# モルモットにおけるツベルクリン過敏症の受身伝達因子に関する研究

京都大学結核胸部疾患研究所内科学第2部門

佐　藤　篤　彦

（原稿受付　昭和49年1月22日）

## 緒　　言

ツベルクリン（以下「ツ」と記す）過敏症の受身伝達についてはChase[1]が結核感作モルモットの腹腔滲出細胞を用いて始めて成功して以来，遅延型過敏症の研究を志す学者が，この手技に基づいて実験を行なうようになって来た。

即ち，Kirchheimer & Weiser[2]はBCG感作モルモットの生きた腹腔滲出細胞，及び脾細胞による「ツ」過敏症の受身伝達を実験的に証明したが，細胞破壊液では伝達できなかったことを報告した。

その頃，Metaxas & Metaxas-Bühler[3]はモルモットにおける「ツ」過敏症のlocal passive transferの技術を開発し，これによっても伝達実験が可能であると報告した。

その後，実験動物における「ツ」過敏症の受身伝達は生きたリンパ系細胞を用いれば可能であるというStavitsky[4]，Nishioka[5]，Schmid[6]らの報告が相次いだが，一方破壊した細胞材料や血清をもってする伝達実験に成功したものはなかった。

1949年Lawrence[7]は人における実験で，「ツ」陽性のヒトの末梢血白血球破壊液を用いて，「ツ」過敏症の受身伝達に成功したと報告した。

その後，Baramら[8,9]はその受身伝達因子をSephadexを用いて分離して$\gamma$-globulinを含む高分子分画とpolynucleotideを含む低分子分画の2分画に伝達因子としての活性があることを証明した。しかし実験動物における伝達因子については人の場合と比べて不明の点が多かった。

Cole & Favour[10]は結核感作モルモットの血漿よりCohnの低温エタノール法により分画した$\alpha$-グロブリン分画（Fraction IV-10）を用いて「ツ」過敏症の受身伝達に成功したと報告したが，Ehrenkranz & Waksman[11]はこれを追試した結果，Cole & Favourの主張を否定している。

Bauer & Stone[12]はinbredのモルモットの生細胞を使用して，「ツ」過敏症の受身伝達実験を行ない，高率にrecipientに伝達することに成功したが，冷凍融解操作や超音波で破壊すると伝達能力を失うことを報告した。

又Turk[13]は結核死菌感作を行なったモルモットの脾細胞，リンパ節細胞及び白血球を破壊して作製した材料を正常モルモットに注射すると，長期間に亘って濃厚ツベルクリン（PPD 40 $\mu$g）に陽性反応を呈することから，このような材料を用いると，active sentizationが起る可能性を指摘している。

更に，Bloom & Chase[14]はモルモットを用いて破壊した細胞材料による遅延型過敏症の受身伝達実験を試みた結果，recipientにみられる反応は特異的免疫反応ではなく脱毛剤などの非特異的刺戟反応ではないかという否定的見解を報告した。

以上のように動物における細胞成分による

「ツ」過敏症の伝達に関しては，最近迄一般的な承認を得るに至らなかったが，免疫学的研究方法の進歩と共に，動物においても「ツ」過敏症の伝達因子の存在を肯定する実験成績が次第に増加して来た。

即ち，Rothman ら[15] はモルモットの「ツ」伝達因子について研究し，リンパ系細胞より分離した γA-グロブリン分画に活性を証明したと報告した。Kochan ら[16]は BCG 感作モルモットの腹腔滲出細胞を冷凍融解操作で破壊して作製した抽出液中に「ツ」過敏症の伝達因子を証明し，更に，これらの細胞が in vitro 或は in vivo で OT と接触 (OT challenge) することにより，transfer material が細胞から遊離するという現象を認めて報告した。辻ら[17]は動物における「ツ」過敏症受身伝達因子について研究し，結核菌で感作及び challenge をおこなったウサギの肺胞滲出細胞中に上記因子が存在することを実験的に証明し，後に岡田[18]は受身伝達因子の本体は分子量15,000〜60,000の低分子の蛋白であると推定される実験成績について報告した。

動物における「ツ」過敏症の受身伝達因子が細胞抽出液中の一定分画中に認められたことは，従来の常識を破る新しい免疫学的事実であり，その意義は重大である。そこで岡田の実験報告については反対意見も少くなかった。その最大の疑問は実験動物の選択方法に向けられた。即ち，本邦で市販されているウサギは購入時既に「ツ」反応が陽性のものが多数混在しており，この原因としては Mycobacterium の自然感染が考えられるからである。従って岡田は伝達実験の recipient として使用する動物は，すべて実験前に「ツ」反応をおこない，陽性のものを除外し，陰性のもののみを実験に使用している。一方「ツ」過敏症の伝達実験にこのようなテストをした動物を使用することは，「ツ」抗原による感作をおこなうことを意味するもので，岡田の実験成績が必ずしも一般の承認を受けるに至らなかった最大の理由がここにあった。

著者は，「ツ」過敏症の受身伝達が，細胞抽出液の一定分画を用いても可能であるか否かという問題は，免疫学上極めて重要であると考え，これを疑問の少ない方法によって研究したいと思い，実験動物としてモルモットを用いることに着目し，以下述べるようにモルモットを用いて「ツ」過敏症の受身伝達因子を追求した。

## 実験材料及び実験方法

実験動物：体重350乃至 450g の市販 Hartley 系モルモット（雌）を用いた。とくに実験前に「ツ」テストを行なっていないが，予備実験成績ではツベルクリン反応陽性を示した動物は皆無であった。

1. donor の感作方法

第1表に示した如く，BCG 加熱死菌 10 mg を Freund adjuvant 1 ml に浮游させて，その

**第1表**　モルモットの感作方法

モルモット（Hartley 系，♀）
↓
感作 I（BCG 加熱死菌 1mg＋Freund adjuvant を足蹠に注射）
↓ 2週
感作 II（BCG 加熱死菌 1mg＋Freund adjuvant を足蹠に注射）
↓ 2週
challenge（BCG 加熱死菌 1mg＋生理的食塩水 0.5 ml を頸静脈内注射）
↓ 3〜4日
($^{60}$Co 照射)
↓ 3〜4日
心臓穿刺により採血後動物を屠殺，
脾臓及び肺臓を摘出．

