

組織培養法による移植免疫の研究

京都大学結核胸部疾患研究所胸部外科学部（指導：教授 長石忠三・助教授 寺松 孝）

伊 東 政 敏

〔第 1 篇〕 培養細胞における異種能動感作下抗原抗体反応

〔目 次〕

緒 言

第 1 章 体液性抗体による反応

第 1 節 実験方法

第 2 節 実験結果

第 2 章 細胞性抗体による反応

第 1 節 実験方法

第 2 節 実験結果

第 3 章 総括並びに考按

結 論

緒 言

臓器移植は今や臨床的にも応用されるに至っているが、今なお未解決の問題点を多く含んでおり、その最大のものは移植免疫であるといえる。

従来、移植免疫、特に同種類のそれは、ツベルクリン型反応、即ち遅延型過敏反応の一種であるとされ¹⁾、免疫血清による受動免疫 passive transfer はできないといわれている。一方、異種移植においては、血中抗体(古典的循環抗体)の関与が早くから注目されており、体液性抗体によって移植された細胞が破壊される可能性が非常に強い²⁾と考えられている。

このように従来から同種及び異種の移植免疫の間には質的な差があると考えられていたが、Steinmvller が唯 1 回の皮膚移植をうけたダイコクネズミ血清を用いて移植免疫の受動的移入が可能なることを証明³⁾して以来、同種移植に

おける免疫反応を遅延型過敏反応のみとする従来の考え方には疑問が抱かれるに至っている。今日、あらためて異種移植と同種移植における免疫反応の相異について再検討を加えなければならないとする所以である。

その際には、異種移植と同種移植との 2 つの場合について、体液性抗体による免疫反応と細胞性抗体による免疫反応をそれぞれ独立的に招来せしめ、これら計 4 つの反応について比較検討することが肝要であると考えられる。元来、移植免疫反応には、グラフト抗原対宿主体液性抗体という反応系と、グラフト抗原対宿主細胞性抗体という反応系との 2 つが混在しており、これをそれぞれ異種と同種の場合にわけて検討する必要があるということである。ディフュージョン・チェンバー法⁴⁾を移植免疫の検討に応用することはこのような意図の下に行なわれたものであり、10m μ ~5 μ の多孔性ミリポアフィルターの中に移植片を入れ、これを宿主腹腔内に挿入することにより、チェンバー内の移植片とホストの体液性抗体とのみの反応が純粹に観察されるわけである。

しかしながら、この方法では、体液性抗体との反応は観察し得ても、細胞性抗体による反応を分離できないため、最近では、組織培養法による研究が一部で試みられている。すなわち、ドナー動物の組織を培養し、これにレシピエント動物の血清またはリンパ球などをそれぞれ別

個に添加し、体液性抗体による反応または細胞性抗体による反応を別々に起させようというのがその原理である。

著者もまた、組織培養法を用い、異種および同種移植免疫反応を、体液性抗体および細胞性抗体の2つの反応に分けて、それぞれ独立した形で観察することにより、移植免疫における体液性抗体の存在を再確認するとともに、とくに同種移植免疫における細胞性抗体と体液性抗体との間の反応形式の差異を明らかにしたいと考えたのである。

まず、第1篇においては、異種動物よりの抗原で感作した場合の典型的な抗原抗体反応について培養細胞を標的細胞として観察し、これにより得た知見を基として、以下、それぞれ、第2篇および第3篇において異種および同種移植免疫反応について検討を加えた。

著者は、本検討にあたっては、抗原抗体反応に際して標的細胞に招来せられる形態学的な変化について主として観察したが、これは、従来、この種の検討法による報告では、形態学的変化に関する詳細な記載が少ないからに他ならない。

培養細胞を用いた抗原抗体反応についての検討は少なくないが、培養細胞は全て牛血清を用いた培養液に培養されたものであり、これに直ちに、異種蛋白液である、感作動物血清を体液抗体として加えるなどの不注意が見出される。この場合には、抗体を含む血清それ自体が異種蛋白であり、そのために抗原抗体反応とともに異種蛋白としての傷害作用が培養標的細胞に併せみられることになるからである。

そこで、著者は、まず、第1篇においては、培養液その他にも充分注意を払いつつ標的細胞を培養し、これを用いて可及的に純粋な形での典型的な抗原抗体反応について、主として形態学的に検討したのである。

第1章 体液性抗体による反応

第1節 実験方法

第1項 感作方法

鶏胎児およびモルモットの組織ホモジネートを抗原として成熟家兎の能動的感作を行なった。鶏胎児は、

入卵後9ないし15日目に卵殻より無菌的にとり出したものであり、モルモット臓器は成熟モルモットより無菌的にとり出した心臓、肝臓、腎臓および脾臓の混合物である。これらの鶏胎児またはモルモット臓器は、生理的食塩水で数回洗滌したのち、ガラスホモジナイザーで充分すりつぶして滅菌試験管中で -20°C に保存する。

ラノリン1と流動パラフィン2の割合に混合したFreundの不完全アジュヴァント⁹⁾ 2mlに、上記の鶏胎児またはモルモット組織ホモジネート 0.5mlを加え、さらにガラスホモジナイザーで充分攪拌する。

この液1mlを1週に1回ずつ、計4回ないし6回連続して、1回の感作とする。このようにして感作した家兎の血清を体液性抗体として実験に供した。

第2項 培養細胞

鶏胎児：入卵後9ないし12日目の鶏胎児を卵殻より無菌的にとり出し、燐酸緩衝液で充分洗滌した後、緩衝液中で鶏胎児より心臓をとり出す。

モルモット肝臓：成熟モルモットをネブタール麻酔下で開腹して、無菌的に肝臓組織をとり出し緩衝液で充分洗滌する。

このように無菌的にとり出した鶏胎児心臓またはモルモット肝臓を、緩衝液をみたしたシャーレの中で、メスを用いて 1mm^3 の大きさに細断する。ヘパリン加鶏血漿を塗布した短冊カバーガラス($10\text{mm}\times 25\text{mm}$)に、細断した鶏胎児心臓細片またはモルモット肝臓細片をのせ、 37°C に約20分間放置すると鶏血漿よりフィブリンが折出し、組織片はカバーガラス壁に軽く固定される。この短冊カバーガラスを短い試験管に入れ、さらに10%の割合に正常家兎血清を含む表1に示すような、10%家兎血清加YLH液(YLH-RS10液)を培養液として加える。これにダブルゴム栓を施して、 37°C 恒温室中に 5° に傾斜して静置、培養する。

培養後は3日目毎に培養液を交換して、培養組織片に新しい栄養を補給する。このような組織培養によって4日目位より組織片周囲に細胞の増殖が認められるようになる。培養開始後、6日ないし7日目の培養細胞を実験に供した。

第3項 抗原抗体反応

鶏胎児またはモルモットの組織ホモジネートによって能動的に感作された家兎の血液より血清を分離し、これを感作家兎血清として使用する。16%正常家兎血清加YLH液に、その濃度が25%になるように新鮮感作家兎血清を加える。

この培養液に、燐酸緩衝液で充分洗滌した鶏胎児心

表 1

YLH 液及び YLH-RS10 液の組成			
1) YLH 液 (Yeastextract-Lactalbumin-Hanks 氏液)			
NaCl	8.00g	KCl	0.40g
CaCl ₂	0.20	MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O	0.06	KH ₂ PO ₄	0.06
Glucose	1.00	NaHCO ₃	0.25
Yeast extract	0.70	Lactalbumin	5.00
Aq. dest. ad 1000 ml			
2) YLH-RS10 液(10%家兎血清加 YLH 液)			
YLH	90 ml		
家兎血清	10 ml		

臓またはモルモット肝臓培養細胞を入れ、37°Cに4時間放置した後、温い緩衝液で洗滌し、メタノールで5分間固定、May-Grünwald-Giemsa染色を施して鏡検する。

対照群は、感作家兎血清の代りに、新鮮な正常無処置の家兎血清を用いて全く同様の操作を行なったものである。なお、対照群は各実験群毎においてある。

鏡検に当っては、①培養細胞の分裂頻度の変化、②細胞分裂の時期別の頻度の変化、および③培養細胞の形態学的変化などについて検討を加えた。

第2節 実験結果

第1項 細胞分裂係数の推移

鶏胎児で感作した5羽の家兎およびモルモット組織で感作した4羽の家兎、計9羽について

表2のような成績を得た。細胞分裂の頻度をあらわすため、細胞分裂係数(静止細胞1000個について細胞分裂像を呈している細胞の数)を算定した。

鶏胎児心臓およびモルモット肝臓培養細胞に正常家兎血清を加えた対照群では、静止細胞1000について10.9個の分裂中の細胞が認められる。

これに対し、感作家兎血清を使用した実験群では、0.9個の分裂細胞が認められるのみであり、細胞分裂の頻度は対照群の8.2%に減少している。

また、実験群には、細胞分裂頻度の減少に加うるに、細胞分裂の形相においても異常が認められるものが多く、それらでは、染色体の配列が不規則で、染色体も塊状に変形している。

第2項 細胞分裂の時期による分類

一般に、細胞分裂はその時期に従って前期、中期、後期および終期に分類されている。

鶏胎児心臓およびモルモット肝臓の培養細胞に正常家兎血清を加えた対照群では、表3のように、細胞分裂は前期のもの28.9%、中期のもの51.8%、後期のもの10.7%および終期のもの8.6%の比率を示している。

一方、感作家兎血清を添加した実験群では、

表 2 細胞分裂係数の変化

		無処置家兎血清	感作家兎血清	感作家兎血清 無処置家兎血清	無処置家兎 脾臓細胞	感作家兎 脾臓細胞	感作家兎脾臓細胞 無処置家兎脾臓細胞
				×100			×100
鶏 胎 児	No. 1	21	1	4.8%	15	2	13.3%
	No. 2	10	4	40.0	8	5	62.5
	No. 3	11	0	0	—	—	—
	No. 4	8	0	0	—	—	—
	No. 5	14	0	0	—	—	—
	平 均	12.8	1.0	7.8	11.5	3.5	30.4
モ ル モ ット	No. 6	17	2	11.8	7	1	14.3
	No. 7	4	0	0	—	—	—
	No. 8	—	—	—	9	2	22.2
	No. 9	7	0	0	—	—	—
	No.10	6	1	16.7	—	—	—
	平 均	8.5	0.8	8.8	8.0	1.5	18.3
平 均		10.9	0.9	8.2	9.8	2.5	25.6

表 3 細胞分裂の時期による分類 (体液性抗体)

		NRS					SRS				
		MC	前 期	中 期	後 期	終 期	MC	前 期	中 期	後 期	終 期
鶏	No. 1	62	15	30	10	7	3	0	1	2	0
	No. 2	30	10	15	3	2	12	4	7	1	0
胎	No. 3	33	9	17	5	2	0	0	0	0	0
	No. 4	24	8	11	2	3	0	0	0	0	0
児	No. 5	42	10	20	7	5	0	0	0	0	0
	平 均	38.2	10.4	18.6	5.4	3.8	3.0	0.8	1.6	0.6	0
モ	%	100	27.3	48.7	14.1	9.9	100	27	53	20	0
	No. 6	50	14	32	1	3	5	2	3	0	0
ル	No. 7	12	5	6	0	1	0	0	0	0	0
	No. 9	21	5	13	2	1	0	0	0	0	0
モ	No.10	17	8	7	1	1	4	0	2	2	0
	平 均	25.0	8.0	14.5	1.0	1.5	2.3	0.5	1.3	0.5	0
ット	%	100	32.0	58.0	4.0	6.0	100	22.2	55.6	22.2	0
全 平 均		32.3	9.3	16.8	3.4	2.8	2.7	0.7	1.5	0.5	0
全 %		100	28.9	51.8	10.7	8.6	100	25.0	54.2	20.8	0

NRS: 無処置家兎血清 SRS: 感作家兎血清 MC: 細胞分裂係数
(数値は静止細胞3000に対する分裂中の細胞数を示す.)

前期のもの25.0%, 中期のもの54.2%, 後期のもの20.8%および終期のもの0%であり, 前期および中期の分裂像を示すものでは, 対照群との間に大きな差異はみられない。しかし, 後期のものは対照群のほとんど2倍に達し, その反面, 終期の分裂像を示すものは全くみられない。

第3項 培養細胞の受ける形態学的変化

感作家兎血清を加えると, 鶏胎児心臓およびモルモット肝臓の両者の場合ともに, それらの培養細胞の核, 原形質, 細胞膜などに強い傷害がみられる。

この細胞傷害の判定の基準としては, 無処置正常家兎血清を加えた場合の所見を採ってある。(写真1および3)。その際, 正常血清を加えた場合と比較して感作家兎血清を加えた培養細胞の細胞構造が, 何等かの変化をうけている場合を細胞の変化ありあるいは傷害ありと判定し, 一つの実験において観察培養細胞の半数以上が変化あるいは傷害をうけている場合には傷害陽性とみなすことにした。

このような基準の下に, 細胞の部位に分けて

細胞の傷害を観察することにより, 写真2, 写真4および表4のような結果を得た。

まず, 核についてみると, 実験例9例のうち, 核の大きさは5例において縮小, 核小体は8例において不明瞭または濃染している。

また, 核膜は8例において厚く且つ濃染, 核構造は8例において不明瞭となり且つ9例全てに濃染, 核の変形は6例においてみられている。

原形質においては, 繊細な顆粒構造が消失し混濁腫脹するもの6例, 空胞の増強せるもの2例, 染色性の変化せるもの7例, 変形せるもの5例であった。

細胞膜ではその輪廊が不明となったもの7例, 断裂をみるもの2例である。

第4項 培養細胞の分裂頻度と細胞傷害度との関係

細胞分裂係数の低下と細胞傷害の程度とは, 図1にみられるように, 明らかに正の相関関係がみられ, 細胞傷害の著しい培養細胞群では, 細胞分裂頻度の減少も著明であることが判る。

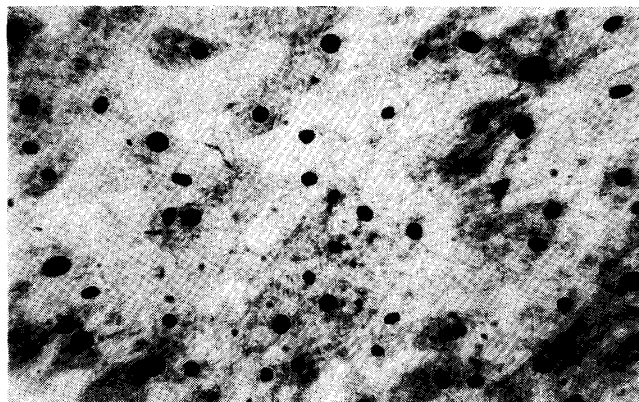


写真1 鶏胎児心培養細胞＋無処置家兎血清
M.G. 染色×400



写真2 鶏胎児心培養細胞＋感作家兎血清
M.G. 染色×400

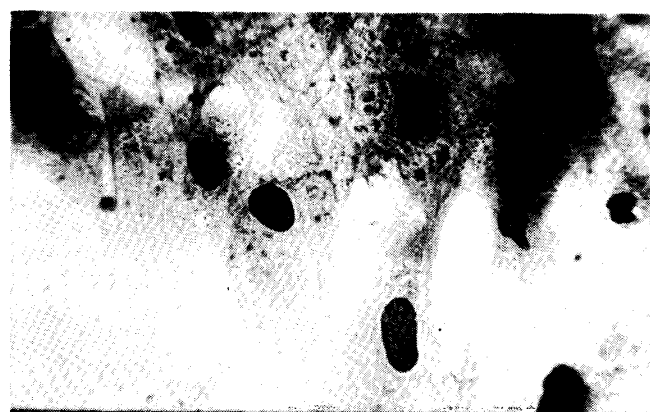


写真3 モルモット肝培養細胞＋無処置家兎血清
M.G. 染色×400

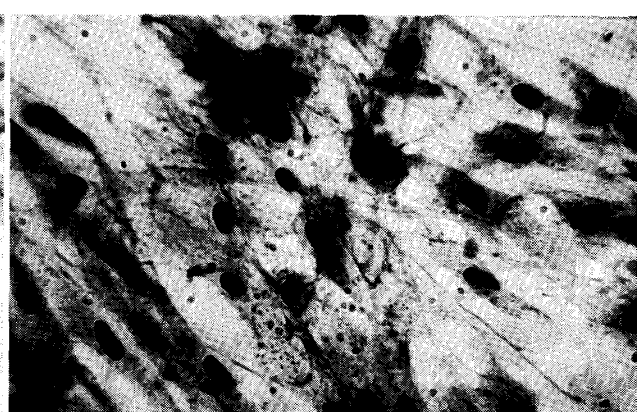


写真4 モルモット肝培養細胞＋感作家兎血清
M.G. 染色×400

表4 異種感作における細胞傷害の部位と程度

		CE → 兎							モル → 兎							CE 及びモル合計 における細胞傷害 %				
		体 液 性 抗 体					細胞性抗体		体 液 性 抗 体					細胞性抗体						
		1	2	3	4	5	計	1	2	計	6	7	9	10	計	6	8	計	血 清 抗 体	細胞性抗体
核	大きさ	+	-	-	+	+	3	-	-	0	-	+	-	+	2	+	-	1	55.6	25
	核小体	+	-	+	+	+	4	+	-	1	+	+	+	+	4	+	+	2	88.9	75
	核 膜	+	-	+	+	+	4	+	+	2	+	+	+	+	4	+	+	2	88.9	100
	核構造	+	-	+	+	+	4	+	-	1	+	+	+	+	4	+	+	2	88.9	75
	染色性	+	+	+	+	+	5	+	-	1	+	+	+	+	4	+	+	2	100	75
	形	+	-	-	+	+	3	-	-	0	+	+	-	+	3	+	-	1	66.7	25
原 形 質	顆 粒	-	+	-	+	+	3	-	-	0	+	+	+	-	3	-	-	0	66.7	0
	空 胞	-	-	-	-	+	1	-	-	0	-	+	-	-	1	-	-	0	22.2	0
	染色性	+	-	+	+	+	4	-	-	0	-	+	+	+	3	+	-	1	77.8	25
	形	-	+	+	+	+	4	-	-	0	-	+	-	-	1	+	-	1	55.6	25
細胞膜	輪 廓	+	-	+	+	+	4	-	-	0	-	+	+	+	3	+	-	1	77.8	25
	連続性	-	-	-	+	+	2	-	-	0	-	-	-	-	0	-	-	0	22.2	0
傷害の程度		8	3	7	11	12	41	4	1	5	6	11	7	8	32	9	4	13	67.6	37.5

