

遅延型皮膚アレルギー感受性の受身伝達に関する研究

〔第3篇〕 Alveolar Macrophage 抽出液の電気泳動分画によるツベルクリン感受性の受身移行の試み

京都大学大学院学生（主課目担当教授 西尾 雅七）

京都大学結核研究所第2部研究員（主任教授 辻 周介）

大 城 盛 夫

（昭39. 2.26受付）

緒 言

第1篇に記載した如く、Chase (1945)¹⁾の発表以来数多くの報告が、感作動物より得たリンパ細胞の移植によって、遅延型皮膚過敏性の受身移行に成功したことを報じてきた。これ等の実験では何れも生きた細胞の移植によって、その陽性成績が齎されたものであって、細胞を能滅または破壊に導くときは、その過敏性伝達色が失われると述べられている。これに対し少数の報告ではあるが、感作細胞の破壊産物の移入によって、同様に過敏性の伝達が可能であると主張しているものがある。即ち先づ Jeter ら (1954, 1957)²⁾³⁾は感作モルモットの腹腔滲出細胞の超音波破壊上清で遅延型の薬物皮膚アレルギーが、次いでツベルクリン（以下「ツ」と略す）感受性の伝達が行われ得たと報告し、Lawrence (1955)⁴⁾は人の白血球冷凍融解液の一定分画を用いて、「ツ」並びにヂフテリヤトキソイドに対する感受性の受身伝達に成功したと報告した。Cumming (1956)⁵⁾も亦超音波で破壊した感作モルモットの腹腔滲出細胞及び脾臓細胞を用いて同じ成功をおさめたが、その報告の中で彼は「ツ」感受性伝達因子が細胞破壊の操作によって、同時に破壊される可能性に注意を喚起している。わが国においては最近 Yasuhira et al (1961)⁶⁾⁷⁾によって、感作細胞破壊物による「ツ」感受性の受身移行の可能性が広く探求され、感作家兎の腹腔滲出細胞やリンパ細胞のミトコンドリア並びにマイクロゾーム分

画で、「ツ」感受性の移行が可能であるが、抗原である結核菌が細胞分画に混入して recipient に移植される可能性のあることが明らかで、この点に留意することなくして「ツ」感受性の受身移行の可否を論ずべきではないと述べている。

一方 Myrvik (1961)⁸⁾は感作家兎に結核菌を静脈内注射することにより、肺胞内から多量の alveolar macrophage を採集する方法を提案した。既に Yasuhira (1961)⁶⁾はこの方法によって得た alveolar macrophage を使用して、「ツ」感受性の受身移行に成功しているのであるが、著者は更にこの細胞の破壊抽出物より、「ツ」感受性伝達因子を取出すことを企てた。以下方法の詳細と得られた結果について記載する。

実験材料及び実験方法

動物：体重 2~3kg の白色家兎を用いた。実験前凡ての家兎について「ツ」反応陰性であることを確めた。

ツベルクリン液：国立予防衛生研究所製旧ツベルクリン液を、通常生理的食塩水（以下生食水と略す）で5倍或いは10倍に稀釈して使用した。

感作方法：BCG 加熱死菌 50mg を 2ml の Freund の incomplete adjuvant に浮游させた後、1ml 宛家兎の両側大腿部皮下に注射した（以下本文中単に「感作」と述べる時はこの処置のみを指す）。

感作3～4週間後「ツ」反応が陽性（通常10倍稀釈「ツ」液で径20mm程度の発赤硬結）であることを確かめた後、BCG加熱死菌5mgの生食水浮游液を耳静脈より注射した（以下これを“challenge”と呼ぶ。）