0.05 ml づつ計 0.1 ml を後肢足蹠に注射した（第1回感作）。2週後に同一量の浮游液を足蹠に再注射した（第2回感作）。更に2週後に BCG 加熱死菌 1 mg を 0.5 ml の生理的食塩水に浮游させ頸静脈より注射した（以後，この処置を challenge と記す）。これらの処置をおこなった動物を VC (vaccinated and challenged) モルモットと略称することにする。

更に対照として以下の3群をおいた。

N．正常群（無処置）

$V_1$．1回感作群（challenge を行なっていない）

$V_2$. 2回感作群 (challenge を行なっていない)

2. 脾細胞の採集及び細胞抽出液の作製方法

感作後 challenge をおこなった7日目のモルモットを心臓穿刺により採血，屠殺し，速やかに脾臓を摘出した。脾臓を Hanks 液を用いて充分洗滌した後， Hanks 液中にてハサミをもって細かく切り砕き，2層の滅菌ガーゼで沪過して Hanks 液による細胞浮游液を作製した。その細胞を2回遠心沈澱によって洗滌した。最後は目盛り付きスピッツグラスで細胞量を計測したのち，packed cell 1容の脾細胞を4容の蒸溜水に浮游させた。この細胞は凍結融解操作を5回反復して細胞膜を破壊し，20,000 $g$ 60分間冷却遠心分離を行なった後，その上清を細胞抽出液として実験に用いた。細胞浮游液は実験に使用するまで —20°C に保存した。尚採取した血液より血清を分離し —20°C に保存した。又 N 群，$V_1$ 群及び $V_2$ 群のモルモットにも上記同様の操作を行ない，脾細胞抽出液及び血清を作製した。対照実験材料として岡田の方法により，BCG 死菌で感作及び challenge を行なったウサギの肺胞滲出細胞抽出液を作製した。この細胞抽出液もモルモット脾細胞抽出液の場合と同様に —20°C に保存した。

3. 受身伝達実験方法

生細胞抽出液を実験材料として recipient の静脈内に注射した後， recipient のツベルクリン感受性を経時的にテストする所謂 systemic passive transfer の方法を用いた。血清を投与する場合は，通常3回に分けて3日間連続で，recipient 1匹当り計 20 ml となるように等量に分割して腹腔内に投与した。テスト抗原としては PPD 10 $\mu$g (Parke Devis 社製) を用いた。注射後5時間，24時間，48時間目に局所反応を観察し，以下述べる判定基準に従って各時間における皮膚反応の状態を記録した。

＋：明瞭な硬結（径 10 mm 以上）を認めたもの

±：弱い硬結が認められるが，径10mm以下のもの

－：まったく反応が認められないもの

recipient のツベルクリン感受性は静脈内投与後，即時，1日目，3日目，7日目（必要に応じて14日目）について調べたが，原則としてテストは recipient については1乃至2回に回数を制限した。その理由としてはモルモットはテスト抗原によって感作されるので，その影響を避けるためである。

4. 細胞抽出液の透析による分画方法

Transfer Factor (受身伝達因子) が細胞抽出液中高分子成分であるか，低分子成分であるかを検討する目的でセロファン膜 (Visking No 32) による透析を行ない，透析内液，外液に分けた。透析操作は 4°C 18 時間蒸溜水中で行なった。各分画は前記の方法による受身伝達実験の材料とした。又必要に応じて一度分離した両分画を再び混合して (4°C 18 時間放置) 同様の受身伝達実験を行なった。

5. ゲル沪過による脾細胞抽出液分画実験

a) Sephadex G-200 によるゲル沪過：

Sephadex G-200 粉末 (particle size 40～120 $\mu$, water regain 20 ± 2 g, dry gel, Pharmacia, Uppsala) 160 g を蒸溜水中で膨潤， 洗滌後，pH 7.4, 0.075 M phosphate buffered saline (0.15 M NaCl, 0.001 M disodium ethylene diamine tetraacetete 以下 PBS-EDTA と記す) を含む溶液で充分洗滌し，直径 6.5 cm, 高さ 50 cm のカラムに充塡した。細胞抽出液上清約 17 ml を凍結乾燥法により約2倍濃度まで濃縮した後，カラムに注入し，PBS-EDTA により15 ml～20 ml/hr の速度で溶出を行ない，12 ml 宛フラクションコレクターにより採取した。この操作は全て，4°C の低温室内で行なった。溶出液の紫外線吸光度を UV coder (Type 1, L.K.B 社製)で記録し，必要に応じて島津紫外線分光光度計により各試験管ごとに吸光度を測定した。**図2**に示す如く，溶出液を C0, C1, C2, C3, C4 及び C5 の5分画に分けてプールし，それぞれ 2.5ml 迄凍結乾燥法により濃縮した後，C1, C2 分画は 100 倍量の EDTA に対して24時間透析し，その透析内液を受身伝達実験に用いた。C3

及び C4 の両分画は比較的低分子であるため濃縮後，以下に記載する Sephadex G-25 を用いて脱塩し，生理的食塩水で等張とし，その分画を伝達実験材料とした。伝達因子の分子量を測定する目的で，上記のカラムに次の6種類の分子量既知の物質をカラムにかけて，その溶出位置を測定した。

| | | |
|---|---|---|
| human gamma-globulin | 分子量 | 160,000 |
| bovine serum albumin | 〃 | 67,000 |
| ovalbumin | 〃 | 45,000 |
| chymotrypsin | 〃 | 25,000 |
| bacitracin | 〃 | 12,400 |
| cytochrom c | 〃 | 1,450 |

(Schwarz/Mann 社，ゲル沪過法による分子量測定用標準蛋白質キット)

b) Sephadex G-25 によるゲル沪過：

Sephadex G-25 粉末 (particle size 20〜80 $\mu$, water regain 2.5 ± 0.29 water/g, dry gel, Pharmacia Uppsala)を蒸溜水で洗滌後，PBS-EDTA で平衡し，直径 4.5 cm, 高さ 15.0 cm のカラムに充塡した。前記濃縮 C3, C4 の 8.5ml を用いてゲル沪過を行ない，7ml づつフラクションコレクターで分画採集し，図3の如く P1, P2 の2分画に分け，生理的食塩水で等張として伝達実験材料に使用した。

6. 酵素による伝達因子死活試験

酵素としては，Trypsin (Sigma 社製，2× cryst.), RNAse (Sigma 社製 from bovin pancreas, 5× cryst.) を使用した。

