

結核菌感染に対する家兎 Alveolar Macrophage

の抵抗性に関する組織培養的研究

京都大学結核研究所病態生理学部 (主任教授 辻 周 介)

中 島 道 郎

(昭39. 1.30受付)

緒 言

結核感染に対する生体の防衛機序を解明するに当って、貪食細胞の機能について研究することは極めて重要な意義を有するものと考えられる。その一つの方法として、結核菌を貪食させた貪食細胞を組織培養する実験は、従来より少ない。Lurie (1) Suter (2) Berthrong 及び Hamilton (3) 等はいずれも組織培養法により、モルモットや家兎の貪食細胞内に貪食された毒力結核菌は、細胞内でよく発育するのに反して、弱毒結核菌や無毒結核菌の場合は、その発育が抑制され、一方免疫動物の貪食細胞内では、毒力結核菌でもその発育が抑制されるということを報告した。教室の浅田(4)は、家兎の腹腔滲出細胞の母体である大網乳斑細胞の組織培養実験において、同様な成績を得たと報告している。又 Hsu 及び Kapral (5) は免疫処置ではないが、Triiodothyronine 処置をうけたモルモットの腹腔滲出細胞では未処置動物の腹腔滲出細胞よりも、結核菌に対する発育抑制力が高まっている事実を観察した。これ等に反して、Mackaness (6) (7) は家兎の腹腔滲出細胞内に貪食された毒力結核菌の発育は、免疫家兎細胞においても、正常家兎細胞におけると同様に良好であり、両者間に明瞭な差を認めることが出来なかったと報告している。この実験では、毒力菌を貪食した滲出細胞は、免疫家兎由来のもの、正常家兎由来のものも、同様に、短期間のうちに速やかに崩壊してしまうので、菌の細胞内増殖の差を観察するには、実験条件が不適

当ではなかったかとも考えられる。Fong, Schneider 及び Elberg (8) (9) はこの毒力菌を貪食した細胞の変性、崩壊という現象に注目し、Mackaness (10) の方法を少し修正することによって、免疫家兎腹腔滲出細胞は、免疫家兎血清の存在下においてはじめてその毒力結核菌による細胞変性が少くなることを観察した。即ち、彼等は腹腔滲出細胞による細胞内での結核菌の発育の抑制という面よりも、結核菌の毒性に対する細胞の抵抗性の面から、正常細胞と免疫細胞の相違について追求し、免疫血清の持つ意義を明かにした。鈴木と渡辺(11)は、Fong 等と同様な実験方法によってこれを追試し、家兎においては彼等とほぼ同様の成績を得たが、毒力結核菌を貪食した免疫モルモット腹腔滲出細胞の死亡率は、免疫モルモット血清の存在下において、正常モルモット血清の存在下におけるよりもむしろ高く、家兎の細胞と家兎の血清を用いて観察した成績とは全く反対であったと報告している。免疫家兎細胞に対する免疫家兎血清の相加作用については、浅田 (4) もこれを認めているところである。他方 Suter (2) は、免疫家兎腹腔滲出細胞の結核菌発育抑制作用は、免疫血清の存在には関係がないとし、そのような免疫血清の持つ意義を認めていないという状態で、この問題に関しては、いまだ明確な結論は得られてないと言えよう。諸家の意見が一致しない原因として、この様に微細な差を追求する免疫学的実験において、実験条件を一定することにかかなりの困難があることが先づ第一に考

えられる。例えば、家兎やモルモットの腹腔滲出細胞は、すべて流動パラフィンとかグリコーゲンなどの薬剤を多量に腹腔内に注入することによって採集したものであるため、結核菌を貪食させるという実験以前の段階において相当弱体化していることが、組織培養法による実験成績を、かなり不安定なものにしたのではないかと考えられる。従って、しばしばこの種の実験に用いられる腹腔滲出細胞なるものが、果して適当な実験材料であるか否かも検討を要するものと思われる。

Myrvik (12) は、家兎の肺臓より Alveolar Macrophages を可成り純度の高い割合で採集する方法を考案し、この Alveolar Macrophages が腹腔細胞と機能的に異なることを暗示している。そこで従来用いられた腹腔細胞のかわりに、Myrvik の方法による Alveolar Macrophages を用いて、貪食実験を行ってみた。人間の場合、結核感染の多くは先ず肺内に発生するもので、従って Alveolar Macrophages はこの場合の感染防衛の最前線にあると考えられ、この点からも本実験は従来にない新しい意味を有するものとする。

ここに言う Alveolar Macrophages とは肺胞内に遊離の状態で存在する大単核食菌細胞のことで、古く Mechnikov の命名になるものであるが、dust cell とか large exudate cell とか種々の名でも呼ばれ、板木 (13) や石河 (14) はこれを所謂「塵埃細胞」と呼んでいる。塵埃細胞では食菌作用の概念が十分表わされていないうらみもあり、その他に統一された訳語があるとも聞かないので、米国で慣用されている Alveolar Macrophage なる語をそのまま用い、以下本論文中においては「AM」と省略する。又これとの関連性において、腹腔滲出細胞の方も Peritoneal Macrophage をそのまま使用することとし、以下「PM」と省略することにした。

実験材料並に実験方法

実験動物：2.2乃至2.7kgのニュージーランド系白色家兎が用いられた。

感作方法：二種類の感作方法が用いられた。

(a) BCG 加熱死菌 0.1mg を Freund の Adjuvant

0.1ml 中に懸濁し、耳静脈内に注入感作後、3週間を経たもの。(b) BCG 生菌 10mg を生食水に浮游し、筋肉内注射によって感作し、3週乃至8週間を経たもの。以上の感作動物を用いた。

家兎 AM の採集：Myrik (12) 並に大島 (15) (16) (17) の方法に若干の修正を加えたものである。先ず空気注入法によって家兎を屠殺した後開胸し、下大静脈より可及的多量の血液を無菌的に採集した。(これは遠沈により血清を分離し、後に組織培養液中に添加するために用いられた。) 次に気管を指子で挟み、両肺を心臓と共に胸廓から摘出し、滅菌シャーレ上にて心臓と大血管を除去し、Hanks 液(18)で湿めたガーゼで両肺表面をふきながら、軽く圧迫して肺脈管中の血液を可及的に除去した。約 20ml の Hanks 液を、輸血針をつけた滅菌注射器にとり、これを気管より両肺内に注入した。針は挿入したままこれを気管と共に上から指子で挟み、注入液が溢れ出ないようにし、軽く肺をマッサージした後、再び注入液を注射器に吸取するという操作を繰返して、多量の AM を含んだ液を太い滅菌試験管に採集した。この様にして得られた正常家兎 AM 浮游液 約 40ml 中には Packed cell にして約 0.1~0.2ml、細胞数にして 約 $1\sim 2 \times 10^7$ 個(概算)の AM を含んでいた。感作家兎の場合は差が大きく、Packed cell にして約 0.5ml から 3.0ml まで得られた。次にこの細胞浮游液を 700 回転 5 分間位の軽い遠沈によって細胞を集め、新しい Hanks 液に浮游して再遠沈するという操作を二、三回繰返して細胞を洗い、最後に 20% の割に家兎血清を含む Medium 199 (Microbiological Associates Inc. Bethesda, Md.) (19) (20) に浮游させた。その際細胞数は約 2×10^5 /ml 位になるよう調整した。

