



Title	家兔肺胞食細胞による試験管内多核巨細胞形成
Author(s)	菊地, 由生子; KIKUCHI, Yuko; 小野江, 和則 他
Description	
Citation	結核の研究, 34, 64-74
Issue Date	1974-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26836
Type	departmental bulletin paper
File Information	34_P64-74.pdf



家兎肺胞食細胞による試験管内核多巨細胞形成

菊地由生子 小野江和則 森川和雄

(北海道大学結核研究所病理部門)

(昭和48年10月1日受付)

はじめに

結核病巣とくに増殖性肉芽性病巣の特徴的な所見は、結核菌をかこんで出現する類上皮細胞と、その間に散在する多核巨細胞及びこれらを取りまいて浸潤するリンパ球などである。この特徴ある巨細胞の出現はRokitansky (1855)¹⁾により発見され、Langhans (1868)²⁾ によつてはじめて記載された。以来多核巨細胞の起源や形成機序について議論が重ねられたが、Lambert (1912)³⁾ は *in vitro* で実験的に異物細胞形成を観察して報告し、つづいて多くの研究者が同様の検索を試みて来た^{4), 5)}。現在迄に一般に多核巨細胞は血中の単球又は大食細胞に由来し^{6), 7)}、種々の条件下で (1) 細胞質の分離を伴わない amitosis 又は mitosis による⁵⁾、(2) 複数の単核細胞の融合 (fusion) によって出来るだろうとされ、とくに後者の可能性が高いとするものが多い^{3, 4, 5)}。

我々は結核感作家兎の肺胞細胞で、マクロファージ遊走阻止現象を検索しているとき、特異抗原で遊走阻止された群に多核巨細胞 (Polykaryocyte, PKC と略す) が多数みられるのを経験して来た。この現象は特異性があり、細胞性免疫の関与が予想された。そこで、結核感作及び正常家兎肺胞食細胞を種々の条件下で単層培養して PKC を作り、主として光顕的、電顕的観察をし、更に 16 mm 位相差顕微鏡映画でその動態を観察して PKC の形成機序を検索した。

材料と方法

1. 動物：白色家兎、2,000~3,000 g の ♂, ♀, 96 匹
2. 感作方法：H 37 Rv 死菌。10 mg に incomplete Freund adjuvant (IFA) を加えて皮下に 1 回注射し、1 週後から種々の時期に使用した。再感作は皮下には 10 mg、静注で 5 mg を使用し種々の時期に使用した。

Listeria monocytogenes 死菌。(札幌医大中検永井竜夫氏より恵与のもの) 10 mg に IFA を加えて皮下に 1 回注射し、2 週前後に使用した。

Bovine γ -globulin (BGG)。28 mg の PBS suspension に IFA を加えて皮下に注射後 3 週間隔で 1~2 回で同量

の抗原で再感作し、最終感作後 15~18 日目に使用した。

3. 培養細胞：感作家兎又は正常家兎 (未処置家兎) を全採血してから肺を摘出した。Myrvik 法⁸⁾ に従って heparin 加 Hanks 液を経気管で注入して肺胞細胞を数回洗い出し、Hanks 液で 3 回洗滌遠心をくり返し、 $1 \times 10^7/ml$ の細胞浮遊液を 20% 正常家兎血清加 Eagle MEM で作成した。これを直径 25 mm の円形 cover glass 上にのせ 1~2 時間 37°C の CO₂ 培養器内に静置し肺胞食細胞の単層培養 cover glass を作った。肺胞食細胞は壁粘着性が低く簡単に剝離してくるので MEM で軽く洗って Sykes-Moore chamber に set し、試料を入れて 37°C で培養しながら経時的に観察した。

4. *in vitro* 抗原及び試料

a) 血清

正常家兎血清 (NS)：5 匹以上の未処置家兎から得た血清を 56°C 30 分非動化し、Eagle MEM に 20% の割合で加えた。

結核家兎血清 (TS)：H 37 Rv 死菌 10 mg に IFA をつけて 3 回以上免疫して得た血清で、沈降価が 128 倍以上の高力価血清を非動化後 20% の割合で Eagle MEM に加えて用いた。

抗 *Mycobacterium marinum* (M. marin.) 家兎血清 (MS)：M. marin. 死菌 10 mg に IFA を加えて家兎を 2 回免疫したもつから得た血清で、非動化後 20% の割合で Eagle MEM に加えて用いた。

抗 *Listeria monocytogenes* (List.) 家兎血清 (LS)：List. 死菌 10 mg に IFA を加え、免疫して得たものを非動化、20% の割合で用いた。

抗 BGG 家兎血清 (BS)：BGG 20 mg に IFA を加えて 2 度免疫し、沈降価 128× 以上のものを非動化して 20% の割合で用いた。

b) 抗原

ツベルクリン蛋白 (PPD)：H 37 Rv 培養液から硫酸法で精製した蛋白抗原で、最終濃度 25 $\mu g/ml$ として用いた。

BGG：牛血清より硫酸法で精製した γ -globulin で 26 $\mu g/ml$ の最終濃度として用いた。

H 37 Rv 死菌 (Myc.), *M. marin.* 死菌, List. 死菌: すべて加熱乾燥死菌で最終濃度 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように Eagle MEM で菌浮遊液を作成, 使用した。

c) 感作リンパ球培養上清

結核死菌感作家兎 (主に遅延型皮内反応を示すもの) のリンパ節, 脾の $1 \times 10^7/\text{ml}$ Eagle MEM 細胞浮遊液に 20% NS と PPD 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて CO_2 培養器で 20 時間培養後, 2,500 rpm, 20 分間低温遠心した上清を MIF を多量に含む上清と考え, 便宜上これを MIF と呼ぶこととし, 対照の PPD を加えずに培養した上清を cont-MIF とし, -70°C に保存し使用時には対照に PPD 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ となるように抗原を加えて用いた。最終使用量は培養液の 1/2 量とした。肺胞食細胞による遊走阻止試験は毛細管法で既報⁹⁾ の如く行った。

d) その他

PHA-P (DIFCO)(PHA): 0.05 ml/ml を最終濃度として用いた。

Caolin (第一化学薬品), zymosan (Nutri. Bioch. Co. Cleveland, OHIO): 各々 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 最終量として用いた。