(註) CE: 鶏胎児 モル: モルモット

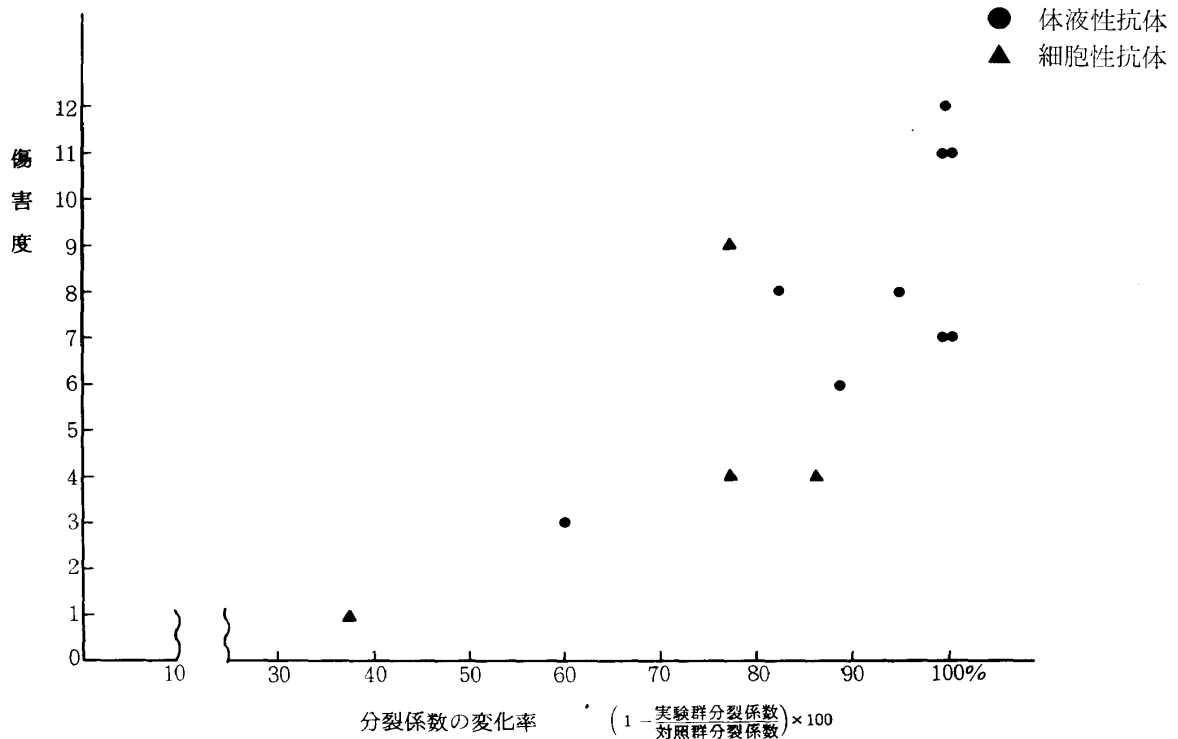


図1 異種感作における細胞分裂係数の変化と細胞傷害との関係

第2章 細胞性抗体による反応

第1節 実験方法

第1項 実験動物および細胞浮游液

感作家兎は前章と同一の家兎を用いた。すなわち、感作家兎血清として血液採取を行なった同じ家兎から、脾臓を取り出して細胞性抗体についての反応を観察したのである。

このような感作家兎をネブタール麻酔下で開腹し、無菌的に脾臓を取り出し、燐酸緩衝液で洗滌し、同液を入れたシャーレの中でメスを用いて可及的細かく細断する。これに20%新鮮家兎血清加YLH液を適量加え、1mm³中に約50,000個の脾臓細胞を含有するように調整することにより、感作家兎脾細胞浮游液が得られる。

これに対して、対照群では、無処置正常家兎の脾組織を細断して正常家兎脾細胞浮游液を作り、この液の中に培養細胞を入れたものを用いた。

第2項 標的培養細胞

前章第2項に述べた方法により、鶏胎児心臓およびモルモット肝臓の組織細片を正常家兎血清加YLH液中に培養し、これを標的培養細胞とする。

第3項 抗原抗体反応

第1項に述べた方法で作製した感作家兎脾臓細胞浮游液を滅菌シャーレに入れる。短冊カバーガラス上

に培養してある鶏胎児心臓およびモルモット肝臓細胞を、温かい燐酸緩衝液で洗滌した後、カバーガラスと共にシャーレに入れ、標的培養細胞の蒙む形態学的変化について観察した。

すなわち、感作家兎脾細胞浮游液を含むシャーレの中に、培養細胞の乗った短冊カバーガラス6～8枚を入れ、37°Cに20時間放置した後、温かい燐酸緩衝液で洗滌し、添加細胞の大きな塊、血清などを洗い落とす。この後、メタノール固定、May-Grünwald-Giemsa染色を施して鏡検する。

なお、対照群としては、感作家兎脾臓細胞浮游液の代りに、第1項に述べた正常家兎脾臓細胞浮游液を用いた他は、実験群と全く同様の操作を行なったものを用いた。

第2節 実験結果

第1項 細胞分裂係数の推移

鶏胎児で感作した2羽、モルモット臓器で感作した2羽、計4羽の家兎について検討し、前に掲げた表2のような結果を得た。

鶏胎児心臓およびモルモット肝臓培養細胞に正常家兎の脾臓細胞浮游液を加え、37°Cに20時間放置した対照群では、静止細胞1,000個に対して9.8個の分裂細胞が認められる。

これに対し、感作家兎の脾臓細胞浮游液を加

えた場合には、静止細胞1,000個に対して2.5個の分裂細胞を認めるのみで、実験群の細胞分裂の頻度は対照群の25.6%に減少している。

第2項 細胞分裂の時期による分類

標的培養細胞に正常家兎の脾臓細胞浮游液を加えた対照群における細胞分裂は、表5にみられるように、前期のもの36.5%,中期のもの47.4%,後期のもの9.4%および終期のもの6.7%となっている。

感作家兎の脾臓細胞浮游液を加えた実験群では、前期のもの32.0%,中期のもの44.9%,後期のもの23.1%であり、終期のものは0%である。前期および中期の分裂像を示すものの割合は、対照群と実験群の間に大なる相異は認められないが、実験群では、後期のものが相対的に多くなり、終期の分裂像は全くみられない。

第3項 培養細胞のうける形態学的変化 標的培養細胞と感作家兎脾臓細胞との接触に

よって、両者ともに、核、原形質、細胞膜などに著明な変化がみられる。

感作家兎脾臓細胞浮游液を加えた実験群と無処置正常家兎脾臓細胞浮游液を加えた対照群の培養細胞の形態学的変化について、前章第2節第3項に述べた判定方法に従って細胞傷害を観察し、表4のような結果を得た。

対照群の写真5, 7および実験群の写真6, 8にみられるように、鶏胎児心臓からの培養細胞とモルモット肝臓からの培養細胞とではやや異なる変化がみられる。

鶏胎児心臓由来の培養細胞では、核膜は厚く濃染、核小体も濃染し屢々不明瞭となり、核構造もまた濃染し不明瞭となる。核全体として小型化し、変形し、中等度の核濃縮の像を呈する。

モルモット肝臓由来の培養細胞を用いた実験群では、核構造、核小体共に消失し、核は均等に赤染している。

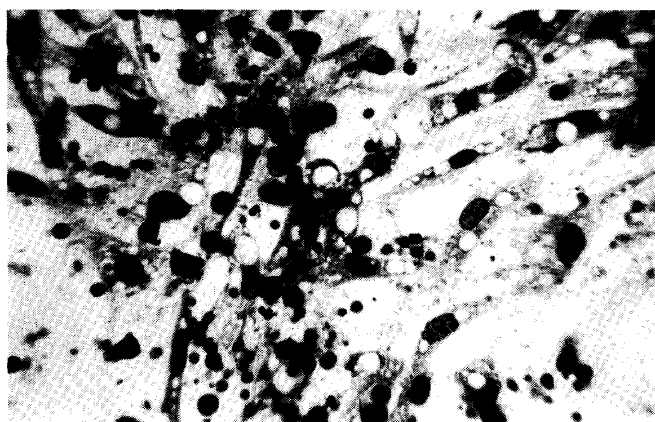


写真5 鶏胎児心培養細胞+無処置家兎脾細胞
M.G. 染色×400

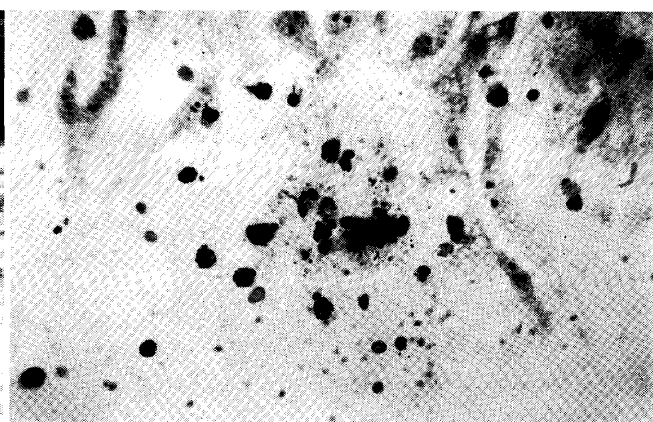


写真6 鶏胎児心培養細胞+感作家兎脾細胞
M.G. 染色×400



写真7 モルモット肝培養細胞+無処置家兎脾細胞
M.G. 染色×400



写真8 モルモット肝培養細胞+感作家兎脾細胞
M.G. 染色×400

表 5 細胞分裂の時期による分類(細胞性抗体)

	NRM					SRM				
	MC	前 期	中 期	後 期	終 期	MC	前 期	中 期	後 期	終 期
No. 1	45	12	21	6	6	6	2	3	1	0
No. 2	25	8	12	3	2	14	4	8	2	0
No. 6	21	9	11	1	0	5	2	2	1	0
No. 8	27	14	12	1	0	6	2	1	3	0
平 均	29.5	10.8	14.0	2.8	2.0	7.8	2.5	3.5	1.8	0
%	100	36.5	47.4	9.4	6.7	100	32.0	44.9	33.1	0

(註) NRM: 無処置家兎脾細胞 SRM: 感作家兎脾細胞 MC: 細胞分裂係数
(数値は静止細胞3,000に対する分裂中の細胞数を示す。)

原形質では両群ともに同じような変化がみられ、染色性は低下し形もやや変形するが、顆粒、空胞などの異常はみられない。また、細胞膜も構造が不明なものが一部にみられる。

以上のように、脾臓細胞添加群では、原形質の変化に比べて、核の蒙むる変化が著明である。

第4項 添加リンパ球様細胞の変化

家兎脾臓細胞浮游液と培養細胞との接触によって、培養細胞には上述のような傷害像がみられるが、培養細胞と接触している添加脾臓細胞(主にリンパ球様細胞)にも変化がみられる。

表6に示したように、対照群では、培養細胞と接している添加リンパ球様細胞100個のうち、変形せるものは平均6.5個、破壊像を呈したものは平均2.3個、合計8.8個に何等かの変化がみられる。

表6 添加リンパ球様細胞の変化

	対 照 群 (C)			実 験 群 (F)			E / C
	変形	破壊	計	変形	破壊	計	
No. 1	6	2	8	15	35	50	6.3
No. 2	7	2	9	15	11	26	2.9
No. 6	7	2	9	13	18	31	3.4
No. 8	6	3	9	12	27	39	4.3
平 均	6.5	2.3	8.8	13.8	22.8	36.5	4.2

これに対して、実験群では、培養細胞と接している添加リンパ球様細胞100個のうち、変形せるものは平均13.8個、破壊像を呈したものは平均22.8個、合計36.5個に変化がみられる。

すなわち、添加された感作リンパ球様細胞は、

正常細胞を加えた場合に比べて4倍以上の高率に変化を蒙り、特に破壊されるものの割合が高い。

第3章 総括並びに考按

本篇では、第2篇および第3篇における移植免疫反応の機序に関する研究についての基礎的知見を得る目的で、抗原配列の差の大きな異種動物を用い、ドナー組織のホモジネートを抗原とした能動的な感作を行なうことにより招来される典型的免疫反応について、抗原とした組織からの培養細胞を標的細胞として観察した。

著者の成績によると、感作家兎の抗体を含む感作家兎血清あるいは脾臓細胞は、モルモット肝臓および鶏胎児よりの標的培養細胞に対して細胞傷害的に作用する。

すなわち、感作家兎血清の添加後4時間で、鶏胎児よりの標的培養細胞およびモルモットの肝臓よりの標的培養細胞の分裂頻度は約12分の1に減少し、形態学的には著明な核濃縮(核は縮小、核膜は厚く、核小体、核構造は不明瞭となり濃染)と原形質の混濁、腫脹および変形等がみられる。

鶏胎児心臓またはモルモット肝臓よりの標的培養細胞に感作家兎脾臓細胞を加えると、添加したリンパ球様細胞は標的培養細胞の周囲に凝集する。一方、培養細胞では、その分裂頻度は減少し、著明な細胞傷害がみられる。その時の細胞傷害は主として核の著明な変化であるが、鶏胎児心臓とモルモット肝臓との間にやや異な

る反応がみられる。

体液性抗体を添加した場合には、両種の標的培養細胞にはほぼ同様な形の細胞傷害がみられるのに対して、細胞性抗体を加えた鶏胎児よりの標的培養細胞では、軽度の核濃縮がみられる時点で、既に、モルモットよりの標的培養細胞では、核の変化がより高度で均質に赤染されている状態となっている。これは後述するように、鶏とモルモットの間では、最も典型的な細胞反応を呈するまでに要する時間が異なっている為と考えられる。以下、これらの所見に文献からの知見等を参考にしつつ考按を加える。

組織培養法を応用することによって、緒言でのべたように、体液性抗体と細胞性抗体とを分離し、それぞれ別個に免疫反応を観察するという利点がもたらされるわけであるが、その際には、まず、体外で培養された細胞が生体内にあるときの特性、すなわち、種、個体、臓器などの特異性を保持しているか否かという問題について検討しておく必要がある。

生体の細胞は、これを培養すると、生体内とはやや変形した形態をとることが少なからずあり、そのために Champy⁶⁾ の「あらゆる組織細胞は、これを培養すれば一定期間後には何れも共通な原始型に復帰するものである」という説も生ずるに至ったのである。しかしながら、その後の研究成績は Champy 説を認めるにいたらず、現在では、むしろ、培養中においても、細胞の分化現象すらも認めうることがあるというのが通説となっている。すなわち、甲状腺は培養数カ月後にもその構造を保持して特殊ホルモンを分泌する⁷⁾、短期間の培養細胞はもちろん、長期間体外培養細胞からも抗体が産生される^{8,9,10)}、あるいは、鶏胎児の肝臓よりの培養細胞においても胆汁分泌¹¹⁾がみられる等の報告があるのである。

著者も、第3篇同種移植の予備実験で、家兎肝臓よりの培養細胞の PAS 染色でグリコーゲンと思われる顆粒を確かめており、上に述べた組織培養の一般原則と併せ考えると、著者の行った組織培養においても、培養細胞はその種、個体または臓器などの特異性をかなり保持し

ているものと考えて差し支えないと思われる。

さて、通常の臓器移植に際しては、“生きた組織”が移植されるのであるが、その際には、移植されたグラフトの抗原に対してホストに抗体が産生されるのみならず、移植されたグラフト自体にもホストに対する抗体が産生せられ、いわゆる Graft versus Host Reaction¹²⁾がみられるに至る。

それであるから、著者は、本篇では、複雑な移植免疫反応を検討するに先きだって、培養細胞を標的細胞とし、免疫血清学の概念でいう処の一般的な抗原抗体反応を観察したいと考えたのである。そこで、Graft versus Host Reaction を除外して観察するために、ドナー組織を生きた組織としてではなく、生細胞はほとんどない程度まで摩砕したホモジネートを抗原として用いたのである。

また、ホモジネートには、いわゆる Freund の不完全アジュバンドを免疫助成剤として加えたが、これはアジュバンドの抗体産生の促進作用を利用¹³⁾したいと考えた為である。

