

免疫生物学

シンポジウム 3

目 次

複合ホヤの allogeneic recognition	
田中 邦男, 向井 秀夫, 渡辺 浩	1
昆虫の寄生卵に対する非特異的細胞性防御反応	北野日出男
重層遠心法によるマクロファージの分離と分離マクロファージの異種赤 血球処理	木下 喜博
食細胞, 血液細胞と抗原抗体補体結合物の反応	関根 暉彬, 西岡久寿弥, 吉田 孝人, 今井 邦之
マウス腹腔内のマクロファージ—マクロファージ, マクロファージ—リ ンパ細胞間のブリッジ形成反応と抗体産生	横室 公三, 木村 義民
マクロファージの免疫反応	三橋 進, 大沢 伸孝, 齊藤 和子
マクロファージと抗体産生 — リンパ節の酵素免疫細胞化学および酵素 組織化学的観察	渡辺 慶一, 増淵 誠夫, 大谷 武彦, 鈴木 裕, 影山 圭三
遅延型アレルギー感作動物細胞から放出されるマクロファージ遊走阻止 因子について	橋本達一郎, 綿貫まつ子, 吉田 彪
マクロファージ遊走阻止試験と細胞性免疫—第2報	
秋山 武久, 内山 竹彦, 木村 敏郎, 笠原 四郎, 小山 弘之	77
移植免疫および遅延型過敏症におけるマクロファージの役割	
野本亀久雄	82
マウスの日本脳炎ウィルス感染におよぼす BCG の作用	大滝 研也
家畜の自己免疫性貧血症におけるマクロファージの役割	大木与志雄

1969. 11. 18~19. — 大阪

第 3 回

免疫生物学会シンポジウム

プログラム

と き 昭和44年11月18日(火)・19(水)

ところ 大阪府医師会館

第1日 (11月18日)

- 14:00 開会の辞 花岡正男(京大・ウイルス研)
- 14:10 1. 複合ホヤのallogeneic recognition (30分) 渡辺浩(東教大・理・動物)
- 田中邦男(")
- 向井秀夫(群大・教育・生物)
- 15:00 2. 昆虫の寄生卵に対する非特異的細胞性防御反応(30分) 北野日出男(東学大・生物)
- (15:50—16:10 休憩)
- 16:10 3. 重層濾心分離法によるマクロファージの分離と分離
マクロファージの異種赤血球処理(30分) 木下喜博(大市大・医・生理)
- 17:00 4. 食細胞、血液細胞と抗原抗体結合物の相互作用(30分) 関根昭彬(国立がんセンター)
- 吉田孝人(愛知県がんセンター)
- 西岡久寿弥(国立がんセンター)

(18:00—運営委員会)

第2日 (11月19日)

- 9:20 5. マウス腹腔内のマクロファージ・マクロファージ、マクロファージ
リンパ細胞間のブリッジ形成反応と抗体産生(15分) 横室公三(日医大・微生物)
- 木村義民(")
- 9:50 6. マクロファージによる抗体産生(30分) 三橋進(群大・医・微生物)
- 10:40 7. 抗体産生とマクロファージ(30分) 渡辺慶一(慶大・医・病理)
- 増渕誠夫(")
- 大谷武彦(")
- 鈴木裕(")
- (11:30—12:00 会務報告)
- 13:00 8. 遅延型アレルギー感作動物細胞のマクロファージ遊走阻止(30分) 橋本達一郎(予研・結核)
- 綿貫まつ子(")
- 13:50 9. cell migration 阻止現象の成立と細胞性免疫(15分) 秋山武久(慶大・医・微生物)
- 内山竹彦(")
- 三間孝(")

(14:20—14:40 休憩)

複合ホヤの allogeneic recognition

田 中 邦 男 (東教大・理・動物)
向 井 秀 夫 (群大・教育・生物)
渡 辺 浩 (東教大・理・動物)

はじめに

原索動物門、尾索綱に属するホヤ類には、有性生殖のみを行なう単体ホヤと、有性生殖と同時に無性生殖も行なって群体を形成する複合ホヤとがある。以前は、この単体か、群体かにより分類されていたが、現在では生殖腺の発生位置により分類され、単体か群体かの形質は、系統分類上の基準からはずされている¹⁾。しかし系統的に独立して、無性生殖の能力が存在することは、興味ある問題である。また有性生殖に際しても、自家不和合性の存在が、いくつかの種において、知られている²⁾。しかし、この現象も、系統分類との関係については、ほとんど知られていない。

自然より採集した複合ホヤを、それぞれ数個の個虫を含む群体片に切断して、ガラス板に付着させ、飼育すると、増殖させることができる³⁾。したがって、同一遺伝子構成の群体を多数得ることができる。また同一群体より分けた群体 (same clone) は、再び、切断して、切断面 (cut surface) どうしを合わせるか、または、近接しておいたとき、群体の成長により両者の成長端 (growing edge) が接すると癒合して、一つの群体になる (fusion)。しかし起原の異なる群体間では多くの場合、癒合しない (non-fusion)。

1903年 BANCROFT⁴⁾ は複合ホヤの fusion, non-fusion の現象について観察しているが、著者らは、このような群体の癒合に関する特異性 (fusibility)、自家不和合性 (self-sterility) およびその関係、さらに、群体の形状との関係を含めて、研究を進めているが、今回は、群体の fusibility を中心に、数種のホヤを用いた観察と実験から allogeneic recognition の存在と、その機構の一端について考察する。

無性生殖の方法と群体の形状

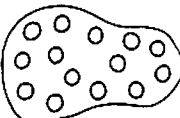
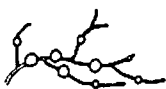
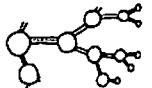
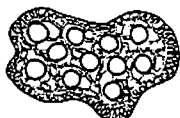
群体の形成は、有性生殖によって生じた1受精卵が、発生、変態過程を経て単一の個虫になり、後にひきつづく無性生殖の結果に起因する。無性生殖の方法には、いくつかの様式があるが^{5) 6)}、著者らは、親から由来する無性芽の組織構成から、基本的に四つの様式にまとめられると考えている (表1)。type A. 無性生殖が横分裂、あるいは "pyloric budding" によるホヤでは、epidermis+epicardium を主要素とする無性芽が形成され、増殖した個虫は、共通の皮のうに埋まり、個虫間に血管系 (test vessel) による連結はない (シロウスボヤ、ヘンゲボヤ) (type I)。type B. epidermis+septal mesenchyme によって出芽増殖するホヤでは、通常、各個虫は芽茎 (ストロン, stolon) により連結され分枝状血管を持つが、共通の皮のうに埋まることはなく、各個虫は一見独立しているように見える (マメボヤ) (type II)。type C. epidermis+atrial epithelium からの出芽によるホヤには、同一群体の血管の盲端部 (アンブル, ampullae) が、互いに癒合して網目状の共通血管系を作り共通皮のうに埋もれた形状を示すもの (キクイタボヤ、イタボヤ、コバンイタボヤ) (type IV) と、アンブルが互いに癒合することなく、網目状の血管系を形成せずに、1~2本の血管により連結するにとどまり、しかも、共通皮のうに埋まらないものがある (メタンドロカルバ) (type III)。Type C の前者の様式をとるホヤのうち、ボトリルス属とボトリロイデス属のホヤは、同時に epidermis+lymphocyte による無性生殖も行なう。このように群体の形状は、無性生殖の様式と epidermis の突出による血管 (アンブル, ストロン) の癒合性などに大きく作用されるが、著者らは、群体の形状についても、基本を四つに分類している (表1)。

各種複合ホヤに見られる群体の fusibility

キクイタボヤ (*Botryllus primigenus*): 個虫の大きさ約 1~2 mm, 群体の厚さ約 1~2 mm で群体内の個虫

* 松永記念科学振興財団より受けた研究助成金により本研究の一部はなされた。

表1 複合ポヤの無性生殖の様式と群体の形状との関係

Type of Asexual Reproduction	Constitution of Tissues	Species	Type of Colony
A	epidermis + epicardium	— (<i>Polycitor</i> <i>Didemnum</i>) — I	
B	epidermis + septal mesenchyme	— (<i>Perophora</i>) — II	
C	epidermis + atrial epithelium	— (<i>Melandrocarpa</i>) — III — (<i>Symplegma</i>) —	
D	epidermis + lymphocyte	— (<i>Botryllus</i> <i>Botrylloides</i>) — IV	