5. 観察方法:

光学顕微鏡所見: 倒立位相差顕微鏡で, 培養後主に 6, 12, 24, 48 時間目に観察し, 必要に応じて写真撮影をした。又 cover glass は chamber からはずし型の如く Giemsa 染色或いは acid phosphatase 染色を行って, 細胞の形態学的, 組織化学的な観察, 細胞の分類算定をした。

電子顕微鏡所見 (日本電子 JEM 100):

多核巨細胞の多数出来ている時期に型の如く formalin 固定, Epon 包埋で標本作成し, 観察, 写真撮影した。

倒立位相差顕微鏡 16 mm 映画 (NIKON): 肺大食細胞の単層培養をした Sykes-Moore chamber を用いて 2 frames/min., 100 \times , 200 \times , で 24 時間, Neopan R 40 (Fuji) に撮影した。

本文及び図, 表, 中の略語一覧

PPD: ツベルクリン蛋白
Myc: H 37 Rv 死菌
Cont. MIF: 感作リンパ球培養上清
MIF: 抗原加感作リンパ球培養上清
M. marin.: *Mycobacterium marinum*
BGG: bovine γ -globulin
NS: 正常家兎血清

TS: 結核感作家兎血清
LS: *Listeria* 菌感作家兎血清
BS: BGG 感作家兎血清
IFA: incomplete Freund adjuvant
PKC: Polykaryocyte
MI: migration index

結 果

正常兎肺胞食細胞は, 極めて均一な大きさの大食細胞が高率 (95% 以上) を占め, 他に少数のリンパ球と好中球が混在する。これに対して結核再感作 4 日目の肺胞食細胞では Myrvik¹⁰⁾ らの云うように大食細胞は大小不同がみられ, リンパ球, 好中球の混在がより高率で (20% 前後) あった。このような細胞を培養すると 20 時間目で少数の, 時には相当数の PKC が出現した。又, PPD を加えるとより多数の PKC が観察され, MIF, H 37 Rv 死菌又はこれと抗血清を同時に加えた場合は極めて多数の PKC が出現し, とくに MIF では合胞細胞様の PKC が観察された。PKC の判定は弱拡大の一視野に 5 コ前後を (+), 20 コ前後を (H), それ以上視野のほとんどが PKC で占められるか, 合胞細胞様の巨大な PKC をみとめる場合は (H) として基準をおいた。これにより再感作群による予備的成績をまとめると表 1 のようになる。

表 1 結核再感作家兎肺胞細胞の PKC 形成

Exp. No. 免疫後日数	25 (4)	45 (6)	32 (7)	16 (11)	17 (17)	41 (17)	42 (20)	43 (24)
NS	+	+	-	+	-	#	#	-
PPD+NS	+	-	-	#	#	#	#	-
PPD+TS						#	#	+
Myc+NS						#	#	+
Myc+TS						#	#	#
Cont. MIF+NS	#	-	-		+		#	-
MIF+NS	#	#	+	#	#		#	#
PHA+NS	#							

この所見から, 再感作によって感作度が高ければ, in vivo ですでに PKC の形成がおきているか, 或いは極めて PKC 形成のおきやすい状態に活性化されていると想像される。

Myrvik ら¹⁰⁾ の報告によれば, 静注感作では, granulomatous response がおきて, 肺洗滌液中に PKC が種々の程度に出現し, in vivo ですでに PKC の形成はある程度進行していると考えられる。それ故 PKC 形成

の条件をより正確に知るためには実験の場を出来るだけ *in vitro* に移すために我々は主として初感作ないしは、正常家兎の細胞を使って実験をすすめた。

1. **結核初感作群：**結核死菌感作後1週から5週目までの種々の時期に肺胞食細胞を採取し、抗原その他の試料を作用させて観察した。作用後経時的に観察すると、5~6時間で、PPD 或いは MIF を加えた群では、細胞の凝集、接着がみられ、9時間目頃から数コの食細胞で共有する細胞膜がみえて来て次いで PKC が出現しはじめた。20時間で、ほぼ peak に達した。48時間目では、多少の PKC 増加があるが大きな差はなく、cont-MIF、抗血清 (TS) のみを加えた場合は、48時間でやや増加の傾向があった。PKC 形成の判定は、従って20時間目に行なった。

その結果は表2に示すように、正常血清 (NS) のみでは PKC を作らないが、結核死菌を抗結核血清 (Myc+TS) 又は MIF+NS を作用させると著明な PKC 形成がみられ、とくに MIF では核数 200 をこす合胞細胞性 PKC が数例に出現した。このような細胞のあるものは

24時間以上経過すれば細胞膜の突起が短縮して小型化、円型化する傾向がつよかった。Myc+TS では、ほとんどの場合に境界鮮明の凝集型の PKC で、合胞細胞性 PKC がみられることはなかった。各々の対照では少数の小型 PKC をみとめるのみであった。非特異的細胞凝集因子として PHA はすべての場合に PKC を作らず、glass 面上に平面的に互に接着した細胞島を形成しただけであった。又、caolin, zymosan を貪食させると、稀に5~6核の PKC が出現したが、殆んど例で PKC 形成は陰性であった。