なお、アジュバンドを併用する時に家兎の免疫に用うべき抗原蛋白量としては、1回10ないし15mgが適当とされている¹³⁾。著者の実験では流動パラフィン・ラノリン混合物2mlに対し、2倍に稀釈した鶏胎児またはモルモットのホモジネート0.5mlを加えた。鶏胎児またはモルモットの組織中の蛋白含有量を20%とみなすと、アジュバンドとホモジネートとの混合液1ml中には約20mgの蛋白質があることになる。上記混合液1mlを1回感作量とした由縁である。

さて、高野等¹⁴⁾は、ラット肝臓由来細胞株(JTC-6)およびマウス由来L株で家兎を免疫し、その血清の両株に対する傷害作用を位相差顕微鏡下で観察している。

彼等の観察によると、7～12時間後には細胞質が濃縮し、核周囲に微小顆粒が増加する。しかし、核の内部構造にはあまり変化がみられず、40時間前後で全細胞の細胞質は無構造となるか消失し、濃縮した核のみが認められるようになるという。

この実験は、体外に取り出されて世代を重ねたいわゆる培養“株”細胞を抗原細胞として用いたものではあるが、その細胞傷害像からみると、著者の成績とほぼ同じ傾向を示していると思われる。

工藤ら¹⁵⁾は試験管内で受動的に感作された細胞の抗原抗体反応を 16mm 位相差顕微鏡微速度撮影法によって観察している。この実験では、正常家兎の大網より培養した線維芽様細胞に抗 BSA 家兎血清から精製した γ -Globulin を加えて受動的に感作させたものが使用されている。彼等の報告に従うと、“細胞体の excitation が約 30 分間続いたのち細胞体は dense となるが、これは細胞体のゲル化のためと考えられる。核および核小体の変化もみられる。このような変化は約 1 時間で反応が完結する”と述べているが、この細胞傷害の招来形式は、著者の成績とほぼ同じ傾向と考えてよいようである。

以上のように、先人の報告においても、著者の得た実験成績とほぼ同様の細胞傷害が観察されている。ただし、細胞傷害の発現までに要する時間については、それぞれの間に相当のひらきがみられるが、これは感作に用いられた抗原量や動物の種類などが相異なるためであろう。

なお、前記の 2 報告では、培養細胞を栄養する培養液についての記載がなされていないが、第 3 篇の考按で詳細に検討するように、組織培養法を応用して移植免疫反応を研究する場合には、培養液に添加する血清も重要な役割を果たすであろうことを附記しておきたい。

以上、異種動物間の能動的感作による抗原抗体反応のうちの体液性抗体による反応について述べた。次に、細胞性抗体による反応について、考按を加える。

異種動物間の能動的感作においては、体液性抗体に関する研究は多いが、脾臓細胞、リンパ球などの細胞性抗体に関する研究はほとんど皆無といってよい。

感作脾臓細胞によって招来された標的培養細胞での細胞傷害を感作血清によるそれと比較したのが 図 2 である。この図のように、体液性抗体により核・原形質ともに著明な傷害をうけ

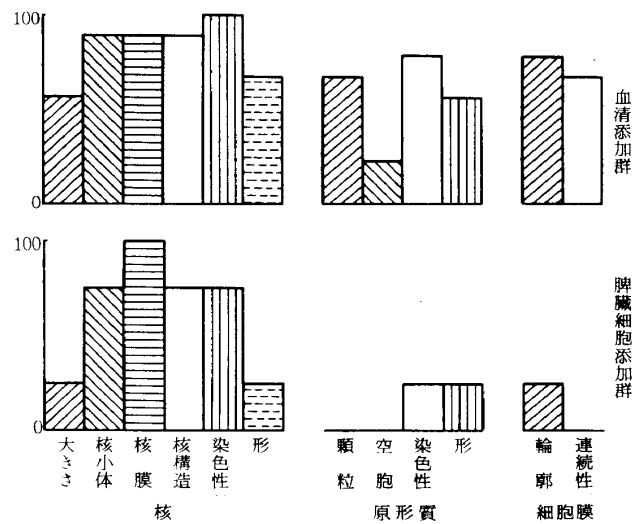


図 2 細胞構成々分別にみた傷害出現の頻度 (異種感作)

るが、細胞性抗体による反応では、核の変化が著明で、原形質の変化は軽度である。

著者は体液性抗体として血清を、細胞性抗体としては脾臓細胞を用いた。体液性抗体として感作動物の血清を用いることには異論はないと思われるが、細胞性抗体として脾臓細胞を用いることが適当か否かは検討しておかねばならない。

著者の場合、脾臓を細断して得る細胞浮游液は主としてリンパ球様細胞からなっている。また、Taylor 等¹⁶⁾の観察では、感作マウスおよび感作モルモットの脾臓組織は、Plasma blast 32.5%, Plasma Cell 16.5%, Lymphocyte 49.5%, Granulocyte 1.5%の組成を示している。

これらのことから、感作動物の脾臓細胞を細胞性抗体保有細胞とみなして使用してもさしつかえないといい得るようである。

最後に、問題となるのは、リンパ球様細胞と標的培養細胞とによる最も典型的な細胞変化の観察に必要な培養時間である。

これについて、Wilson¹⁷⁾は、ラット皮膚移植の試験管内免疫反応の観察で、添加したレスピエントリンパ球は、7時間を経過した頃より標的細胞に附着しはじめ、20時間後に細胞の著明な変化がみられるようになったと述べている。

著者の実験でも、鶏胎児よりの標的培養細胞に感作脾臓細胞を添加した場合、5～6時間までは著明な変化がみられず、20時間前後では

典型的な細胞傷害があらわれる。しかし、20時間以上にわたって培養を続けると変性が強くなる傾向がみられる。

このように、鶏胎児よりの標的培養細胞の場合では細胞性抗体による典型的な反応の観察に最も適当な時期は培養後20時間目である。

一方、モルモット肝臓からの標的培養細胞を用いた実験では、20時間目には、既に、培養細胞の核は無構造となり、均質に赤染する。原形質も染色不良となり、壊死に近い傷害像がみられる。

両者の間の以上のような差異は、免疫反応の一連の過程についての観察時点の差異により生ずるものと考えられる。著者の予備実験では、モルモットからの標的培養細胞に感作脾臓細胞を添加した場合、培養後4～5時間目まではほとんど変化はみられないが、20時間後にはすでに壊死の像がみられる。この場合には、5時間目と20時間目との間で適当な時期をとれば、壊死という最終的な変化に至る前の、免疫反応にもとづく典型的な細胞傷害を観察できたものと考えられる。

また、このことから、モルモットにみられる免疫反応は、鶏または後に述べる家兎にみられる反応よりも時間的に早いテンポで進むといえるようである。

結 論

本篇では、鶏胎児と家兎およびモルモットと家兎の二つの組合せで、それぞれ前者の組織ホモジネートで家兎を能動的に感作し、その間での抗原抗体反応について組織培養法を応用して観察した。この際、正常家兎血清を含む培養液を用いることにより、異種蛋白による非特異性異物反応を除外し、より純粋な抗原抗体反応系を作り出すことに留意して実験を行ない、以下のような結論を得た。

1) 鶏胎児心臓由来の培養細胞またはモルモット肝臓由来の培養細胞を標的培養細胞とし、これにそれぞれに対応した感作家兎血清を加えて37°Cに4時間放置すると、培養細胞の細胞分裂の頻度は著明に減少する。すなわち、鶏胎

児心臓からの培養細胞では対照群の分裂頻度の7.8%に、モルモット肝臓からの培養細胞では対照群の8.8%となっており、ともに10分の1以下の頻度にまで減少する。また、分裂細胞における染色体の形、配列にも異常が認められるものが多い。

2) この際の細胞分裂を、分裂の時期に従って、前期、中期、後期および終期に分類して、実験群と対照群とについてその割合を比較すると、前期および中期の分裂像を示すものの数には大きな変動はないが、相対的に後期のものが多く、終期の分裂像は全くみられない。このことから、抗原抗体反応による分裂の障害は、後期から終期へ移行する時点において招来されるものといえる。

3) さらに、標的培養細胞には著明な細胞傷害がみられる。すなわち、核の縮小・変形・濃染などのいわゆる核濃縮と、原形質の混濁・濃染・変形などである。これらの変化は鶏胎児心臓とモルモット肝臓とからの両培養細胞に共通しており、とくに相違する点は認められないが、傷害の程度は後者でより強くあらわれている。

4) 培養細胞の細胞分裂の頻度の減少の度合いと細胞傷害の程度との間には正の相関々係が認められ、細胞傷害の著しくなるに伴って細胞分裂の頻度の減少も著しくなっている。

5) 感作家兎血清の代りに感作家兎の脾臓細胞浮游液を加えても、同様に培養細胞の分裂の頻度は著明に減少し、鶏胎児心臓からの培養細胞では対照群の30.4%、モルモット肝臓からの培養細胞では対照群の18.3%となる。

6) この際の細胞分裂の傷害も、抗血清の場合と同様に、細胞分裂の後期から終期への移行の時点で招来される。

7) 鶏胎児心臓由来の培養細胞に感作家兎脾臓細胞を加えると、20時間後には、脾臓細胞は標的培養細胞周囲に凝集し、両者とも相互に傷害をうける。すなわち、培養細胞では中等度の核濃縮、核の変形、原形質濃染などの変化がみられ、また、培養細胞に接した添加脾臓細胞の多くは破壊されている。

8) モルモット肝臓由来の培養細胞に感作家兎脾臓細胞を加えた場合にも、脾臓細胞の培養細胞周囲への凝集および両者の細胞傷害がみられる。しかし、モルモット肝臓由来の培養細胞の場合には、核構造、核小体ともに消失し均等に赤染されており、原形質の染色性も低下して

いる。

すなわち、モルモット使用群での標的培養細胞の傷害は、鶏胎児の場合のそれよりもより高度である。これは、鶏に比較して、モルモットに起る免疫反応の進み方が早いと思われる。

〔第2篇〕 培養細胞における異種動物間移植免疫反応

〔目 次〕

緒 言

第1章 体液性抗体による反応

第1節 実験方法

第2節 実験結果

第2章 細胞性抗体による反応

第1節 実験方法

第2節 実験結果

第3章 総括並びに考按

結 論

緒 言

前篇においては、異種動物間における能動的感作における典型的抗原抗体反応の標的培養細胞に及ぼす影響について形態学的に観察したが、本篇では異種移植の場合についての成績を、第1篇の成績と比較しつつ検討する。

異種移植は外科学では、古くから種々の目的で使用されているが、これは危急の際にも移植材料を容易に入手しやすいことが主たる理由であろう。しかしながら、異種移植では当然のことながら、異種動物間における能動的感作の場合と本質的には同様な、種としての特異性抗原による激しい移植免疫反応がみられる。

一般に、異種組織を移植すると、グラフトとレシピエント組織との間に脈管系の連結がみられるようになる前に拒否現象がおこる。この点が同種移植とは本質的に相異なる点であり、同種移植の際にみられる著明な炎症性細胞浸潤が少なく、逆に血管系の変化が強くあらわれる。すなわち、移植された組織は体液性抗体によって破壊されるという面が強い。

この異種移植の分野における研究は多いが、

その大部分は特殊な部位、すなわち前眼房とかハムスターの cheek pouch 等に関するものである。また腫瘍組織も屢々用いられている。しかしながら、その成功率がほとんど零であるために異種移植についての一般の関心はうすく、その体系的な研究は少ない。

これらの点にかんがみて、著者は異種移植について、組織培養法を応用して検討を加えてみた。すなわち、ドナー動物培養細胞にレシピエント異種動物の体液性抗体または細胞性抗体を加えて、標的培養細胞のうける異種免疫反応を観察したのである。このような方法を用いて異種移植免疫反応における細胞変化をあきらかにした後、更に同じ方法によった同種移植についての検討成績と比較したいと考えたからである。

第1章 体液性抗体による反応

第1節 実験方法

第1項 移植方法

実験動物として鶏と家兎を用いた。鶏は入卵後14ないし18日目の胎児を、卵殻を破って無菌的に採り出して使用する。この鶏胎児を生食水で洗滌した後、成熟無処置家兎腹腔内に挿入する。すなわち、ネブタールで麻酔した家兎の下腹部を剃毛、消毒したのち、正中線にそって約2cmの切開を行なって腹腔内に鶏胎児を挿入する。切開創は、腹膜、筋膜、皮膚夫々別個に縫合する。

鶏胎児移植後3ないし6週目のレシピエント家兎を実験に供した。

第2項 培養細胞

第1篇第1章第1節にのべたような方法で、入卵後9ないし12日目の鶏胎児より、無菌的に心臓を採り出

し、細断した心臓組織片を短冊型カバーガラスにのせる。これを短試験管に入れ、10%の割合に正常家兎血清を含むYLH液を加えて培養を開始し、型のように3日毎に培養液を交換する。培養開始後6ないし7日目の鶏胎児心臓培養細胞を実験に供する。

第3項 免疫反応

腹腔内に鶏胎児を挿入された家兎の耳静脈より得た血液より血清を分離し、これをレシピエント家兎血清として使用する。10%正常家兎血清加YLH液に、この新鮮なレシピエント家兎血清を加え、レシピエント家兎血清の濃度が25%となる様に調整する。(正常家兎血清を加えると全体としての濃度は32.5%となる。)

短冊カバーガラス上に6ないし7日間培養した鶏胎児心臓の細胞を、温かい磷酸緩衝液で充分洗滌したのち、これに前記のレシピエント家兎血清を含むYLH液を加える。このようにすると、ドナーである鶏胎児心臓からの培養細胞とレシピエント家兎の血清とが相接することになり、ここに移植免疫反応が招来せられる。37°Cに4時間放置した後、型のように洗滌、固定した上で染色を施す。

対照群としては、レシピエント家兎血清に代えて、10%家兎血清加YLH液に更に新鮮な正常無処置の家兎血清を25%の割合に加えたものを対照群の培養細胞に加え、37°Cに4時間静置し、固定、染色する。

この対照群における培養細胞と、実験群の培養細胞とを対比し、それらにおける分裂頻度の変動、細胞分裂の時期別頻度の変化および形態学的変化などについて検討した。

第2節 実験結果

第1項 細胞分裂係数の推移

異種移植5例について、細胞分裂係数を算定し、表7のような結果を得た。鶏胎児心臓からの培養細胞に正常家兎血清を加えた対照群で

は、静止細胞1,000個に対して12.5個の分裂中の細胞がみられる。これに対し、異種移植を施行されたレシピエント家兎の血清を加えた実験群では、3.6個の分裂細胞がみられるのにすぎず、細胞分裂の頻度は対照群の約1/3にまで減少していることが判る。

また、細胞分裂の形態にも異常を認めるものが多く、染色体の配列が不規則となり、その形も塊状に変形しているものが多い。

第2項 細胞分裂の時期による分類

前篇でものべたように、培養細胞の分裂細胞を前期、中期、後期並びに終期に分類して、対照群と実験群とを比較した。

対照群では、表8のように、細胞分裂の前期のもの29.6%、中期のもの52.7%、後期のもの11.6%、終期のもの6.1%の割合になっている。

レシピエント家兎血清を添加した実験群では、前期のもの33.3%、中期のもの59.3%、後期のもの7.4%、終期のもの0%である。レシピエント家兎血清を加えることによって、ドナー由来の標的培養細胞の分裂頻度は著明に減少するが、とくに、後期以降の分裂像を示すものの減少が著しく、終期の像を呈するものは全くみられないことが特徴であり、これらの成績は、第1篇で得た成績とほぼ一致する。

第3項 標的培養細胞のうける形態学的変化

レシピエント家兎血清を加えた際の培養細胞の蒙むる形態学的変化について観察した。その際、1回の実験において、観察した培養細胞のうちの半数以上が対照の培養細胞の正常構造と

表7 細胞分裂係数の変化

	無処置家兎血清 (NRS)	レシピエント 家兎血清家 (XTRS)	XTRS NRS × 100	無処置家兎 脾臓細胞 (NRM)	レシピエント 家兎脾臓細胞 (XTRS)	XTRS NRS × 100
No. 1	11	1	9 %	—	—	— %
No. 2	—	—	—	14	4	29
No. 3	22	2	9	12	4	33
No. 4	8	0	0	—	—	—
No. 5	11	7	64	7	2	28
No. 6	9	8	89	—	—	—
平均	12.5	3.6	34	11	3.3	30

表 8 細胞分裂の時期による分類(体液性抗体)

	NRS					XTRS				
	M.C.	前 期	中 期	後 期	終 期	M.C.	前 期	中 期	後 期	終 期
No. 1	32	5	22	3	2	2	1	1	0	0
No. 3	66	26	29	8	3	5	5	0	0	0
No. 4	24	6	12	4	2	0	0	0	0	0
No. 5	32	7	17	6	2	22	0	21	1	0
No. 6	36	9	15	0	2	25	12	10	3	0
平 均	36	10.6	19	4.2	2.2	10.8	3.6	6.4	0.8	0
%	100	29.6	52.7	11.6	6.1	100	33.3	59.3	7.4	0

NRS: 無処置家兔血清 XTRS: 異種移植レシピエント家兔血清
M.C.: 細胞分裂係数(数値は静止細胞3000に対する分裂細胞数)