はすべて、共通血管系により連結し、群体の周縁部には、先にのべたようにアンブルと呼ばれる血管の盲端部が配列している (type IV)。これが伸長し、その基部に“vascular bud” (type D の無性生殖) を生じ、群体は成長して広がる。また、無性生殖としては、古くから知られている type C の囲鯉腔側壁からの無性芽を生じて、群体内の個虫の密度も高くなる。自然より得た群体間で fusibility を調べると、growing edge、人為的な cut surface のいずれの場合の接触時にも、fusion の組合せは少なく、多くの組合せでは non-fusion で、接触領域は特異な反応 (non-fusion 反応) (後述) を生じて、最後には脱落する (rejection)。

イタボヤ (*Botrylloides violaceum*): キクイタボヤと同じボトリルス科に属し、群体の形状 (type IV)、無性生殖の様式 (type C と D) ともキクイタボヤと類似している。fusibility に関しては、同一群体より分断して増殖した群体間では growing edge、cut surface の何れの場合でも fusion が認められるが、自然から採集した群体間では、キクイタボヤと同様多くの場合 non-fusion の関係にある。しかし、non-fusion の場合、cut surface による実験では rejection が生じるが、growing edge による実験では、接触したアンブルは、互いに強く押し合う形となり、キクイタボヤで見られる、テストマトリックスの fusion も rejection も認められない。

コバンイタボヤ (*Symplegma reptans*): ボトリルス科と近縁のスティエラ科に属し、群体の形状 (type IV) は前記の2種と比較的似ているが、無性生殖では、type

C の様式のみが見られる。fusibility に関しては、キクイタボヤと同様、fusion、または non-fusion、さらに rejection を生ずる。

メタンドロカルバ (*Melandrocarpa taylora*) スティエラ科に属し、各個虫の大きさは約 4~5 mm に達する。無性生殖の様式は、コバンイタボヤと同様 type C で、無性芽は囲鯉腔壁のふくらみによって作られる。先にのべたように、各個虫は1~2本の共通血管により連絡され、type III の群体の形状を示す。アンブル相互の癒合は決して行なわれることなく、また、同じクローンに属する個虫が接触すると、皮のうの癒合は認められるが、初期の無性芽はしばしば退化吸収される。一方、異なった起源による個虫間では、皮のうの癒合すら起こらない。したがって、一方の個虫、あるいは血管の上を、他方のそれが伸長するようになる。

上記の4種は側性ホヤ目に属するが、次の3種は内性ホヤ目に属する。

シロウスボヤ (*Didemnum moseleyi*): ディデムニ科に属し、群体の形状は type I、無性生殖の様式は type A である。群体内の個虫はアンブル様突起を持つが、それは伸長せず、個虫間を連結する血管系はない。したがって、各個虫は、皮のう中に独立して存在しているが、テスト細胞は、皮のう中に共存している。群体の周縁部には、周縁部の個虫のアンブル様突起がならんでいる。fusibility に関しては、皮のうの癒合による fusion と rejection が、growing edge、cut surface の両実験で認められる。

ヘンゲボヤ (*Polycitor proliferus*): ポリキトール科に属し、群体は厚さ 6 mm に達し、個虫も 4 mm に達する。このホヤも type I の群体の形状を示し、個虫間を連結する血管系はない。今までの実験結果によれば、この種では、自然より採集した、どの群体間でもその起原に関係なく、growing edge による接触では、non-fusion を示し、cut surface による接触では、皮のうの fusion を示したり。

マメボヤ (*Perophora orientalis*): ペロフォラ科に属し、群体は type II の形状で 1 本、あるいは枝分れたストロンに、type B の様式で出芽した個虫が付着した形状を呈する。このストロンは、うすい皮のうに包まれているだけで、分岐はするが決して網目状には連結していない。このことからわかるように、同一クローンでも growing edge の癒合は認められず、fusibility は non-fusion である。しかし cut surface の実験では自然から得た群体間でもすべて fusion を示した。

以上 7 種のホヤについての結果は表 2 に示す通りである。また、キクイタボヤ、イタボヤ、コバンイタボヤの異種間では、すべて non-fusion であるが、rejection は生じない。

表 2 各種複合ホヤに見られる fusibility

Species	Contact between	
	growing edges	cut surfaces
Botryllus	f n-f (r)	f n-f (r)
Botrylloides	f n-f	f n-f (r)
Symplegma	f n-f (r)	f n-f (r)
Metandrocarpa	f n-f (r*) n-f	
Didemnum	f n-f (r)	f n-f (r)
Polycitor	n-f	f
Perophora	n-f	f

f, fusion; n-f, non-fusion; r, rejection

* 他のホヤに見られる rejection とは異なる

キクイタボヤ群体の fusibility と self sterility の遺伝的支配

自然より採集した、non-fusion の関係にある 2 群体から、有性生殖によって得た多数の F₁ 群体は、その間の fusibility を調べると、4 系列に分けられ、2 組の non-fusion 組合せが存在する⁹⁾。またこの 4 系列は 1 : 1 : 1 : 1 の比率で現われ、いずれの系列に属するもの

も、二つの親群体とは fusion の関係にある。さらに、non-fusion の関係にある二つの F₁ 群体から由来する F₂ 群体も、やはり 4 系列 (1 : 1 : 1 : 1) に分かれ、そのうちの 2 系列は、P 群体のそれぞれと同じ系列に属する。これらの実験より、OKA & WATANABE¹⁰⁾ は次のような仮説を設けている。

1) Each colony in nature is heterozygotic in respect to the gene governing concrescibility, 2) The gene is represented by a series of alleles like the S gene governing self-incompatibility in flowering plants, and 3) Colonies containing at least one gene in common are concrescible with one another. したがって、P, F₁, F₂ 群体の fusibility に関する遺伝子の構成は図 1¹¹⁾ のように示される。

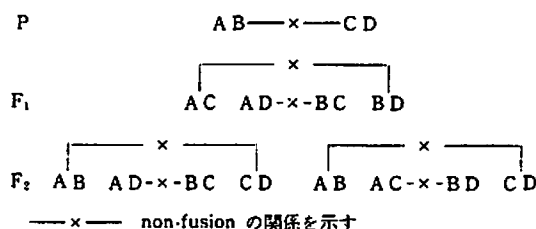
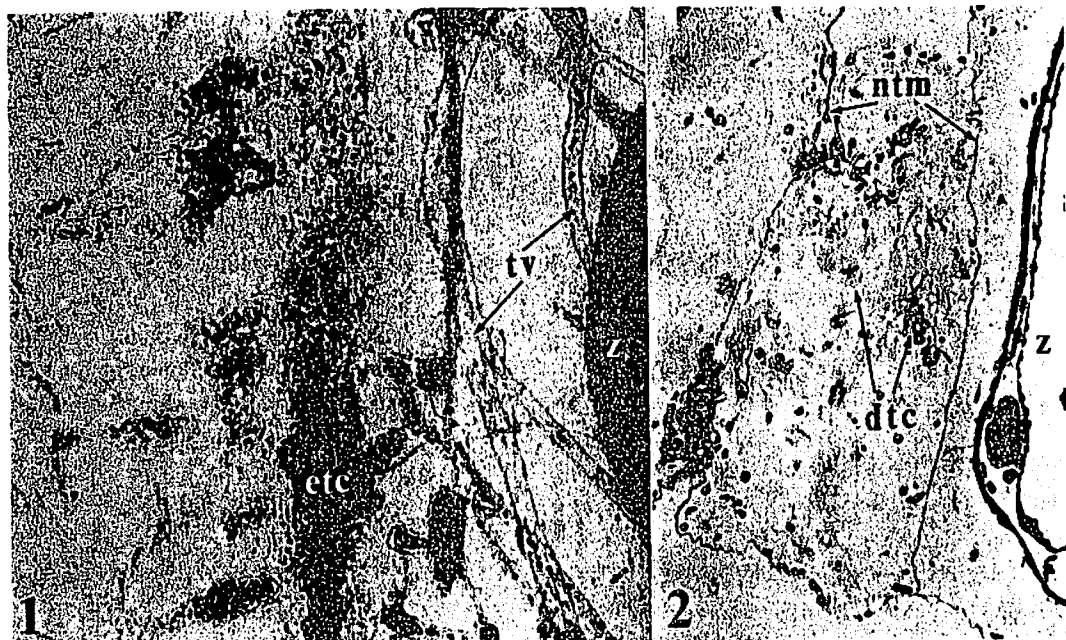