家兎の採集：PM を採集するため家兎腹腔に約 50 ml の Bayol F を注入した後、五日目、その家兎を屠殺した。腹部切開により、10u/ml の割に Heparin を添加した Hanks 液 約 200ml を注入し、PM を洗い出した。これを AM の場合と同じ操作によって Medium 199 に浮游させた。

細胞の死亡率算定：AM, PM, 両者における死亡率は次の様にして算定した。即ち AM (PM) 浮游液 0.1ml を別の試験管に移し、0.5% Trypan-blue 溶液(21)(22) 0.05ml を加えて軽く振盪し、その混液の一滴を Fuchs-Rosenthal 血球計算盤上にとり、全視野中の細胞総数と、Trypan-blue に染色された細胞数とを算えてその死亡率を算定した。本実験においては、AM 浮游液と結核菌浮游液を混合した後、原則

として、直後、2時間目、6時間目、並びに24時間目の4回にわたってその死亡率を算定したが、一部の実験では、その後引続いて観察を行ない、10日に及んだものもあった。

結核菌液の作製：本実験には主として毒力人型結核菌 H37Rv 株¹⁾を用いた。これは Youmans 修正, Proscauer-Beck 培地²⁾に2乃至3週間培養した後、更に1週間 Middlebrook-Dubos 培地²⁾(0.1% Tween 80R, 0.5%牛血清アルブミン (Microbiological Associate, Inc.) に植えついでものである。本実験においては、結局厳密な意味における単個菌を必要としなかったため、約1,000回転10分の軽い遠心沈澱によって大きな菌塊を除いた残りを全部集めて、0.1% Tween 80R 添加生食水で2回洗滌した後、同じ生食水に浮游させてその濁度を、Coleman 型比濁計 (Model 7) で測定し、菌数を算定した。しかる後一定数の菌を20%家兎血清添加 Medium 199 に浮游せしめて、大体 8×10^7 /ml の割合に菌を含む菌液を作製した。毒力比較実験においては、H37Rv 株の他に、毒力株として結核患者喀痰より分離した T2160 株及び T3125 株、弱毒株として BCG、無毒株として H37Ra²⁾を用いた。

組織培養法：AM (PM) の培養は20%家兎血清添加 Medium 199 の中で行なった。この場合、しばしば正常健康家兎気管中に見出される *Bordetella bronchio-septica* の混入を防ぐ意味において、Tetracycline (10 γ /ml) (Lederle) を添加した。組織培養に普通に用いられている Streptomycin は、結核菌の毒性に対する影響力を考慮して、本実験には原則として用いなかった。但し、長期観察の培養実験においては、細胞外の遊離結核菌の発育を抑制する必要があるため、培養第2日目より 5 γ /ml の割合に Streptomycin を添加した。十分に清浄な滅菌スクリーキャップ試験管 (16 $\times$ 125mm) (これは厳密に密栓されるものを用いた) の中に、約 2×10^5 個の細胞を含む AM 浮游液 1ml と、約 8×10^7 個の菌を含む結核菌浮游液 1ml を混合し、垂直懸架して $36^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ の温度中に静置した。混合直後及び2時間目、6時間目、24時間目にこの混合液の一部をとり出して、AM の死亡率を算定したのは前述した如くであるが、その際別に塗抹標本作製し、紫外線照射下において乾燥滅菌し、95%エタノールで固定、抗酸菌染色を行なって細胞の菌貪食状態を観察した。

細胞の結核菌貪食数、貪食率の算定：以上の方法とは別に次の様な組織培養も行なって、AM (PM) の貪食状態を観察した。滅菌平底組織培養用試験管 (16 $\times$ 125mm) の底にカバーガラス (8 $\times$ 24mm) をおきその上に前述の AM (PM) 浮游液 1ml をのせた。水平懸架静置30分後、その上に更に結核菌浮游液を添加した。しかる後、孵温に静置した。この様な試験管を数本用意しておき、15分、30分、1時間、2時間、4時間及び24時間の培養期間において、一本ずつその中からカバーガラスをとり出し、95%エタノール中で30分以上固定、染色して標本作製した。その標本について、細胞全体における、結核菌を貪食している細胞の比率 (これを貪食率と呼ぶことにする) と、細胞1個中の平均菌数 (これを貪食菌数と呼ぶ) を算定した。

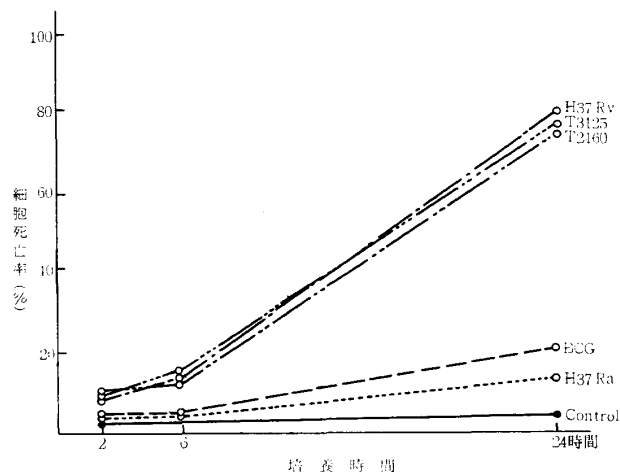
実験成績

I) 正常家兎 AM に対する結核菌の毒性に関する実験

(1) 各種菌株による相違

結核菌毒力株と弱毒株及び無毒株の、正常家兎 AM に対する毒性の比較を行った。組織培養系において、AM 1個に対し約400個の割合で結核菌が添加された場合、AM の死亡率の時間的推移は図表1に示される如くである。即

図表 1. 正常家兎 Alveolar Macrophage (AM) に対する結核菌 (毒力菌, H37Rv, T3125, T2160, 弱毒菌 BCG, 無毒菌 H37Ra) の毒性



ち培養24時間目における AM の死亡率は、毒力株 H37Rv, T2160, T3125 のいずれにおいて

註 1) Dr. G. P. Youmans, Northwestern Univ., Med. Sch. Chicago Ill. より提供をうけた。

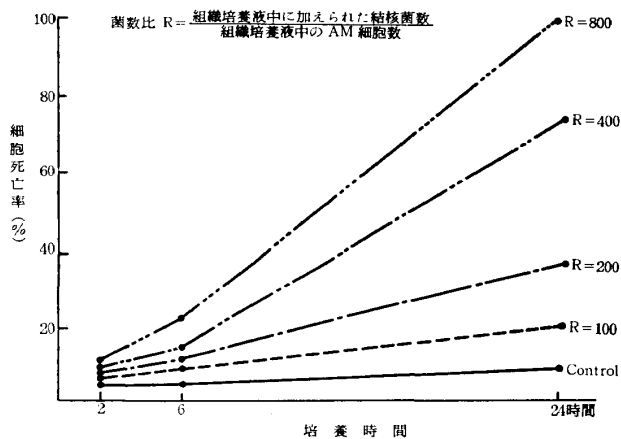
2) Dr. W. Steerken Jr., Trudeau Laboratory, Saranac Lake, N.Y. より提供をうけた。