は異なった病的状態にある場合に傷害陽性とした。

写真 9, 10及び表 9 から明らかなように, 実験群では, 著明な核濃縮と原形質混濁とが認められる。

実験例 5 例のうち, 核の小型化のみられるもの 3 例, 核膜が厚く濃染されるもの 3 例, 核構造が不明瞭となるもの 4 例, 核の変形は 3 例, 核が全体として濃染しているものは全例にみられる。細胞質では, 全例において繊細な顆粒構造が消失し, 混濁腫脹が認められ, またやや濃染されている。原形質の外形は 4 例で変形がみられるが, 空胞などにはとくに顕著な変異はみとめられない。細胞膜ではその輪廓が不明のものが 2 例あり, 1 例では断裂が著明である。

第 2 章 細胞性抗体による反応

第 1 節 実験方法

第 1 項 移植方法および培養細胞

前章の同項と同じである。

第 2 項 脾臓細胞浮游液の調製

鶏胎児を腹腔内に挿入されたレシピエント家兔をネンブータル麻酔下で開腹し, 無菌的に脾臓を取り出す。温かい燐酸緩衝液で洗滌, 同液を入れたシャーレの中で可及的細かく細断する。このようにして得た, 主としてリンパ球様細胞からなるレシピエント家兔の脾臓細胞を, 25%新鮮無処置家兔血清加 YLH 液に加え, 1mm³ 中に約 50,000 個の脾臓細胞を含有するようにして, これを脾臓細胞浮游液とする。

対照群では, 無処置正常家兔の脾臓組織を細断し, 同様な方法で正常家兔脾臓細胞浮游液を作成した。

第 3 項 免疫反応の観察方法

短冊カバーグラス上に培養した鶏胎児心臓由来の標的培養細胞を温かい燐酸緩衝液で静かに洗滌した後, カバーグラスごと, レシピエント家兔脾臓細胞浮游液をみたしたシャーレに入れる。このようにして, シャーレの中に短冊カバーグラス 6~8 枚を入れ, 37°C に



写真 9 鶏胎児心培養細胞 + 無処置家兔血清
M.G. 染色 × 400

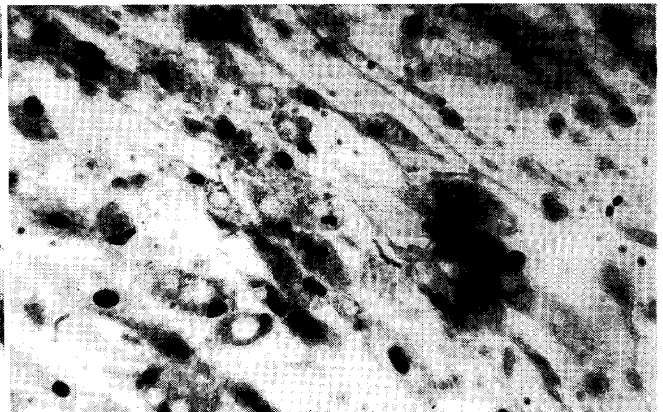


写真 10 鶏胎児心培養細胞 + 異種移植家兔血清
M.G. 染色 × 400

20時間放置した後、温かい磷酸緩衝液で洗滌して添加細胞の大きな塊、血清等を洗い落とす。このあと、型の通り洗滌、固定、染色を施こした上で鏡検する。

第2節 実験結果

第1項 細胞分裂係数の推移

鶏胎児心臓由来の標的培養細胞にレシピエント家兎の脾臓細胞を加えた3例の成績は、前掲の表7の通りである。鶏胎児心臓からの培養細胞に無処置正常家兎脾臓細胞浮游液を加えて、37°C に20時間放置した対照群では、静止核細胞1,000個に対して11個の分裂核を認める。

これに対し、レシピエント家兎脾臓細胞浮游液を加えると、静止核細胞1,000個に対し分裂中の細胞は3.3個であり、実験群の細胞分裂頻度は対照群の約1/3にまで減少している。

第2項 細胞分裂の時期による分類

培養細胞の中で分裂像を示すものについて前述のように4期に分けると、表10のような結果が得られた。

対照群では、前期のもの52%、中期のもの36%、後期のもの7%および終期のものが5%の割合にみられる。

これに対し、レシピエント家兎の脾臓細胞浮游液添加群では、前期のもの37.5%、中期のもの41.6%、後期のもの13.5%および終期のもの

7.3%である。前期のものが減少し、中期の分裂像を示すものがやや多くなっているのに対して、後期および終期の分裂像を呈するものには大きな変動はみられない。

この成績は、第1篇の異種能動感作における成績と反対とはなっているが、全体としては対照群との間に大差はないといってよいと思われる。

第3項 培養細胞のうける形態学的変化

実験群では、培養細胞（抗原細胞）および脾臓細胞（抗体含有細胞）の両者ともにおいて、核・原形質、細胞膜等に著明な変化が認められた。それらのうち、典型的なものを例示すると写真11および12にみられる通りである。

表10に示したように、核の変化が強く、その小型化、核膜の肥厚と濃染、核構造の不明瞭化などのいわゆる核濃縮としての変化がみられる。核小体は多く不明となるが、核の変形は著明でない。原形質は全例濃染するが、顆粒、空胞およびその形などには著変はみられず、一部では細胞膜の輪廓が鮮明になっているものもある。なお、細胞傷害の判定法は本篇第1章で述べた基準に従っている。

第4項 添加リンパ球様細胞の変化

実験群では、標的培養細胞には前述のような

表 9 異種移植における細胞傷害の部位と程度

		体 液 性 抗 体						細 胞 性 抗 体				細 胞 傷 害 の %	
		1	3	4	5	6	計	2	3	5	計	体液性抗体	細胞性抗体
核	大 き さ	—	+	+	—	+	3	+	+	+	3	60	100
	核 小 体	+	+	+	—	—	3	+	+	—	2	60	67
	核 膜	—	+	+	+	—	3	+	+	+	3	60	100
	核 構 造	+	+	+	+	—	4	+	+	+	3	80	100
	染 色 性	+	+	+	+	+	5	+	+	+	3	100	100
	形	+	+	+	—	—	3	—	—	—	0	60	0
原 形 質	顆 粒	+	+	+	+	+	5	—	—	—	0	100	0
	空 胞	—	—	—	—	—	0	—	—	—	0	0	0
	染 色 性	+	+	+	+	+	5	+	+	+	3	100	100
	形	—	+	+	+	+	4	+	—	—	1	80	33
細胞膜	輪 廓	+	—	+	—	—	2	+	—	—	1	40	33
	連 続 性	—	—	+	—	—	1	—	—	—	0	20	0
傷 害 度		7	9	11	6	5	38	8	6	5	19		

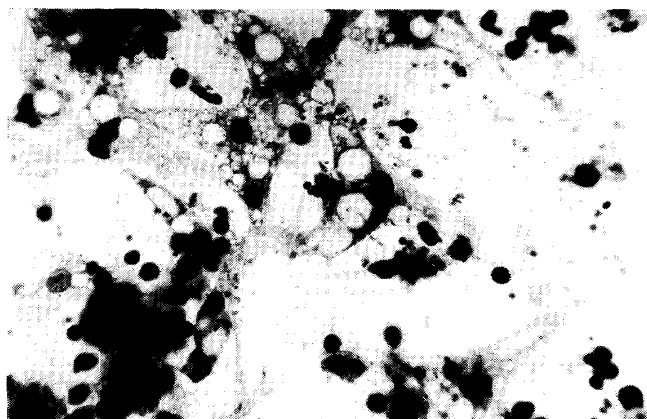


写真11 鶏胎児心培養細胞＋無処置家兎脾細胞
M.G. 染色×400



写真12 鶏胎児心培養細胞＋異種移植家兎脾細胞
M.G. 染色×400

表 10 細胞分裂の時期による分類(細胞性抗体)

	NRM					XTRM				
	M.C.	前 期	中 期	後 期	終 期	M.C.	前 期	中 期	後 期	終 期
No. 2	42	24	14	2	2	11	5	4	1	1
No. 3	36	18	14	3	1	12	4	5	2	1
No. 5	22	10	8	2	2	6	2	3	1	0
平 均	33.3	17.3	12.0	2.3	1.6	9.6	3.6	4.0	1.3	0.7
%	100	52.0	36.0	7.0	5.0	100	37.5	41.6	13.5	7.3

NRM: 無処置家兎脾臓細胞添加群 XTRM: 異種移植レシピエント家兎脾臓細胞添加群

M.C.: 細胞分裂係数(数値は静止細胞3000に対する分裂細胞の数)

傷害像がみられるが、それと接している添加脾臓細胞(主にリンパ球様細胞)にも著明な変化がみられる。

表11にみられるように、対照群では培養細胞と接している添加リンパ球様細胞100個のうち、変形するもの平均7.3個、破壊像を呈するもの平均2.3個で、合計9.6個に変化がみられるのみである。一方、レシピエント家兎脾臓細胞を添加した実験群では、培養細胞と接している添加リンパ球様細胞100個のうち、平均して変形するもの5.6個、破壊像を呈するもの19.6個、合

計25.3個に変化がみられた。すなわち、レシピエントより得たリンパ球様細胞は、正常家兎由来のものに比べて2.6倍の高率に変化をうけ、とくに破壊される割合が高い。

第3章 綜括並びに考按

前篇では、異種動物間で能動的に感作を行なった場合にみられる抗原抗体反応について、培養細胞を用いて検討したが、本篇では、さらに異種動物間における移植免疫反応について同じ方法を用いて検討した。ここでは、本篇で得られた結果を総括し、前篇の成績と比較しながら考按を加えてみる。

まず、細胞分裂の頻度は、異種能動感作の場合と同様に対照の約3分の1に減少する。

しかし、細胞分裂像をみると、レシピエント血清を添加したものでは、異種能動感作の場合と同様に、対照群と異なり、分裂の後期から終期の間に阻害がみられるがレシピエント脾臓細

表11 添加リンパ球様細胞の変化

	対 照 群 (C)			実 験 群 (E)			E/C
	変形	破壊	計	変形	破壊	計	
No. 2	7	2	9	4	21	25	2.8
No. 3	6	2	8	4	18	22	2.7
No. 5	9	3	12	9	20	29	2.4
	7.3	2.3	9.6	5.6	19.6	25.3	2.6

胞を添加したものでは、若干の差はあっても対照群に近い値が得られている。

このように、異種能動感作と異種移植との間では、その免疫状態に若干の差異があることが明らかとなった。その差異の原因としては、異種能動感作では、異種移植の場合よりも、抗体産生がより多種類に、またより大量になっていると考えたいが、著者の実験のみではこの点を明らかにし得なかった。今後の問題であろう。

次に細胞傷害について検討してみる。鶏胎児よりの標的培養細胞にレシピエント家兎血清を加えると、標的培養細胞には体液性抗体による細胞傷害が観察される。すなわち、標的培養細胞の原形質の混濁、腫脹や変形などがみられ、核も濃染し構造も不明となる。

これを、異種能動感作による反応の場合と比較すると、**図3**のように要約しうる。細胞傷害の部位、程度とも大体同じ傾向がみられ、ほぼ同じ様な細胞傷害を受けていることがわかる。

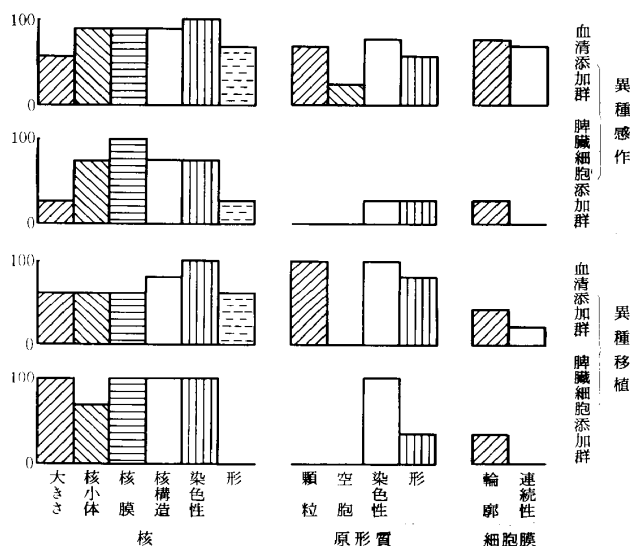


図3 細胞構成々分別にみた傷害出現の頻度

標的培養細胞にレシピエント家兎脾臓細胞を加えると、添加リンパ球様細胞の培養細胞周囲への凝集がみられるとともに、標的培養細胞には細胞性抗体による細胞傷害が招来される。すなわち、標的培養細胞の核は濃染、小型化し、核構造も不明で、いわゆる強い核濃縮の像を呈する。これに比べて、原形質はやや濃染される位であり、細胞膜とともに変化は軽度である。また細胞分裂の頻度も、無処置家兎脾臓細胞を

加えた対照群の30%に減少しており、細胞増殖の抑制がみられる。

これを前篇でのべた異種能動感作における変化と比較すると、**図3**のように、核・原形質・細胞膜ともにほぼ同質の傷害を受けていることが判るが、核では、異種移植においてより強い変化がみられるようである。

以上、異種移植免疫反応の際に抗原となる標的培養細胞の蒙む各種の変化について、異種動物間能動的感作による抗原抗体反応の場合と比較しつつ総括した。

このように、体液性抗体による変化と細胞性抗体による変化の間には、細胞傷害の現われ方や、傷害部位においても両者を区別し得る顕著な差異は認められない。換言するならば、既に生命力を失なった異種組織ホモジネートを用いた能動的感作による免疫反応と、生きた異種組織の移植による免疫反応との間には、大差はないということである。

異種移植では、同種移植の場合に比べて、体液性抗体がより優位を示し、細胞性抗体の関与なしにグラフトの細胞が破壊される⁴⁾。このようなことから、異種移植では体液性抗体による免疫反応が移植片拒否現象の主な役割を果たしているものと考えられている。

このように、異種移植においては、体液性抗体の作用の方が表面に出ているためか、細胞性抗体に関する研究は少ない。

Taylor and Colling¹⁶⁾はマウスのL株線維芽細胞をモルモットの腹腔内および脾臓内に注射した後、モルモットの脾臓細胞によるL株細胞の細胞傷害を観察している。彼らによると、L株細胞のミトコンドリア腫脹、細胞突起のひっこみ、細胞膜破壊、細胞質顆粒成分のメジウム中への流出とともに、核は壊死の像を示したということである。すなわち、原形質により強度の変化があらわれるという詳細な記載があるにもかかわらず、核については単に壊死の像を呈しているという記載のみである。著者の成績では核の変化が強いことが特徴的であり、この点で Taylor 等の成績と相当な隔たりがあるようである。

また、この中で Taylor らは、正常な脾臓細胞に対してともに成長促進的に作用する。すなわち、L 株細胞を単独で培養した場合に比べて、正常または殺した感作脾臓細胞を加えた際には L 株細胞の増殖が約 50 % 増加すると述べている。

著者の成績では、鶏胎児よりの標的培養細胞に正常家兎血清を加えた時の細胞分裂係数（静止細胞 1,000 個に対する分裂中の細胞数）は 12.5 であるのに対し、正常家兎脾臓細胞添加群では 11.0 であり、軽い抑制効果がみられる。すなわち、Taylor らの成績とは反対の結果となっている。

このような喰い違いの原因としては種々のことが挙げられるが、使用した培養細胞、実験方法などの差に負うところが大きいと思われる。くわしくは次篇第 3 章において検討するが、Taylor 等の実験は臓器移植における移植免疫反応を忠実に再現しているとはいいい難いと思われることを附言しておきたい。

以上、レシピエント脾臓細胞による免疫反応とレシピエント血清による反応とについて、それぞれ別個に考察を加えてきたが、最後に異種移植における体液性抗体と細胞性抗体とによる両反応について、相互に比較検討を加えてみる。

体液性抗体添加群では、抗原となっている標的培養細胞では、原形質の混濁・腫脹・変性等がみられ、核も濃染される。これらの変化は短冊カバーガラス上に培養した標的細胞全体にほぼ均等にみられ、細胞の存在場所による不均等はみられない。

これに対して、脾臓細胞添加群、すなわち、細胞性抗体添加群では著明な核濃縮の像がみられるが、原形質の変化は軽度である。また、傷害をうけている標的培養細胞の分布には偏りがあり、短冊カバーガラス上の部分によっては重篤な傷害がみられる個所とほとんどみられない個所とがある。

このように、異種移植の際の体液性抗体による反応と細胞性抗体による反応との間には、細胞傷害の起り方（細胞の内部構造の傷害の形態）

に差違がみられるとともに、傷害をうけた細胞そのものの分布もかなり違っている。後者は興味ある所見であり、次篇第 3 章において更に考察を加えてみたいと考える。

結 論

組織培養法を応用して鶏と家兎との間の異種移植について検討を加え、以下の結論を得た。

1) 鶏胎児よりの標的培養細胞に、レシピエント家兎血清を加えると、標的培養細胞の分裂頻度は対照群の 1/2 に減少し、細胞増殖の抑制が顕著となる。また分裂細胞の染色体の形態や配列にも異常を認めるものが多い。

2) この際の細胞分裂を、分裂の時期に従って、前期、中期、後期および終期に分類して実験群と対照群についてその割合を比較すると、実験群では対照群に比較して、細胞分裂の後半以降のものの減少が著しく、終期の像を呈するものは全くみられない。