図 1 キクイタボヤの fusibility に関する遺伝子構成の仮説

複合ホヤは雌雄同体の個虫が集まって群体を形成しているが、キクイタボヤもその例外でない。個虫間、群体間での受精の可否を調べると、興味あることに、fusibility と対称的な結果を得た¹¹⁾¹²⁾。すなわち、受精は同一群体内、同一系列間では不可能であった。これは顕花植物の自家不稔の現象と比較して考えられる。また単体のホヤにおいて、MORGAN²⁾ は *Ciona intestinalis* に自家受精が、低い率でしか起こらないこと、ESPOSITO³⁾ は *Ciona intestinalis* で 10%、*Asciidiella aspersa* で 80%、*Ascidia malaca* で 25%、*Ascidia mentula*, *Phallusia mammilata* では 100% 生ずることを報告している。

キクイタボヤにみられる non-fusion 反応

キクイタボヤの non-fusion の際にみられる反応を著者らは non-fusion 反応と呼んでいる¹³⁾¹⁴⁾。この反応領域を生きた材料で、あるいは組織切片や、電子顕微鏡で調べると、血管外のテストマトリックス中のテスト細胞に著しい変化が生じていることがわかる。cut surface の接触後 (例えば AC-BD 群体の組合せ) 3~4 時間経過すると、接触面に近いテスト細胞は、エリスロシン B で染まるようになる (図 2-1 参照)。電子顕微鏡像による



1. 接触後8時間、接触部域のテスト細胞はエリスロシンBで良く染まる (etc)。
2. 接触後15時間、Glutar-O₂O₂ 固定、Epon 包埋、トルイジンブルー染色、テスト細胞の崩壊 (dic) と、新しく形成された境界膜 (ntm) が認められる。(tv, 血管; z, 個虫)

図2 キクイタボヤの cut surface による non-fusion 反応。

と、テスト細胞は膜が破壊され、内容物は飛散して、核も necrotic な像を示している (図3-1a)¹⁴⁾。そしてさらにこわれたテスト細胞の周辺に、特異な filament 様構造が認められる (図3-1a, 1b)。12時間を経過すると、群体の反応部域と健康な部域との間に境界膜が現われ (図2-2)、反応部域は脱落するにいたる。この反応過程は、growing edge であるアンプル相互の接触による場合もほとんど差はないが、反応が生ずる前に、アンプルが相互の群体に侵入する過程が加わる。図4に接触から rejection が生ずるまでの non-fusion 反応の過程を模式的に示す。

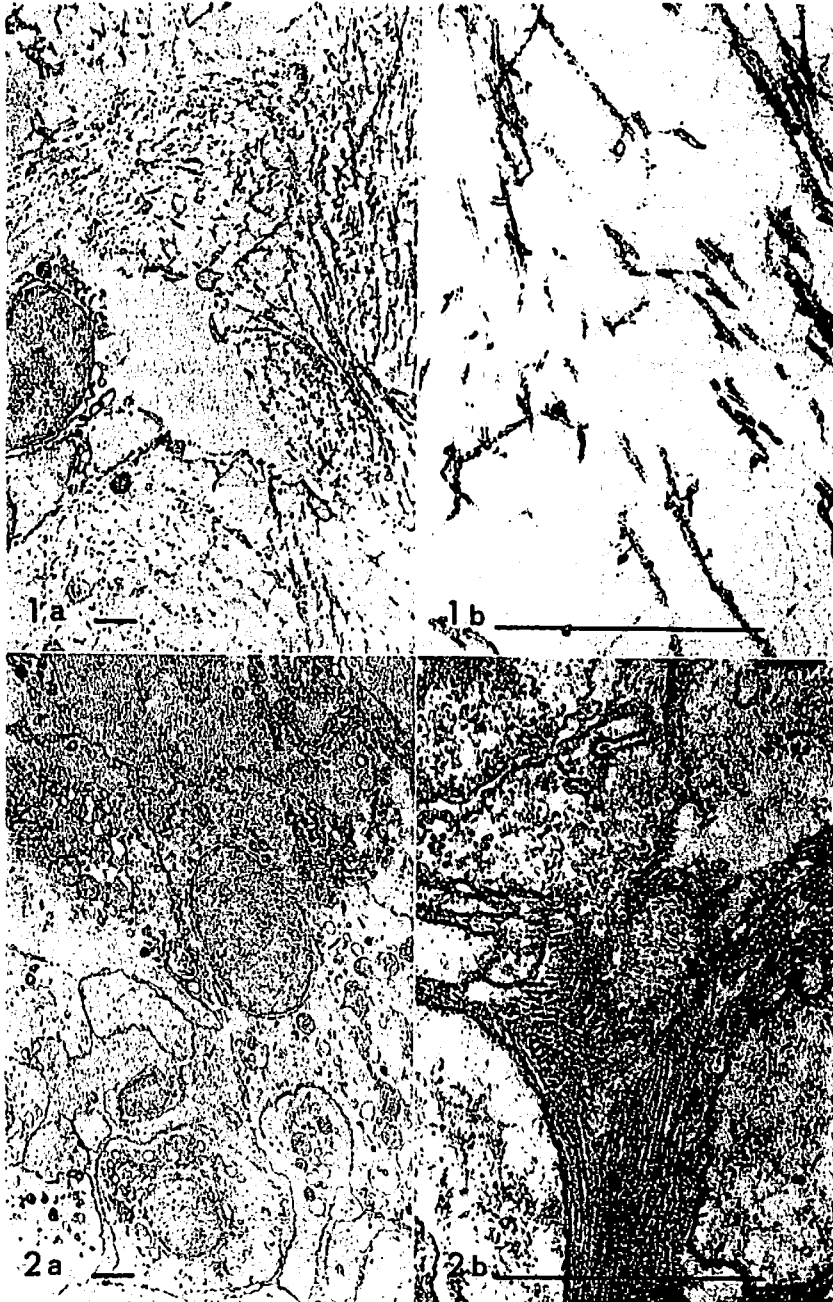
しかし、接触後、アンプルが侵入してテストマトリックスが癒合する以前に、接触させた群体の一方をとり除いたときは、non-fusion 反応は起こらないが、アンプルの侵入が始まり、多少ともテストマトリックスの癒合が起きてから引き難した場合には、反応はそのまま進行し、rejection が生ずるまでの時間は、対照実験と何ら変ることがない。

また AC 群体と BD 群体の間に AD 群体を置き、同時あるいは時間をずらして、同一の AD 群体に、相対する位置で AC 群体と BD 群体を癒合させると、AC=AD 群体間、AD=BD 群体間の血流は3時間程度

認められたのち、どちらか一方の群体間で、血管は切断される。ときには AD 群体の中で血管が切断され、AD 群体が二つにわかれることもある。時間差30分～1時間の場合には、あとから癒合させた群体間で、約1時間血流が認められたのちに、血管は切断される。3時間の時間差で癒合させると、あとから癒合させた群体間で、1回、ときには、数回の血液の交換を行なうと直ちにその血管内で血球が集合 (凝固、凝集?) し、血流は停止し、つづいて血管は収縮し、切断される。これをエリスロシンBで染めると、集合した血球中に特に良く染まる細胞がいくつか認められる。この部域を電顕で調べると (図3-2a, 2b)¹⁴⁾ のように、多くの細胞は直接接触し、一部の細胞間に filament 様物質が密に存在している。この血管内での反応が生じてから数時間を経てから調べると、血管外のテストマトリックス中に、前の実験で認められた filament 様構造が出現している。AC (あるいは BD) 群体と AD 群体が癒合して6時間を経ると、BD (あるいは AC) 群体は AD 群体と、本来癒合が可能であるにもかかわらず、non-fusion 反応が生ずる。