も80%近くであったのに対して弱毒株 BCG では20%, 無毒株の H37Ra では15%と, 毒力株との間に明らかな相違があることを認めた。この場合同時に作製した塗抹標本によってAMはいづれの菌株についてもほぼ同程度の貪食能を示し, 貪食細胞中の平均菌数は殆ど同じであったので, この細胞死亡率の差は有意であると考ええる。

(2) 菌数の影響

次に毒力結核菌 H37Rv 株のみを用いて, 一定の貪食細胞に加えられる菌数を変化させた場合の細胞死亡率について観察した。用語の混乱を避けるため, 以下, 貪食細胞1個につき, 加えられる結核菌数の比を仮りに菌数比と呼ぶことにする。本実験においては, 倍数稀釈によって菌数比800, 400, 200, 100の四段階の菌液を作製しこれを一定数の AM 浮游液と混合してその細胞死亡率を観察した。結果は図表2に示

図表 2. 正常家 AM の死亡率に及ぼす接種 H37Rv 菌数の影響



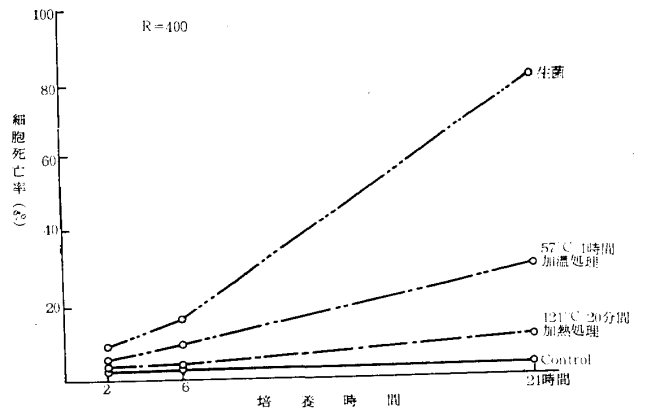
す如く, 菌数比と細胞死亡率の間にはほぼ一定の関係が成立つことが判明した。この実験においては菌数比が 100, 200, 400 と増すにつれて細胞死亡率は15%, 30%, 70%と上昇した。菌数比800の場合は100%以上にはならないのでやむを得ないが, 概算して菌数比が2倍になれば死亡率も2倍上昇するということがいえよう。

(3) 菌の熱処理による影響

AM の組織培養系に多量の毒力結核菌を添加した場合に AM が死亡することを観察したが, 次に同じ H37Rv 株生菌浮游液を三分し,

a) 121°C 20分加熱処理, b) 57°C 1時間加熱処理, c) 無処理の三群に分け AM に対する毒性の変化を観察した。結果は図表3に示す

図表 3. 正常家兔 AM に対する H37Rv の毒性

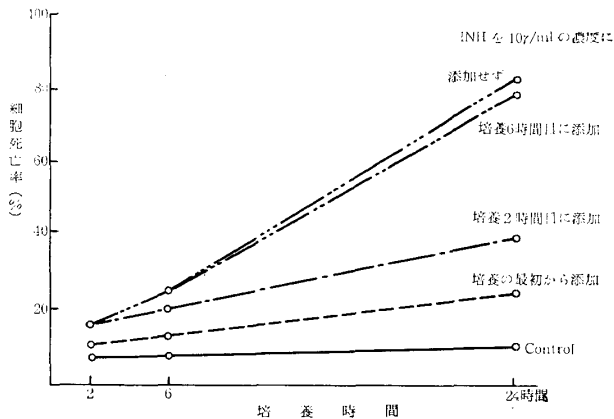


如く, 培養24時間目における細胞死亡率は c) 群では82%の死亡率を示したのに対して, b) 群では30%, a) 群では僅か10%の低い死亡率を示した。これは熱処理をうけた菌は, 無処理の生菌に比して毒性が低下したものと考えられる。これは熱処理ではないが, ここにつけ加えておきたいことは, Dubos 培地培養6日目の H37Rv 菌は相当混濁してみえるが, これに1mg/ml の高濃度に Strepto mycin を添加するとその翌日にはすっかり沈澱して培養液は透明に近くなる。このようになった菌を洗滌して上述と同様な実験を行ってみると, 24時間目における AM の死亡率は約30%で, 丁度 57°C 1時間加熱処理菌と殆ど同じ程度に毒力が低下していることを観察した。

(4) INH 添加による影響

AM-H37Rv 菌混合液を四分し, 1) INH 10 γ /ml を最初から添加したもの, 2) 2時間後に添加したもの, 3) 6時間後に添加したもの, 4) INH を添加しないもの (対照) の4群に分け, 培養24時間目における AM の死亡率を観察したところ, 図表4に見られる如く第4の INH 無添加群では80%という高い死亡率を示したのに対し, 1) 群では死亡率が18%という低率であり, 2) 群ではやや高く30%, 3) 群では75%と殆ど無添加群と同様の高い死亡率を得た。

図表 4. 正常家兎 AM に対する H37Rv の毒性に及ぼす INH の効果

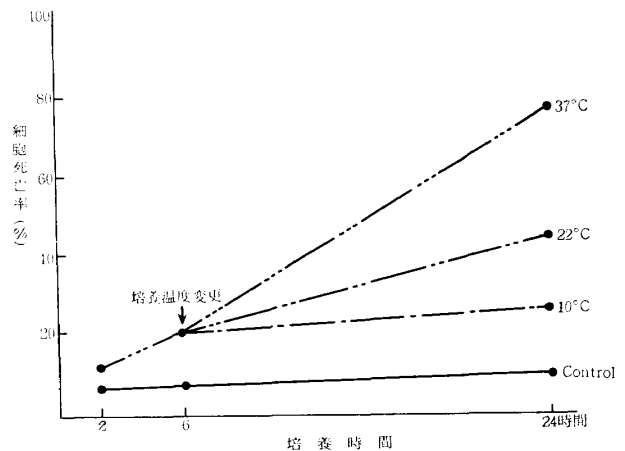


以上の実験から、結核菌の AM に対する毒性は、INH の添加によって著しく減弱することを知った。又、3) 群の死亡率の高かったことは、細胞は6時間目までにとりこんだ菌によって既に致命的な損傷をうけてしまっていた結果といえよう。

(5) 培養温度の影響

AM-H37Rv 菌混合液を孵温に6時間放置した後三分し、1) 氷室 (10℃) 2) 室温 (22℃) 及び 3) 孵温 (37℃) の3種類の温度中に静置すると、24時間目の AM 死亡率は、図表5に