alveolar macrophage 採集方法：Challenge 4日後の家兎を屠殺，開胸，気管を頸部で切断し，肺臓を損傷しない様に取り出して，これを気管の断端を支点として懸垂する。気管よりHanks氏液を注入し，肺胞内の細胞を洗い出し，この操作を繰返し行って得た液を遠心沈澱（1,000回転，20分間）し，得られた細胞を目盛付きスピッツグラスに生食水で再浮游させ，再び同様に遠心沈澱して細胞量を測定した（packed cells と呼ぶ）。通常1匹の感作家兎より，2～3mlのpacked cellsを得ることが出来る。1mlのpacked cellsは $3\sim 6\times 10^8$ 個の細胞を含んでおり，その大部分は活発な嚥食能を有する大型の単核細胞であったが，10～20%にリンパ球や少数の巨細胞を混じていた。対照としてこれとは別に，感作のみを行ってChallengeを行わなかった動物，及び全く無処置の動物を選び，同様に肺を取り出して，Hanks氏液によって肺胞細胞を洗い出した。この場合細胞採集量はchallenge群に比し格段に少く，感作のみの動物では約0.5mlのpacked cellsが，無処置動物よりは約0.2mlのpacked cellsが1匹の動物より得られるに過ぎなかった。細胞種は，感作のみの場合は約75%が単核球で，残り約25%が好中球，リンパ球及び気管支上皮細胞であり，正常家兎では約85%が単核球，残りの約15%にその他の細胞を混じていた。

細胞抽出液の作製方法：packed cellsに4倍量の蒸留水を加えた後，凍結融解操作を5回繰返して細胞を破壊して遠心沈澱（1,000回転，20分間）し，得られた上清を凍結乾燥器で約 $\frac{1}{2}$ 量に濃縮し，これを“細胞抽出液”として実験に使用した。

zone electrophoresis による細胞抽出液の分画方法：第2篇におけると同様Kunkelの方法に従って，澱粉カラム（ $2\times 5\times 45\text{cm}$ ）によるzone electrophoresisを行って，第1図の如く

4分画に画分した。即ち泳動された抽出液は，血清分画の γ -globulin相当部にみられる最大の峰の他，多くの場合に合計4個の峰を有している。従って峰を1個宛含む画分を，陽極側より逐次A，B，C及びDと呼称した。これにより，A分画は血清のalbumin分画に相当することとなり，B，C及びD分画は夫々 α -， β -及び γ -globulin分画相当部に位置することとなった。電気泳動条件，分画抽出操作等はすべて第2篇に記載の如くである。

電気泳動分画による「ツ」感受性の受身伝達実験方法：

1) 局所性受身伝達実験方法：一前2篇と同様に，泳動で得た各分画をセロファン膜で透析し，凍結乾燥器で濃縮した後，その0.1mlを正常家兎側腹部皮内に注射し，その後24時間して旧「ツ」10倍液0.1mlを同一局所に再注射することにより，局所性受身伝達の成否を実験した。

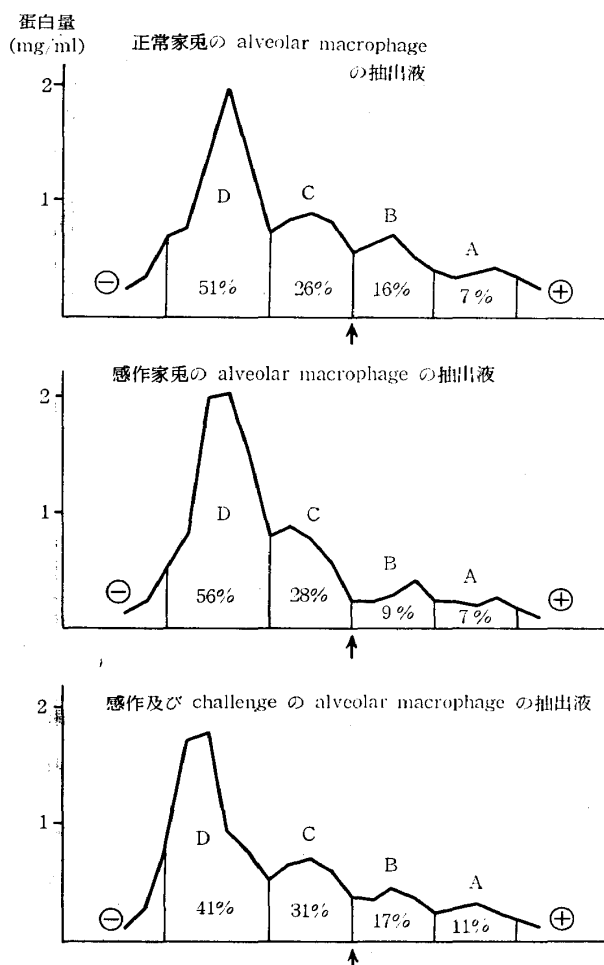
2) 全身性受身伝達実験方法：一細胞抽出液より得た各分画を濾過器を通して滅菌し，健康家兎の耳静脈内に注射した。その後一定時日（直後，1，3，7，14日等）に5倍及び10倍稀釈の旧「ツ」液を，両者同時にrecipientの側腹部皮内に注射して5，24及び48時間の3回に亘って局所変化を観察した。この操作によって出現する「ツ」反応は，能動免疫による感作家兎の「ツ」反応とは大いに異り，ごく僅かの発赤があるのみで硬結は全く認められなかった。それ故発赤の直径を測定し，これを判定の基準とした。