2. **正常群：**結果をまとめて表3に示すと、感作群と同じく Myc+TS の場合と、MIF+NS を作用させた場合に最も強い PKC 形成がみられた。しかしその程度は一般に感作群より弱く、とくに MIF+NS による合胞細胞性 PKC の出現頻度は低く、その程度も弱かった。結核死菌の対照として *M. marin.* 死菌を作用させると、抗 *M. marin.* 血清 (MS) を加えた場合には特に強い PKC 反応があらわれ、両菌に共通抗原性のあることから、興味ある現象である。

表2 結核感作家兎肺胞食細胞の PKC 形成

Exp. No. (免疫後日数)	14 (7)	14 (13)	12 (15)	11 (16)	55 (17)	13 (19)	31 (19)	63 (19)	49 (24)	49 (24)	53 (28)	50 (31)	44 (34)	60 (36)
NS	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
PPD+NS	-	-	+	+		-	-	-	-	-	+	-	-	
Myc+NS					+	+			+	-	#	-	+	
Myc+TS					#			+	#	+	#	-	#	
cont. MIF+NS							-	-	#	+	-	-	-	+
MIF+NS	#	#	#	#		+	+	+	#	#	#	#	#	+
PHA+NS					-		-	-			-		-	

表3 正常家兎肺胞食細胞の PKC 形成

Exp. No.	15	27	32	37	38	39	40	45	47	51	52	55	57	64
NS	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-
PPD+NS	-	-	-	+		#	-	-	+					-
PPD+TS						+	+	-	+					
Myc+NS				+	+		+	-	+	+	+	+		
Myc+TS				+	#		#	+	#	#	+	+		
cont. MIF+NS		-	+	+			-	-	+	+	-		-	-
MIF+NS	+	+	#	+			+	+	#	+	-		#	+
<i>M. marin.</i> +NS						#	+	-	+					
<i>M. marin.</i> +MS						#	#	-	#					
PHA+NS	-	-								-	-	-		

表 4 正常及び結核感作家兎肺胞食細胞の PKC 形成例数

in vitro	PKC 陽性例数/全例数	
	normal (%)	immunized (%)
NS	0/14 (0)	1/14 (0)
PPD+NS	1/9 (11.1)	0/12 (0)
PPD+TS	0/4 (0)	1/4 (25.0)
Myc+NS	0/8 (0)	1/7 (14.3)
Myc+TS	4/8 (50.0)	4/7 (57.1)
Cont. MIF+NS	0/10 (0)	1/8 (12.5)
MIF+NS	3/11 (27.3)	9/13 (69.2)
M. marin.+NS	1/4 (25.0)	
M. marin.+MS	3/4 (75.0)	
PHA+NS	0/5 (0)	0/5 (0)
Caolin+NS	1/4 (25.0)	0/3 (0)
Zymosan+NS	1/3 (33.3)	0/4 (0)

以上1, 2の結果について, PKC 形成(+)以上を陽性例として, 例数をまとめたのが表4である。この中で最も高率なのが感作群の MIF+NS を作用させた群で, 次いで, 両群の Myc+TS を作用させた群と M. marin.+MS 群, であり, 正常群に MIF+NS を作用させたものでは, (+) の場合が多かったため, 比較的陽性率が低かった。しかし, 対照の cont. MIF+NS 群に比較して高率であった。

3. 16 mm 位相差顕微鏡映画所見

結核再感作 14 日目の肺胞食細胞に PPD をかけて培養しつつ 16 mm 映画撮影を行った。培養後 5~6 時間で食細胞は互に強く凝集しはじめ, 遊離食細胞は長い偽足を出してさかんに隣接する細胞の細胞膜に接着, 離反する運動がみられた。又, 大食細胞の間を小型のリンパ球と思われる細胞が遊走して大食細胞に接着, 離反するのが観察された。又, 9 時間頃から, 多数の細胞が共有するような細胞膜がみえて来て, 間もなく多核巨細胞が出現して来た。現在まで, MIF による合胞細胞様巨細胞の形成過程を充分観察していないが, 少なくとも細胞分裂を思わせる像はみられず, PKC 形成は時間的にも極めて短時間内の現象であって, 細胞融合, 貪飲などがむしろ予想しうる。

4. PKC の核数からみた出現頻度

各試料を作用させてから培養 20 時間目に chamber から cover glass をはずして Giemsa 染色をし, 構成細胞の核数をかぞえてそれにより PKC 細胞を分類してみると図1のようになる。即ち, 結核感作家兎は, 対照の NS のみでも 2~4 核の細胞が増加し, PPD を加える