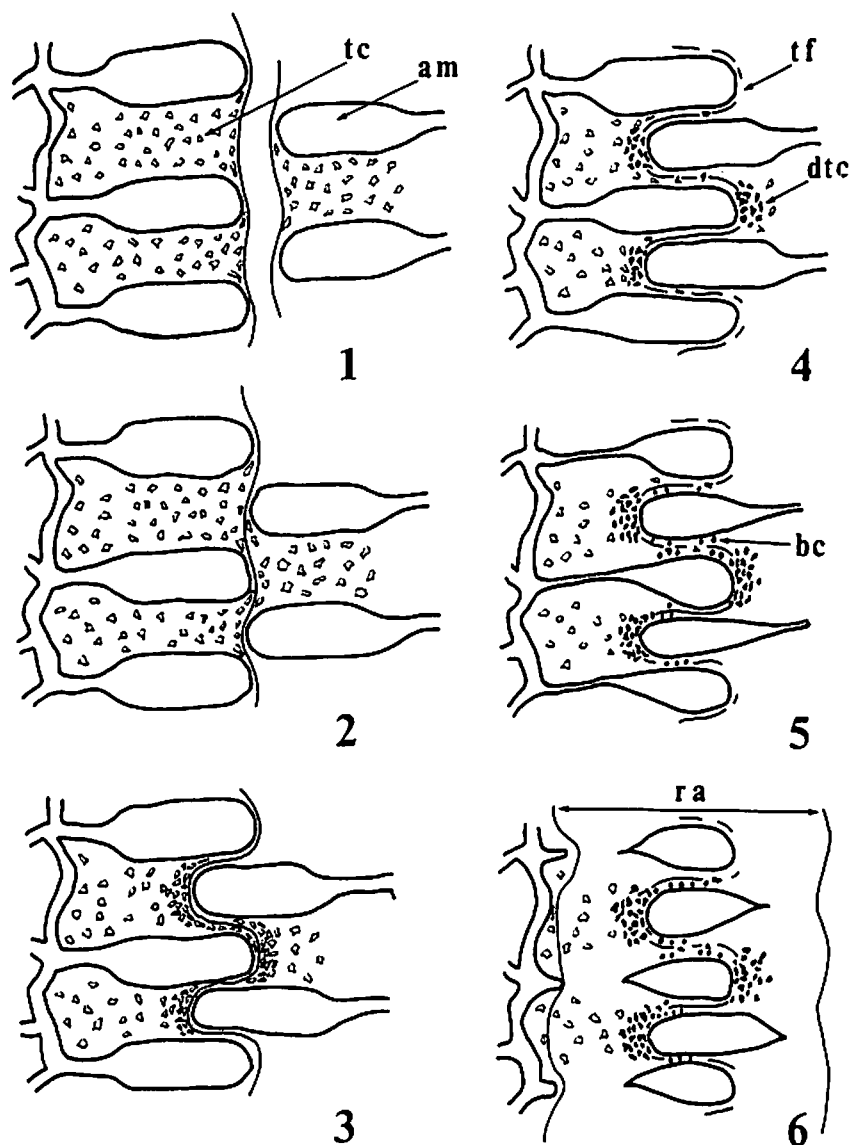
ま と め

キクイタボヤには、同種内の群体間で、fusibility や



1. テストマトリックス中の反応。テスト細胞の破壊(1a)、フィラメント様構造の出現(1b)。
2. 血管内での反応。血球の集合(2a)、フィラメント様物質が認められる(2b)。

図3 ヤマイタゴヤの non-fusion 反応の電子顕微鏡像。Glutar-O₂O₄ 固定, Epon 包埋, U-Pb 染色。



1. アンブルとアンブルが相互に向い合うように、スライドグラス上に接着させる。
 2. 接触直後。
 3. アンブルは強く接触しているが、テストは癒合していない。
 4. アンブルは相互のテスト中に侵入して癒合し、テスト細胞の破壊が認められる。
 5. 反応は進行し、アンブルは基部で収縮する。ブラウン細胞の流出も認められる。
 6. アンブルは切断され、反応領域と健康領域との間に、新たに境界膜が生じ、この領域は reject される。
- am, アンブル; bc, ブラウン細胞; dtc, 破壊したテスト細胞; ra, 排除される領域; tc, テスト細胞。

図4 キクイタゴの growing edge 相互 (アンブルーアンブル) による non-fusion 反応の過程を示す模式図。

fertility に能・不能があり、それは遺伝的支配を受けている。すなわち allogeneic recognition が存在する。fusibility に関する recognition の存在を、複合ホヤの数種について調べると、ポリキトール科のヘンゲボヤと、ペロフロラ科のマメボヤには認められず、ディデムニ科のシロウスボヤには存在し、側性ホヤ目ではボトリルス科のキクイタボヤ、イタボヤ、スティニラ科のコバンイタボヤには存在するが、同じスティニラ科のメタンドロカルパでは、同一クローンに属する群体間でも fusion は起こらず、接触した個虫の退化が認められ他の場合と異なっていた。またイタボヤにおいては、cut surface による接触では顕著な non-fusion 反応を示したが、growing edge による実験では non-fusion ではあったが rejection は起こらなかった。これはアンブルが同系列の群体には侵入できるが、異系列の群体には侵入できず、したがってテストマトリックスの癒合が生じないために、non-fusion 反応が現われないものと考えられる。

non-fusion 反応の機構は、十分に解明されていないが、キクイタボヤを用いた実験から、著者らは次のような反応機序を考えている。growing edge のアンブルが延びて、他群体のテストマトリックスへの侵入が始まると、fusion する関係にある群体間では、何等の排除も受けずに進行し、アンブルは相手群体の血管と癒合して、この二つの群体は共通血管系を持つようになるが、fusibility に関する遺伝子を共通に持たない群体間ではアンブルの侵入により、テストマトリックスが癒合すると、液性因子が相手群体のテスト細胞に作用するようになる。この液性因子の存在は、3 群体 ($AC=AD=BD$) の時間差癒合実験からも予想される。その結果、テスト細胞は崩壊し、液性因子の浸透阻止に役立つと考えられる filament 様構造が、テスト細胞周辺のテストマトリックス中に出現する。テスト細胞からは、さらに血管収縮作用を持つ物質(?)が放出されて、アンブルはその基部で収縮し、切断されるにいたる。cut surface による実験では、直接的に、テストマトリックスが接触するため、時間的には速く反応をみる事ができる。また除去実験からも明らかのように、第一段階で一度液性因子が互いに相手群体に作用すると、第2段階の血管の収縮、切断が恢復することはない。

3 群体癒合実験 ($AC=AD=BD$) により、AC と BD の血液が AD 群体の血管内で混合すると、血球が集合し、血流の停止、血管の収縮が生ずるが、この集合が凝固によるものか、凝集によるものか、今のところ不明である。しかし一部の細胞が反応に参加し、死ぬことか

ら、未同定ではあるが、テスト細胞以外の反応関与細胞の存在は確かなようである。

いずれの実験においても、アンブルや血管を構成している細胞の電顕像では、反応の末期においても、著しい変化が認められない。しかし、ブラウン細胞の遊出のように、正常では認められない現象や、収縮や切断が起こることから判断して、第二段階 (あるいは直接的に) で、なんらかの影響を受け、接触部域の rejection に関係するものと考えられる。non-fusion 反応の末期に認められる健康部域との境界膜の出現は、どのような仕組みによるものかわからない。

このように、non-fusion 反応に関与する物質や、その反応機構は不明であるが、fusibility に関して recognition が存在することの意義は、fertility と密接に関連して、ホヤの集団遺伝的均斉に役立っているものと考えられる。また哺乳類における allogeneic inhibition や¹⁵⁾、免疫機構の問題、アカバンカビにみられる allogeneic inhibition¹⁶⁾ の存在などと比較しても、生物界を通じての自己-非自己認識機構の一端として興味ある問題と考えている。

文 献

- 1) BERRILL, N. J., 1950: The Tunicata. The Ray Society, London.
- 2) MORGAN, T. H., 1938: J. Exp. Zool., 78, 271.
- 3) ESPOSITO, S., 1949: R. Cl. Sci. Fis., Mat. e Nat. (Ser. 8), 6, 502.
- 4) OKA, H. & USUI, M., 1944: Sci. Rep. Tokyo Bunrika Daigaku, (Sec. B) 7, 23.
- 5) BANCROFT, F. W., 1903: Proc. California Acad. Sci. (Ser. 3), 3, 137.
- 6) BERRILL, N. J., 1951: Biol. Rev., 26, 456.
- 7) OKA, H. & WATANABE, H., 1957: Biol. Bull., 112, 225.
- 8) OKA, H. & WATANABE, H., 1959: Biol. Bull., 117, 340.
- 9) OKA, H. & WATANABE, H., 1957: Proc. Jap. Acad., 33, 657.
- 10) OKA, H. & WATANABE, H., 1960: Bull. Mar. Biol. Stat. Asamushi, 10, 153.
- 11) 丘 英通, 渡辺 浩, 1967: 科学, 37, 307.
- 12) 渡辺 浩, 1967: 実験形態学誌, 21, 462.
- 13) 渡辺 浩, 田中邦男, 1968: SABCO. J., 4, 1.
- 14) 田中邦男, 1969: 発生生物学誌, 23, 3.
- 15) MÖLLER, G. & MÖLLER, E., 1966: Ann. N. Y. Acad. Sci., 129, 735.
- 16) WILLIAMS, C. A. & WILSON, J. F., 1966: Ann. N. Y. Acad. Sci., 129, 853.