実験成績

1) 細胞抽出液の電気泳動像：正常無処置家兎肺より得た細胞抽出液，感作動物のそれ，またchallengeを行った動物より得た抽出液の各々の泳動像が第1図に挙げられている。図によればこの3者間で泳動像に著差が認められないが，元来この方法による細胞抽出液の泳動像には各資料間での差異が著しく，感作或いはchallengeによる泳動曲線の変化，或いは各分画毎の蛋白量の変化を明らかにすることは現在の段階では到底出来難いことの様に思われた。

第1図

Alveolar Macrophage の抽出液の電気泳動分画像
澱粉カラム $2 \times 5 \times 45 \text{ cm}$, 250 V , 2 mA/cm^2 , 30 時間



従って以下の実験成績には、一応夫々の泳動曲線を、その移植成績に添加して示すこととした。

2) 細胞抽出液及びその分画による「ツ」感受性の局所性受身伝達：正常、感作及び challenge した家兎の肺細胞抽出原液またその電気泳動各分画の皮内接種による局所性受身伝達の成否の検討が多数の動物を使用して行われた。しかし得られた成績は非常に不安定で、成績の向うところを明らかにすることは出来なかった。これは細胞抽出液のもつ強い非特異的な起炎性によるもので、同じ現象が脾臓や骨髓細胞の水抽出液を使用した場合にも認められた。

3) 細胞抽出液の電気泳動分画による「ツ」感受性の全身性受身伝達：実験成績の一部が第2図として示されている。これは何れも、感

作後 challenge を行った家兎の細胞抽出液を使用した場合の成績であって、分画注射動物におこる「ツ」反応の陽性転化が認められるが、多くはその成績が不均一で、独りD分画が注射された recipient においてのみ、毎常確実に「ツ」感受性の伝達が認められた。即ちD分画注射直後の recipient で「ツ」反応は明らかに陽性となり、1日目、3日目と次第に「ツ」反応感受性は減弱し、7日目には全く感受性が認められなくなることが多かった。しかし場合によっては7日を過ぎて「ツ」反応感受性が再現し、或いは増強する場合も認められ、recipient の「ツ」反応は二相性に現われるものの如くであった。B分画或いはC分画の移入によっても、その約半数に「ツ」反応の陽転が認められた。しかしこの場合、現われた反応はD分画移入時に比して軽度であるが、反応は同様に二相性に出現する。反応陽性を来した多くの例で、その移入したB或いはC分画に、泳動の原点が含まれていたことは注意せねばならないと思う。A分画の移入では、殆んどの場合、recipient の「ツ」反応はすべて陰性で、例外的に7日以後になって「ツ」反応の陽転する例が認められた。即ちA分画では「ツ」反応感受性の第2相のみが出現する。

対照として行った正常家兎及び感作のみ行った家兎の細胞抽出液より得たすべての分画によっては、「ツ」反応感受性の受身伝達は全く証明できなかった。

考 按

著者は、BCG 死菌静脈内 challenge を行なった感作家兎の、alveolar macrophage の冷凍融解によって得た細胞抽出液を用いて、「ツ」感受性の受身伝達に成功した。加えて「ツ」アレルギー感受性の「伝達因子」ともいふべき factor が、主として抽出液電気泳動分画中のD分画、即ち γ -globulin に相当する分画に存在するという結論に到達した。