図表 5. 正常家兎 AM に対する H37Rv の毒性に及ぼす培養温度の影響

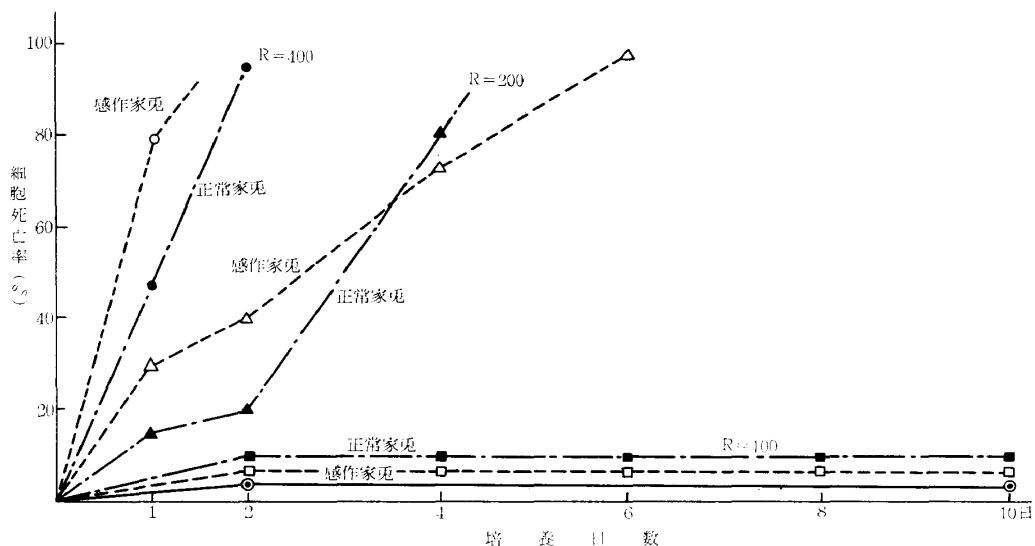


II) BCG 感作家兎 AM に対する結核菌の毒性に関する実験

(1) 細胞死亡率と菌数比の関係

BCG 感作家兎 AM を用いて同様の実験を行い、H37Rv 株によって受ける影響を、正常家兎 AM の実験成績と比較した。感作家兎としては、10mg BCG 生菌生食水浮游液を筋肉内に注射し、3週乃至8週後、ツ反応陽性を呈したものをを用いた。本実験においては、組織培養液には正常家兎血清を用い、接種菌数の差による細胞死亡率の差を最少限に留めるため、感作家

図表 6. H37Rv を貪食せる正常並びに感作家兎 AM の死亡率の長期観察



示した如く、1) では20%で、培養温度変更点の死亡率と較べて死亡率に著明な相違はなく、2) では42%とやや高く、3) では80%という結果が得られた。

兎 AM と正常家兎 AM に対しそれぞれ同一の菌浮游液を二分して与えることにより、両者の死亡率の推移を同時に観察した。又、感作家兎 AM と正常家兎 AM の、結核菌の毒性に対する抵抗力の差を観察するにあたり、短時間内の

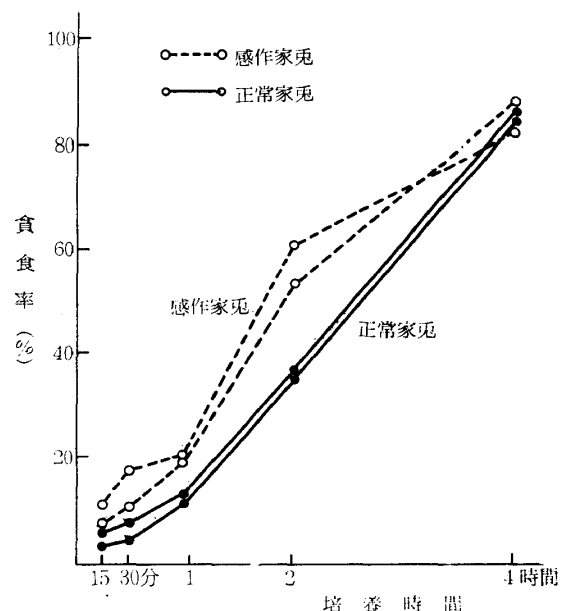
差の外に、長時間培養した場合の差も観察する必要があるので、本実験の観察期間は、他の実験に較べて長く、10日にも及んだ。接種菌数は菌数比 400, 200, 100 の三群に分けて観察した。この実験成績は図表 6 に示した如くである。この成績から判明したことは、菌数比が 100 の場合、培養第 2 日における細胞死亡率は、正常家兎 AM で 10%, 感作家兎 AM で 6% であり、この率は第 10 日目においても全く変らなかった。それに反して、菌数比 200 の場合は、培養第 1 日目に正常 AM 15%, 感作 AM 30% 第 2 日で正常 AM 20%, 感作 AM 40%, それが第四日目では正常 80% 感作 72% と変った。又菌数比が 400 の場合は、培養第一日目で正常 AM 47% 感作 AM 78% それが第二日目では感作 AM 100% 正常 AM 95% と上昇した。この成績から言えることは、菌数比が少い場合は正常細胞も感作細胞もその毒力結核菌による死亡率は変わらないが、菌数比が多い場合には感作細胞の方がむしろ正常細胞よりも死亡率が高いということである。しかもその相違は、菌数比 100 と 200 の所ではっきりと現れている。即ち、菌数比が 200 以上の場合には AM は速やかに死亡するのに対して、菌数比 100 以下の場合には 10 日にわたる観察期間中殆ど死亡率に変化がなかった。なお後者の場合における細胞内に貪食された結核菌の数は平均一細胞あたり 20 前後、即ち、培養第一日目が平均 18 位、第十日目で平均 22 位で殆ど菌数にも変化がなかった。この場合、細胞外の浮游結核菌の發育を抑制する意味で、培養第二日目より、5 γ /ml の割合に Streptomycin を培養液中に添加し、又培養液を 2 日目毎にその半量ずつ新しい液と交換した。Streptomycin はこの濃度においては、細胞外の結核菌には作用するが、細胞内にとりこまれた結核菌には作用しないと云われている。(Suter (25), Mackaness (10)) 従って、この実験期間中、細胞内において菌数の増加が認められなかったのは、正常家兎 AM は明かに毒力結核菌の細胞内における發育を抑制しているということが出来る。そしてその抑制力は感作家兎 AM と殆ど差がなかった。又、組織培養液中の血

清を、感作家兎血清におきかえて、同様の実験を行ってみたところ、24 時間観察に現れた限りでは、実験成績の上に、感作家兎血清と正常家兎血清の差を得ることは出来なかった。

(2) 貪食率について

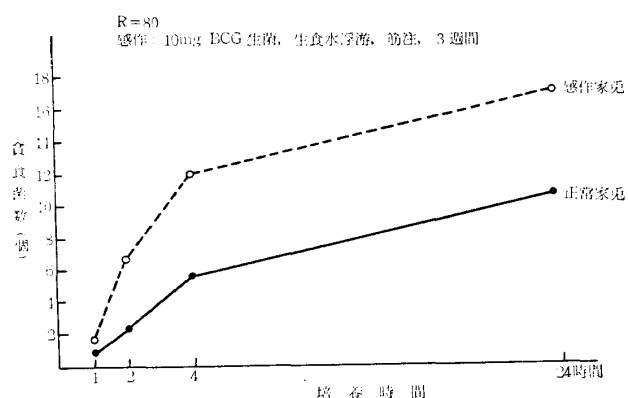
高い菌数比の場合、短期間の観察期間中において、毒力結核菌を貪食した AM の死亡率は、感作家兎 AM においては、むしろ正常家兎におけるよりも高いという実験結果を、図表 6 に見出したが、この事実と関連性を持つと思われるその他の貪食現象について、次の様な事実は見出された。貪食細胞群の中でその体内に結核菌をとりこんでいる細胞の数の百分比を算定し、これを貪食率と呼ぶことにする。又、一つの細胞の中にとりこまれている菌の平均数を貪食菌数と定義することにする。この二つは同じ現象をみているのであるが、貪食率はこの細胞群の活潑さを群全体の立場から示したものであり、貪食菌数は一つの細胞の作用の大きさの指標となるものと考ええる。然しながら、感作家兎 AM と正常家兎 AM の貪食作用の強さをこの二つの概念から追求しようとする時、この二つを同時に満足に示して、しかも両者に差のあることを見出すことはむづかしい。なぜならば、