藤尾芳久 (名大・農): 癒合性を支配している遺伝子の遺伝子型がホモである個体がなぜ存在しないのか。

答：キクイタボヤの self-sterility は、渡辺¹⁴⁾の報告のように、卵を取り囲む卵細胞、卵膜などに起因すると考えられるが、ホモの遺伝子型が出現しない原因は不明である。しかし現在まで、自然より、または、実験的处理を経て、得た受精より由来した群体は、癒合実験の結果、図1の仮説にあてはまり、すべてヘテロと考えられる。

北村公一（三共製薬中央研）：fusion と non-fusion の認識は、細胞と膜のどちらによって行なわれるのか。

答：イタボヤでの non-fusion は、アンプルの侵入、テストマトリックスの癒合をともなわないことから、テスト構成物質に、系統による相違があると考えられる。

キクイタボヤでは、fusion, non-fusion いずれの場合にも、アンプルは、相手群体に侵入可能であることから、テストの構成物質は、系統間で差がないか、あってもアンプルから出る酵素（？）が、その差をこえて作用するものと考えられる。そのため、テストマトリックス中に埋もれている、テスト細胞が rejection の役割を担っていると考えている。

花岡正男（京大・ウイルス研）：同じクロン間では fusion は必ず起こるのか。

答：必ず fusion が起こる。また哺乳類で知られる allogeneic inhibition と異なり、異系統でも、例えば、

AC に対し、AB, AD, CB, CD, のように一つの遺伝子を共通に持つ場合には、fusion が起こる。

木下喜博（大阪市大・医・生理）：1) ホヤには白血球様細胞が存在するとのお話であったが、リンパ球や顆粒球などのように、数種に分類されているのか。2) rejection に関与する細胞は如何なる細胞でしょうか。

3) ホヤに血管系があるとのことだが、その中に赤血球に相当する細胞があるのか。あるとすれば、赤血球様細胞の中にガス交換に必要な血色素様物質が存在するのか。ないとすれば、ホヤの生体内のガス交換は如何にして、行なわれているのか。

答：1) 哺乳類の各種血球と、必ずしも機能的に一致するとは考えられないが、キクイタボヤでは、lymphocyte, macrophage, granular amoebocyte, brown cell 等8種類の細胞が血流中に認められる。2) 第1段階では、テスト細胞と未同定の血流中の細胞、第2段階では血管を構成している細胞と考えている。3) ガス交換に関与する血色素、細胞は存在しないと考えられている。ホヤは、一般に、非常に鰓が大きく、また、各組織も一層から数層の細胞で構成されており、ガス交換は比較的簡単におこなわれると想像される。また、鰓への海水の出入も、非常に、活発に行なわれている。

昆虫の寄生卵に対する非特異的細胞性防御反応

北 野 日 出 男 (東京学芸大・教育・生物)

1. ま え が き

昆虫類はその体内に侵入した異物のうち、自己の捕食細胞によって取り込み不可能な大型の異物に対しては“encapsulation” (SALT, 1967¹⁾) という型で生体防御機能を発現する。筆者は異物に対する昆虫のこの反応が、血球による非特異的な反応であることから、それを“非特異的細胞性防御”と呼んだ (北野, 1970²⁾)。 (以下、防御反応と略記する)

しかるに、自然における内部寄生性昆虫 (以下、寄生昆虫と略記する) とその宿主昆虫間にあっては、宿主にとって寄生昆虫の卵または幼虫は本来異物であるにもかかわらず、大部分の宿主は寄生昆虫に対して防御反応を生起しない。

筆者は現在、寄生昆虫がどのようにして宿主昆虫の防御反応にうちかち、どのような生物学的性質によって寄生性の進化のいろいろな過程でそのような特性をうけついたのであろうかという問題を、内部寄生蜂アオムシコマヌバチ *Apanteles glomeratus* (以下ハチと略記する) とその宿主モンシロチョウ *Pieris rapae crucivora* 幼虫 (以下アオムシと略記する) を用いて研究している。ここに、現在までに明らかにしえた事実を報告し、この種の問題を検討していく場合の一資料として提供したい。

II. 材 料 と 方 法

この実験に用いたハチおよびアオムシはすべて小金井産個体群である (北野, 1967³⁾)。すなわち、東京都小金井市内のキャベツ圃場で、産卵中のモンシロチョウを捕獲し、それらのチョウより、多数の卵をリシャル法⁴⁾で得た。孵化後のアオムシは $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下でキャベツ葉を与えて飼育した。ハチは小金井市内のキャベツ圃場で被寄生アオムシを採集し、それより得られたハチ成虫を実験に供した。種々の異物をアオムシに注入する方法は内径 $130 \sim 140 \mu$ の SALT (1955)⁵⁾ のマイクロピペットによった。今回の実験に用いた異物は、ハチ卵または幼虫にどのような処理を加えた場合にそれらはアオムシの防御反応を被るのであろうかという考えのもとに、ハ

チの貯卵嚢内にある成熟未分割卵、アオムシ体内に産下された卵、孵化したハチの1令幼虫、“巨細胞” (北野, 1962⁶⁾, 1965⁷⁾) を用いた。

異物注入実験に用いたアオムシはその操作の容易さと処理後の死亡率の低さから考えて、すべて5令幼虫を用いた。ちなみに、5令アオムシ体内でハチ胚は正常にその胚子発生を完了し得ることがわかっている (北野, 1969 a⁸⁾)。

1 実験群で用いたアオムシの数は5個体から16個体である。エーテルで麻酔したアオムシの第2腹脚関節間膜より異物をリンガー液 (北野, 1969 a) とともに注入した。異物注入後のアオムシはシャーレ内でキャベツ葉を与え、 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 条件下で飼育した。注入2~3日後に、リンガー液内でアオムシを解剖し、双眼実体顕微鏡下で異物に対する防御反応発現の有無をしらべた。

基本的な実験方法は以上のとおりであるが、以下各実験群の実験方法と結果をまとめて記すことにする。

III. 実 験 結 果

1. ハチ貯卵嚢内卵の注入実験: 羽化後12時間でハチ貯卵嚢内の成熟卵数は平均534に達し、3~4日後には平均950に達する。このような成熟卵を、エーテルで麻酔したハチをリンガー液内で解剖して取り出し、アオムシに注入した (表1)。注入卵は注入4日後まではほとんど防御反応を被らないが、5日後からは防御反応を被るようになる。ハチ卵の胚子発生はハチによって産卵された場合には、産卵後4日間でほとんど完了している (北野, 1969 c⁹⁾)。また、このハチは産卵性単為生殖を行なうことが知られている。しかるに、貯卵嚢内卵を直接アオムシ体内に注入した場合には、正常な胚子発生開始の引き金はひかれず、未分割卵のままアオムシ体内にとどまり、注入5日後からアオムシの防御反応をうける。正常な胚子発生開始の引き金は何であるかという問題は別として、発生が阻止されている卵は、アオムシ体内で4日間は防御反応阻止の特性をたもつことができるが、5日目以後からはその特性を失うと解釈することができよう。

Table 1. Fate of eggs, which were obtained from the reservoir of paired oviducts of *Apanteles* adult and artificially injected into the body cavity of the 5th instar *Pieris* larva.

Dissection: (Days after injection)	1		2		3		4		5		6	
Number of eggs observed with (+) or without (-) encapsulation:	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
0 45	0	45	0	6	0	4	0	3	0	1	7	0
0 51	0	51	0	3	0	5	1	8	2	0	0	1
0 9	0	9	0	6	0	3	3	14	1	0	0	2
0 31	0	31	0	17	1	7	0	9	1	0	14	0
0 38	0	38	0	1	0	4	0	4	4	0	19	0
0 5	0	5			0	9	0	2	2	0	3	0
1 32	1	32			0	6	0	1	0	1	36	0
0 31	0	31			0	3	0	2	1	1		
0 21	0	21										
0 32	0	32										
Total number of eggs observed:	1	295	0	33	1	41	4	43	11	3	79	3
%:	0.3	99.7	0	100	2	98	9	91	79	21	96	4

* Coupled figures refer to one and the same individual host.