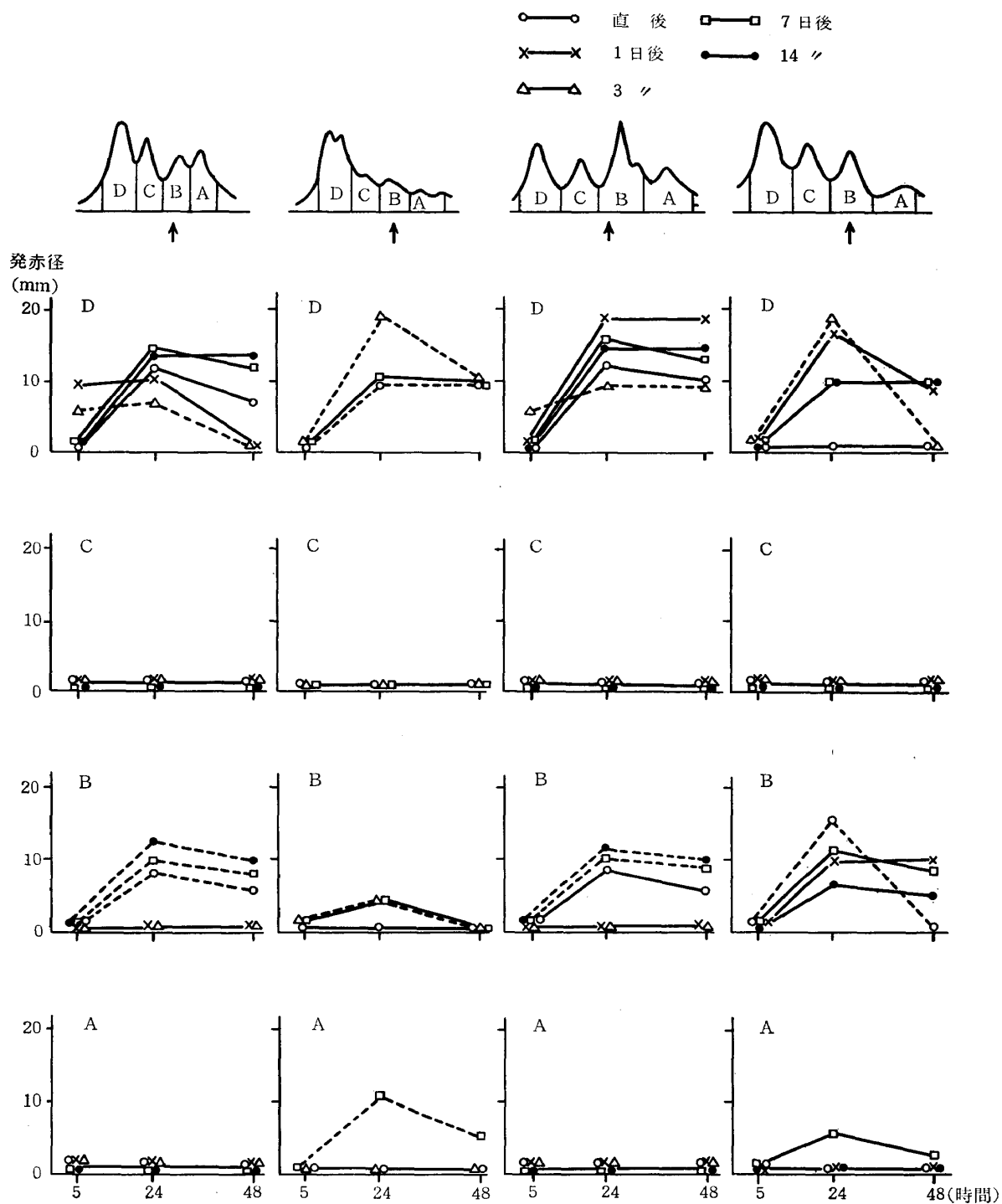
元来「ツ」過敏性は、定型的なアレルギー反応の一つとして周知のところであるが、数多くの研究にも拘らず、その過敏性を担う抗体を同