Sephadex ゲル沪過により分離した伝達活性を有する分画に，蛋白量 10mg に対して各酵素 1 mg を低温で24時間作用させた後(pH 7.4)，その混合液を recipient に投与して活性を試験した。

7. $^{60}$Co 照射実験

島津製 $^{60}$Co 照射装置 (RTGS-2 型，2000 ci) を用いて，感作及び challenge を行なったモルモットに，challenge 後 3〜4 日目に全身 800 r 照射し，更に3〜4日目に採血屠殺し，その脾細胞及び血清を実験材料とした。対照として正常モルモット或は感作のみで，challenge を行なわないモルモットについても照射を行なって，脾細胞及び血清を採集した。

8. 病理組織学的検査

recipient の「ツ」テストを行なった局所について実験群，対照群の両者共標本を作成し，病理組織学的検索を行なった。標本はすべてヘマトキシリン，エオジン染色法によって染色した。

## 実験成績

第1節：生脾細胞による受身伝達実験

**第2表**は VC モルモットの生脾細胞による実験成績を示すものである。即ち，表の如く packed cell 1.0 ml（細胞数約 $10^8$個）を注射された recipient は注射直後（即時）は17匹全例について明瞭なツベルクリン感受性が認められたが，注射後1日目，3日目，7日目と日を経るに従って「ツ」感受性は微弱となり，14日目には6匹全例について反応陰性であった。即ち recipient の「ツ」感受性は移入された脾細胞によるものであって，所謂受身伝達であることが認められた。recipient に移入する細胞量を packed cell 0.5 ml (5×$10^7$ 個）とした場合は即時で16匹中15匹に「ツ」感受性が認められ「ツ」感受性の伝達はこの量でも充分可能であることが判明した。移入細胞量を packed cell 0.1 ml ($10^7$ 個）に減量すると recipient の皮膚反応は5例中2例陽性であったが，他の3例で陰性であり，1日目ではすでに5例全例が陰性であった。従って確実な「ツ」感受性の移入には少くとも VC モルモット生脾細胞 5×$10^7$ 個が必要であると思われた。

**第2表**　VC モルモットの生脾細胞によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験成績

| Recipient 投与脾細胞量 | ツベルクリン陽性 recipient＋動物数/recipient＋総数 静脈内投与後の日数 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | 直後 | 1日 | 3日 | 7日 | 14日 |
| $10^8$個 | 17/17 | 13/15 | 4/8 | 3/5 | 0/6 |
| 5×$10^7$個 | 15/16 | 9/13 | 2/14 | 2/5 | |
| $10^7$個 | 2/5 | 0/5 | | | |

第2節：各種処置を行なったモルモット生脾細

**第3表**　各種処理を行なった dororの生脾細胞によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験成績（細胞数 $10^8$ 個投与）

| donor 群 | 脾臓重量/体重 ×100 | ツベルクリン陽性recipient 動物数/recipient 総数 静脈内投与後の日数 | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | 直後 | 1日 | 3日 | 7日 | 14日 |
| N | 0.21 | 0/3 | 0/3 | | | |
| $V_1$ | 0.21 | 5/6 | 1/2 | 0/4* | | |
| $V_2$ | 0.23 | 4/4 | 1/2 | | | |
| VC | 0.78 | 17/17 | 13/15 | 4/8 | 3/5 | 0/6 |
| VC-Co | 0.29 | 0/9 | 0/7 | | | |

* 2日目

胞による伝達実験

第1節の成績で示されたように VC モルモット脾細胞 $10^8$ 個を用いれば「ツ」感受性の受身伝達は確実に可能であり，多くの recipient においては感受性の持続期間は1週間であった。challenge を行なわない $V_1$, $V_2$ 群について，生脾細胞 $10^8$ 個移入された recipient では移入直後の「ツ」感受性はかなり明瞭に認められたが（**第3表**），持続期間が VC 群の場合と比較して短かく，移入後2日目にはすでに全例が陰性化していた。一方対照群であるN群では同量の生脾細胞を用いた recipient では全たく「ツ」感受性が認められなかった。以上の実験成績より challenge という処置が脾細胞中に「ツ」感受性受身伝達因子を集積する作用があるものと考えられる。即ち，第3表の如く VC 群では他の群と比較して脾臓の腫脹が著明であった（正常の約3.7倍）。この VC モルモットの脾臓中には多数の小肉芽腫（**図1**）が認められ，類上皮細胞及び多数の単核細胞の浸潤が認められた。受身伝達因子は恐らくこの肉芽腫を形成する細胞内に含まれており，challenge により多数の細胞が脾臓に集積されるものと思われる。

第3節：脾細胞抽出液各分画によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験

VC モルモットの脾細胞より冷凍融解操作を反復して作製した脾細胞抽出液そのものを投与された recipient では，**第4表**に示す如く，$10^8$ 個相当量投与の場合も，$2\times10^8$ 個相当量投与の場合も，即時及び1日目では微弱な「ツ」感受性が認められたにすぎず，注射後3日目には，すでに陽性反応は全く認められなかった。細胞抽出液透析内液分画を投与された recipient の場合は $10^8$ 個に相当する量の同分画の投与で