と 8 核以上の PKC が出現した。MIF を入れたものでは核数の少ないものから多いものまで著明に増加したのがわかる。

一方, 正常家兎でも同様の傾向がみられるが(図2) 他

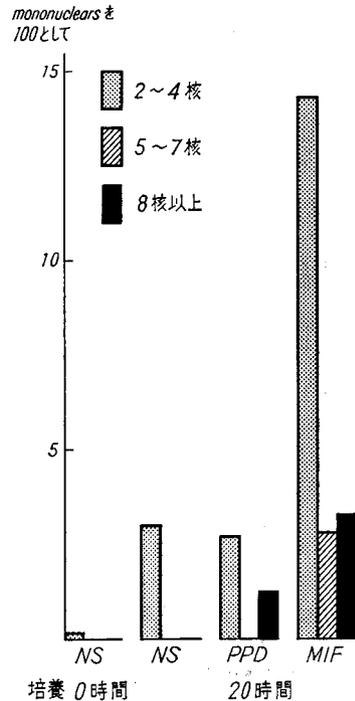


図1 結核感作(16日目)家兎肺胞食細胞の核数からみた PKC の割合

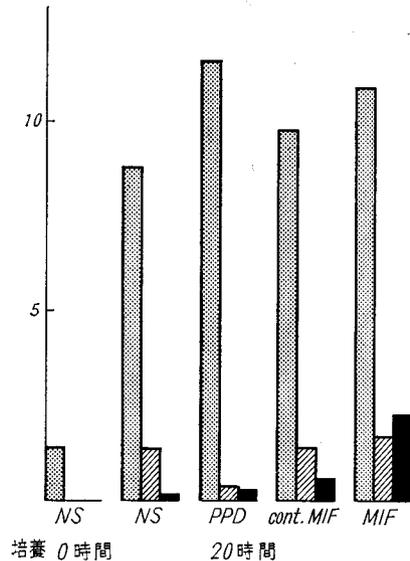


図2 正常家兎肺胞食細胞の核数からみた PKC の割合

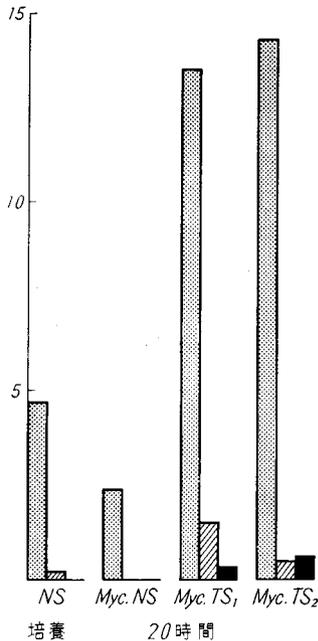


図3 正常家兎肺胞食細胞の結核死菌によるPKC形成の核数からの分類

の実験例の経験から相当な個体差が伺われた。又、Myc+TSでは著明なPKC形成がみられた(図3)。

5. 2, 3の特殊染色によるPKCの所見

a) エオジン Y による生死の判定

培養後20時間目に、cover glassに接着している細胞をエオジン Y 0.1% 生食液で処理して鏡検すると、大食細胞及びPKCの95%以上は生存してエオジンに染まってこない。48時間以上では、生存率はやや低下する傾向があるが、PKCの生存率は一般に高い。

b) 酸性フォスファターゼ染色

Naphthol AS法(Barker)により、固定は冷ホルマリン、カルシウム液で行い cover glass上の細胞を観察した。試料を加えずに、NSのみで培養6時間では、正常細胞は強陽性の染色性を示してうす紅く、20時間目ではより濃染した。これにMyc+TSを加えれば、6時間で対照と差はないが、20時間目では対照より濃染し、食細胞の活性化がみられた。この際形成されるPKCは、遊離食細胞よりやや濃染するが、これは核が周囲に並び、染色物質はPKCの中心に集まるので、局所的な絶対量が多いためと考えられる。他方MIF+NSで処理した場合のPKCは、一般に細胞質が広く、偽足様の細胞膜の形がみられ酸性フォスファターゼ陽性顆粒が一般にうすく散在性にみられた。

c) 結核菌染色(Ziehl-Nelsen法)

正常食細胞に結核死菌を加えて培養し、3時間目、20時間目に型の如く菌染色し食された菌を観察した。3時間目では、遊離食細胞もPKCも食した菌数は極めて少いが50%程度の細胞に陽性であった。20時間目では約90%の細胞に食菌がみられ、1細胞に10コ前後の菌がみられることが多かったが、PKCが必ずしも多数の菌を食ってはいなかった。個々の細胞により食菌数に差があって、細胞膜に充満する程の菌をみとめるものもあった。

6. 電子顕微鏡(EM)所見

結核感作家兎肺胞食細胞にMIFを加えて培養し、20時間目にEMで観察すると、PKCには次のような所見がみられた。即ち、細胞自体が極めて大きく、核は多く、円形又は卵形で切込みのあるものも存在する。核のchromatinは少く、核小体は1~2コのものが多い。細胞質は明るく、mitochondriaは中等大でよく発達し、一般に丸くて、長いものはほとんどない。Golgi野は小さくて随所にみられ、phagosomeはdenseなものからclearなものまで雑多であるが、正常肺胞細胞のように大きなphagosomeはみられない。滑面小胞体は比較的よく発達し、粗面小胞体はあまり発達していない。このように大食細胞に修飾が加わって類上皮細胞に近い形をとっている。又、細胞質内にしばしば隣合った細胞の細胞質突起のゆ合によると思われる網目状の構造物がみられた。これは大食細胞膜の多数の突起の構造によく一致している。

結核菌と抗血清を加えて観察すると、PKCは小型で円形のものも多く核は少いが、外側に片寄って並びphagosomeは中心に集り、denseなものからclearなものまでみられるが、検索の範囲では結核菌体ないしはその破壊産物も見出せなかった。又、細胞小器官や多数の脂肪滴が外側に位しmitochondria、粗面小胞体も相当数みられた。

MIFによるPKC内にみられた細胞膜の入りくんだ網目構造物はみられなかった。

7. PKC形成の特異性について

a) 結核感作家兎の皮内反応と肺胞食細胞遊走阻止

結核菌感作家兎肺胞食細胞によるPKCの形成は、感作家兎の遅延型アレルギー成立の程度に関連性があるかどうかを、皮内反応と肺胞食細胞遊走阻止試験⁹⁾の直接法と間接法で検討した。結果は表5に示したように、皮内反応の強弱と平行した直接法のMI値(migration index)を示すものと、関係のないものがあった。又直接法と間接法によるMI値は、ほぼ平行するものが多