定し得ないまま、これを特殊な範疇に閉じこめてきたのである。しかるに Chase¹⁾ に始った細胞移植による「ツ」過敏性伝達の成功が、その抗体の産生に関する細胞種を明らかにしたのである。しかし更に進んで、感作された生細胞

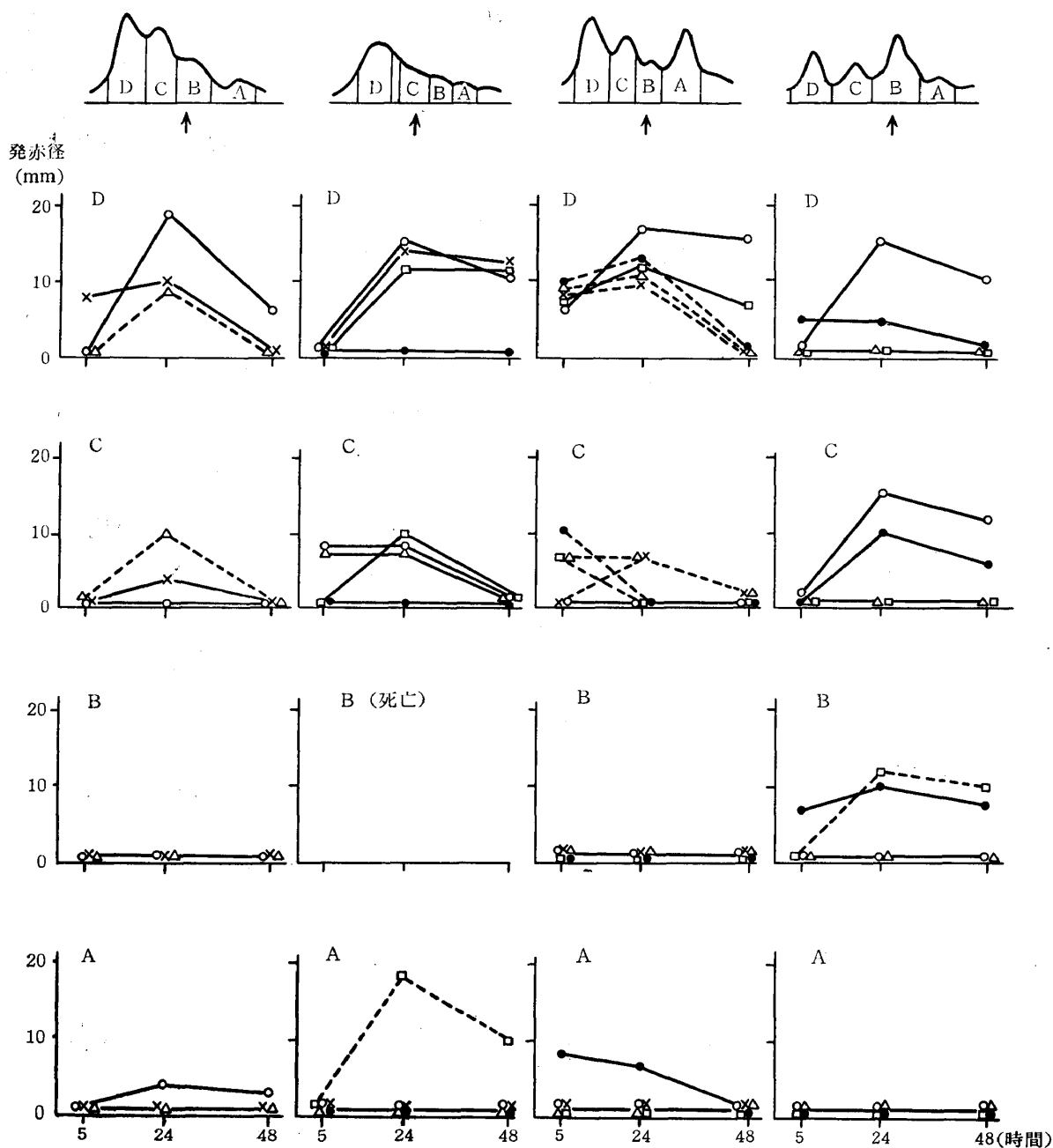
という最後のヴェールを取除き、「ツ」反応抗体を他のアレルギー反応系と同様に、化学物質として明らかにしようとする試みが進んでいる。Jeter³⁾, Lawrence⁴⁾, Cumming⁵⁾, Yasuhira^{6,7)}, らの成績は感作細胞の破壊物によっても