図表 7. 正常並びに感作家兎 AM による結核菌貪食能の比較。
貪食率 = 1 個以上の菌を貪食している細胞の百分比。
感作 = 0.1mg BCG 死菌, Adj 懸濁, 静注, 3 週間。
R = 20



貪食菌数の差をみようと思うとき菌数比が高いと、菌と細胞とが遭遇する機会が高すぎて速かに高い貪食率となつて現れてしまい両者に差がなくなってしまうのである。従つてこの二つの現象は、一つのことを二種に条件を変えて観察しなければならない。図表7に示したのは先づ貪食率の比較である。組織培養法は平底組織培養管-水平懸架法を用い、カバーガラス標本について観察した。この場合の菌数比は20である。感作家兎は0.1mg BCG 死菌を0.1mlのAdjuvantに懸濁し、耳静脈注入によって感作したものをを用いた。感作家兎AMと正常家兎AMの貪食率の差がよく現れているのは培養2時間目で、感作家兎AMでは55乃至60%に対し正常家兎AMでは35%と低い値が出ている。しかし両群とも4時間目になると80%から85%になって、両者に差が見られない。これはこれ位で大体両者とも飽和に達したものと考ええる。この実験成績から感作家兎AMの方が、感染の早期においてより活潑に動く細胞が多いかと考えられる。次に貪食菌数の比較であるが、この場合感作家兎として、10mg BCG 生菌、生食水浮游、筋肉内感作、3週目のものをを用い、組織培養液中の菌数比は80にした。この成績は図表8に示した。感作家兎AMの貪食菌数は培養2時間、4時間においてそれぞれ6.8及び12.0

図表 8. 正常並びに感作家兎 AM による 貪食結核菌数の比較。 R = 80



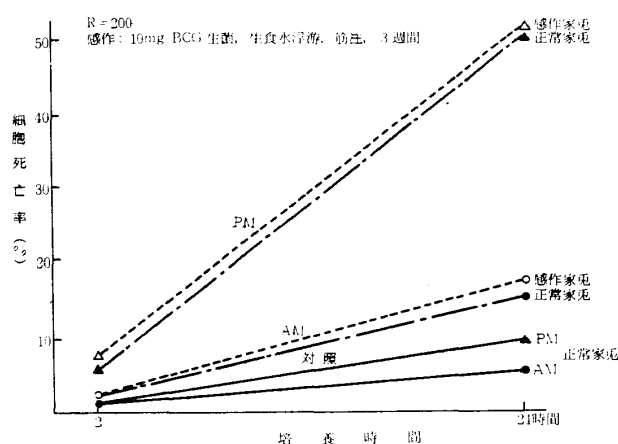
であるに対し、正常家兎AMでは2.5・6.0と明かに差が認められた。以上二つの実験成績から、感作家兎AMは、その結核菌混合の初期において、貪食作用の強さの点で（貪食率においても、貪食菌数においても）、正常家兎AM

よりもまさっているということが出来る。

Ⅲ) 家兎 AM と、家兎 PM に対する結核菌の毒性に関する比較実験

以上に述べた実験成績から、家兎AMが結核菌の侵襲に対してかなり強い抵抗力を持っていることを知ったが、これと、従来多くの研究者(1)~(11)達が実験材料に供して来たPMの持つ抵抗力とを比較検討するために、AMの場合と同様の実験を家兎PMについて行った。実験方法の項に記載した様にPMを20%家兎血清添加Medium 199に浮游させた。同時に同一個体からAMを採集し、同じMedium 199に浮游させ、両細胞浮游液は全く同じ濃度になるよう調製した。この二種類の細胞浮游液に対して、別に調製した結核菌Medium 199浮游液を両者に同量ずつ混合した。この場合の混合菌数比は200であった。この混合液について、培養2時間目と24時間目におけるAMとPMの死亡率を比較すると図表9に示す如く、PMの方がAMに比して明かに高い死亡率を呈した。しか

図表 9. H37 Rv による。正常並びに感作家兎の AM と PM の死亡率の比較



るに他方、平底組織培養試験管法によって、AMとPMの貪食の様子を標本について検討してみると、写真1, 2, 3, 4に見られる如く、AMは4時間目において4時間目に比してかなり多量の菌を貪食しているのに反して、PMの方は24時間目においても、細胞内菌数は4時間目の菌数に比して著明な相違が見られなかった。即ち、菌を貪食する容量が少ないように思われた。この場合細胞内菌数の比較を容易にするため、接種菌数は前述の普通試験管法の

場合の菌数比よりは少く、約80の菌数比の液を用いた。この成績より PM は同じ動物から得られた AM に比し貪食能が低くしかも死亡率が高いことが判明した。本実験における PM は、採集された時には既に大量の油滴を貪食しているので、もはや正常な状態にあるとは考えられず、ここに現れた差が、細胞に本質的なものか否かはこの実験からでは判定し難い。しかしとにかく、この様に流動パラフィン法により採集した家兎 PM は同一個体からの AM と比較して、結核菌の毒性に対する抵抗力は低いということが推定された。又 BCG 感作家兎 (10 mg BCG 生菌、生食水浮游、筋注感作4週) についても正常家兎とほぼ同様の実験成績を得た。感作家兎の AM と PM の比較を、培養液中に感作家兎血清と正常家兎血清とをそれぞれ含む培養系を作って比較してみたが、いづれにおいても感作家兎血清がこの組織培養液の中で、正常家兎血清と異った機能を持つということを示す実験成績は得られなかった。感作家兎 AM と正常家兎 AM の比較において、図表7に示した如く、感作家兎 AM の方が培養初期に高い貪食能を示すという傾向は、PM 同志の比較においても観察された。即ち感作家兎 PM は培養初期に正常家兎 PM に比し少し高い貪食率を示した。しかしその差は有意のものといえる程大きなものではなかった。

考 按

貪食細胞に対する結核菌の毒性を論じ、それに対する細胞の抵抗性を論ずるために、菌の毒性発現の指標として、従来から、大体三種類の現象が観察されて来た。即ち 1) 毒力結核菌を貪食した細胞は、それによって遊走作用が阻止されるという現象 (Middlebrook (26) Bloch (27) 大岩 (28)) 2) 毒力結核菌は貪食細胞内で発育増殖していくことが出来るという現象 (Lurie (1) Suter (2) Berthrong (3) 浅田 (4) Hsu (5) Mackaness (10)) 3) 毒力結核菌を貪食した細胞の変性現象 (Fong (8) 鈴木 (11)) 等である。しかしながら、例えば第一の貪食細胞遊走阻止現象についてみれば、大岩は鶏の白血球を用い