かった。しかし、PKC 形成能は MI 値 (間接法) の低い MIF に強い例があり、実際に正常細胞に加えて PKC 形成の多かったものは、MIF No. 1, 2, 4 であった。Galindo¹¹⁾らの云うように肺胞食細胞を用いた場合、皮内反応の強弱と MI 値は必ずしも平行しないが、ある程度の相関は伺われた。実際、食細胞の遊走野を詳しく観察すれば、図 4 のように、しばしば PKC 形成をみとめる例もあり、PKC 形成は、肺胞食細胞の遊走阻止に一役かっている可能性もある。

以下の 3 項目では、PKC 形成の特異性に関する対照実験の成績を示した。

b) List. 感作家兎肺胞食細胞: List 菌の感作によって遅延型アレルギーが成立すると云われているので¹²⁾、上述の感作条件で得た細胞を用い PKC 形成について検討した。表 6 に示すように、List 菌で感作した場合は、List 菌に最も強く、結核菌に弱く、逆に結核菌感作の場合は結核菌に強く、List 菌に弱く反応した。対照の NS, caolin, zymosan, PHA では殆んど PKC の形成はみられなかった。すなわちこれら二種類の菌による PKC 形成は、特異性が強く、とくに対応する抗血清を同時に加えたものに最も強かった。List 感作細胞に対して、結核菌は多少の PKC 形成反応を示したが、正常細胞に対する PKC 形成反応と比較すれば当然とも云えよう。

c) BGG 感作家兎肺胞食細胞: 即時型アレルギーに関する対照として、BGG 抗原を選び、上述の条件で家兎を感作して得た肺胞食細胞で、次の成績を得た。すなわち、表 7 のように、感作後 15~17 日では一部の例外を除いて殆んど PKC 形成はなく、正常肺胞食細胞とほぼ同様であった。すなわち、可溶性抗原の BGG のみ、抗 BGG 血清のみ、両者の混在による培養などでも PKC の形成はみられなかった。

d) PPD, BGG による immune complex の態度

抗原と抗血清を作用させれば、正常及び感作肺胞食細胞でも、PKC 形成が比較的容易になる傾向がある。とく

に固型抗原である菌体を抗血清で処理するとその傾向が強かった。そこで液性抗原である PPD, BGG を各々の抗血清と合わせて immune complex を作り、今回は正常肺胞食細胞に作用させてみた。結果は、大量の immune complex を作用させると、抗原のみ或いは抗体のみを加えた場合よりも PKC 形成の傾向がみられた。

総括と考察

今回の実験で、結核感作家兎の肺胞食細胞は、in vitro で PPD, 結核菌と結核血清及び MIF を含む感作リンパ球培養上清などにより高率に PKC を形成することが知れた。特に後 2 者では、正常家兎の肺胞食細胞にも PKC を形成させる能力のあることを知り、種々の角度から両者の PKC 形成機序を検索した。この両者の作用機序は各々別個であるらしいが、感作肺胞食細胞の場合においては、混在する感作リンパ球に結核菌と云う抗原を伸立ちとして cellular immunity が関与しており、その一部において MIF を含む感作リンパ球培養上清による PKC 形成機序と共通性がある可能性もあり、問題は複雑である。

便宜上問題をいくつかに分けて考察したい。

1. PKC の細胞起源と感作リンパ球培養上清 (MIF と記載) による PKC 形成過程

PKC の細胞起源の前に、肺胞食細胞の起源から考察しなければならぬが、ここでは一般に信じられているように、血中単球が肺胞食細胞に移行する^{6),7)}と考えると次の step にすすみたい。

尚、肺胞食細胞との比較の意味で、腹腔食細胞 (PEC) が MIF による PKC 形成能をもっているかどうかを予備の実験でしらべたが、PKC 形成はきわめて少なく、MIF に対する態度がかなり異なることを経験した。実際、PEC で遊走阻止試験をすると対照群でも遊走性が非常に悪く、家兎 PEC でのこの種の実験には困難を感じた。両者は形態学的に類似性があるとは云え、PEC は偽足の形成がさかんで壁粘性性に富む点など、肺胞食細胞とは生物学的に相当異なった細胞¹³⁾と考えられ、今回の実験では、検索の対照としなかった。

我々の観察した MIF による PKC は、酸性フォスファターゼが弱いながら陽性であり、大食細胞由来を意味している。又、16 mm 顕微鏡映画で経時的に PKC 形成を追うと、主に大食細胞の接着、凝集から PKC が形成されて行くのが観察される。又、Giemsa 染色標本によっても大食細胞の特徴である広い明るい細胞質と、偽足を形成した細胞膜、染色質の少い核などを観察しうる。電

表 7 BGG と抗 BCG 血清による PKC 形成

in vitro	Days after immun.			normal		
	15	16	17			
NS	-	-	-	-	-	-
BGG+NS	-	-	-	+	-	-
BS	-	-	+	-	-	-
BGG+BS	-	-	+	-	-	-
PHA+NS	-	-	-	-	-	-
Zymosan+NS	-	-	-	-	-	-