第 2 図 (I)

Alveolar Macrophage 抽出液各分画による「ツ」過敏性の全身性 Passive Transfer 実験成績



第 2 図 (II)



「ツ」過敏性が伝達されることを示しており、またミトコンドリア以下の小粒子を含む細胞分画に、その感受性伝達能のあることを明らかにしているのである。

「ツ」感受性の受身伝達に使用する細胞種に関しては、前述した腹腔滲出細胞の他に、各種のリンパ組織がその細胞給源として使用されてきた。近年感作動物の肺に各種の結核菌体成分を注入する実験の進行に伴って、結核病巣がアレルギー反応として成立することが明らかにさ

れてきた。この際肺胞に滲出した所謂大滲出細胞が、その後器質化して結核結節を形成し、類上皮細胞となるのであるが、Myrvik (1961)⁹⁾はこの大滲出細胞を、気管より遊出、採取する方法を提案した後、Oshima (1962)⁹⁾と協同して、この細胞より lysozyme を同定し、これによって結核免疫の機作を説明した。Yasuhira (1961)⁶⁾はこの細胞を使用して「ツ」感受性の受身伝達を行なったが、challenge 後4日目の細胞が、「ツ」反応の伝達に最も有効であるとい

う結果を得た。著者も同じ方法を使用して感作家兎の *alveolar macrophage* を大量に採集し、これを素材としてその水抽出液をとり、更に澱粉カラムによる電気泳動によって分画し、「ツ」感受性伝達能を有する物質を精製しようと企てた。

元来「ツ」抗体を、血清或いは細胞抽出液より分画精製しようとする試みは、Cole ら(1955)¹⁰⁹に始ったものである。彼らは感作モルモットの血漿を Cohn によるエタノール分画法で分画し、その α -globulin を含む分画で「ツ」感受性の受身伝達に成功した。その後同じ試みが Ehrenkranz ら(1956)¹¹⁰によってなされたが、彼等は Cole らの成績に賛同しなかった。Jeter ら(1957)³⁹は感作モルモット白血球抽出液を電気泳動で分画し、 $\alpha 1$ -globulin 分画に transfer factor が存在するものと推定した。今回著者は、感作家兎の *alveolar macrophage* の抽出液を電気泳動で分画し、主としてその D 分画即ち γ -globulin 相当部位の移入により、「ツ」感受性を受身に伝達し得ることを発見した。尚 α -globulin に相当する B 分画或いは β -globulin に相当する C 分画でも時に伝達が成功する。しかし著者の使用した澱粉カラムによる分画では、原資料の装置部即ち泳動の原点が、B 時に C 分画中に来ることを考えれば、「ツ」感受性の伝達因子を担っているのは D 分画であるということが推定されるのである。この点著者の成績は、Cole や Jeter らの成績と大きな違いがあるといつてよい。

ここで問題となることは、*alveolar macrophage* 採取に当たって行った challenge という操作である。古く Zinsser(1925)¹²⁰の研究も、また Cole らの実験でも、感作血清による「ツ」感受性の受身移行の成功には、何れも血清採取前に「ツ」注射が行われた。即ち感作動物の「ツ」による challenge が、感作細胞より“plasma factor”を遊離させ、これが受身伝達成功の鍵をなすものと見做される。著者の実験にあっても *alveolar macrophage* 採取のため、事前に結核死菌の静脈内注射が行われた。このことは、「ツ」による challenge と本質