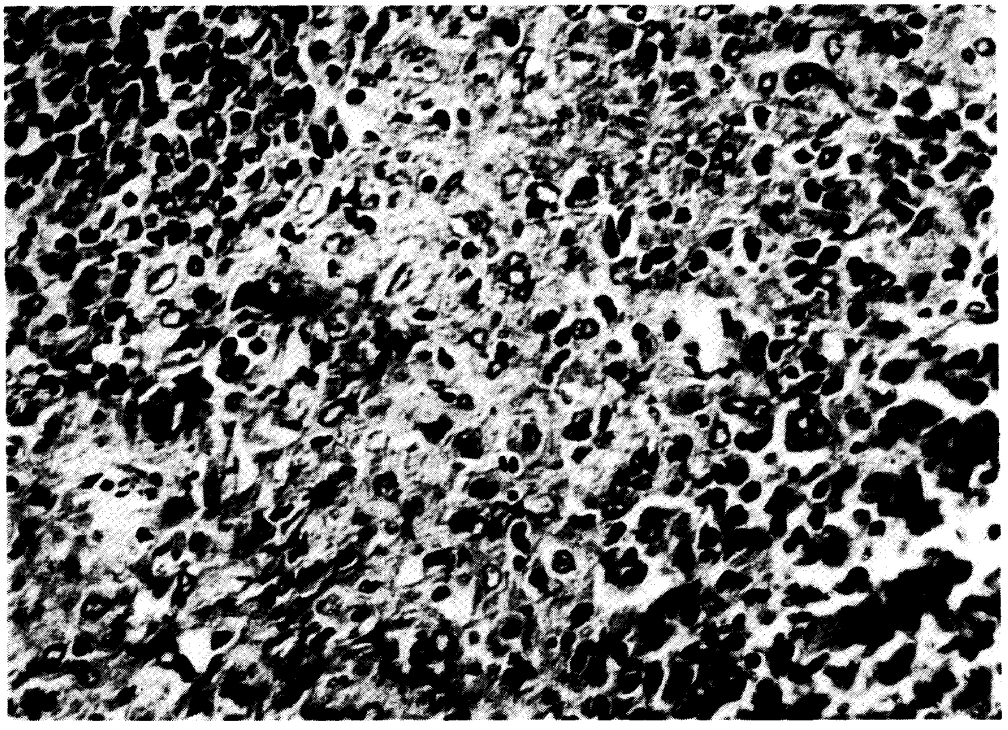

**図1**　VC モルモットの脾臓　境界が鮮明な類上皮細胞結節。

**第4表**　VC モルモットの脾細胞抽出液の各種分画によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験成績

| | | 投与した細胞相当量 (packed cell volume) | recipient のツベルクリン反応 (10μg PPD, 24時間, 硬結径 mm) 静脈内投与後の日数 | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | 直後 | 1日 | 3日 | 14日 |
| 細胞抽出液 | 原液 | 2 ml | +12×12<br>± 6× 6<br>− 0× 0　1/5<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | +12×10<br>+10×10<br>± 5× 5　2/5<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | ± 9× 9<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | |
| | | 1 ml | +13×10<br>+10×10<br>− 0× 0　2/5<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | − 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　0/5<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | − 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　0/3 | |
| | 透析内液 | 2 ml | − 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　0/5 | +12×11<br>+15×12<br>+12×10<br>+10×10<br>± 7× 7　4/7<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | +13×11<br>+11×10<br>+10×10<br>+10×10<br>+11×10　5/9<br>± 8× 6<br>± 8× 4<br>± 8× 6<br>− 3× 3 | − 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　0/5 |
| | | 1 ml | +10×10<br>± 7× 7<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　1/5 | +10×10<br>± 7× 5<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　1/9<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | +10×10<br>± 8× 6<br>± 7× 6<br>± 6× 5<br>± 5× 4　1/9<br>± 7× 5<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | − 0× 0　0/1 |
| | 透析外液 | 2 ml | − 0× 0<br>− 0× 0　0/2 | − 0× 0<br>− 0× 0　0/3<br>− 0× 0 | − 0× 0<br>− 0× 0　0/3<br>− 0× 0 | |
| | 透析内液 + 透析外液 | 2 ml | − 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　0/3 | ± 5× 5<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　0/7<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | − 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0　0/7<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | |

は recipient の「ツ」感受性は不明瞭であったが，その倍量に当る $2\times10^8$ 個相当量投与の場合は投与後1日目，3日目に明瞭な「ツ」感受性が認められた。一方，透析外液を投与された recipient では全く「ツ」感受性の伝達は認められなかった。従って，細胞抽出液自身では「ツ」感受性の伝達は殆んど認められないが，透析することにより低分子成分を除いた高分子分画は，明瞭な伝達活性を保有していることが証明できた。低分子成分の細胞抽出液の伝達因子の阻害能を確認する意味で，透析内液分画と外液分画の両分画を再び混合し（原液と同一），4°C—夜放置したものを注射した recipient では注射後1日目，3日目，いずれも「ツ」感受性を認めなかった。従って，この実験成績より透析外液分画は，伝達因子に対して活性阻害能を有することを実験的に証明されたものと考えられる。

第4節：細胞抽出液の Sephadex G-200 及び G-25 ゲル沪過分画による伝達実験

細胞抽出液のゲル沪過の結果は **図2** の如く C0, C1, C2, C3 及び C4 の5分画を得た。C1 は 19s グロブリンを含む高分子の蛋白分画，C2 は 7s グロブリン，C3 はリゾチームのような比較的低分子の蛋白分画，C4 は低分子物質を含