た彼の実験において、白血球の遊走作用を阻止するためには、結核菌は必ずしも白血球に貪食される必要はなく、白血球の近くに存在するだけで十分だと報告しているので、厳密な意味における、結核菌とそれを貪食した宿主細胞の間の相互関係を観察しようとする試みに対しては必ずしも適当な方法ではない。又、2)の結核菌の貪食細胞内発育観察についても、筆者は、本実験にかかる前の予備実験として、繰返し毒力結核菌 H37Rv 株の、家兎 AM 内での発育について観察を行ってみたが、どうしてもこの結核菌が、AM 内で増殖するという証拠を得ることが出来なかった。結核菌の毒性についての実験においては、この方向からの接近を主とすることは断念した。即ち、たとえ一細胞内の平均菌数が増加するという事実が観察された場合でも、それが果して細胞内増殖によるものか、細胞が浮游菌を更に貪食したものか、あるいは、一旦ある細胞に貪食された菌が何かの事情でその細胞が死亡した場合、再び浮游菌となり得ることは十分考えらるるし、どうしても増殖と再貪食は区別出来ないものと考えたのである。このような理由によって、筆者は、主として第三の指標、即ち、貪食細胞が自ら貪食した結核菌によって変性乃至死亡せしめられる現象について追求しようと試みた。それに対して Fong や鈴木の採用した方法は、結核菌による貪食細胞の変性を観察するものであったので、判定が主観に陥る危険があるとする批判もあり、又彼等が用いた Mackaness 型 Chamber は、非常に少量の培養液で以って培養するもので、培養条件として不利な点を持っているというような欠点を持っていたので、このような方法によらないで、筆者は実験方法の項で述べたような手技を考案した。この方法によると、Chamber の様な特殊な装置は必要とせず、実験操作は簡略化され、培養液の量は自由に調節出来、一本の試験管中の細胞-菌混合液でその変化の推移を連続的に追求して行くことが出来、又一度に数本の試験管を用いて実験を重複させることも出来るというように、種々の利点を持っていた。細胞の生死の判定には、Trypan-

blue 法(21)(22)を用いたが、それは Fong 等の方法に較べてより客観的であったと信ずる。この方法で菌数を加減すれば、同時に細胞内菌数の変化も観察出来たが、きれいな塗抹標本が得られないのが欠点で、平底組織培養試験管法を併用したのはそのためである。以上の方法で得られた実験成績として、24時間以内に家兎 AM の十分に高い死亡率を得るためには、菌数比 400 即ち、細胞 1 に対して結核菌 400 という。一見非常識とも思われる多量の菌を混合する必要があるという結果である。この様に多量の結核菌と接触した AM は、24 時間後には無数の菌を、標本について抗酸菌染色を行なってみると、まるで苺のように真赤に染まるまで、貪食しているのであるが、その場合一細胞中の結核菌の数はあまり多すぎて算え切れず、結局 AM 一細胞が貪食し得る結核菌数の限度は求められなかったが、概算 50 程度と推算された。それならば、菌数比が 100 もあれば、それが 200 になっても 400 になっても結局はその限度までしか貪食出来ないのだから、最後の死亡率はいずれも 100 % になる筈であるのに、事実はそのでなく、図表 2 及び図表 6 に見られる如く、細胞死亡率と菌数比との間には、明かな一定の関係が成立つことが知られた。特に図表 6 に見られる如く、菌数比が 100 以下の場合と 100 以上の場合には明かな差が存在し、100 以下の場合には培養が 10 日に及んでも細胞死亡率には殆ど変化が見られなかった。この場合細胞内に貪食されていた結核菌数は平均 20 前後であったので、家兎 AM 一細胞が処理出来る毒力結核菌の数は大体このあたりだと推定出来た。又この現象から次の様なことも推定出来る。即ち、貪食細胞にとりこまれた毒力結核菌がその宿主細胞に対して毒性を示すまでにはある時間的なズレがあるのであるまいか。貪食細胞が結核菌を多く貪食するか否かは、要するに細胞と菌が接触する機会の多寡によるもので、菌数比が高い程、又一定菌数比であれば、細胞の動きが活潑な程、その機会は多いわけである。ここに一応一細胞が処理出来る限度を 20 と仮定すると、あまりこの接触機会の多すぎる場合には、細胞はまだ菌による毒性が発現しな

いううちに 20 以上の菌を貪食してしまう場合があるのである。そうなるとその細胞はとりこんだ菌を処理することが出来ず結局死んでしまう。他方その様な機会がさ程高くない場合には、細胞はゆっくり菌を貪食して行くので、菌の毒性が発現される時間になると、細胞は 20 以下の菌しか貪食してなくとも、それ以上に貪食をすることをやめてしまう。これは大岩等のいわゆる“遊走阻止”に匹敵する現象と思うが、細菌はしかしまだ余力を残しているの菌によって活動は停止してもまだ殺されてしまうには至らないといった状態に留まるのである。ここで若し培養条件が悪ければ細胞は菌に負けて殺され、菌は細胞内で発育するが、そうでなければ、細胞は菌を体内に保ったままその発育を許さないという事態もあり得ると考えられる。本実験においては、この様な、細胞内発育をおさえることの出来る結核菌の限度は約 20 と推定されたが、その数は感作処置によって上昇せしめられるという証拠は得られなかった。それ故、大量菌数比の場合、感作家兎 AM の方が正常家兎 AM に比し、かえって死亡率の高い事実は、感作細胞の方がより早く、より多く結核菌を貪食するためであろうとする想像を支持するものである。この貪食細胞にとりこまれた結核菌による毒力発現機序について考察してみるに、本実験において、同じ毒力菌液でも、一方を 57°C 1 時間の加熱とか、Streptomycin や INH の添加とかによってその毒性が顕著に修正された(図表 3 及び 4)という事実から、これは単純に、ある菌体成分、例えば Bloch の Cord factor (29) といったような物質が結核菌の毒性の主役を演ずるものとは考え難い。貪食された結核菌が、貪食細胞の中で生活が続けているというそのことが、即ち毒性の発現につながるものであって、貪食細胞と結核菌の両者の代謝機構の中に、両者に共通な代謝因子があって、両者のいずれかがその因子を奪うことによって勝負がきまるという考え方はどうであろうか。従って細胞と菌のいずれもが活動を停止すればこの代謝因子の奪い合いも停止するので、細胞の死亡も起らない筈であり、氷室内に入れた場合、死亡率の増

加が見られなかった(図表5)のはそのことを裏書きすると思われる。

次に BCG 感作家兎 AM について考察してみよう。いわゆる結核に対する細胞免疫の問題は、Lurie や Suter をはじめ、現在までに多くの研究者によって考究されて来た。Lurie (1) は免疫家兎単核細胞が貪食した結核菌はその発育が抑制され、その際免疫家兎血清の存在は菌発育阻止を更に助長することを認めたが、Suter (2) は感作家兎や感作モルモットの貪食細胞が結核菌の発育を抑制するのは細胞自体の作用であって、免疫血清の存在を必要としないと述べ、Mackaness (7) はそれに反して毒力結核菌は感作家兎腹腔滲出細胞の中でもよく発育し、免疫血清の存在もその発育抑制に役立たなかったと報告している。Berthong (3) はモルモット PM について、感作動物 PM の方が正常動物 PM よりも結核菌発育制力が強かったとしているが、その差は大きいものではなかった。浅田 (4) は家兎大網乳斑細胞の組織培養により、感作家兎細胞内における毒力結核菌の発育抑制並にその際の感作家兎血清による抑制力増強現象を観察している。これらの一連の研究における諸家の成績の不一致が絶えず論争と批判の対象とされているところであるが、要するに培養条件の不安定さに帰因するものと思われる。殊に Mackaness の Chamber 法 (10) は優れた着想で、彼以後のこの種の研究に示唆するところ大なるものがあるが、組織培養のための環境としては不適當な面を持っている。Fong (9) はその方法を用いて毒力結核菌を貪食した家兎 PM が変性する点に注目し、感作家兎と正常家兎について比較したところ、細胞変性は、感作家兎 PM が感作家兎血清と共に培養された場合にのみ著しく低下せしめられると報告した。鈴木 (11) もこれを追試してこの結論に同調した。これは前述した如く、Chamber が小さいため細胞は変性をうけ易いということと、判定が主観に左右され得るという点で批判された。元來結核菌は発育が遅い菌であり、不十分な培養条件下においては、菌の方がゆっくり発育している間に、細胞の方は急速に衰退していくということが考え