顕所見では、最も大食細胞の特徴がみられる。即ち、核の chromatin は少く、細胞質は明るく、mitochondria, phagosome がよく発達している。全般にむしろ類上皮細胞に近い形をとっている。最も興味ある所見は、細胞質内にしばしばみられる細胞膜突起の複雑なからみ合いによって出来たと思われる網目状の構造物である。おそらく相隣合った大食細胞の細胞膜突起が融合してその遺残物が細胞質内に閉じ込められた可能性が大きい。実際、in vivo で異物巨細胞内に、同様な遺残物を観察した報告がある¹⁴⁾。又、我々は in vitro で PKC 形成までの時間をはかると、約12時間ですでに PKC が観察され、20時間で peak に達するので数10コから時に数100コに及ぶ核をもつ PKC が endomitosis や amitosis によって出来るとは考えにくく、従来、異物巨細胞での報告^{3),4),15),16)}や、Galindo¹⁷⁾の報告と同様、恐らく融合 (fusion) の可能性が強く、あるいは合体 (incorporation) と表現しうるのかも知れない。実際、我々の標本では核分裂像に相遇する率が非常に低い。細胞の融合に MIF を含む感作リンパ球培養上清が、いかに作用するかは、全く想像の域を脱しない。いくつかの報告によれば、我々と同様の培養上清に含まれると云う macrophage aggregation factor (MAF) による大食細胞の凝集現象、壁粘着性の亢進^{18)~21)}、貪食能の亢進作用など¹⁹⁾、大食細胞の細胞膜に何らかの変化が起ると想像される成績がある。この際、物理的な細胞同志の接着は必ずしも PKC 形成に移行しないことは、我々の PHA 添加が PKC 形成に無効であったことから知れる。

本文でも記したように、数例の MIF を含むリンパ球培養上清を比較すると、強い PKC 形成を示すものとそうでないものがあり、食細胞の遊走阻止された migration 野に PKC をみとめること及び MI 値とある程度の相関があることは興味がある。大食細胞膜に与える変化の強弱によるのかもしれない。最近、細胞融合因子 (cell fusion factor) として HVJ (Sendai virus) 粒子が報告^{22),23)}されている。その細胞融合機序は、細胞膜表面のレセプターにその粒子が吸着して細胞間を橋渡しし、細胞膜基底部の脂質層相互の融合で細胞融合が終るとされているが、示唆に富む現象と考える。

以上の考察は正常及び感作肺胞食細胞に共通のものであるが、更に強く感作された食細胞では、MIF を含む培養上清により強い PKC 形成反応を示し、合胞性 PKC が観察されることが多い。この細胞は、いかにも活性が強く、大型の偽足を出した様で特徴的である。このような細胞が PPD をかけた場合にもみられるのは、肺胞

食細胞に混在するところの感作リンパ球から放出された MIF を含む mediator によって出来ると考えられる。

MIF を含むリンパ球培養上清中の PKC 形成因子と MIF 又はその他の mediator との関係は今後の検索に待たねばならない。

2. 結核菌又はこれと結核血清による PKC 形成とその特異性

結核菌又はこれと対応する結核血清で出来た PKC はすでに述べたように、MIF で出来た PKC とは異り、細胞膜が鮮明で偽足が少く、一般に円型である。とくに細胞の融合の一つの根拠である細胞質内の細胞膜遺残物は検索の範囲では、電顕でも見出せなかった。ただ、phagosome の著しい発達があり、大食細胞の貪食能と密接な関係が予想される。電顕像では見出されなかったが、光顕では菌染色により多数の結核菌の貪食がみられ、食細胞同志による貪食又は貪飲現象も PKC 形成に一役かっているのではないだろうか。

PKC 形成を促進する効果が沈降価の高い結核血清にみられた。沈降価の低い血清や、結核血清だけでは促進効果はなく、結核菌を加えてはじめて高い PKC 形成能をみとめる。恐らく菌に対する opsonin 作用として働くと思われるが、更に immune complex の形成があって、PKC 形成に好条件を与えるのかもしれない。この現象は List 菌と抗 List 血清の組合せでも観察される。しかし、PPD, BGG による immune complex は、正常細胞に PKC を形成させなかった。

感作家兎肺胞食細胞による PKC 形成は特異性がある。現在迄、非特異的な異物巨細胞の形成は多数発表されて来た。我々の実験では、結核菌、List 菌で感作すると、それぞれの菌体に特異的に in vitro の PKC 形成が強く、Galindo¹⁷⁾も報告しているように、この現象には特異性のあることが伺われる。又、PPD 抗原と結核血清も、結核菌より弱いが PKC 形成を示す。これは PPD が結核菌体の抗原物質の一部しか担っていないことと、immune complex が出来たとしても粒子がはるかに小さいことによると思われる。しかし、単に粒子の大きさだけが重要でないことは、非特異的物質の粒子としての zymosan, caolin は PKC 形成に無効であることでも知れる。

以上、2つの方法によって PKC が形成されたが、その機序についても、形態についても相当の差異があるように思われる。ただ全く相異なるものではなくて、最初に述べたように、少なくとも感作肺胞食細胞においては、MIF を含むリンパ球培養上清に類した因子を介して、共通な形成機序があり、又、細胞融合による PKC 形成

の点でも、融合の形式が異なるであろうが類似性があると考えられる。

ひるがえって、生体の増殖性結核病巣では、基本的には菌をとりかこむ大食細胞と類上皮細胞及びここに混在する Langhans 型巨細胞が特徴的であり、その外側にリンパ球の種々の程度の浸潤がある。この組織像から当然予想しうるのは、感作リンパ球と、常在する結核菌ないしはその産物とが反応して放出する MIF を含む mediator が病像の修飾に関与しているのかもしれないと云うことである。すなわち、放出された mediator が食細胞の食菌作用を亢め¹⁰⁾、細胞同志の粘着性を増し、細胞の遊走を阻止して更に、食細胞の食菌に対する共同作用としてか或いは PKC 形成因子としての mediator があって細胞融合が起こり、PKC が出現するのかもしれない。又、この際、結核血清は常に供給されており、結核菌を opsonize したり、immune complex を作る可能性もある。このように考えると、PKC 形成機序は in vivo においては、遅延型アレルギーと密接な関係をもつ、即ち病像を修飾し増殖性へと導く細胞免疫の mechanism と深い関連があるのかもしれない。