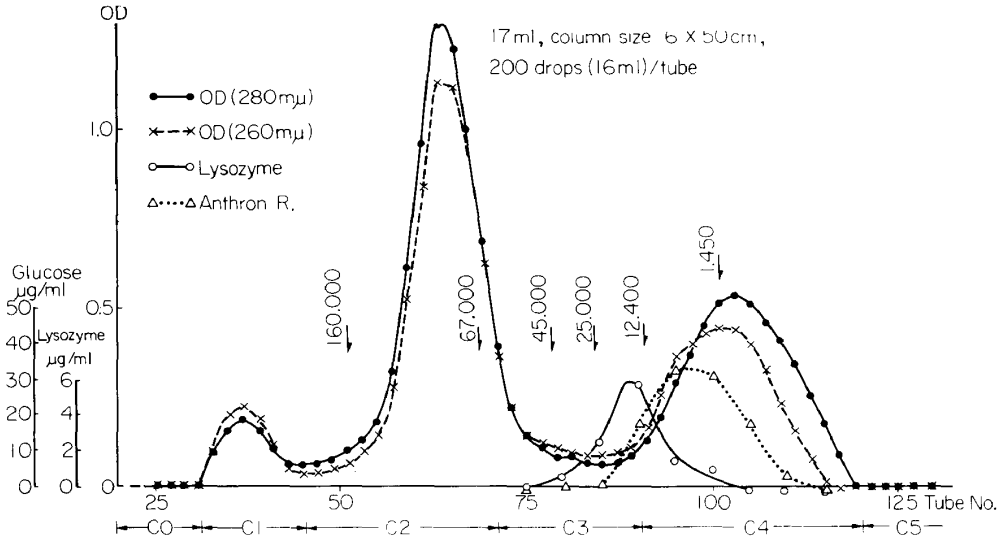


**図2**　VC モルモット脾細胞抽出液の Sephadex G-200 によるゲル沪過分画

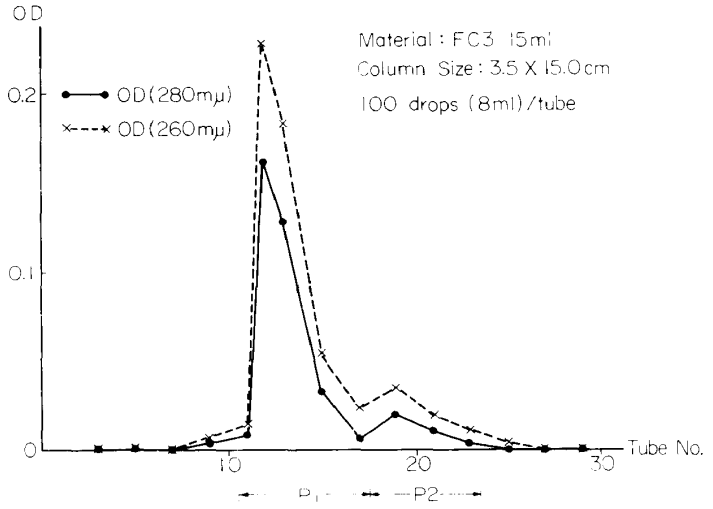


**図3**　Sephadex G-25 による FC3 の細分画

む分画であった。C1 及び C2 の両分画はセロファンチューブで透析後，生体内濃度の2倍まで濃縮して，recipient に投与した。C3 及び C4 の両分画は Sephadex G-25 を用いて脱塩した後，recipient に投与したが，C3 分画は，**図3**の如く Sephadex G-25 ゲル沪過により2つの蛋白分画(C3-P1, C3-P2)に分画されたので，各分画をそれぞれ別個に投与した。その実験成績は**第5表**に示す如く，C3-P1 分画に著明な活性を認めた。C3-P2 分画にも微弱な活性を認めたが，恐らく C3-P1 分画の tailing によるものと思われる。その他の分画即ち C0, C2 及び C4 分画には全く伝達活性は認めなかった。この C3-P1 分画の分子量は，**図2**に示した分子量既知の物質の溶出位置より推定して，15,000〜67,000と測定された。

第5節：ウサギの肺胞滲出細胞抽出液透析内液分画によるモルモットへの伝達実験

BCG 死菌による感作及び challenge を行なったウサギの肺胞滲出細胞抽出液を用いれば，ウサギからウサギへの「ツ」感受性受身伝達が可能であることについては，既に岡田[18]が報告している。著者はこの活性分画即ち肺胞滲出細胞抽出液透析内液分画を作製して，モルモットに対する「ツ」過敏症の受身伝達が可能であるか否かについて検討した。実験成績は**第6表**

**第5表**　VC モルモット脾細胞抽出液の Sephadex ゲル沪過によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験成績

| 分画 | | 投与した細胞相当量 (packed cell volume) | recipient のツベルクリン反応 (10 μg PPD, 24時間, 硬結径 mm) 静脈内投与後の日数 1日 | | 3日 | | 5日 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| C1 | | 2 ml | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/4 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/6 | −0×0<br>−0×0 | 0/2 |
| C2 | | 2 ml | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | ±8×8<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/4 | −0×0<br>−0×0 | 0/2 |
| C3 | P1 | 2 ml | +11×10<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 1/7 | +10×10<br>+13×11<br>+11×10<br>+10×10<br>+11×11<br>±8×7<br>±6×6<br>−0×0<br>−0×0 | 5/9 | ±6×6<br>−0×0 | 0/2 |
| C3 | P2 | 2 ml | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/6 | +10×10<br>±10×7<br>±10×9<br>±9×9<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 1/7 | −0×0<br>−0×0 | 0/2 |
| C4 | | 2 ml | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | ±9×7<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/5 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 |
| CO (対照) | | 2 ml | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/4 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/7 | −0×0<br>−0×0 | 0/2 |

**第6表**　VC ウサギ肺胞浸出細胞透析内液分画によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験成績

| recipient | 相当細胞量 (ml) | ツベルクリン反応 (10 μg PPD, 24時間, 硬結径 mm) 直後 | | 1日 | | 3日 | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| モルモット | 1 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | −0×0<br>−0×0 | 0/2 | −0×0<br>−0×0 | 0/2 |
| モルモット | 3 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/6 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 |
| ウサギ | 5 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | ±8×7<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | +12×11<br>+10×10<br>±9×8 | 2/3 |

の如く，recipient であるモルモットにおける「ツ」反応は，細胞相当量 1 ml を移入した場合も，3 ml を移入した場合もすべて陰性であり，ウサギからモルモットへの「ツ」感受性の伝達は認められなかった。

第6節：酵素処理による死活実験

「ツ」感受性受身伝達因子の本態については，従来これが RNA であるとする説と，低分子の蛋白とする説とがある。著者はモルモットの伝達因子の本態を究明する目的で，トリプシン処理及び RNAse 処理により，伝達因子の活性

**第7表**　酵素処理した活性分画 (C3-P1) によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験成績

| 分　画 | Recipientのツベルクリン反応 (10 μg. PPD, 24時間, 径mm) 1日 | 3日 |
|---|---|---|
| C3-P1 分画（対照） | ＋10×10<br>± 6× 6<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | ＋11×11<br>＋11×10<br>＋10×10<br>＋10×10<br>− 0× 0<br>− 0× 0 |
| トリプシン処理した C3-P1 分画 | ± 7× 7<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 | ± 7× 7<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0<br>− 0× 0 |
| RNAse 処理した C3-P1 分画 | ± 8× 7<br>± 7× 5<br>± 7× 5<br>− 0× 0 | ＋12×10<br>＋13×10<br>± 9× 8<br>− 0× 0 |

が変化するかどうかを確めるため実験を行なった。その成績は**第7表**の如く，トリプシン処理により活性分画 (C3-P1) の活性が完全に消失したのに反して，RNAse 処理では活性に変化が認められなかった。

第7節：ツベルクリン注射部位の病理組織学的検索

活性分画を静脈注射した recipient の「ツ」テスト部位を生検し，その病理組織標本について検索した。「ツ」テスト実施後24及び48時間後の変化は，単核細胞の浸潤と皮下の浮腫を認めるが，好中球の浸潤は殆んど認められなかった（**図4**）。この変化は，donor の反応或は生脾細胞を移入した場合と比べて，一般に軽度であり，皮膚反応の強さと細胞反応の強さとは平行していた。斯様に細胞抽出液の活性分画による反応は，細胞浸出の程度において差がみられるようであるが，その性格は同一のものであり，従って組織学的所見からも「ツ」過敏症の伝達が行なわれたことを意味するものと考えられる。