的に同一の作用を有するものと考えられ、これが著者の実験の成功の一因をなしていることが考えられる。

次には移行に使用した細胞抽出分画に、抗原の混入される危険である。このことは既に Yasuhira (1961)⁶⁰によって厳密に指摘され、細胞性受身移行の全般に亘る問題として注目されているところである。従来移行実験に使用され、また成功を収めてきた細胞抽出液なるものは、ミトコンドリア以下の微細な細胞成分を多量に混じたものであることが明らかである。従ってこれらの抽出液に結核菌、或いは抗原性の菌体成分が含有され、これによって recipient が能動的に感作される可能性は充分ある。殊に肺細胞採取のため、BCG 死菌を静注するときは、採取された *alveolar macrophage* が、多量の菌を喰食含有していることは、細胞の菌染色で容易に証明されるところである。しかし注意されねばならないことは、著者によって検査された recipient の「ツ」反応が、分画移入後直ちに陽性化することで、Yasuhira のいうような、微量抗原による早期感作の成立を顧慮しても、尚且つこれを抗体成分の移行による受身感作と見做すに充分な成績と考えられる。更に著者の実験では、recipient の「ツ」反応が分画移入直後に最強で、その後日を経るに従って弱くなり、時には一たん陰性化した後に 7 日以後再び陽性となる場合がある。この事実よりすれば、二相性に現われる recipient の「ツ」反応のうち、第 1 相は受身感作、第 2 相は能動感作によるものと解すべきところである。従って Yasuhira のいうように、移行物質中にその抗原の混入することを否定することは出来ないが、また感受性そのものの受身伝達の可能性も、著者の実験成績よりこれを認めなければならぬところである。ただ家兎を用いる「ツ」感受性の受身伝達の実験では、recipient における「ツ」反応の出現が極めて微弱であり、しばしばその判定に困難を来す点、今後の実験方法に改良の余地を残すことを示している。

総 括

1) 家兎より得た *alveolar macrophage* 水

参 考 文 献

抽出液の、澱粉カラムによる電気泳動を行って、A, B, C及びDの4分画を得、それらが各々略々 albumin, α -, β -, 及び γ -globulin 分画に相当するものであることを明らかにした。

2) 結核感作動物に BCG 死菌の静脈内注射を行うことによって得た alveolar macrophage の分画 D, 即ち γ -globulin 相当分画の静脈内移入により, 正常家兎に「ツ」反応の陽転を来し得た。

3) この recipient の「ツ」反応は二相性に出現する。そのうち第1相は受身感作による「ツ」反応であり, 第2相は移入分画に混入する菌或いは菌体成分によって起された能動感作に由来するものである。

附記(1): 稿を終るに臨み本研究の指導を給った辻周介教授, 大島駿作助教授, 並びに御協力頂いた泉孝英学士に深く感謝いたします。また原稿校閲の労を取られた安平公夫助教授に感謝します。

附記(2): 第1篇より第3篇に至る本論文に記述された研究は, 著者の大学院在学中に行なわれたものであって, この間終始御指導を頂きました指導教授西尾雅七先生に深謝の意を表します。

- 1) Chase, M.W.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 59, 134, 1945.
- 2) Jeter, W.S., Tremani, M.M. & Seeborn P.M.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 86:251, 1954.
- 3) Jeter, W.S., & Laurence, K.A.: J. Bact., 74, 680, 1957.
- 4) Lawrence, H.S.: J. Clin. Invest., 34, 219, 1955.
- 5) Cumming, M.M., Patnode, R.A., & Hudgins, P.C.: Am. Rev. Tuberc., 73, 246, 1956.
- 6) Yasuhira, K.: Acta Haematologica Japonica. 24, 100, 1961.
- 7) Yasuhira, K., Asada, T., & Nagano, K.: Acta. Tuberc. Jap. 11:28, 1961.
- 8) Myrvik, Q.N., Leark, E.S., & Fariss, B.: J. Immunol., 86, 128, 1961.
- 9) Myrvik, Q.N., & Oshima, S.: J. Immunol. 89, 745, 1962.
- 10) Cole, L.R., & Favour, C.B.: J. Exp. Med. 101, 391, 1955.
- 11) Ehrenkranz, N.G., & Waksman, B.H.: J. Exp. Med. 104, 935, 1956.