我々のテーマは古いようであるが、未だ新しい問題を含んでいる。PKC 形成因子と MIF 又は MAF そのものとの異同、結核菌による PKC 形成機序との異同など残された問題である。今後の検討にまつ他はない。

この稿を終るに当たり、結核菌 H 37 Rv の分与、Listeria 菌の培養精製を快よくお引きうけ下さった当研究所山本健一助教授に心から感謝致します。

尚、この研究は日米医学研究会結核専門部会研究費によった。

文 献

- 1) Rokitansky, C.: Lehrbuch der Pathologischen Anatomie, 3rd ed. Vol. 1, p. 295, Braunmueller, Viena, 1855.
- 2) Langhans, T.: Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. **42**, 382, 1868.
- 3) Lambert, R. A.: J. Exp. Med., **15**, 510, 1912.
- 4) Gomoglio, P. M., Ottino, G., and Cantino, D.: J. Reticuloendothel. Soc., **9**, 397, 1971.
- 5) Sutton, J. S., and Weiss, L.: J. Cell Biol., **28**, 303, 1966.
- 6) Onoe, K., and Morikawa, K.: Recent Advances in RES Research, **12**, 100, 1972.
- 7) Bowden, D. H., Adamson, Y. R., Grantham, W. G., and Wyatt, J. P.: Arch. Path., **88**, 1969.
- 8) Myrvik, Q. N., Leake, E. S., and Fariss, B.: J. Immun., **86**, 128, 1961.
- 9) 菊地由生子: 免疫実験操作法, p. 137, 日本免疫学会編, 1971.
- 10) Myrvik, O. N., Leake, E. S., and Oshima, S.: J. Immun., **89**, 745, 1962.
- 11) Galindo, B., and Myrvik, Q. N.: J. Immun., **105**, 227, 1970.
- 12) Miki, K., and Mackaness, G. B.: J. Exp. Med., **120**, 93, 1964.
- 13) Pollock, E. M., Pegram, C. N., and Vazquez, J. J.: J. Reticuloendothelial Soc., **9**, 383, 1971.
- 14) 家森武夫: 日病会誌, **52**, 35, 1963.
- 15) Silverman, L., and Shorter, R. G.: Laborat. Invest., **12**, 985, 1963.
- 16) Goldstein, M. N.: J. Histochem. Cytochem., **2**, 274, 1954.
- 17) Galinds, B.: Infect. Immunity, **5**, 583, 1972.
- 18) Lolekha, S., Dray, S., and Gotoff, S. P.: J. Immun., **104**, 296, 1970.
- 19) Nathan, C. F., Karnovsky, M. L., and David, J. R.: J. Exp. Med., **133**, 1356, 1971.
- 20) Mooney, J. J., and Waksman, B. H.: J. Immun., **105**, 1138, 1970.
- 21) Neta, R., and Salvin, S. B.: Immunity, **4**, 697, 1971.
- 22) Okada, Y.: Experiment. Cell Research, **26**, 98, 1962.
- 23) 岡田善雄: 蛋白質, 核酸, 酵素, **18**, 657, 1973.

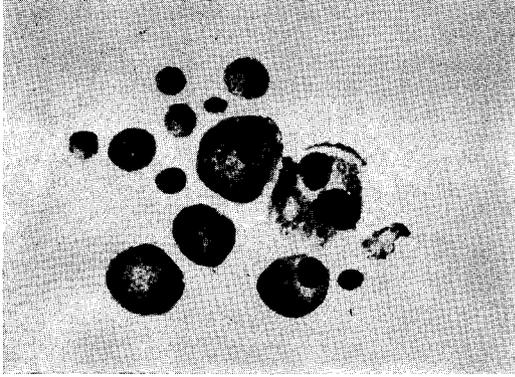


図 5-1 結核再感作4日目家兎細胞に PPD を作用させ 20 時間目。4~5 核の丸い PKC 形成, Giemsa 染色

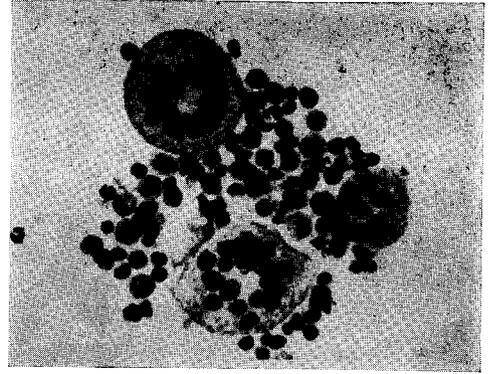


図 5-2 結核感作4日目家兎細胞に結核菌を加えて培養 20 時間目。15~20 個核をもつ PKC 形成, Giemsa 染色

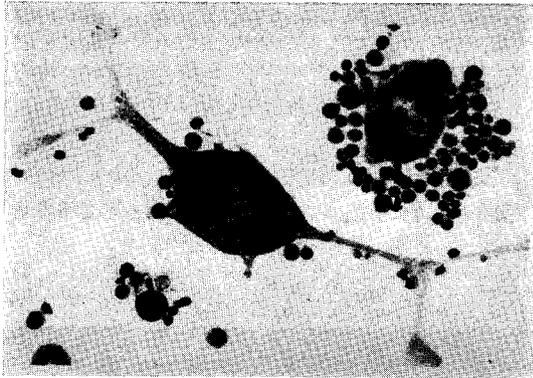


図 5-3 結核再感作4日目家兎細胞に MIF を作用させて培養 20 時間目。長い突起を出して 30 個位の核をもつ PKC。Giemsa 染色

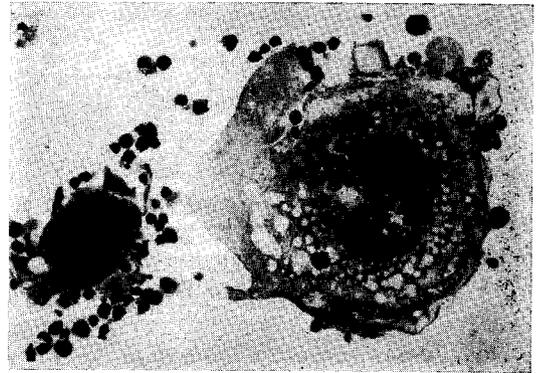


図 5-4 結核再感作4日目家兎細胞に MIF を作用させて培養 20 時間目。100 個近い核をもつ。PKC 細胞膜が、流動性をもつかにみえる。Giemsa 染色