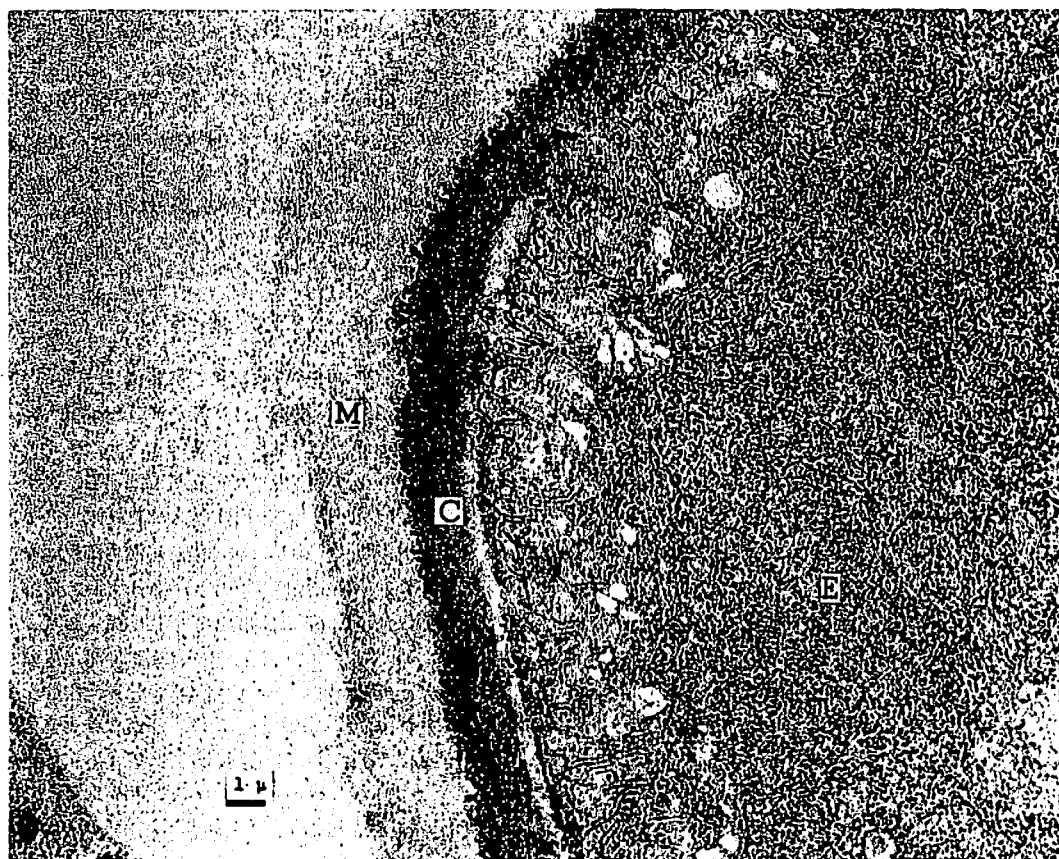


図1: アオムシコマニバチ貯卵嚢内成熟卵表面の微細構造 (8400倍)

M. 卵表面を被覆する粘液

C. 卵殻

E. 卵細胞質

(岡 俊樹氏による)

2. Hyaluronidase, trypsin で処理した貯卵嚢内卵の注入実験：貯卵嚢内卵の表面は、貯卵嚢内に充満するかん白を含むカルボキシル基をもった酸性粘液多糖類の1種からなる粘液で被覆されている(図1, 北野, 1969c)。この粘液の組織化学的特性は、切片を hyaluronidase (Sigma, Type I, 1 mg/cc, pH 6.8 Ringer) で 37°C, 2 時間, または, trypsin (Nutritional Biochem. Corp. 2 X cryst., 1 mg/cc, pH 6.8 Ringer) で 37°C, 15 分間処理した場合に消失する (北野, 1969a, 1969

c)。そこで、貯卵嚢内卵が4日間防御反応を免れている原因は卵を被覆するこの粘液にあるのではなからうかと考え、hyaluronidase を用い 37°C, 2 時間, または, trypsin を用い 37°C, 15 分間処理した貯卵嚢内卵をアオムシに注入した(表2)。これらの処理卵は 0.4% erythrosin B を含むリンガー液中に30~40分つけておいても赤染されないことから生卵状態が保たれているものと考えられる。注入卵はこのような酵素処理によっても防御反応を被らないことから、卵が生きてさえいれば、卵

Table 2. Fate of eggs taken from the reservoir of paired oviducts of *Apanteles* adult and artificially injected into the body cavity of the 5th instar larva of *Pieris* after the treatment with hyaluronidase and trypsin at 37°C.

Dissection: (Days after injection)	2					
	hyaluronidase		trypsin		non (control)	
	2 hr		15 min		2 hr	
Duration of the treatment:						
	Number of eggs observed with(+) or without(-) encapsulation					
	+	-	+	-	+	-
	0	47	1	8	0	14
	0	2	0	13	7	14
	1	14	1	0	0	12
	0	3	0	9	0	7
	0	2	0	4	0	4
	0	24	1	24	0	2
	1	19	0	10	0	21
	0	15	0	50	0	5
	0	29	1	35		
	0	57	0	1		
Total number of eggs observed:	2 212		4 154		7 79	
%:	1 99		3 97		8 92	

* Coupled figures refer to one and the same individual host.

Table 3. Fate of eggs, which were obtained from the reservoir of paired oviducts of *Apanteles* adult and artificially injected into the body cavity of 5th instar *Pieris* larva after the treatment with pH 4 acetate buffer solution.

Dissection: (Time after injection)	5 hr		18 hr		2 days		3 days	
	+	-	+	-	+	-	+	-
Number of eggs observed with(+) or without (-) encapsulation:								
	+	-	+	-	+	-	+	-
	0	12	3	5	6	0	3	0
	2	16	6	7	7	0	2	0
	2	11	5	10	23	0	4	0
	15	40	5	0	17	0	11	0
	8	43	5	0	5	0	1	0
	8	22	6	0	5	0	14	0
	0	12	1	0	5	0	1	0
					4	0		
					6	1		
					0	1		
					2	0		
Total number of eggs observed:	35 156		31 22		80 2		36 0	
%:	18 82		58 42		98 2		100 0	

* Coupled figures refer to one and the same individual host.

表面の化学的特性がいくぶん変化をうけても防御反応を免れうるのではなかろうかと考えられる。しかしながら、この考え方は今回のシンポジウムでもご指摘をうけたように、以上のような酵素処理方法によって卵表面の粘液が化学的に変性されたという確実な実証がないため不完全であろうと思われ、他の各種の酵素処理による同様な実験、および電顕像による酵素処理後の卵被覆粘液消失の確認をまたねばなるまい。

3. Acetate buffer 液 (pH 4) で処理した貯卵嚢内卵の注入実験: 貯卵嚢内卵を pH 4 acetate buffer 液で処理すると肉眼でもみとめられる程度に卵は白く固定される。これらの固定卵をアオムシに注入した(表3)。注入卵は注入18時間後にその半数以上が防御反応を被った(図2)。

4. シアンまたはアザイドガスで殺したハチ成虫の貯卵嚢内卵注入実験: 卵表面を被覆する粘液の化学的特性を変化させることなく殺した卵をアオムシに注入した場合、注入卵は防御反応を被るかどうかを吟味するために行なった実験である。シアンまたはアザイドガスで6時間処理したハチの貯卵嚢内卵は注入2日後には100%近くが防御反応を被った(図3, 表4)。

5. 低温処理(-15°C)により殺したハチ成虫の貯卵嚢内卵注入実験: 4. と同様の目的で行なった実験である。-15°C, 4日間の低温処理では大部分の卵は防御反応阻止の特性を失っていないが、10日間の処理ではその特性が失われるようである(表5)。

6. 産下卵の移植注入実験: SALT (1965)¹⁰⁾ は産卵後2日目の *Devorgilla canescens* (ヒメバチの1種) 卵を

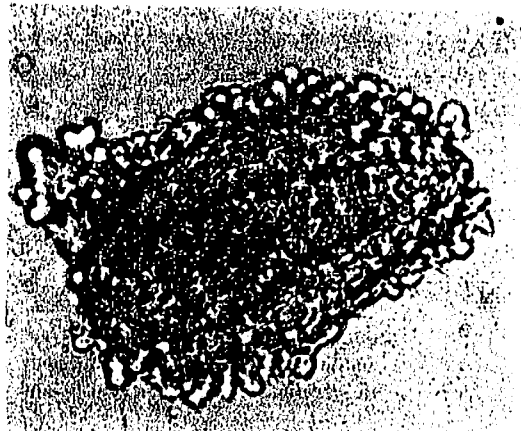


図2 pH 4 の acetate buffe 液で処理したアオムシコマユバチ貯卵嚢内成熟卵に対するモンシロチョウ幼虫血球の“防御反応”

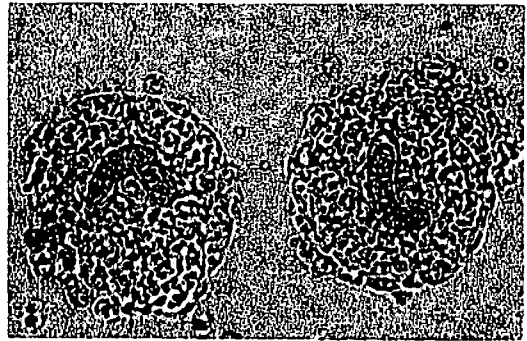


図3 苛酸ガスで処理したアオムシコマユバチ貯卵嚢内成熟卵に対するモンシロチョウ幼虫血球の“防御反応”

Table 4. Fate of eggs taken from the reservoir of paired oviducts of *Apanteles* adult exposed to hydrocyanic or hydrazoic acid gas and artificially injected into the body cavity of the 5th instar larva of *Pieris*.