3) レシピエント家兎血清を添加した培養液では、著明な核濃縮と原形質混濁とがみられる。すなわち、核は小型で変形し、核膜・核小体共に濃染、核構造も濃染し不明瞭となり、原形質の繊細な顆粒構造は消失し混濁する。

4) 以上、レシピエント家兎血清の標的培養細胞に及ぼす変化は、細胞分裂の抑制状態や細胞傷害の起り方等からみて、前篇でのべた異種能動感作の際にみられる変化とほぼ同様である。

5) 標的培養細胞にレシピエント家兎の脾臓細胞浮游液を加えても、レシピエント家兎血清の場合と同様に、標的培養細胞の増殖は抑制せられ、分裂の頻度は対照群の約 1/2 に減少する。

6) この際の細胞分裂を時期によって分類してその比率をみると、中期および後期のものの比率が稍高いのみで、著明な変化は認められない。この点が、血清抗体を添加した場合および異種能動感作の場合と異なるが、その原因については、これを明らかにし得なかった。

7) 標的培養細胞にレシピエント家兎の脾臓細胞を加えると、脾臓細胞は標的培養細胞周囲に凝集し、両者とも相互に傷害をうける。培養

細胞では核の変化が主で、核濃縮像を示すが、原形質でも濃染がみられる。また、培養細胞に接している添加脾細胞は破壊されているものが多い。

8) 標的培養細胞が異種移植の際のレシピエント脾臓細胞によって蒙る諸変化は、前篇においてのべた異種能動的感作による反応とほぼ同様である。

9) 異種移植免疫反応では、体液性抗体のみならず細胞性抗体の関与も明らかであるが、細胞傷害作用は前者の方がはるかに強度である。この両者を比較すると、体液性抗体を加えた場合には、標的培養細胞の核・原形質の双方に高度の変化が招来されるが、細胞性抗体を加えた場合には主として核に変化がみられ、原形質には著明な傷害はない。

〔第3篇〕 培養細胞における同種動物間移植免疫反応

〔目 次〕

緒 言

第1章 体液性抗体による反応

第1節 実験方法

第2節 実験結果

第2章 細胞性抗体による反応

第1節 実験方法

第2節 実験結果

第3章 総括並びに考按

結 論

全篇結論

緒 言

第1篇および第2篇においては、異種動物間における抗原抗体反応および移植免疫反応について記述した。これによって、遺伝元 (gene) 的に大きく異なっている異種動物間における典型的な移植免疫反応を観察し得たわけであるが、本篇では以上の免疫反応形式をふまえながら同種移植における免疫反応について検討を加える。

周知のように、今日、疾病その他により機能の荒廃した腎、肺、心臓などを採り出し、人工腎臓、人工心臓、人工弁などの人工臓器を移植することによってその機能を代行せんとする試みが盛んになされている。人工臓器は材質、機能などの点で、成功裡に移植された同種臓器にははるかに及ばないことは明らかであるが、それでもなお人工臓器の研究が行なわれている所以は、臓器移植の成功への道があまりにも険しいからに他ならない。

同種移植については、その応用範囲の広範さから、近年種々の角度から研究がなされ、人の腎臓移植など臨床的応用例の報告も多い²⁰⁻²²⁾。

同種移植を試みるに当り、今後さらに開拓されねばならない問題点の主なものは、移植手技の進歩改良、同種移植組織の拒否現象のメカニズムの究明、その免疫反応を制御する有効でしかも副作用の少ない方法の発見、レシピエントに適合したドナーの発見方法などに要約され得る²³⁾。これらのうち、同種移植の拒否現象のメカニズム、すなわち、同種移植免疫反応の究明が最も重要であることはいうまでもない。

さて、免疫学的な細胞破壊がみられる一連の病変、すなわち、実験的アレルギー性脳脊髄炎²³⁾、実験的甲状腺炎²⁴⁾、さらに同種移植免疫反応などにおいては、リンパ球様細胞が重要な役割を演ずることは広く認められている処である。

すなわち、同種組織を移植すると、その移植組織の中あるいはレシピエントの組織と接する部位に炎症性細胞浸潤が招来されるが²⁵⁾、その際の炎症にはリンパ球様細胞が主役をなしているといわれる。このことは、感作動物のリンパ球様細胞による移植免疫の受動的伝達が可能であることから^{26,27)}明らかである。

このような細胞性抗体は研究の極く初期においてもすでにその存在が認められていたが、同種移植免疫反応における体液性抗体の関与については、血清成分によっては受動免疫が成立しないという理由から、否定的な見解をとる論者が多かったのである^{28,29)}。しかし、最近では、

細胞反応^{30,31)}、凝集反応^{32,33)}などを呈する体液性抗体が証明されたために、同種移植免疫反応は、ドナーからの抗原とレシピエントの細胞性抗体との反応に加うるに、ドナーからの抗原とレシピエントの体液性抗体との反応という2種の抗原抗体反応の複合反応とみなされるに至っていることは既に述べた。

そこで本篇においても、第2篇と同じ方法を用い、2種類の反応が複合している同種移植免疫反応について、それらを細胞性抗体による免疫反応と体液性抗体による免疫反応とに別け、組織培養法を用いてそれぞれ別個に観察すべく努めてみたのである。

第1章 体液性抗体による反応

第1節 実験方法

第1項 移植方法

実験動物は家兎を用いた。無処置の成熟家兎2羽でペアを作り、各ペアにおいて、ドナー家兎の脾臓と耳介とをレシピエント家兎に移植した。

ネンブータル麻酔の下に、ドナー家兎の上腹部を剃毛、消毒し、無菌的に脾臓を露出し、その約3分の2を剔出し生理的食塩水中に貯える。開腹したドナー家兎の創の処置を終えた後、直ちにレシピエント家兎の下腹部を剃毛、消毒して、正中線上で約5mmの大きさに開腹する。とり出してあるドナー家兎脾臓をメスまたは鉗で2~3mm角に細断してレシピエント家兎の腹腔内に挿入する。これで同種移植の第1段階を終える。

次に、2日ないし9日の日数において、第2段階の移植を行なう。すなわち、すでに前回脾臓剔出を受けているドナー家兎の耳介を剃毛、消毒したのち、局所麻酔下に血管を結紮し、耳介を切断する。耳介の先端と根部との大約中程の部分で切断を行なうと、切断された耳介は約4×6cmの広さを有するものとなる。これをクロラムフェニコールまたはペニシリンを含む1,000倍マーズニン溶液の中で1cm²の大きさに細断する。第1段階の移植として、すでに脾臓移植をうけているレシピエント家兎の背部正中線を剃毛、消毒したのち、約2cmの皮膚切開を加え、切開部より上下左右に皮下を剝離、ドナー家兎耳介片をなるべく均等に1層となるように注意しながら挿入する。この切開創を縫合、第2段階の移植を終る。なお、この耳介の追加移植は、移植組織の蛋白量を第2篇の異種移植実

験における鶏胎児のそれとほぼ等しくするために行なわれたものである。

第2項 培養液

第1篇第1章第2項で述べたように、培養液としては、Hanks氏液にYeast Extract, Lactalbuminなどを加えたYLH液80mlに家兎血清20mlを加えたものを用いた。この家兎血清20mlのうち、10mlはあらかじめ定めておいた無処置家兎“C”兎の血清で、残りの10mlはレシピエントに予定している家兎から、第1段階の脾臓移植を実施する以前に採取して、無菌的に4°Cに保存しておいた血清である。

なお、“C”兎は対照実験用に温存しておくものであり、1つの実験は、ドナー家兎、レシピエント家兎、“C”兎の3羽の組合せよりなっている。

“C”兎の血清はドナーからの培養細胞の培養液の成分として使われるとともに、培養細胞に抗体を加える実験の際には、対照実験として、“C”兎の血清および脾臓細胞がそれぞれ対照血清および対照脾臓細胞として使用される。

以上のようにして作製した培養液は、その100ml中に移植前のレシピエント予定家兎血清10mlおよび対照“C”兎血清10mlを含有するものであり、レシピエント「予定」家兎血清加YLH液と呼ぶ。

第3項 標的培養細胞

第1段階の脾臓移植を行なってより2ないし5週間後に、同じドナーから肝臓組織を採り出して培養する。

すなわち、上腹部を剃毛、消毒したドナー家兎をネンブータル麻酔下に正中線上で開腹、無菌的に肝臓組織(約10×10×15mm³)を採り出す。第1篇第1章第2項で述べた方法に従い、この肝臓組織を1mm³の大きさに細断し、短冊カバーグラス上に鶏フィブリンで固定する。これに前項で述べたレシピエント「予定」家兎血清加YLH液を加えて培養を開始する。3日目毎に培養液を更新し、5ないし11日間培養した細胞を、ドナー家兎肝臓由来の標的培養細胞として実験に供する。

第4項 移植免疫反応

ドナー家兎肝臓由来の培養細胞にレシピエント家兎血清を加えて、培養細胞にみられる免疫反応を観察する。

すなわち、培養開始後5ないし11日を経過すると、短冊カバーグラス上に附着せしめたドナー家兎肝臓組織より周囲に向って細胞増殖がみられる。この培養細胞を短冊カバーグラスにつけたまま取り出し、温か

い磷酸緩衝液で充分洗滌する。レシピエント血清としては、前記のレシピエント「予定」家兎血清加 YLH 液 50ml に、第1次および第2次の同種移植をおえたレシピエントより得た新鮮血清 5 ml を加えたものを用いる。

この液を滅菌シャーレに取り、これに短冊カバーグラス上に培養してあるドナー家兎肝臓培養細胞を没す。このようにするとドナー培養細胞はレシピエント血清と接して、種々の変化をうけることになる。37°C に4時間放置した後、温かい磷酸緩衝液で洗滌し、メタノールで5分間固定、May-Grünwald-Giemsa 染色を施して鏡検する。

対照群としては、レシピエント家兎血清の代りに、対照実験用家兎としておいた“C”兎より新たに採取した血清を用い、レシピエント「予定」家兎血清加YLH 液 50ml に、“C”兎新鮮血清 50ml を混合した液に培養細胞を没す。以後、実験群と全く同様の操作を行なったものを対照群とし、このような対照群を各実験毎に置く。

このような操作を行なった上で、①培養細胞の分裂頻度の変化、②細胞分裂の時期別の頻度の変化、③培養細胞の形態学的変化などについて観察した。

第2節 実験結果

第1項 細胞分裂係数の推移

同種移植例8例を用い、標的培養細胞の分裂係数について検討し、表12のような結果を得た。

細胞分裂の頻度は細胞分裂係数であらわした

が、標的培養細胞に新鮮無処置“C”兎血清を加えた対照群では、8例の平均で静止細胞1,000個に対し19.6個の分裂中の細胞が認められる。

一方、レシピエント家兎血清を使用した実験群では平均9.5個の分裂細胞を認めるのみである。細胞分裂の頻度は対照群の47.6%と半分以上に減少している。

第2項 細胞分裂の時期による分類

細胞分裂の時期に従って分類すると、表13のような結果が得られた。

標的培養細胞に対照“C”兎血清を加えた対照群8例についての値を平均すると、前期のもの18.9%、中期のもの50.8%、後期のもの17.1%および終期のもの11.2%となっている。

一方、レシピエント家兎血清を加えた実験群では、前期のもの20.8%、中期のもの50.8%、後期のもの17.9%および終期のもの10.5%である。

このように、細胞分裂の頻度の絶対数は減少しているが、分裂時期からみると、その相対的割合には有意の差はみられない。

第3項 標的培養細胞のうける形態学的変化

標的培養細胞にレシピエント家兎血清を加えると、写真13および14にみられるように、培養細胞の核・原形質・細胞膜などに種々の程度の傷害像が認められる。

表 12 細胞分裂係数の変化

	NRS	ATRS	$\frac{\text{ATRS}}{\text{NRS}} \times 100$	NRM	ATRM	$\frac{\text{ATRM}}{\text{NRM}} \times 100$
No. 1	16	3	18.9	2	0	0
No. 2	15	7	46.7	15	0	0
No. 3	25	14	56.0	10	9	90.0
No. 4	13	7	53.8	8	0	0
No. 5	19	14	73.7	9	7	77.8
No. 6	—	—	—	11	10	90.9
No. 7	24	12	50.0	11	4	36.4
No. 8	—	—	—	7	3	42.9
No. 9	17	6	35.3	7	2	28.5
No. 10	28	13	46.4	12	2	16.7
平均	19.6	9.5	47.6	9.2	3.7	38.3

NRS: 無処置家兎血清添加群

NRM: 無処置家兎脾臓細胞添加群

ATRS: 同種移植レシピエント家兎血清添加群

ATMS: 同種移植レシピエント家兎脾臓細胞添加群

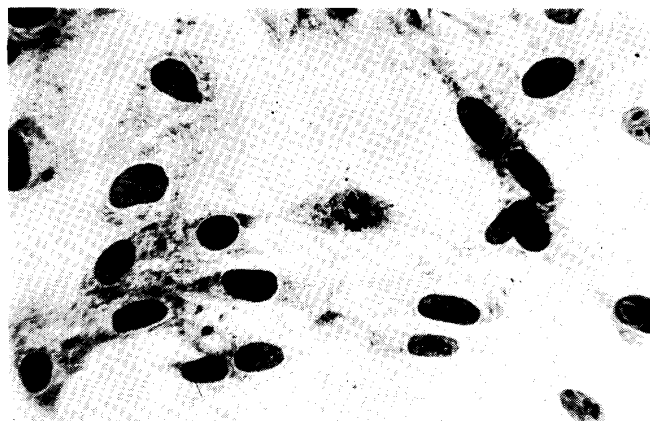
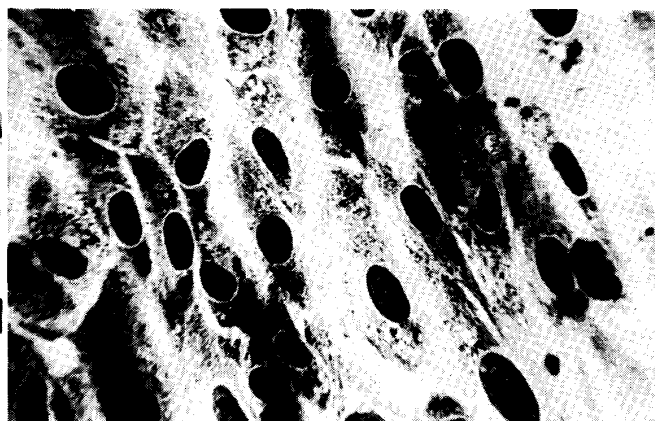
表 13 細胞分裂の時期による分類(体液性抗体)

	NRS					ATRS				
	MC	前 期	中 期	後 期	終 期	MC	前 期	中 期	後 期	終 期
No. 1	49	7	21	18	3	9	2	5	1	1
No. 2	45	4	25	11	5	22	2	11	5	4
No. 3	74	13	39	13	9	41	9	20	8	4
No. 4	40	6	20	6	8	20	5	11	4	0
No. 5	57	5	39	8	5	43	12	24	5	2
No. 7	72	23	29	7	3	35	11	11	5	8
No. 9	51	11	30	6	4	18	2	9	7	0
No. 10	84	19	37	12	16	39	4	24	6	5
平 均	59	11.2	30	10.1	6.6	28.4	5.9	14.4	5.1	3
%	100	18.9	50.8	17.1	11.2	100	20.8	50.8	17.9	10.5

NRS: 無処置家兔血清添加群

ATRS: 同種移植レシピエント家兔血清添加群

MC: 細胞分裂係数(数値は静止細胞3000に対する分裂細胞数)

写真13 ドナー家兔肝培養+細胞無処置家兔血清
M.G. 染色×400写真14 ドナー家兔肝培養細胞+レシピエント家兔
血清 M.G. 染色×400

細胞傷害の判定基準は第1篇および第2篇と同様であり、実験例8例についての成績は表14に示す通りである。

まず核についてみると、核の大きさおよび核構造には対照群との間に差異がみられないが、核小体では、1例で濃染と不明瞭化がみられ、核膜では、2例に高度の濃染および核と原形質との間に染色されない間隙がみられた。核の染色性としては2例で濃染、1例に核の変形がみられた。

原形質では、3例に、繊細な顆粒構造が消失しており、5例に、空胞形成、3例に、変形、1例では、やや青染しているものがみられた。

細胞膜では、その輪廓が、対照に比べて、鮮明となるか異常に不鮮明なものが4例みられた

が、細胞膜の破壊などは認められなかった。

第2章 細胞性抗体による反応

第1節 実験方法

第1項 移植方法

本章において述べる細胞性抗体についての実験は、すべて前章の体液性抗体についての実験と同時に、同じドナーとレシピエントのペアを用いて行なわれた。すなわち、1羽のレシピエント家兔より得られた血清は体液性抗体として、また、同じ家兔の脾臓細胞は細胞性抗体として実験に使用した。