第8節：$^{60}$Co 照射実験

動物におけるツベルクリン過敏症を，結核感作動物の血清を用いて行なおうとする試みは Cole & Favour[10] らによって試みられたが，その成績については一般の承認を受けるに至っていない。Dupuy ら[19,20] は PPD に対する特異的皮膚反応は，大量のX線照射を受けた結核感作モルモットの血漿，若しくは血清を用いて受身伝達されると報告した。

著者は VC モルモットに $^{60}$Co 800 r 全身照射すると，**第3表**に示す如く，脾臓が縮少し，

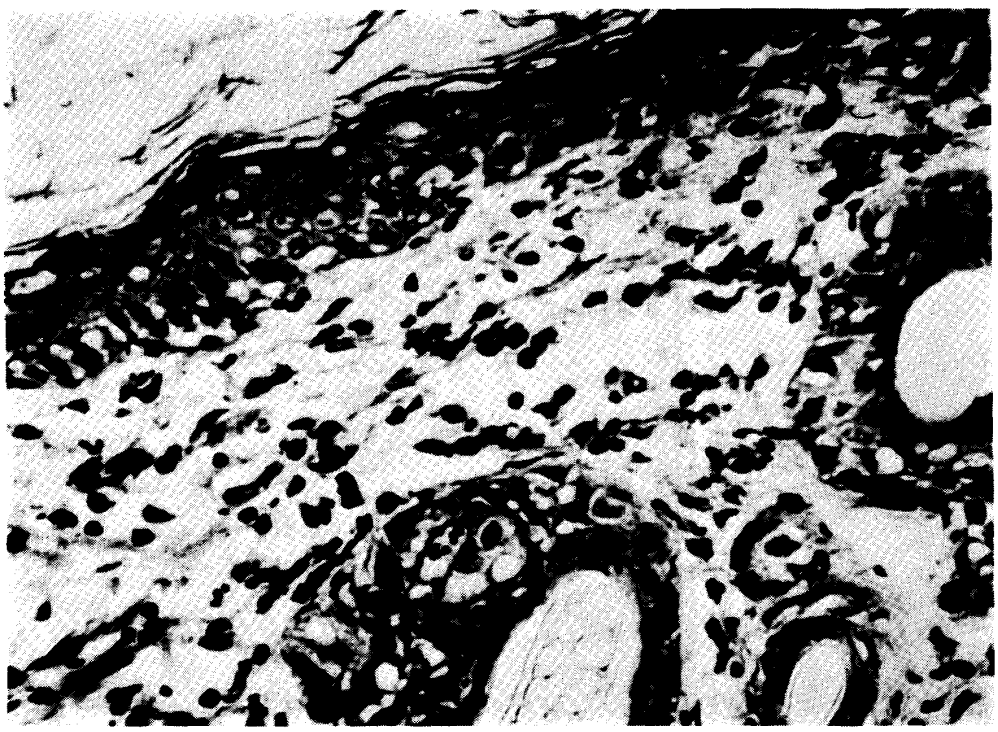

**図4**　recipient のツ反応部位の皮膚　皮下組織内への単核球の浸潤。

**第8表**　各種モルモットの血清材料によるツベルクリン過敏症の受身伝達実験成績

| donor群 | 血清材料を注射後3日目のツベルクリン反応 (10 μg PPD, 硬結径 mm) | | | | ツベルクリン陽性 recipient 動物数 / recipient 総数 |
|---|---|---|---|---|---|
| | 透析内液 | | 透析外液 | | 血清(透析前) |
| N | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/6 | | | |
| V | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | |
| VC | +15×13<br>±8×8<br>±6×6<br>±8×7<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 1/9 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/3 | |
| VC-Co | +14×14<br>+12×10<br>+10×10<br>+12×12<br>+10×10<br>+10×10<br>+10×10<br>+11×10<br>±7×6<br>±9×8<br>±5×5<br>±5×5<br>−0×0<br>−0×0 | 8/14 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0<br>−0×0 | 0/5 | −0×0<br>−0×0<br>−0×0 　0/3 |

且つ生脾細胞を注射した recipient の皮膚反応はすべて陰性であった。そこでこの動物の血清及び上記の実験に用いた donor の血清を用いて，「ツ」過敏症の伝達を試みた。血清を透析し，内液と外液に2分した後，夫々3日間連続腹腔内注射によって計 20 ml 投与した。実験成績は**第8表**の如く，透析内液分画を注射された recipient は，注射終了後3日目に14匹中8匹が「ツ」反応陽性であった。一方全血清或は透析外液分画を注射された recipient は，すべて反応が陰性であった。対照であるN群，V群の血清を用いた実験では，recipient の反応はすべて陰性であり，又VC群においては，その血清透析内液によって9匹中1匹に陽性反応を認めたに過ぎなかった。この実験成績より結核死菌により感作及び challenge を行なった donor を $^{60}$Co で全身に大量照射すると伝達因子は脾細胞より流血中に遊離すると思われる。

## 考　按

動物における「ツ」過敏症の受身伝達因子に関しては，先に泉[21]がウサギの肺胞滲出細胞中の同因子について報告している。その後岡田[18]は Sephadex ゲル沪過法により肺胞滲出細胞抽出液の分画実験を行ない，その実験成績よりウサギの伝達因子としては，比較的低分子の蛋白様物質（分子量15,000〜60,000）を分離した。この成績は著者のモルモット脾細胞より分離した伝達因子と略同様の成績であった。しかし岡田のウサギを用いた実験には若干の問題が残された。その第1は，recipient として使用されたウサギについて，「ツ」による予備テストを必要としたことである。即ち，これらのウサギはしばしば購入時に「ツ」反応陽性のものが混っていたため，受身伝達実験前に予め「ツ」テストを行なって，「ツ」反応陽性動物を除かねばならなかった。従って「ツ」抗原で recipient を感作する結果となり，伝達因子移入後の recipient の反応の解釈を困難にした。

著者の実験では，モルモットを使用したが，このモルモットは購入時すべて「ツ」反応陰性であることを予備実験で確めてあり，従って recipient に使用する動物は予め「ツ」テストを実施する必要がなかった。

更に著者の実験では，成績の正確を期するため同一の recipient については「ツ」テストを1〜2回に制限した。そのため recipient として多数の動物を必要としたが，このような厳重な条件下で行なった著者の実験成績が，ウサギにおける実験成績と略同様であったということは，岡田の実験成績について提起された疑問を解消する結果となった。このことは，従来生細胞を用いなければ伝達し得ない[2,12,14]とされていた遅延型過敏症の受載伝達が，cell free extract によっても可能であることを確認したこととなると共に，伝達因子の化学的同定も理論的には必ずしも不可能でないことを示唆するものとして，今後の免疫学の研究に極めて重要な意義を