られ、よほどはっきりした指標を求めない限り、正常細胞と感作細胞の比較を組織培養法で以って追求しようとすることは意味のない試みだという非難を否定することは困難である。そのような諸点をふまえて、筆者は、これまでどの研究者もとりに上げなかった家兎 AM を用いて、感作家兎と正常家兎の貪食細胞の比較を試みた。その結果は、実験成績の項で述べた如く、結局感作家兎 AM における、結核菌に対する抵抗力の増加という成績を得ることは出来なかった。それは要するに、家兎 AM は正常家兎において既に相当結核菌に対して抵抗力が強く、感作処置によって、それが更に増加するかどうかはこの実験では検出出来なかったということである。本実験においては反対に、大量菌接種に際しては、むしろ感作細胞の方が死亡率が高いという、一見矛盾した成績が得られた。つまり感作細胞の方が感受性が高まっているというわけである。それに対してアレルギーの概念が導入さるべきかも知れないが、それにしても過敏性が、無数の菌を貪食した場合にのみ起ることは説明困難である。むしろ培養初期における感作細胞の活潑化ということの方が前述したような理由によって、説明し易いように思われる。即ちその活潑性の故に、結核菌の毒性によって細胞が貪食活動を停止する以前に既に20個以上の菌を貪食する細胞の率が、正常細胞に比して多いということである。これが原因のすべてだとは言えなくても、その原因の一部ではあり得よう。しかしとにかく、このような、感作細胞の貪食能の活潑化という現象は、貪食細胞というものの本来から考えて合理的である。但しこの場合、この現象が結核菌感作処置による特異的な反応であるか否かは不明である。

次に AM との比較について述べよう。形態学的には殆ど見分けのつかない Macrophage 同志であるのに、AM と PM に種々相違のあることは最近注目されて来た点である。例えば Myrvik (30) は Lysozyme は AM に多いのに PM には殆どないことを指摘し、Dannenberg (31) は Cytochrom oxidase, Amino-peptidase,

Succinic dehydrogenase, Acid phosphatase, Esterase の五つの酵素のいずれにおいても AM の方が PM よりも活性が強いことを指摘し、Oren (32) は食食に際してのエネルギー源として、AM は主として Oxidative phosphorylation に依存するのに反して、PM の方は Glycolysis に依存していることをあげている。既にこの様な相違点が指摘されている以上、毒力結核菌を食食した場合、AM と PM とでは、結核菌の毒力に対する態度が異っていたとしても不思議ではない。本実験において、写真 1, 2, 3, 4 及び図表 9 に示した如く、結核菌に対する食食能と、菌の毒性に対する抵抗力の点で、AM と PM の間には明かな相違が示された。このことは、これまでの研究者が結核菌に対する細胞性抵抗力を論ずるのに、このように結核菌に対して抵抗の弱い PM のみを用いて来たという事実を反省せしめるに充分であろう。PM は、家兎腹腔内に流動パラフィンやグリコーゲンを注入することによって採集されるが、その細胞構成は、いわゆる PM の他に、リンパ球や多核球も相当高率に混在し、又、それ等の細胞は、腹腔からとり出された時には、既に大量の油滴を食食した状態であって、必ずしも正常なものとは言えない。更に PM の中には、Fibroblast が多く含まれ、1～2 日の組織培養の間にこれが網状に増殖して、形態がすっかり変わってしまうことが多いが、腹腔からとり出された時には殆ど形態的に PM と区別が出来ない難点がある。この様に PM の組織培養では培養の主体が判然としない欠点もあり、この取扱いには慎重であらねばならない。それに反して AM の方は殆どが Macrophage のみであるからその様な心配は少い。もつとも、感作家兎や、感作家兎に更に BCG 死菌を静注（これを Myrvik は Challenge と呼んでいるが）して得られる AM の場合は、AM の他に多核球やリンパ球を或程度含むので同じような注意は必要である。実験材料としてこの様に AM は PM に比し多くの利点を有するものであるが、なお若干の欠点を免れない。正常家兎 AM が既に結核菌に対して抵抗性が強いというのも、結核菌の実験にとって

有利とは言えない場合もあろうが、その他に、重大な欠点として、気管内の雑菌混入の危険性がある。本実験において筆者が悩まされたのは *Bordetella bronchioseptica* の混入であった。この菌は Tetracycline, Oxitetracycline の他は感受性がない。これが筆者の、組織培養系に Penicillin や Streptomycin の代りに Tetracycline を用いた理由である。この菌は季節的に変動があり³³春から夏にかけては殆どこれに悩まされずにすんだ。

総 括

正常家兎ならびに BCG 感作家兎 AM に結核菌を食食せしめて、組織培養的にその Host-Parasite Relationship を考究しようとして、結核菌を食食した細胞の死亡率と、細胞の菌食食率について観察した。その結果、家兎 AM に対し著明な毒性を有するのは、結核菌のうちでは毒力株のみで、弱毒株や無毒株では毒性が殆ど見られず、毒力株でも、熱処理や、抗結核剤添加、或は低温における培養などの処理によってその毒性発現が著しく低下することを知った。正常家兎 AM と BCG 感作家兎 AM について、その細胞死亡率と菌食食率の比較を行ったところ、食食率に多少の差が見られたが、感作家兎 AM の方がより強い抵抗性を獲得するというような事実は認めることが出来なかった。その際感作家兎血清の添加によっても成績に何の変化も見られなかった。同一動物個体から同時に採集された AM と PM について、同様の比較がなされたが、その結核菌による死亡率は AM に比し、PM の方が遙かに高かった。

参 考 文 献

- 1) Lurie, M.B. : J. Exper. Med. 1942, 75, 247.
- 2) Suter, E. : J. Exper. Med. 1953, 97, 235.
- 3) Berthrong, M. 他 : Am. Rev. Tuberc, 1959, 79, 221.
- 4) 浅田高明 : 最近医学 昭34. 14. 10-1
- 5) Hsu, H. S. 他 : Am. Rev. Resp. Dis., 1960, 81, 881.
- 6) Mackaness, G. B. 他 : Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 479.