それであるから、本実験における移植方法、培養液および標的培養細胞の作成法などについては、いずれも本篇前章の第1、第2および第3項において述べた方法と同様である。

第2項 脾臓細胞浮游液

表 14 同種移植における細胞傷害の部位と程度

		体 液 性 抗 体									細 胞 性 抗 体										細 胞 傷 害 の %			
実 験 No.		1	2	3	4	5	7	9	10	計	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	計	体液性抗体	細胞性抗体	
核	大 小 核 核 膜 構 造 染 色 形	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	+	—	+	—	—	—	—	—	—	—	2	0	20
		—	—	—	—	—	—	+	—	1	—	—	—	+	—	—	—	+	—	+	3	13	30	
		—	—	+	—	—	—	—	+	2	+	+	—	+	—	—	—	—	—	+	4	25	40	
		—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	+	—	+	—	—	+	+	+	—	5	0	50	
		—	—	+	—	—	—	—	+	2	+	+	—	+	+	—	—	+	+	+	7	25	70	
		—	—	—	—	—	—	+	—	1	—	—	—	+	—	—	+	—	—	—	2	13	20	
原 形 質	顆 粒 空 胞 染 色 形	—	+	—	—	+	+	—	—	3	—	+	—	+	—	—	+	+	—	—	4	38	40	
		+	—	—	+	+	—	+	+	5	—	—	—	—	—	—	—	+	+	—	2	63	20	
		—	+	—	—	—	—	—	—	1	—	+	—	+	—	—	—	—	+	+	4	13	40	
		+	—	—	—	—	+	—	+	3	—	+	+	—	—	—	—	—	—	—	2	38	20	
細胞膜	輪 廓 連 続 性	—	+	—	+	—	+	—	+	4	+	+	—	+	—	—	—	—	—	—	3	50	30	
		—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0	0	0	
傷 害 度		2	3	2	2	2	3	3	5	22	3	8	1	9	1	0	3	5	4	4	38			

第1次移植として脾臓を、また第2次移植として耳介を移植した後、20日ないし45日を経過したレシピエント家兔を、ネンブタール麻酔下に上腹部正中線上で開腹し、無菌的に脾臓（約2分の1）を採り出す。採り出した脾臓は少量の磷酸緩衝液を入れたシャーレの中で、可及的小さく細断した後、磷酸緩衝液で洗滌する。

このレシピエント脾臓の細片に、レシピエント「予定」家兔血清加 YLH 液80%, 無処置 “C” 兎の新鮮血清20%よりなる培養液を加える。添加する培養液の量を加減して、1mm³ 中約50,000個の脾臓細胞を含有するように調整する。この液をレシピエント家兔脾臓細胞浮游液として使用する。

これに対して、対照実験としては、対照家兔として用意されている “C” 兎を用い、この “C” 兎の脾臓組織を細断し、これに実験群と同じ細成の培養液を加えて正常家兔脾臓細胞浮游を作り、この液に標的培養細胞を入れて対照群とした。

第3項 移植免疫反応

前項の方法で作製したレシピエント脾臓細胞浮游液を滅菌シャーレに入れる。短冊カバーガラス上に培養してあるドナー家兔肝臓からの標的培養細胞を温かい磷酸緩衝液で洗滌した後、カバーガラスに附着したままシャーレに入れて、培養細胞のうける形態学的変化について観察する。

シャーレの中に短冊カバーガラス6ないし8枚を入れ、37°C に20時間放置した後、温かい磷酸緩衝液で

洗滌して添加細胞の大きな塊、血清などを洗い落す。その後、型のようにして固定、染色、封入し鏡検する。

対照実験群における操作も全く同様である。

第2節 実験結果

第1項 細胞分裂係数の推移

標的培養細胞にレシピエント脾臓細胞を加えた10例について、細胞分裂係数を算定し、前掲の表12のような結果を得た。

標的培養細胞に無処置の “C” 兎の脾臓細胞浮游液を加えた対照群では、静止核細胞1,000個に対して平均9.2個の分裂核を認める。これに対して、レシピエント脾臓細胞浮游液を加えた場合には、静止核細胞1,000個に対し、分裂中の細胞は3.7個であり、実験群の細胞分裂頻度は対照群の38%に減少している。

第2項 細胞分裂の時期別による分類

細胞分裂の時期別にその割合をみると表15に示したようになる。

すなわち、対照群では、前期のもの24.4%, 中期のもの56.2%, 後期のもの11.0%および終期のもの8.4%であるが、実験群では、前期のもの16.2%, 中期のもの63.1%, 後期のもの13.5%および終期のもの7.2%である。

後期および終期の分裂像を呈するものに大きな変動はみられないが、前期のものが減少し、

表 15 細胞分裂の時期による分類 (細胞性抗体)

	NRM					ATRM				
	MC	前 期	中 期	後 期	終 期	MC	前 期	中 期	後 期	終 期
No. 1	5	2	2	1	0	0	0	0	0	0
No. 2	46	4	28	10	4	0	0	0	0	0
No. 3	31	8	21	1	1	26	4	19	2	1
No. 4	23	5	17	0	1	0	0	0	0	0
No. 5	27	5	20	2	0	21	2	12	5	2
No. 6	32	15	12	3	2	31	6	21	3	1
No. 7	32	7	17	3	5	11	2	4	2	3
No. 8	21	5	6	4	6	10	2	7	1	0
No. 9	21	4	14	2	1	6	1	4	1	0
No. 10	36	12	17	4	3	6	1	3	1	1
平 均	27.4	6.7	15.4	3.0	2.3	11.1	1.8	7.0	1.5	0.8
%	100	24.4	56.2	11.0	8.4	100	16.2	63.1	13.5	7.2

NRM: 無処置家兎脾臓細胞添加群 ATRM: 同種移植レシピエント家兎脾臓細胞添加群

MC: 細胞分裂係数 (数値は静止細胞3000に対する分裂細胞数)

中期の分裂像を示すものが相対的に増加する傾向がみられる。しかしながら、大体においては変動は少ないといってよいと思われる。

第3項 標的培養細胞のうける形態学的変化

ドナー家兎肝臓からの培養細胞とレシピエント家兎脾臓細胞との接触によって、写真15および16にみられるように、標的培養細胞および添加脾臓細胞の核、原形質、細胞膜などに著明な変化が招来される。

それら細胞傷害についての成績を示したのが前掲の表14である。なお、細胞傷害の判定基準は第1篇および第2篇と同様である。

まず核についてみると、実験例10例のうち、2例に核の小型化、2例に核小体の不明瞭化、1例に核小体の増加、4例に核膜の肥厚、5例に核構造の不明瞭化、7例に核の濃染、2例に核の変形が認められた。

次に、原形質についてみると、4例に繊細な顆粒構造の消失、2例に空胞形成、4例に染色性の変化がみられ、うち、2例では薄染、1例では赤染、残り1例は青染していた。また、2例で変形がみられた。

さらに、細胞膜についてみると、2例に、輪廓の不鮮明化が生じ、1例では、その反対に異常に鮮明となっている。

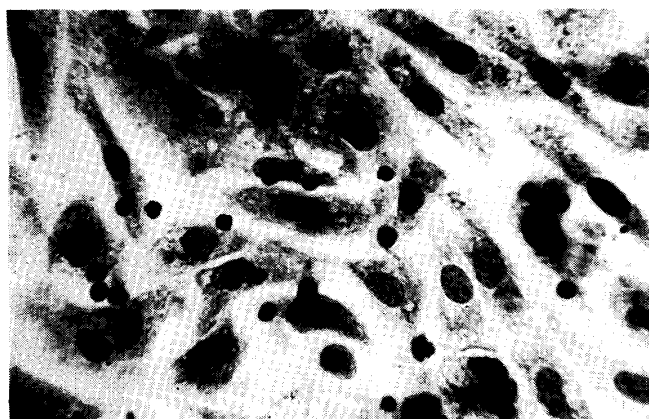


写真15 ドナー家兎肝培養細胞+無処置家兎脾細胞 M.G. 染色×400

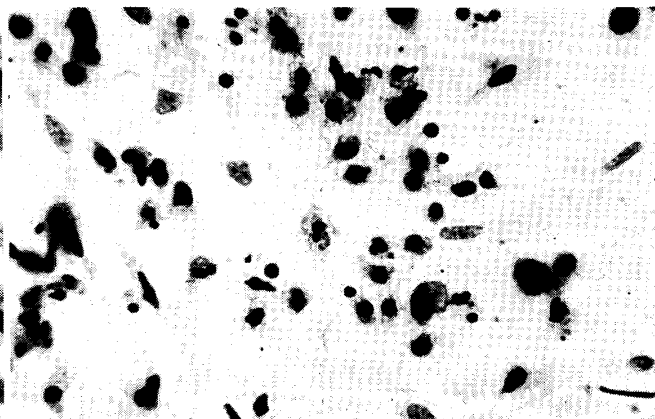


写真16 ドナー家兎肝培養細胞+レシピエント家兎脾細胞 M.G. 染色×400

以上の所見から、実験群では、核の変化化著明で、核濃縮が主たる所見であることが判る。

第4項 添加リンパ球様細胞の変化

レシピエント家兎の脾臓細胞との接触により、標的培養細胞には上述のような傷害像がみられるが、培養細胞と接触しているレシピエント脾臓細胞（主にリンパ球様細胞）にも著明な変化がみられる。

表16にみられるように、標的培養細胞に無処置の“C” 兎脾臓細胞を加えた対照群では、標的培養細胞と接触している添加リンパ球様細胞100個のうち、変形しているもの平均10.1個、破壊されているもの平均2.6個で、合計12.7個に変化がみられている。

表16 添加リンパ球様細胞の変化

	対 照 群 (C)			実 験 群 (E)			E/C
	変形	破壊	計	変形	破壊	計	
No. 1	7	2	9	29	14	43	4.8
No. 2	12	0	12	13	19	32	2.7
No. 3	17	5	22	36	24	60	2.7
No. 4	8	6	14	25	15	40	2.8
No. 5	8	2	10	26	8	34	3.4
No. 6	1	1	2	11	10	21	10.5
No. 7	10	2	12	19	10	29	2.4
No. 8	14	2	16	30	12	42	2.6
No. 9	9	2	11	29	7	36	3.3
No.10	15	4	19	25	30	55	2.9
平 均	10.1	2.6	12.7	24.3	14.9	39.2	3.3

これに対して、レシピエント家兎の脾臓細胞を添加した実験群では、標的培養細胞と接触している添加リンパ球様細胞100個のうち、変形しているもの平均24.3個、破壊されているもの平均14.9個、合計39.2個に変化がみられる。

このように、添加されたレシピエントリンパ球様細胞は変化を蒙る率が高く、対照群に比べて2.6倍の高率に変化をうけるが、とくに破壊されるものの割合が高い。

第5項 細胞傷害の程度と細胞分裂頻度の減少との関係

レシピエント家兎の血清または脾臓細胞浮游液を加えた場合に、標的培養細胞にみられる細胞傷害と細胞分裂頻度の減少との間の相関々係

は図4の通りである。

図には体液性抗体による反応および細胞性抗体による反応の両実験の結果を同時に記入してあるが、図のように細胞傷害の程度と細胞分裂係数の変化率(註)との間には正の相関々係がみられる。

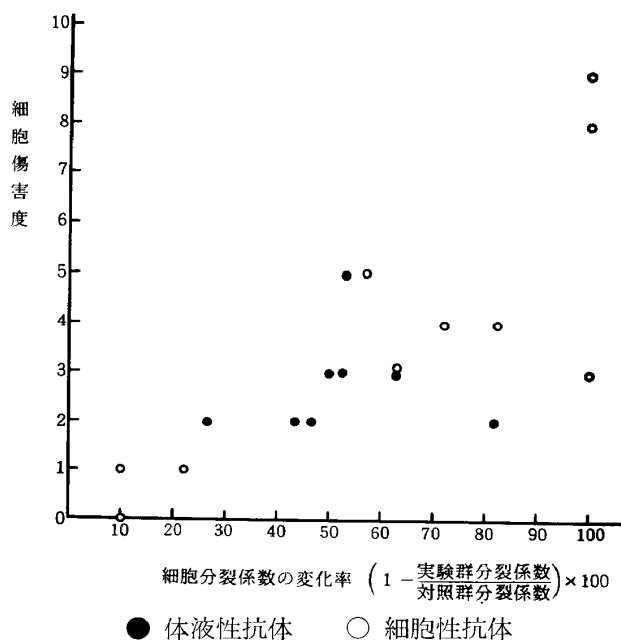


図4 同種移植における細胞傷害度と細胞分裂係数の変化との相関

すなわち、細胞分裂係数の減少がより著明となるに伴ない、細胞個々の傷害の程度も強くなることが判る。

第6項 同種移植における体液性抗体および細胞性抗体による細胞分裂係数の低下の相互関係

ドナーとレシピエントという一つのペアについて、細胞性抗体および体液性抗体による二つの実験を平行して行なった8ペアについて、体液性抗体による分裂頻度の減少と、細胞性抗体による分裂頻度の減少の両者の関係について検討を加えた。

図5にみられるように、両者の間に一定の関係は見出し難いが、この図から、体液性抗体添加群に比べると、細胞性抗体添加群での細胞分裂頻度の減少がより著しいことが判る。

(註) 細胞分裂係数の変化率 = $\left(1 - \frac{\text{実験群分裂係数}}{\text{対照群分裂係数}} \times 100\right)$

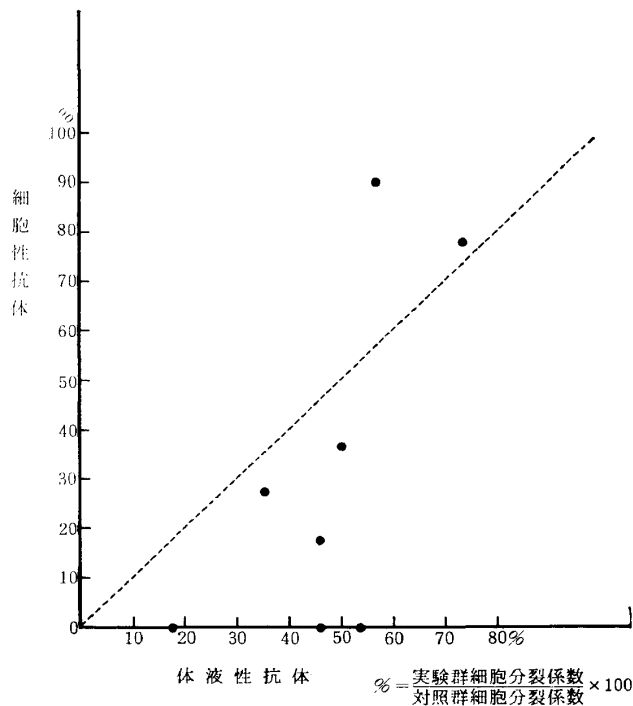


図5 同種移植における体液性抗体及び細胞性抗体による細胞分裂係数の変化の相関々係

第7項 同種移植における体液性抗体および細胞性抗体による細胞傷害の程度の相互関係

前項と同じ8ペアについて、体液性抗体による細胞傷害度と細胞性抗体による細胞傷害度との間の関係について検討を加えた。

図6のように、両者の間には大体において正の相関々係が認められるが、2例の例外がみられている。これは、この2例では、体液性抗

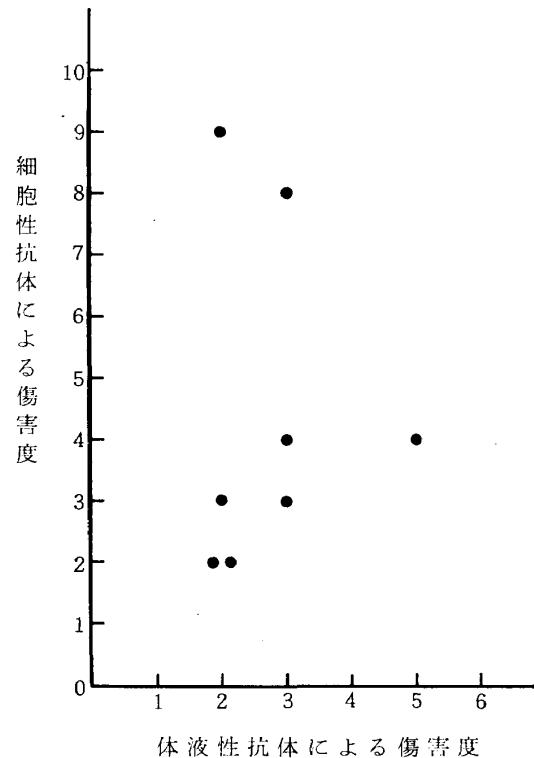


図6 同種移植における体液性抗体及び細胞性抗体による細胞傷害の相関々係

体による細胞傷害が特に著明であったためである。

第8項 同種移植後経過日数と細胞傷害等との関係

表17は一次および二次移植、培養開始日、実験を行なった日などと共に、細胞分裂頻度の変化、細胞傷害等について、各実験別にまとめたものである。

表 17 実験までの日数と細胞傷害の関係

実 験 No.	1 次移植		耳介移植	肝臓培養	実 験 (一 次移植後)	実験群分裂係数 対照群分裂係数×100		細 胞 傷 害 度			補 体
						血	清	脾臓細胞	血	清	
2	脾	臓	2口目	14日目	20日目	46.7%	0	%	3	8	+
4	脾	臓	7	14	21	53.8	0		2	9	+
3	脾	臓	4	16	23	56.0	90		2	1	+
1	肝	臓	9	18	29	18.9	0		2	3	—
9	脾	臓	7	23	30	35.3	28.5		3	4	+
8	脾	臓	8	23	31	—	42.9		—	5	+
10	脾	臓	20	25	31	46.4	16.7		5	4	+
7	胎	児	—	33	41	50.0	36.4		3	3	+
5	脾	臓	2	37	43	73.7	77.8		2	1	+
6	脾	臓	8	40	45	—	90.9		—	0	+