有するものと思われる。

Dunn & Patnode ら[22]は結核感作モルモット（challenge せず）の脾細胞，肺胞滲出細胞及び末梢血白血球抽出液を用いて，「ツ」過敏症の受身伝達に成功したと報告し，その結果比較的高分子の蛋白様物質と，RNA 様の物質の2種類の「ツ」過敏症伝達因子を証明したと報告した。しかし donor に challenge を行なわなかったためか，recipient の皮膚反応は陽性のものでも径 10 mm 未満で，著者の実験成績で径 10 mm 以上の硬結を陽性としたものに比べると全体に反応が微弱であり，その信頼性に疑問の余地が感じられる。

著者が行なった実験成績からすると，感作後の donor に challenge を行なうと，モルモットの脾臓に集中的に伝達因子を保有する細胞を集め得ることが明らかとなった。これは先に岡田がウサギにおいて同様の処置を行なった際，肺臓に「ツ」反応伝達因子に富む肺胞滲出細胞が多数集まることを認めたのと類似している。しかし，その taget organ がウサギとモルモットで異なるという点は誠に興味深い事実である。

Dupuy ら[19,20]は結核感作モルモットを $^{60}$Co で照射すると，その血漿中に受身伝達因子が出現すると報告した。血漿中の受身伝達因子に関しては，別に Kochan[16] や岡田も一定の実験条件下でその存在を認めている。

著者は結核死菌による感作及び challenge を行なったモルモットについて $^{60}$Co を照射し，血漿中の伝達因子を追求した結果，照射前脾細胞中に存在した伝達因子が照射後多量に流血中に遊離するという現象を認めた。この事実は，従来 cell fixed と思われていた遅延型過敏症の受身伝達因子が，一定の実験条件下では細胞から遊離して存在しうるという点で，従来の既成概念を改めさせる重要な事実である。

著者の分離した受身伝達因子の反応機構については，活性分画を注射した recipient の反応が，生細胞移入の場合と異なって，24～48時間遅れて発現するという点に特徴がある。先に安平[23]は感作動物の食細胞内に取り込まれた結核死菌，或は菌体成分による能動感作であるかもしれないという疑問を提出しているが，この点に関しては，結核死菌感作及び challenge を行なったウサギの肺胞滲出細胞抽出液活性分画が，ウサギに対しては「ツ」過敏症を伝達し得るけれども，モルモットに対しては全く活性が認められないという著者の実験成績より，結核菌体成分による能動感作の可能性は全く否定出来る。従って，recipient の反応出現時が遅い理由としては，むしろ伝達因子が recipient 体内でリンパ球或は macrophage に作用し，これらの細胞が感受性を獲得するに要するための時間が必要なためと考えられる。

Bloom & Chase[14] は遅延型過敏症が生細胞以外の実験材料，例えば細胞抽出液や血清によって受身伝達されることに強く反対した。即ち脱毛剤による「ツ」注射部位の非特異的刺戟作用などを理由に，細胞抽出液や血清を投与された recipient における反応「陽性」の判定を鋭く批判している。このように recipient の皮膚反応が非特異的刺戟による反応ではないかという点に関しては，著者の実験では，この点を考慮して脱毛剤は全く使用していないし，又正常脾細胞を注射した対照群や非活性分画を注射した群では，全く陽性反応を認めなかった点からも，非特異的刺戟反応であることは否定し得ると考える。

「ツ」過敏症受身伝達因子の本体は，著者の実験成績よりすれば分子量 15,000～67,000 の比較的低分子の蛋白様物質であると推定されるが，それ以上の詳細は尚不明である。しかし，その分子量からみて少くとも所謂 conventional antibody とは異なる物質であることは確実と思われる。

先に Bloom & Bennett[24] はモルモットのリンパ球を PPD 添加培地中で組織培養し，その上清中に PPD の存在下で macrophage の遊走を阻止する "Migration Inhibitory Factor (MIF)" を証明して報告した。この MIF の分子量は，著者がモルモット脾細胞より分離した伝達因子の分子量によく類似している。即ち著者の伝達因子の分子量は 15,000～67,000 と推

定され，一方 MIF の分子量は最初 60,000～70,000 と報告されたが，その後，Bloom & Jimenez[25] は血清を用いない培養系より得た MIF の分子量は，ゲル沪過及び庶糖密度勾配遠沈で 25,000～50,000 と報告している。このことから著者の分離した活性分画中には MIF が含まれている可能性が充分考えられる。更に MIF は非透析性で[26] 56°C 30分では破壊されないが，80°C 30 分では失活すること[27]，chymotrypsin 処理で完全に失活し[28]又 trypsin 処理でも活性が減弱すること，DNAse, RNAse では失活しない[29] ことから蛋白様物質と考えられる。これらの諸性質は著者の分離した活性物質と類似している点が多い。著者の実験においては結核感作モルモットに結核菌を静脈注射 (challenge) することにより，donor のTリンパ球を刺戟して in vitro において種々の lymphokins を産生することになるであろう。従って著者の実験は，この lymphokins の一つである MIF が recipient に注射されることにより，その recipient が「ツ」感受性を獲得することを個体レベルで証明した実験と言い得るかもしれない。しかしこの点に関しては今後の検討に待たねばならない。

## 総　括

1. 結核死菌で感作及び challenge をうけたモルモットの脾臓内に多数の肉芽腫形成を認め，この脾細胞内にツベルクリン過敏症の受身伝達因子が豊富に存在している。
2. 上記脾細胞を破壊して作成した抽出液中の高分子成分は「ツ」感受性の受身伝達活性を有するが，低分子成分は上記伝達因子の活性を阻害する作用を有する。
3. 脾細胞抽出液の Sephadex G-200 及び G-25 ゲル沪過による分画の結果，C3 の細分画 C3-P1 分画に著明な活性を認めた。又伝達因子の分子量は15,000～67,000と測定された。
4. ウサギの肺胞滲出細胞抽出液透析内液分画 (FC3-P1) で，モルモットに対して受身伝達は認められなかった。
5. 「ツ」感受性受身伝達因子は，トリプシン処理によって活性が完全に消失し，RNAse 処理では活性に変化は認めなかった。従って同因子は蛋白様物質と推定される。
6. 活性分画を静脈注射した recipient の「ツ」テスト部位を生検し，病理組織学的検索を加えた結果，単核細胞の浸潤と皮下の浮腫を認めることから，組織学的所見からも「ツ」過敏症の伝達がなされたことが明らかとなった。
7. VC モルモットに $^{60}$Co を全身照射した後，その生脾細胞によつては「ツ」過敏症の受身伝達はできなかったが，その動物の血清の透析内液を腹腔内注射（3日間連続，計 20 ml）することにより，「ツ」過敏症の伝達ができた。即ち感作及び challenge を行なった donor に $^{60}$Co で大量照射すると伝達因子が脾細胞より流血中に遊離することが証明された。