- 7) Mackaness, G. B. : Am. Rev. Tuberc., 1954, 69, 495.
- 8) Fong, J., 他 : J. Exper. Med. 1956, 104, 455.
- 9) Fong, J., 他 : J. Exper. Med., 1957, 105, 25.
- 10) Mackaness, G.B. : J. Path. Bact. 1952, 64, 429.
- 11) Suzuki, H. 他 : Jap. J. Tuberc. 1960, 8, 125.
- 12) Myrvik, Q.N. 他 : J. Immunol. 1961, 86, 128.
- 13) 板木 皓二 : 呼吸と循環 1956, 4, 440.
- 14) 石河重利 : 京大結研紀要, 昭34, 7, 191.
- 15) 大島駿作他 : 京大結研紀要, 昭36, 9, 154.
- 16) Oshima, S. : British J. Eyper. Path. 1961, 42, 138.
- 17) Oshima, S. 他 : Bact Proc. 1960, 113.
- 18) Hanks, J.H. 他 : Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1949, 71, 196.
- 19) Morgan, J.F. 他 : Proc. Soc. Exper. Biol. Med. 1950, 73, 1.
- 20) Merchant, D.J. 他 : Hand Book of Cell and Organ Culture, Burgess Publishing Co. Minneapolis, Minn. 1962.
- 21) McLinans, W.F. 他 : J. Immunol. 1957, 79, 428.
- 22) Phillips, H. : J. Exper. Cell Res. 1957, 13, 341.
- 23) Youmans, G.S. 他 : Am. Rev. Tuberc. 1947, 55, 329.
- 24) Dubos, R.J. 他 : Am. Rev. Tuberc. 1947, 56, 334.
- 25) Suter, E. : J. Exper. Med. 1952, 96, 137.
- 26) Middlebrook, G. 他 : J. Exper. Med. 1947, 86, 175.
- 27) Bloch, H. : Am. Rev. Tuberc. 1948, 58, 662.
- 28) 大岩 弘治 : 日本細菌学雑誌 1956, 11, 787.
- 29) Bloch, H. 他 : Am. Rev. Tuberc. 1953, 67, 629.
- 30) Myrvik, Q.N. 他 : J. Immunol. 1961, 86, 133.
- 31) Dannenberg, J.R. 他 : J. Cell Biol. 1963, 17, 465.
- 32) Oren, R. : J. Cell Biol. 1963, 17, 487.
- 33) Heise, E. : 未発表

写真 1. 家兔 AM。結核菌液混合後 4 時間目

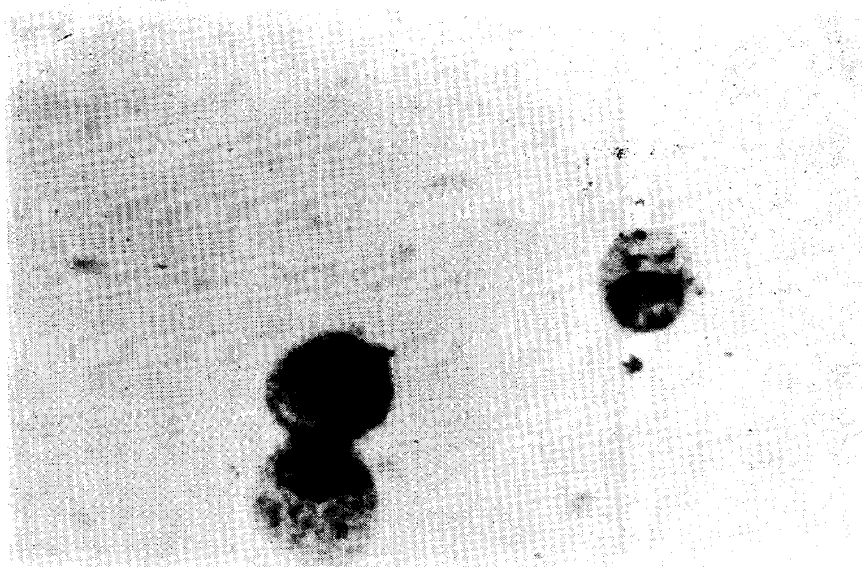


写真 2. 家兔 AM。結核菌液混合後 24 時間目

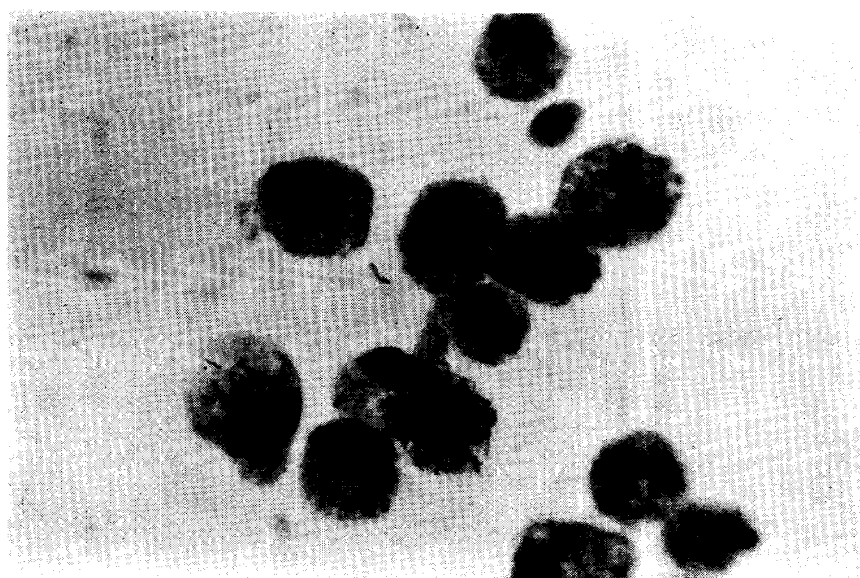


写真 3. 家兎 PM。結核菌液混合後 4 時間目

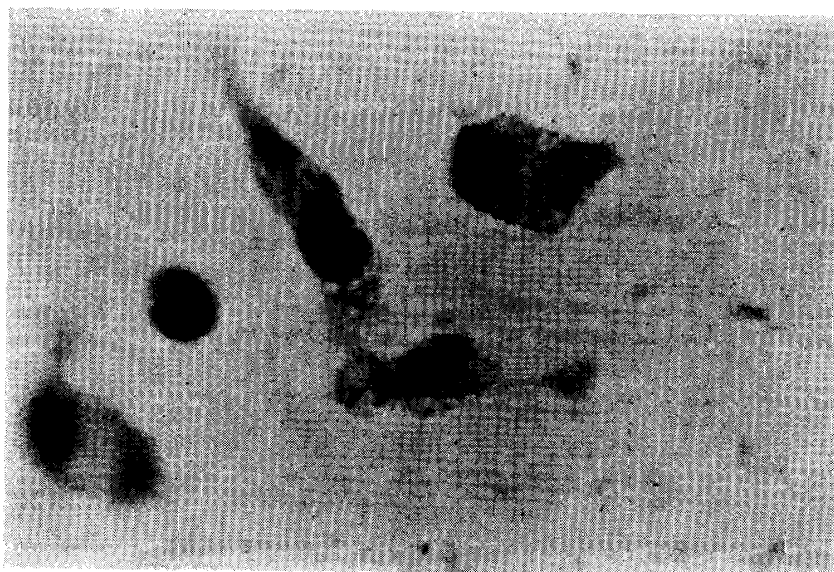


写真 4. 家兎 PM。結核菌液混合後 24時間目