このなかから、一次移植後実験までの経過日数と分裂係数の低下の割合をみると、体液性抗体添加群では移植後経過日数とは殆ど関係なくほぼ一定の低下を示しているが、細胞性抗体添加群では、一次移植後30日に到らないものは、それ以後のものに比べて、分裂頻度の抑制が著しいといえる。

また、細胞傷害の程度をみても、体液性抗体添加群では、移植後の経過日数に関係なくほぼ一定の傷害がみられるが、細胞添加群では、移植後経過日数が長くなるにつれて細胞傷害の程度が軽くなる傾向がみられる。

第3章 総括並びに考按

本章では、ドナー家兎の肝臓から得た培養細胞を標的細胞として、組織培養法を用いて行なった同種移植免疫反応についての検討成績を総括しつつ考按を加えるが、その際、第1篇および第2篇で述べた異種能動感作と異種移植における免疫反応についての成績との対比をも併せ行ないたいと考える。まず、体液性抗体を用いた場合の成績から総括してみる。

レシピエント家兎血清の添加により、標的培養細胞は著明な傷害をうけ、その細胞分裂係数は対照の2分の1以下にまで低下しているが、分裂の時期からみると、異種移植の場合のように、特定の分裂時期での傷害は無い。形態学的には、核、原形質および細胞膜、就中、原形質にかなりの傷害が招来される。

この成績は同種移植においても、体液性抗体が形成されるということを示している。

次に、細胞性抗体を用いた場合の成績を総括すると、細胞分裂係数の減少は、体液性抗体を反応させた場合よりも強く、対照の約3分の1にまで減少するが、同様に特定の分裂時期での阻害はみられない。形態学的には、核、原形質および細胞膜の何れにも傷害がみられるが、この実験群の特色は、体液性抗体の場合に比べて、核の傷害が強いということである。

同種移植におけるこのような抗体産生は、移植数日後より開始され、2週間前後に最高に達し、少なくとも1年以上にわたり抗体が証明さ

れるといわれる^{13,19)}。

著者も、前節第8項に述べたように、細胞性抗体添加群では一次移植より30日前後を境にして細胞分裂抑制および細胞傷害の程度が軽くなることを明らかにした。一方、体液性抗体添加群ではこのような傾向はみられず、移植後の経過日数に関係なくほぼ一定の値を示しているが、これは体液性抗体と細胞性抗体との差異を示唆する興味深い事実であると思われる。

かつては、同種移植における体液性抗体については、否定的な見解が多かった。これは、1)同種移植を行なっても血清中に抗体が証明されなかった³⁴⁾、2)感作血清による受動免疫(Passive Transfer)が成立しなかった³⁵⁾、および3)ディフュージョン・チェンバー法を用いた実験で、感作した動物の腹水はドナー細胞を破壊できなかった^{4,36)}、などの理由からであったといえる。

しかし、組織培養法などを応用した最近の報告をみると、同種移植の際の体液性抗体の存在を否定するものもあるが、否定するものが次第に増加している。

否定論者の報告をみると、まず、Wilson³⁷⁾はマウスおよびラットの同種皮膚移植において、位相差顕微鏡による形態学的観察とクリスタルヴァイオレットによる生体染色とを行ない、そのいずれにおいても、レシピエント動物の血清はドナー動物の腎臓からの標的培養細胞に対して傷害的には作用しないと報告している。

また、Vainio等³⁸⁾もマウスを用いた実験において、ヘマトキシリン、エオジン染色による形態学的観察とトリチウムサイミジン放出試験との二つの成績から、Wilsonと同様の結論に達している。

これらの否定論に対して、Terasaki等³⁹⁾は、家兎の同種皮膚移植を行なった後、ドナーのリンパ節細胞を標的細胞として、これに、レシピエント血清を加え、エオジン生体染色法で判定した場合、標的細胞の生存率が低下しているとしている。

また、Grangerら³⁹⁾もマウス腫瘍細胞(SaI)における免疫反応において、補体の存在下でレ

シピエントマウス血清は細胞傷害的に働くと述べている。

一方、1965年、Wilson¹⁷⁾ は、前掲の彼の報告での見解を否定し、ラット同種皮膚移植における免疫反応について腫瘍培養細胞を用いて観察し、レシピエントラット血清は軽度の毒性を示したとしている。

このように、同種移植免疫反応によるドナー細胞の形態学的変化についてのこれまでの成績からみて、レシピエント血清も標的細胞に対して細胞傷害的に働くと考えてよいようである。しかし、その際の標的細胞の蒙む変化についての詳細な記載はない。これは、1) 体液性抗体による細胞変化は通常軽微であること、および2) 同種移植免疫反応においてはリンパ球等の細胞性抗体の役割がより高く評価されており、体液性抗体の役割は軽視されていること等のためと思われる。

さて、Wilson の1965年の報告および Granger 等の報告における体液性抗体の証明は、いずれも腫瘍細胞を用いて行なわれており、これにより観察された成績はむしろ腫瘍組織の免疫反応とみなすべきで、狭義の同種移植免疫反応におけるものとはみなし難いと思われる。

これに対し、Terasaki 等の報告は狭義の同種移植免疫反応について述べているといい得る。すなわち、彼等は、皮膚移植をうけたレシピエント家兎の血清をドナー家兎のリンパ節からの細胞浮游液に加え、ドナー細胞の蒙む変化について観察しているのである。

しかしながら、Terasaki 等の実験では、第1および第2篇においても述べたように、ドナーのリンパ節細胞は、実験に当たって初めて未知の他家血清に遭遇するための非特異性反応を除外し得ていないという欠点がある。また、前述の組織培養法を用いた Wilson 等の実験でも、組織培養液には何れも牛血清が使用されており、各培養細胞は異種蛋白で栄養されるわけである。さらに、本実験に当たっては改めて異なった他の異種蛋白ないしは、同種ではあっても他家の血清に初めて遭遇することになる。

すなわち、人のリンパ球は培養液中の牛血清

に対し一次免疫反応を現わし⁴⁰⁾、人の白血球は異型血液型物質添加によりその遊走性が抑制される⁴¹⁾等の事実を併せ考えると、上のような実験方法によれば、標的培養細胞とレシピエント血清中の抗体との間における抗原抗体反応と、これに加えて、血液型その他の個体差ともいうべきものに基ずく非特異的反応、すなわち、移植免疫反応とは異質の反応とが混在していると考えてよい。

異種能動感作または異種移植においては、同種移植の場合に比べると、免疫反応がより強烈であるために、この異種蛋白による非特異性反応は表面に出ないと考えてよい。しかし、同種移植では、免疫反応自体が軽微であるために、本来は軽微である非特異性反応がかなり大きな変化となって現われることとなる。

そこで著者は本実験に先き立ち、あらかじめ、ドナー家兎の肝臓組織をレシピエントに予定している家兎から採取した血清を含む培養液中で培養しておくことにしたのである。これにより、ドナー由来の培養細胞は、本実験の前に、既に、レシピエント個有の蛋白に適応していることになる。それであるから、移植後、免疫を獲得している血清を添加する本実験の場合でも、添加される蛋白に起因する非特異性反応は招来されず、純粋な抗原抗体反応としての移植免疫反応のみが惹起されていると考えられる。

また、対照実験としては無処置の“C” 兎を用いたのも以上の点を考慮したからである。

すなわち、標的培養細胞は、レシピエント「予定」兎血清とともに、対照用としての“C” 兎血清にも馴化されているので、対照実験として、これに“C” 兎の血清ないしは脾臓細胞を加えた場合、培養細胞には、最早、他家蛋白に由来する非特異性異物反応はほとんど招来されていない。

組織培養法では、このような配慮をしておいて、はじめて抗原抗体反応のみを純粋に観察し得られると思われる。

さて、これまでに述べてきた異種動物間能動的感作、異種移植および同種移植の3群の実験を通じて、in vitro における免疫反応を観察す

る場合には、標的培養細胞に免疫血清または免疫リンパ球様細胞を加えるのみでなく、必ず新鮮家兎血清を加えることは既に述べた通りである。

これは、とくに培養細胞に免疫リンパ球様細胞を加えた場合には、反応系に細胞成分が多くなるために両種の細胞により多くの栄養を補わねばならないという消極的な理由以外に、新鮮家兎血清を加えることにより補体を添加するという積極的な目的があったためである。

これまでに、人^{42,43)}、家兎⁴³⁾、ラット⁴²⁾、犬⁴⁴⁾等において、移植組織の拒否過程に補体が関与することが明らかにされている。Rother 等⁴⁵⁾はラット大量皮膚移植群では少量皮膚移植群より長期の生着例がみられる^{46~49)}という事実の説明を、大量移植群レシピエントの補体の消耗に求めているが、移植免疫における補体の役割については現在なお明らかではない。著者も、このような補体研究の現状に鑑み、異種感作および異種移植の全例、同種移植では表17のように第1例を除く全例に補体を加えたのである。補体非添加例が少ないため、添加例との比較をし難たいが、両群の間には、細胞分裂の障碍または細胞傷害の程度などに著明な差異はみられていないようである。移植免疫反応における補体の関与は、今後追求さるべき重要な研究課題であろうと思われる。

次に、著者が得た体液性抗体による同種移植免疫反応の成績を、異種移植反応のそれと比較しながらまとめ直してみる。

まず、細胞分裂の頻度は、同種移植例では約2分の1までの減少に止まっているが、これに対して異種移植例では約3分の1までとより大巾の減少を示す。

形態学的な変化をみると、同種移植では核小体および核膜はやや濃染されるに止まるが、原形質では空胞出現と混濁が著明である。これに比べて、異種移植では核および原形質にみられる変化は同種移植よりもはるかに高度であるが、空胞出現は正常の範囲に止まっている。

このような同種移植と異種移植との免疫反応の間の差異は、感作用グラフトの蛋白量の差に

よるものではないと思われる。著者の実験では、同種移植の場合には家兎の脾臓および耳介を、異種移植の場合には鶏胎児を移植したが、その際、グラフトの重量すなわち蛋白量はほぼ等しくしている。それであるから、異種移植においてより強い免疫反応がみられるのは、そのドナーとレシピエントの間においての抗原性が量的にも質的にも、より大であるということであろう。

次に、細胞性抗体による反応について考察してみたい。同種移植免疫反応においては、リンパ球、プラズマ細胞、大喰球などの中にある細胞性抗体が重要な役割を果しているということはこれまでの多くの研究が証明している処である。レシピエントのリンパ球様細胞はドナー動物由来の標的培養細胞に対して特異的に凝集し、細胞傷害的に働くという点では、各研究者ともよく一致しているのであるが、Taylor 等¹⁶⁾の報告を除き、ほとんどの報告が形態学的な変化については言及していない^{17,37,38,39,50)}。

Taylor & Colling の報告の中に挙げてある同種移植免疫の実験成績によれば、マウス由来のL株線維芽細胞に、これを移植したBALB/c系マウスの脾臓細胞を加えると、脾臓細胞は標的L株細胞周囲に凝集し、L株細胞は名種の傷害をうける。すなわち、ミトコンドリア腫脹、細胞質突起の引っこみ、細胞膜破壊等がみられ、核は通常の壊死の場合の像を呈したということである。

著者の実験によれば、ドナー家兎肝臓からの標的培養細胞の変化は次のように要約される。すなわち、細胞質はその微細な顆粒構造の消失、混濁および濃染、核はいわゆる核濃縮の像を呈し、核膜の肥厚、濃染などがみられている。

Taylor 等の実験でみられたミトコンドリアの腫脹は、著者の観察した細胞質の混濁に相当するものと思われる。また、細胞膜の破壊と細胞質突起の引っこみ等は、著者の観察でもごく一部の細胞にはみられるものではあるが、頻度の高い変化ではない。

また、Taylor 等は、核は「通常の壊死の像」を示しているとしているが、壊死の際には核は

均質となり染色性が低下するのが通常であるから、この所見は著者の観察成績と相反しているといわねばならない。著者の観察によれば、同種移植、異種移植並びに異種感作の3つの実験群に共通して、細胞性抗体による傷害反応は著明な核濃縮として現われており、このことから、核濃縮こそ移植免疫反応の際の基本的な細胞変化ではないかと考えられる。これは、Granger等³⁹⁾が、腫瘍細胞株を用いた実験で、標的培養細胞に核濃縮および核崩壊がおけると述べている事実とよく一致している。

Taylor 等の実験で批判さるべき諸点をさらに列挙してみると、1) 標的細胞としてL株線維芽細胞を用いているが、L株細胞は、1948年Earle等により、線維芽細胞系の悪性細胞の単個の細胞から純系として作り出されたものである⁵¹⁾ので、L株細胞の移植は通常と同種臓器移植の概念からは遠いものである。2) L株細胞は10%牛血清加緩衝液の中で培養されているものであり、彼の実験ではレシピエントマウス(BALB/c)という他系蛋白に対する馴化がなされていない、3) 標的L株細胞と脾臓細胞は無血清下に199液のみで24時間ないし72時間培養された後に観察されているので、生体との間の較差がこの種の実験としてはあまりにも大である、等となる。

以上のような諸点から、著者の実験成績との差異も首肯し得ると思われる。

次に、著者の実験でみられた細胞性抗体による変化を、同種移植と異種移植とについて比較すると次のようになる。

まず、培養細胞の分裂頻度をみると、同種移植例では対照群の38%に減少、異種移植では30%に減少しており、同種移植では、異種移植に比べて、細胞分裂頻度に対する傷害が若干少ない。

形態学的変化を比較すると、図7のように、同種移植では、核濃縮、原形質の混濁および濃染などがみられ、異種移植の際の変化とほぼ同様であるが、その程度は異種移植の場合と比べてはるかに弱い。

さらに、同種移植に際しての体液性抗体およ

び細胞性抗体の細胞傷害作用について若干考察してみる。図7のように、両者の標的培養細胞におよぼす細胞傷害の度合は、細胞分裂係数の変化をみても、また、形態学的にも、体液性抗体より細胞性抗体の方がより大である。これは、第1篇および第2篇において述べた異種動物間における感作または移植では、体液性抗体の方がより著明な傷害作用を示したことは対照的な興味ある成績であろう。

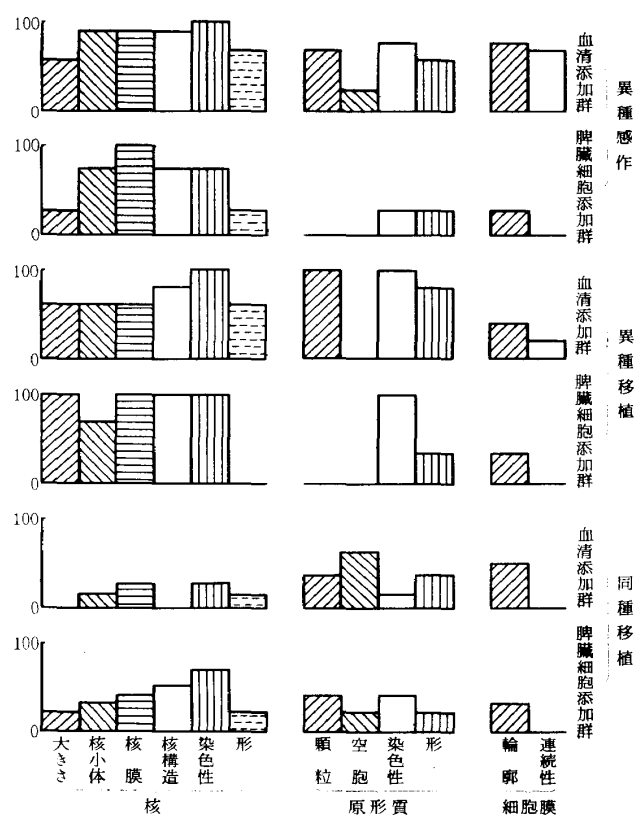


図7 細胞構成々分別にみた傷害出現の頻度

さて、「免疫リンパ球様細胞と呼ばれているものが、他の細胞で作られた体液性抗体をその表面に附着させているものなのか、それとも、自分の細胞内に抗体をもっていて、そのために抗原をもった移植組織のある場所に呼びよせられて反応を起こすのか、今後解明されねばならない問題¹⁹⁾」とされている。

Wilson¹⁷⁾はラットの腫瘍細胞系培養細胞に、同種皮膚移植を受けたレシピエントリンパ球を加えると、7時間目位でリンパ球は標的培養細胞に固く附着するが、目立った細胞傷害は20時間後位から観察されると述べて、このことから

次の様に推論している。すなわち、免疫リンパ球による同種標的細胞の破壊には二段階の順序があり、第一段階では、リンパ球の免疫学的特異性のある無毒の cell-bound のある種の物質によって標的細胞に附着する。次の第二段階においてはじめて細胞の破壊がおこるとしている。

また、花岡⁵⁰⁾等は、マウス白血病株細胞 (SC1) を用いた免疫反応において形態学的観察を行ない、次のような結果を得ている。すなわち、SC1細胞に免疫リンパ球を加えると、両種の細胞は狭い細胞質突起で結ばれているのが観察された。これは、動きまわるリンパ球が偶然 SC1細胞に接して結合するが、リンパ球は更に動きまわろうとしてもはなれないので、狭い細胞質によって結合されたようにみえるのであろうとしている。