Dissection: (Days after injection)	1				2							
Treated with:					HCN-gas				HN ₃ -gas			
Hrs. gassed:	4		6		4		6					
Number of eggs observed with (+) or without (-) encapsulation:	+	-	+	-	+	-	Exp. 1	Exp. 2	+	-	+	-
	1	36	0	4	8	2	17	0	1	0	1	0
	27	20	0	1	11	9	23	0	6	0	1	0
	1	46	1	18	0	19	2	0	1	0	3	0
	1	19	13	1	3	4	10	0	10	0	1	0
	5	15	7	1	1	2	28	0	2	0	11	0
			0	1	7	2	16	0	4	0	25	0
			11	0			11	0	2	1	1	0
			5	1			3	0			0	8
							6	0			51	4
							13	0				
Total number of eggs observed:	35	136	37	27	30	38	129	0	26	1	94	12
%:	20	80	58	42	44	56	100	0	96	4	89	11

* Coupled figures refer to one and the same individual host.

Table 5. Fate of eggs taken from the reservoir of paired oviduct of *Apanteles* adults preserved in a freezer (-15°C) and artificially injected into the body cavity of the fifth instar larvae of *Pieris*.

Time of dissection for examination: (Days after injection)	3					
	2		4		10	
Days of preservation in a freezer:						
Number of eggs observed with (+) or without (-) encapsulation:	+	-	+	-	+	-
	0	5	2	9	8	3
	3	5	0	25	8	0
	1	18	2	22	17	1
	3	10	1	19	11	0
	0	19	1	37	15	0
	0	4	0	3	12	0
	0	4	1	0	2	2
	0	2	3	0	0	1
	0	2				
	0	1				
	0	2				
	0	1				
	1	0				
Total number of eggs observed:	8	73	10	115	73	7
Per cent of cases:	10	90	8	92	91	9

* Coupled figures refer to one and the same host individual.

Table 6. Fate of mature *Apanteles* eggs and embryos artificially injected into the body cavity of the fifth instar larvae of *Pieris*.

Time of dissection for examination: (Days after injection)	3			
	A		B	
Group:				
Number of eggs or larvae observed with (+) or without (-) encapsulation:	+	-	+	-
	0	3	1	0
	0	1	1	0
	0	1	1	0
	0	1	1	0
	0	1	1	0
	2	0	1	0
	0	1	3	0
	0	2	2	0
	1	1	2	0
Total number of eggs or larvae observed:	3	11	13	0
Per cent of cases:	21	79	100	0

Group A: Eggs for injection were directly picked up from the dissecting dish by means of a Salt's micropipette without washing in a fresh Ringer's solution.

Group B: Eggs for injection were picked up from the dissecting dish by means of a coarse pipette and are accumulated in a fresh Ringer's solution for 4 hrs. or more, after being washed in a fresh Ringer's solution.

* Coupled figures refer to one and the same host individual.

このヤドリバチにとって正常な宿主である *Anagasta kuehniella* (メイガの1種) 幼虫に移植する実験を行なっているが、この際、産卵を5時間以上注入用リンガー液内に保存した場合には、卵は正常な胚子発生を続けることができないことをみている。そこで、アオムシコマニバチを多寄生させたアオムシより産卵後3日目の多数のハチ卵を集め、AおよびBのグループに分けて次のような実験を行なった。すなわち、A実験群は採卵後直ちに採卵卵をアオムシに移植する実験であり、B実験群は採卵後新しいリンガー液で卵を洗い、4時間リンガー液内に保存した後、それらをアオムシに移植する実験である。実験結果(表6)はA実験群の移植卵はほとんど防御反応を被っていないが、B実験群では100%防御反応を被るという結果を得た。この実験では、4時間以上リンガー液内に保存した卵が致死卵となったかどうかは確かめていないが、産卵後3日目の卵を4時間リンガー液内につけた場合には、*Devorgilla* 卵と同様、アオムシコマニバチ卵も発生が阻害され、このことがハチ卵の防御反応阻止の特性を消失させたものと考えられる。

7. ハチ1令幼虫の移植実験: 孵化したハチの幼虫は漿膜細胞よりなる網状膜で体表が被われている(GRANDORI, 1911¹¹⁾; 北野, 1962, 1965)。したがって、アオムシの血球がハチ幼虫を異物として処理する場合には必然的に漿膜細胞との接触が必要となってくる。そこで、この網状膜を物理的に剥離したハチ幼虫と、無傷のままのハチ幼虫をアオムシに移植する実験を行なった。実験結果は網状膜の物理的剥離を受けたハチ幼虫は、幼虫自体が生きていても、大部分防御反応を被ることがわかった(表7)。このことから、ハチ幼虫を被覆する漿膜細胞群がなんらかの形で防御反応阻止に関与しているのではなからうかと考えられる。

8. “巨細胞”の注入実験: ハチ幼虫は孵化時に頭端部または尾端部にある漿膜細胞塊をアオムシ体腔内に放散する。放散された漿膜細胞塊はばらばらに崩散して、独自にアオムシ体液より養分を吸収し、異常肥大して“巨細胞”となる(図4, 北野, 1962, 1965)。この種の細胞は“trophic cell”ともよばれ、初期にはなんらかの物質の分泌機能が盛んであるが、後期にはなんらか

Table 7. Fate of larvae obtained by dissecting larvae of *Pieris* that were parasitized by its usual parasitoid, *Apanteles glomeratus*, and artificially injected into the body cavity of the fifth instar larvae of *Pieris*.

Time of dissection for examination: (Days after injection)	4					
Stage of <i>Apanteles</i> larva: (Instar)	1		2		1	
Type of experiments:	Operation 1*				Operation 2**	
Number of larvae observed with (+) or without (-) encapsulation:	+	-	+	-	+	-
	***		***		***	
	2	0	1	1	0	1
	1	0	1	0	0	1
	1	0	0	2	1	0
	1	0	1	0	1	0
	1	0	1	0	0	1
	1	0	1	0	0	1
	1	0			0	3
	2	0				
	1	0				
	1	0				
Total number of larvae observed:	12	0	5	3	2	7
Per cent of cases:	100	0	63	37	22	78

* Operation 1: Larvae for injection were picked up from the dissecting dish by means of a Salt's micropipette which had the same diameter as that of the *Apanteles* larva washed in a fresh Ringer's solution. Serosal membrane of *Apanteles* larvae was mechanically broken by sucking into the micropipette.

** Operation 2: Larvae for injection were picked up without being washed in a fresh Ringer's solution from the dissecting dish by means of a Salt's micropipette whose diameter was larger than that of the *Apanteles* larvae. Serosal membrane of *Apanteles* larvae was not mechanically broken by the operation.

*** Coupled figures refer to one and the same host individual.

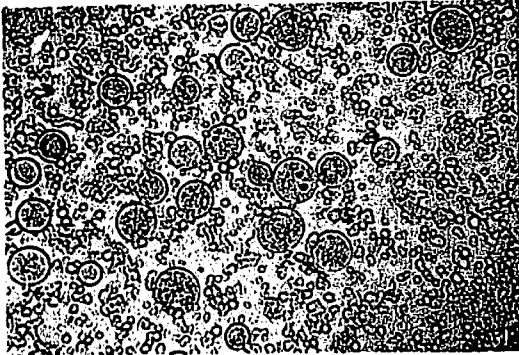


図4 アオムシコマユバチの寄生をうけたモンシロチョウ幼虫体液内に出現する“巨細胞”。生長しきった“巨細胞”の直径は100 μ 内外に達する。

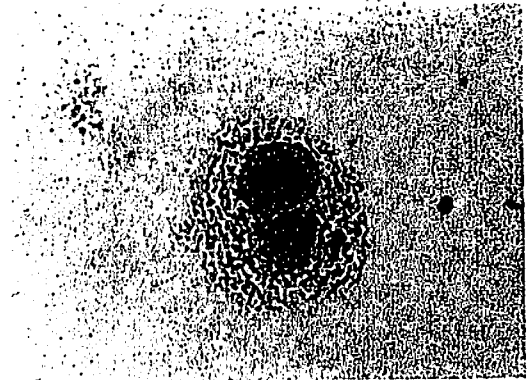


図5 青酸ガスで処理した“巨細胞”はモンシロチョウ幼虫血球の防御反応を渡る。

の物質の吸収機能が活発になることが SLUSS and LEUTENEGGER (1968)¹²⁾ により報ぜられている。また、SALT (1968)¹³⁾によっても、この種の細胞が宿主の防御反応発現の抑制に関与している可能性のあることがのべられている。

