を呈するヒト，モルモット，マウス，家兎等に認められ，感作リンパ球が特異抗原との相互作用で正常マクロファージの遊走を阻止するMigration Inhibition Factor (MIF)を作ることにより起り，皮膚反応とよく一致することが確認された。しかし現在のところMIFが生体内における遅延型過敏性反応においていかなる役割を演じているのか，又感作リンパ球により産生される他の活性因子との関連等については明らかにはされていない。

ヒトにおける本現象の応用は，細胞性免疫の関与が種種の感染症，腫瘍免疫，移植免疫等で，主要問題である現在非常に重要である。

Thor[7)]は，PPD, Histoplasmin, Coccidioidinを用いてCotton Filter Columnで分離した感作ヒトリンパ球の培養上清を10倍濃縮すると，正常モルモット腹腔滲出細胞の遊走を阻止することを初めて報告した。その後Rocklin[8)]等は，PPD, SKSD, Candidaを用いて感作ヒト・リンパ球の培養上清を10倍濃縮して同様の結果を報告している。これら間接法とは別にSoborg, Bendixen[9)]はBrucella患者の白血球を直接毛細管に詰めて抗原の存在下で培養すると遊走が阻止されたと報告し，以来この直接法はシーグレン症候群[10)]，橋本甲状腺炎[11)]，サルコイドーシス[12)]，枯草熱[13)]，腎臓移植[14)]等に応用が報告されている。しかしこれら直接法，間接法はいずれも40～50 mℓの末梢血の採血が必要とされるのが，日常の臨床応用としては問題である。Rajapakse, Glynm[15)]は，正常モルモット腹腔滲出細胞に3%，15%の比率で感作ヒト白血球を混合して毛細管に詰めて抗原のhigh doses (100 μg/mℓ PPD)で遊走が阻止されたと報告している。この方法は，ヒト白血球とモルモット腹腔滲出細胞を混合して毛細管に詰めている点が要点で，ヒト白血球が前述の方法よりは極めて少量ですむことになる。私

達の方法はほぼ Rajapakse 等のそれと同じであるが，白血球よりリンパ球を分離して使用することにより顆粒球のマクロファージに与える影響を除いた。感作リンパ球と正常モルモット腹腔滲出細胞との比率は，いずれも5%以上であったが充分量と思われた。抗原量は100 μg/mℓ TPt で皮膚反応と平行する結果を得た。($P<0.01$) 抗原量の high doses の必要性については Rajapakse 等の報告と一致し，又間接法における抗原添加培養上清の10倍濃縮の必要性の報告とも同じ意味をもつものと思われるが，ヒト MIF の species specificity によるものか，あるいはモルモット腹腔滲出細胞自体の特異性によるものかは明らかではない。従来の方法と比較して，私達の方法はヒトからの採血量は5～10 mℓ で可能であり，操作も比較的簡易であるので細胞性免疫の調査法として広く応用され得ると思われる。

結　論

ツベルクリン反応陽性及び陰性のヒト・リンパ球と正常モルモット腹腔滲出細胞を混合して毛細管につめて遊走面積を観察した。

1) 19名のツベルクリン反応陽性者のうち TPt 100 μg/mℓ の添加培養で17名に遊走阻止を認めた。

2) 4名のツベルクリン反応陰性者は，全て遊走阻止を認めなかった。

3) 本法は細胞性免疫の in vitro assay として用いられ得ると思われた。

文　献

1) George, M. and Vaughan, J. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **III**, 514 (1962).
2) 辻　公美：実験免疫学操作法, 265 (1971).
3) 菊地由生子：実験免疫学操作法, 137 (1971).
4) 辻　公美・宮本　宏：実験免疫学操作法, 89 (1971).
5) David, J. R., Lawrence, H. S. and Thomas, L.: J. Immunol., **93**, 274 (1964).
6) Bloom, B. R. and Bennett, B.: Science **153**, 80 (1966).
7) Thor, D. E., Jureziq, R. E. and Veach, S. R.: Nature **219**, 755 (1968).
8) Rocklin, R. E., Meyers, O. L. and David, J. R.: J. Immunol., **104**, 95 (1970).
9) Soborg, M., Myers, O. L. and David, J. R.: J. Immunol., **104**, 95 (1970).
10) Soborg, M. and Bendixen, G.: Acta med. scand. **184**, 319 (1968).
11) Soborg, M. and Bertram, U.: Acta med. scand. **183**, 101 (1968).
12) Becker, F. W., Krull, P. and Kalden, J. R.: The Lancet **1**, 120 (1972).
13) Roitt, M. I. and Brostoff, J.: The Lancet **1**, 238 (1970).
14) Eddleston, A. L. W. F. and Williams, R.: Nature **222**, 674 (1969).
15) Rajapakse, D. A. and Glynn, L. E.: Nature **226**, 857 (1970).