以上の二報告によっても、免疫リンパ球様細胞は単にその表面に体液性抗体をのせているものではなく、免疫リンパ球は独自の働きをしていることが推定される。

更に、著者の得た実験成績を総括すれば、次の様に推論し得ると思われる。すなわち、前篇および本篇において、著者は、1)同種移植、異種移植を通じて、標的細胞の傷害部位は、体液性抗体と細胞性抗体とで異なること、2)体液性抗体添加群では傷害をうけた細胞はほぼ一様に分布しているが、細胞性抗体添加群では傷害細胞の分布にムラがあり、培養細胞の附着している同じカバーガラスでも、ある個所では著明な細胞傷害がみられるのに、そのそばの細胞には傷害がみられないことがあること、3)添加した免疫リンパ球様細胞は特異的に破壊されるものが多いこと、等を明らかにし得た。

これら三つの事実は、いずれも、体液性抗体と細胞性抗体の作用機序が異なることおよびリンパ球様細胞表面に体液性抗体が単に附着して標的細胞に出会ったときにそれを放出するというようなものではなく、抗体はリンパ球様細胞の細胞内部、もしくは細胞表面にあるとしても細胞膜に固く結合している可能性が大であることを示唆していると思われる。

結 論

本篇では、家兎同種移植における移植免疫反応について、組織培養法を応用して観察を行ない、以下のような結論を得た。

1) ドナー家兎肝臓よりの標的培養細胞にレシピエント家兎血清を加えると、培養細胞の分裂頻度は対照群の半以下に減少する。

細胞分裂の時期、すなわち、前期、中期、後期および終期の相対的比率には、著明な変動はみられない。

2) ドナー培養細胞にレシピエント血清を加えると、培養細胞に形態学的変化があらわれる。すなわち、原形質の空胞出現、微細顆粒構造の消失、混濁および変形等とともに、核膜、核構造の濃染、核周囲の透亮等がみられる。

3) ドナーよりの標的培養細胞にレシピエント脾臓細胞浮游液を加えると、培養細胞の分裂の頻度は対照群の40%以下に減少する。

細胞分裂の時期についてみると、前期のものが減少し、中期の分裂像を示すものが相対的に増加している。

4) ドナーよりの標的培養細胞にレシピエント脾臓細胞を加えると、脾臓細胞は標的培養細胞周囲に凝集し、添加脾臓細胞および培養細胞の両方に著明な細胞傷害がみられる。

培養細胞では、核は濃染し核構造は不明瞭となり、核膜を厚く濃染し、いわゆる核濃縮の像を呈する。原形質の混濁や染色性の変化等もみられるが、その程度は、核の変化に比べて軽度である。

また、レシピエント脾臓細胞は標的培養細胞周囲に凝集し種々の傷害をうけるが、破壊されているものが多い。

5) これらの体液性抗体並びに細胞性抗体についての実験で用いた標的培養細胞は、ともに、レシピエント予定家兎血清を加えた培養液中に培養されたものである。従って、このような条件の下では他家蛋白との接触による非特異性異物反応を除外でき、同種移植免疫反応のみを純粋な形で再現できたものと思われる。

6) 標的培養細胞にレシピエントの血清また

は脾臓細胞を加えて反応をみる場合には、1例を除く全例に新鮮家兎血清を加えて補体を補ったが、補体添加群と非添加群との間には細胞分裂頻度の減少や細胞傷害の程度等に著明な差異はみられない。

7) 同種移植免疫反応において、レシピエント血清もしくは脾臓細胞を加えたいずれの場合にも、標的培養細胞にみられる細胞傷害の程度と細胞分裂頻度の減少とは正比例する。

8) 同種移植免疫反応においてみられる細胞傷害について、血清添加群と脾臓細胞添加群とを比較すると、後者すなわち細胞性抗体添加群でより高度の細胞傷害があらわれる。異種感作および異種移植においては、血清添加群により強い細胞傷害が認められたことと対照的である。

9) 同種移植免疫反応におけるこのような細胞傷害は、細胞性抗体でみると一次移植より約30日を経過した頃より傷害の程度が軽減されるが、体液性抗体で観察すると、このような傾向はみられず、移植後の経過日数に関係なく一定の傷害がみられる。

10) 体液性抗体による免疫反応について、同種移植と異種移植を比較すると、異種移植群では核および原形質の両者ともに同じ程度の著明

な傷害がみられるが、同種移植群では原形質の傷害が著明である。

11) 細胞性抗体による細胞傷害は、異種感作、異種移植および同種移植の3群を通じて、核濃縮を主とした核の変化が著明であり、核濃縮は細胞性移植免疫反応の基本的なパターンであると考えられる。

一方、体液性抗体による細胞傷害は、上記の3つの実験群を通じて、核および原形質の両者ともにほぼ同等、もしくは原形質により強い変化が認められる。

このように、体液性抗体と細胞性抗体は互いに異なる細胞傷害を示すことから、両抗体の作用機序は異なるものと考えられる。

12) 細胞性抗体の担い手である免疫リンパ球様細胞の抗体の存在部位については議論のある所であるが、脾臓細胞添加群では細胞傷害を示す細胞の分布にムラがあること、添加脾臓細胞は特異的に破壊されるものが多いことおよび両種抗体の細胞傷害部位に差異がみられること等の点から、抗体はリンパ球様細胞内部に存在する可能性が大きい。もし、抗体が細胞膜表面にあるとしても、それは細胞膜と固く結合され容易に遊離しないものと考えられる。

〔全 篇 総 括〕

臓器移植の際にみられる移植免疫反応を解明するため、著者は組織培養法を応用して観察を行なった。すなわち、ドナー動物組織より一次培養を行ない標的培養細胞とし、これにレシピエント動物の血清あるいは脾臓細胞を加えて、標的培養細胞の蒙むる変化について形態学的に検討を加えたのである。

このように、*in vitro* において免疫反応を観察するためには、生体と可及的類似の環境を作り出さねばならない。これまでに、組織培養法を用いた移植免疫反応についての報告は多いが、培養液には一律に牛血清を使用するなどの不注意がみられ、いずれも生体との間の格差が大きく、*in vivo* の移植免疫反応を忠実に再現

しているとはいえない。

著者は、ドナー組織を、レシピエントに予定している動物より移植施行前に採取した血清中に培養すること等によって非特異性異物反応を除外し、*in vivo* と可及的近似の条件を作り出すことに留意しつつ実験を行ない、以下のような成績を得た。

1) 鶏胎児と家兎およびモルモットと家兎の二つの組合せで、それぞれ前者の組織ホモジネートで家兎を能動的に感作した異種感作において、感作家兎血清および脾臓細胞は種々の細胞傷害作用をあらわす。

鶏胎児またはモルモットよりの標的培養細胞に感作家兎血清を加えると、培養細胞の分裂頻

度は対照群の約12分の1に減少し、分裂細胞の染色体の形や配列にも異常がみられるものが多い。細胞分裂の時期に従い分類すると、分裂の障害は後期から終期へ移行する時点で招来されている。

標的培養細胞の形態学的変化をみると、核の縮小・変形・濃染等のいわゆる核濃縮や原形質の混濁・濃染・変形等の著明な細胞傷害がみられる。

2) 鶏胎児またはモルモットよりの標的培養細胞に感作家兎脾臓細胞を加えると、脾臓細胞は標的培養細胞周囲に凝集し、両者相互に傷害をうける。

標的培養細胞と接している脾臓細胞は種々の変化をうけ、特異的に破壊されているものが多い。

培養細胞の分裂頻度は対照群の約4分の1に減少しているが、この障害は細胞分裂の後期から終期への移行の時点で起っていると考えられる。

標的培養細胞の形態学的変化をみると、鶏胎児では、中等度の核濃縮、核の変形、原形質の濃染等の変化がみられる。一方、モルモットよりの標的培養細胞では、核構造、核小体はともに消失し、核は均等に赤染し、原形質の染色性も低下しており、鶏胎児の場合より高度の傷害がみられる。これは、鶏と比較して、モルモットに起る免疫反応の進み方が早いと思われる。

3) 鶏胎児を家兎腹腔内に移植した異種移植において、レシピエント家兎の血清および脾臓細胞は種々の細胞傷害作用を示す。

鶏胎児よりの標的培養細胞にレシピエント家兎血清を加えると、培養細胞の分裂頻度は対照群の3分の1に減少し、分裂細胞の染色体の形態や配列に異常を認めるものが多い。細胞分裂の時期に従い分類すると、終期の像を呈するものは全くみられない。

標的培養細胞の形態学的変化をみると、著明な核濃縮と原形質混濁がみられ、異種能動感作の際にみられる変化とほぼ同様である。

4) 鶏胎児よりの標的培養細胞にレシピエ

ント家兎脾臓細胞を加えると、脾臓細胞は標的培養細胞周囲に凝集し、両者相互に傷害をうける。標的培養細胞と接している脾臓細胞は特異的に破壊されているものが多い。

培養細胞の分裂頻度は対照群の約3分の1に減少しているが、細胞分裂の時期には大きな差異は認められない。

標的培養細胞の形態学的変化をみると、核の変化が著明で、核濃縮の像を示すが、原形質にも濃染がみられる。これらの諸変化は、異種能動感作の際にみられる反応とほぼ同様である。

5) 家兎同種移植において、レシピエント血清は明らかな細胞傷害作用をあらわす。

ドナーよりの標的培養細胞にレシピエント血清を加えると、培養細胞の分裂頻度は半分以下に減少し、形態学的には、原形質の空胞形成、混濁、変形等とともに核膜・核構造の濃染が認められる。

6) 家兎同種移植において、レシピエント脾臓細胞は血清による反応よりも更に著明な細胞傷害をひきおこす。

添加したレシピエント脾臓細胞は標的ドナー培養細胞周囲に特異的に凝集しかつ破壊される。

標的培養細胞では原形質の混濁がみられるが、核の変化は更に顕著で、核構造は濃染し不明瞭となり、核膜も厚く濃染しいわゆる核濃縮の像を呈する。

7) 同種移植免疫反応においてみられる細胞傷害について、血清添加群と脾臓細胞添加群とを比較すると、後者、すなわち、細胞性抗体添加群でより高度の細胞傷害がみられる。異種感作および異種移植においては、血清添加群により強い細胞傷害が認められたことと対照的である。

8) 細胞性抗体による細胞傷害は、異種感作、異種移植および同種移植の3群を通じて、核濃縮を主とした核の変化が著明であり、核濃縮は細胞性移植免疫反応の基本的なパターンであると考えられる。

一方、体液性抗体による細胞傷害は、上記の3つの実験群を通じて、核および原形質の両者

ともにほぼ同等、もしくは原形質により強い変化が認められる。

このように、体液性抗体と細胞性抗体は互いに異なる細胞傷害を示すことから、両抗体の作用機序は異なるものと考えられる。

9) 細胞性抗体の担い手である免疫リンパ球様細胞の抗体の存在部位については議論のある処であるが、脾臓細胞添加群では細胞傷害を示す細胞の分布にムラがあること、添加された脾臓細胞は特異的に破壊されるものが多いことおよび兩種抗体の細胞傷害部位には差異がみられること等の点から、抗体はリンパ球様細胞内部に存在する可能性が大きい。もし、細胞膜表面に抗体があるとしても、それは細胞膜と固く結合され容易に遊離しないものと考えられる。

文 献

- 1) Burnet, M.: The clonal selection theory of acquired immunity, 1959.
- 2) 藤本吉秀, 大田和夫: 医学のあゆみ, 52: 449, 1965.
- 3) Steinmuller, D.: Ann. New York Acad. Sc., 99: 629, 1962.
- 4) Algire, G.H., Weaver, J.M. and Prehn, R.T.: Ann. New York Acad. Sc., 64: 1009, 1957.
- 5) Freuned, J. and Mac Dermott, K.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 49: 548, 1962.
- 6) Champy: Compt. rend. de la Soc. de Biol., 72: 987, 1912.
- 7) Ebeling: J. Exp. Med., 41: 337, 1925.
- 8) Bussard, A.E. and Hannoun, C.: J. Exp. Med., 123: 1047, 1966.
- 9) Furth, R. van, Schvit, H.R.E. and Hijmans, W.: Immunology, 11: 1, 1966.
- 10) Fahey, J.L., Finegold, I., Rabson, A.S. and Manaker, R.A.: Science, 152: 1259, 1966.
- 11) Sandström, B.: Acta Soc. Med. Upsal., 71: 14, 1966.
- 12) Simonsen, M.: Progr. in Allergy, 6: 349, 1962.
- 13) 山村雄一, 石坂公成: 免疫化学, 昭和38年.
- 14) 高野宏一, 小河秀正, 広川康子: 国立予防衛生研究所年報(昭和35年度) 237, 1961.
- 15) 工藤修二, 久下 衷, 竹迫良雄, 園田 喬: 熊本医学会雑誌, 39巻1号 p. 84.
- 16) Taylor, H.E. and Culling, C.F.A.: Lab. Invest., 12: 884, 1963.
- 17) Wilson, D.B.: J. Exp. Med., 122: 143, 1965.
- 18) Gibson, T.: Brit. J. Plast. Surg., 8: 234, 1955.
- 19) Russell, P.S. and Monaco, A.P.: New Engl. and J. Med., vol. 271, No. 10~14, 1964.
- 20) 楠木隆光, 園田孝夫: 移植, 1: 4, 1966.
- 21) 稲生綱政, 藤本吉秀他: 移植, 2: 42, 1967.
- 22) 関口守正, 松倉迪雄, 芦川和高: 移植, 2: 134, 1967.
- 23) Paterson, P.Y.: Mechanism of Cell and Tissue Damage Produced by Immune Reactions. Ed. by Grabar, P. and Mischer, P., Grune and Stratton, Inc., New York, pp. 184 1962.
- 24) Roitt, I.M., Jones, H.E.H. and Doniach, D.: Ibid., 174, 1962.
- 25) Murphy, J.B.: Lymphocyte in resistance to tissue grafting, malignant disease and tuberculous infection. pp. 168, New York, 1926.
- 26) Mitchison, N.A., and Dube, O.L.: J. Exp. Med., 102: 179, 1955.
- 27) Billingham, R.E., and Brent, L.: Brent, J. Exp. Path., 37: 566, 1956.
- 28) Medawar, P.B.: Quart. J. Microscopic Soc., 89: 239, 1948.
- 29) Allgöwer, M., Blocker, T.G., Jr., and Engleley, B.W.D.: Plast. & Reconstruct. Surg., 9: 1, 1952.
- 30) Reif, A.E., and Norris, H.J.: Cancer Research, 20: 125, 1960.
- 31) Terasaki, P.I., Bold, E.J., Cannon, J.A., and Longmire, W.P., Jr.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 106: 133, 1961.
- 32) Gorer, P.A., and Mikulska, Z.B.: Cancer Research, 14: 651, 1954.
- 33) Amos, D.B.: Brit. J. Exp. Path., 34: 455, 1953.
- 34) Medawar, P.B.: Brit. J. Exp. Path., 27: 15, 1946.
- 35) Billingham, R.E., Brent, L., and Medawar, P.B.: Proc. Roy. Soc., 143: 58, 1954.
- 36) Algivere, G.H.: J. Nat. Cancer Inst., 15: 483, 1954.
- 37) Wilson, D.B.: J. Cellular Comp. Physiol.,

- 62 : 273, 1963.
- 38) Vainio, T., Koskimies, O., Perlman, P., Perlman, H. and Klein, G. : *Nature*, 204 : 453, 1964.
- 39) Granger, G.A., and Weiser, R.S. : *Science*, 145 : 1427, 1964.
- 40) Johson, G.J., and Russell, P.S. : *Nature*, 208 : 343, 1965.
- 41) Rerábek, E., Pešková, D., Hermanová, E., and Kreček, M. : *Blut*, 14 : 137, 1966.
- 42) Guiney, E.J., Austen, K.F., and Russell, P.S. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 115 : 1113, 1964.
- 43) Volk, H., Maverberger, D., Rother, K., and Rother, U. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 120 : 26, 1964.
- 44) Gewurz, H., Clark, S., Fintand, J., Kelly, W.D., Varco, R.L., Good, R.A., and Gabrielson, A.E. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 129 : 673, 1966.
- 45) Rother, K., Rother, U., and Ballantyne, D.L., Jr. : *Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.*, 124 : 439, 1967.
- 46) Zotikov, E.A., and Urinson, R.M., in *Mechanisms of Immunological Tolerance*, *Proc. of Symposium, Liblice, Czch.*, pp. 273, 1961.
- 47) Calman, J., and Kulatilake, A.E. : *Brit. J. Plast. Surg.*, 15 : 341, 1962.
- 48) Converse, J.M., Siegel, W.H., and Ballantyne, D.L., Jr. : *Plst. & Reconstr. Surg.*, 31 : 9, 1963.
- 49) Ballantyne, D.L., Jr., and Stetson, C.A., Jr. : *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 120 : 7, 1964.
- 50) Hanaoka, M., and Notake, K. : *Ann. Rept. Inst. Virus Res.*, 5 : 134, 1962.
- 51) Sanford, K.K., Earle, W.R., and Likely, G.D. : *J. Nat. Cancer Inst.*, 9 : 229, 1948.