## 謝　辞

稿を終るに臨み，御指導，御校閲を賜わりました辻周介教授に篤く御礼申し上げます。又，研究面で，終始，御指導を頂いた大島駿作助教授並びに御協力をいただいた小原幸信講師，泉孝英博士に深く感謝いたします。実験遂行の上で御協力をいだいた今井保代氏，吉田修子氏に感謝いたします。

## 文　献

1) Chase, M. W.: The cellular Transfer of Cutaneous Hypersensitivity to Tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 59: 134–135, 1945.
2) Kirchheimer, W. F. & Weiser, R.S.: The tuberculin sensitivity with cells of tuberculous guinea pigs. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 66: 166–170, 1947.
3) Metaxas, M. N. & Metaxas-Bühler, M.: Passive transfer of local cutaneous hypersensitivity to tuberculin. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 69: 163–165, 1948.
4) Stavitsky, A. B.: Passive cellular transfer of tuberculin type of hypersensitivity. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 67: 225–227, 1948.

5) Nishioka, K.: Studies on the specific changes of host cells in the course of infection I. Report. Experiments of the tuberculin hypersensitivity. Jap. J. Exp. Med., 20: 665–672, 1950.

6) Schmid, F.: Die passive Übertragbarkeit den Tuberkulinallergie. Beitr. Klin. Tbk., 105: 397–402, 1951.

7) Lawrence, H. S.: The cellular transfer of cutaneous hypersensitivity to tuberculin in man. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 71: 516–522, 1949.

8) Baram, P. & Mosko, M. M.: Chromatography of the human tuberculin delayed-type hypersensitivity transfer factor. J. Allergy, 33: 498–506, 1966.

9) Baram, P., et al.: Studies on the transfer of human delayed-type hypersensitivity, I. Partial purification and characterization of two active components. J. Immunol., 97: 407–420, 1966.

10) Cole, R. & Favour, C. B.: Correlations between plasma protein fractions, antibody titers, and the passive transfer of delayed and immediate cutaneous reactivity to tuberculin PPD and tuberculopolysaccharides. J. Exp. Med., 101: 391–420, 1966.

11) Ehrenkranz, N. J. & Waksman, B. H.: Failure to transfer tuberculin sensitivity passively with plasma fractions containing alpha globulin. J. Exp. Med., 109: 935–945, 1956.

12) Bauer, J. A. & Stone, S. H.: Isologous and homologous lymphoid transplants, I. The transfer of tuberculin hypersensitivity in inbred guinea pigs. J. Immunol., 86: 177–189, 1961.

13) Turk, J. L.: Active sensitization to tuberculin with cells from tuberculin-sensititzed guinea pigs. Nature, 189: 889～890, 1961.

14) Bloom, B. R. & Chase, M. W.: Transfer of delayed-type hypersensitivity. Progr. Allergy, 10: 151–255, 1967.

15) Rothman, U. & Lidén, S.: Passive transfer of delayed hypersensitivity to 2,4-dinitrochlorobenzene and tuberculin by the immunoglobulin A (IgA) fraction of guinea pig serum. Acta derm.-vernereol., 47: 1–8, 1967.

16) Kochan, I. & Bendel, W. L.: Passive transfer of tuberculin hypersensitivity in guinea pigs. J. Allergy, 37: 284–294, 1966.

17) Tsuji, S. et al.: Studies on the "Transfer Factor" of tuberculin hypersen sitivity in animals, I. Observation of succesful passive transfer of tuberculin hypersensitivity with fractions of either disrupted alveolar macrophages or serum of sensitized and challenged rabbits. J. Immunol., 98: 838–849, 1964.

18) 岡田長保：ツベルクリン感受性伝達因子の化学的性状に関する研究，II．ウサギ血漿中に存在する伝達因子の分離精製．京大結研紀要，14：140～154，1964.

19) Dupuy, J. M.: Passive transfer, with plasma, of delayed allergy in guinea pigs. Lancet, 7594: 551–553, 1969.

20) Dupuy, J. M. & Good, R. A.: Role of lymphoid cells in passive transfer with plasma of delayed hypersensitivity in guinea pigs. J. Immunol., 105: 1111–1115, 1970.

21) 泉孝英：ツベルクリン感受性伝達因子に関する研究，II．ウサギの Alveolar Macrophages 及びその細胞画分並びに血清画分による「ツベルクリン」感受性の受身伝達アレルギー，13：583～592，1964.

22) Dunn, D. J. & Patnode, R. A.: Passive transfer of tuberculin hypersensitivity with cellular fractions from sensitized guinea pigs. J. Immunol., 99: 467–475, 1967.

23) Yasuhira, K.: The role of lymphocyte in connection with tuberculin immunity. Acta Haemat. Jap., 24: 100–109, 1961.

24) Bennett, B. & Bloom, B. R.: Reactions in vivo and vitro produced by a soluble substance associated with delayed-type hypersensitivity. Proc. New York Acad. Sci., 59: 756–762, 1968.

25) Bloom, B. R. & Jimenz, L.: Migration inhibitory factor and the cellular basis of delayed-type hypersensitivity reactions. Amer. J. Path., 60: 453–465, 1970.

26) David, J.: Delayed hypersensitivity in vitro: Its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. Proc. Nat. Acad. Sci., 56: 72–77, 1966.

27) David, J.: Proc. of the 3rd International Pharmacological Meeting Pergamon, London, 1966.

28) Remold, H. G. & David, J. R.: Cellular hypersensitivity: Characterization of migration inhibitory factor (MIF) by enzymatic treatment. Fed. Proc., 29: 305, 1970.

29) David, J. R.: Macrophage migration. Fed. Proc., 27: 6-12, 1968.