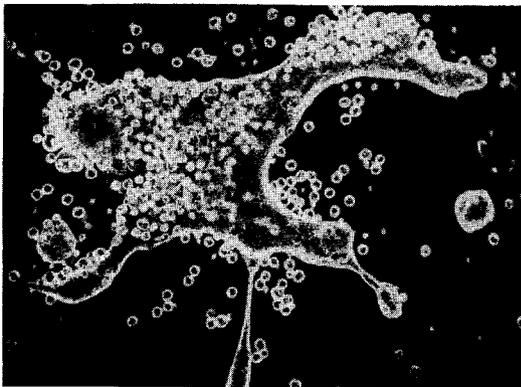


図 5-5 結核感作細胞に MIF No. 1 を作用させ 20 時間目 (位相差) 多数の核をもち、又多数の単細胞を粘着させて、大型の偽足を形成している。

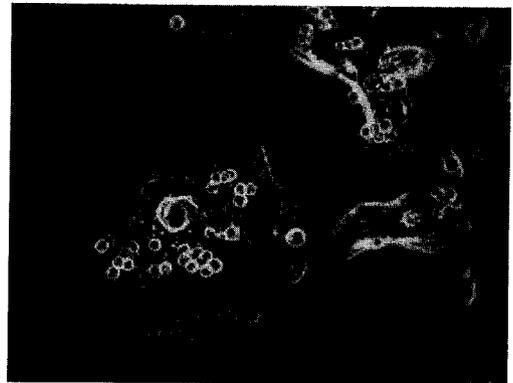


図 5-6 正常細胞に MIF No. 2 を作用させ 20 時間目 (位相差)。多数の核をもち、偽足の形成が目立つ。細胞の上に付着した単細胞もみられる



図 6-1 結核初感作 24 日目家兎細胞に MIF No. 1 を作用させ 20 時間目。PKC 膜に多数の突起が、互にからみ合い、細胞内につづいている。大きな Phagosome の発達はない

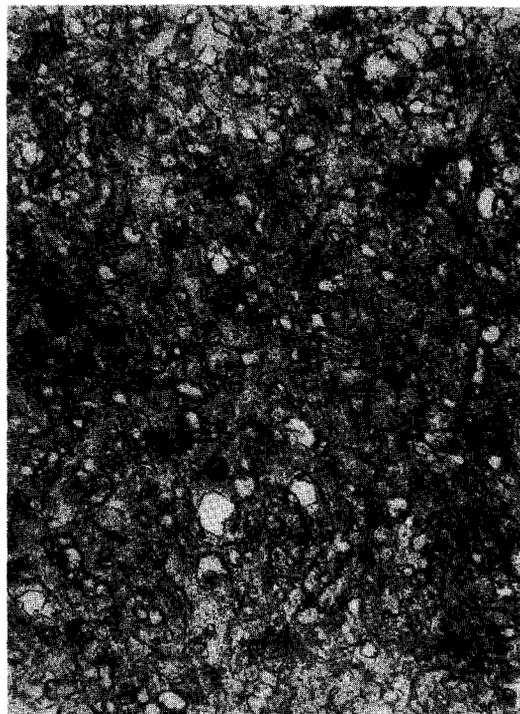


図 6-2 同細胞質内にみられた細胞膜突起の網目状構造物。大食細胞の融合を思わせる



図 6-3 結核初感作 24 日目家兎細胞に H 37 R_v を加えて培養 20 時間目。6 個の核が外側に位置し、中に多数の dense~clear な Phagosome を入れている。核周辺に多数の脂肪顆粒がみられる

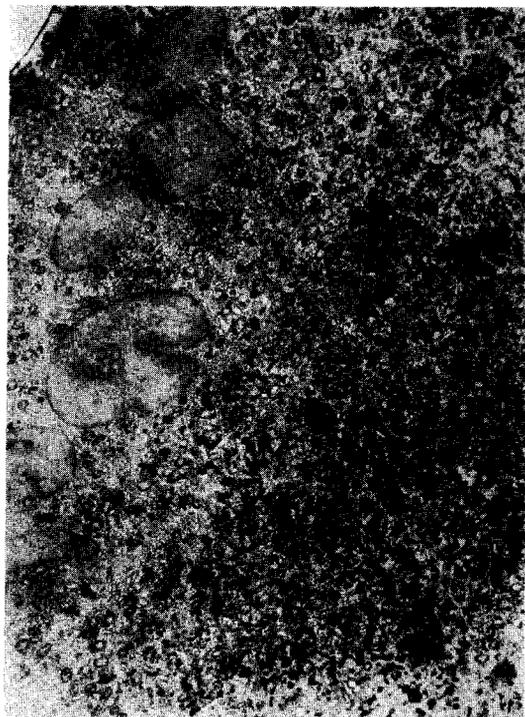


図 6-4 同様の細胞を拡大したもので、多数の Phagosome と Golgi 野がみえる