そこで、シアンガスで殺した“巨細胞”と、生きている“巨細胞”をアオムシに注入する実験を行なった。生きている“巨細胞”の大部分は防御反応を免れているが、死んだ“巨細胞”はその大部分が防御反応を渡るという結果を得た(図5, 表8)。このことは、“巨細胞”

の防御反応阻止要因が、生きている細胞膜、または能動的な分泌活動の結果分泌されるなんらかの物質にあることを暗示する。

9. 被寄生アオムシへのアザイドガスで殺したハチ貯卵嚢内卵の注入実験：すでに、ハチの寄生をうけているアオムシの防御反応発現能力は正常のままか、または低下しているかを検討してみるために行なった実験である。すなわち、前もってハチに産卵させておいたアオムシの体内に、アザイドガスで殺したハチ成虫の貯卵嚢内卵を注入してみたところ、未寄生アオムシでは89%の卵

Table 8. Fate of “giant cells” obtained by dissecting larvae of *Pieris* after the emergence of the last instar larvae of *Apanteles* from the host and artificially injected into the body cavity of the fifth instar larvae of *Pieris*.

Time of dissection for examination: (Days after injection)	2			
	“Giant cells” treated with hydrocyanic acid gas		Without treatment	
	+	-	+	-
Treatment before injection:				
Number of “giant cells” observed with (+) or without (-) encapsulation:				
	3	0	0	18
	1	6	0	10
	15	0	0	10
	5	0	0	8
	9	2	1	4
	6	1	0	16
	3	1	0	3
			1	6
			0	15
			2	26
Total number of “giant cells” observed:	42	10	4	116
Per cent of cases:	81	19	3	97

* Coupled figures refer to one and the same host individual.

Table 9. Fate of eggs taken from the reservoir of paired oviducts of *Apanteles* adults exposed to hydrozoic acid gas for 6 hrs and artificially injected into the body cavity of the fifth instar *Pieris* larvae that were parasitized by its usual parasitoid, *Apanteles glomeratus*.

Time of dissection for examination: (Days after injection)	2	
Stage of <i>Apanteles</i> larva:	2nd instar	
Number of eggs observed with (+) or without (-) encapsulation:	+	-
	0	7
	31	10
	0	1
	7	28
	16	25
	13	47
Total number of eggs observed:	67	100
Per cent of cases:	38	62

* Coupled figures refer to one and the same host individual.

に防御反応が生起しているにもかかわらず(表4), 被寄生アオムシでは38%の卵に防御反応がみられただけである(表9)。明らかに被寄生宿主の防御反応発現能力は低下していると考えられる。

10. ハチ成虫毒液貯蔵嚢の注入実験: ハチ産下卵の表面には貯卵嚢内粘液の他に毒液の被覆していることが考えられる。すなわち, 毒腺で生成された毒液はいったん毒液貯蔵嚢(約 0.0117 mm³)に貯えられ, 産卵時に卵とともにアオムシ体内に注入される(毒液貯蔵嚢からの管は産卵管基部に開孔している)。この毒液が防御反応発現を阻止している可能性も考えられる。そこで, エーテルで麻酔したハチ成虫より毒液貯蔵嚢をとりだし, かならず防御反応を被る異物(熱処理により殺したハチの1令幼虫またはシアンガス処理卵)とともに, アオムシに注入した。実験結果はシアンガス処理卵, ハチ1令幼虫, 毒液貯蔵嚢ともに防御反応を被った(図6)。注入した毒液貯蔵嚢の切口からは, 徐々にではあろうが毒液は放出されていると考えられる。それにもかかわらず, 防御反応が生起した事実は, 毒液は防御反応阻止に関与していないのではなかろうかと考えられる。

11. 少数産下卵 2~3卵に対する防御反応発現の有無: SALT (1968)は1回の産卵で多くの卵を産下するヤドリバチ類は多数寄生によって宿主の防御反応を免れうる可能性をのべている。そこで, 1回の産卵行動で平均25卵を産下するといわれるアオムシコマユバチの場合, 産下卵数を実験的に少なくして寄生させた場合, 産下卵に対して防御反応が生起するかどうかを吟味する実験を行なった。すなわち, 2令アオムシにハチが産卵管を挿

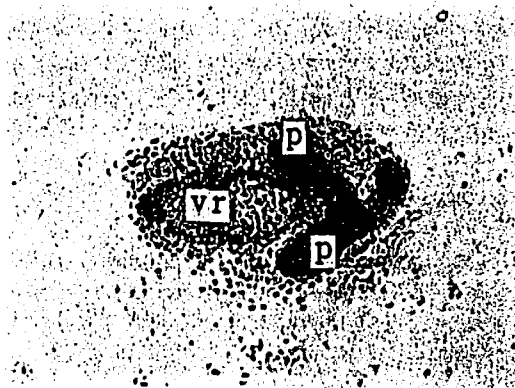


図6 モンシロチョウ幼虫体腔内に注入されたアオムシコマユバチの毒液貯蔵嚢(vr)および熱処理により殺した1令幼虫(P)。ともに, モンシロチョウ幼虫の防御反応を被っている。

入してから2~3秒後にハチをピンセットで除去するという方法で, 1回の産下卵を2~3卵にとどめることが可能である。このような方法で産卵させたアオムシを産卵後5, 8, 10日目に解剖し, 産下卵の発生状態を調べたところ, すべての場合に正常な発育がみとめられた。

IV. 考 察

昆虫における寄生現象を, ある種の寄生昆虫は, ある限られた範囲内の宿主昆虫をもつという事実にたつてながめた場合, この宿主特異性成立の問題は寄生昆虫と宿主昆虫との間で進化的な過程を経てつくりあげられてきた生態学および細胞生物学的関係の両面を考察する

ことにより、はじめて正しく理解され、解決されるものと思われる。筆者はこの点を強く意識しながら、寄生性の起源または宿主特異性成立の問題を、細胞生物学的立場、すなわち、cell (宿主血球) to cell (寄生昆虫の卵細胞) の関係から研究していこうと考えている。このような立場で寄生昆虫—宿主昆虫 (血球を有する发育段階のもの) 間の寄生成立を考えた場合、寄生昆虫の宿主昆虫に対する適応現象の要因は、宿主血球の寄生体に対する不感受性にあると考えられる。この不感受性の原因は、現在次のような二つの立場から説明されている。一つは SALT (1965, 1966⁽¹⁴⁾) や LEWIS and VINSON (1968)⁽¹⁵⁾ らの主張する考え方で、彼らはそれぞれ別種のヤドリバチを使ってではあるが、自然のヤドリバチ—宿主間にあっては、ヤドリバチ卵および幼虫体表面と宿主血球表面に共通抗原物質が存在するために、宿主血球は寄生体を異

物として処理することができないのだと考えている。この考え方は極めて魅力的なものではあるが、まだ、“共通抗原”なるものの検出同定が行われていない。他の一つは、TIMBERLAKE (1912)⁽¹⁶⁾, SCHNEIDER (1950)⁽¹⁷⁾; 1969⁽¹⁸⁾), VAN DEN BOSCH (1964)⁽¹⁹⁾ らの考え方に通ずるものであるが、前述のアオムシコマニバチを用いた実験から筆者が主張するものである。以下、これについて詳述したい。

アオムシコマニバチの宿主は従来の報告では鱗翅目幼虫に限られているが、多くの種類を含んでいる (北野, 1968⁽²⁰⁾)。本邦産の本種はシロチョウ科の2種、モンシロチョウおよびエゾシロチョウ、ドクガ科のモンシロドクガの幼虫に寄生することが知られている (安松・渡辺, 1964⁽²¹⁾)。この点を考えた場合、本種は極めて polyphagous な種であり、狭い範囲での宿主特異的關係は存

Table 10. Suitability of *Apanteles glomeratus* to its usual host, *Pieris rapae crucivora*. Host larvae parasitized were collected from a cabbage farm in Koganei City, Tokyo, from Oct. to Nov., 1964, and dissected in water under a binocular microscope for determining the degree of encapsulation after the emergence of full-grown *Apanteles* larvae from the hosts.

		%
Number of hosts dissected:	75	
Total number of parasitoids observed:	1899	
Number of parasitoid larvae emerged:	1750	92.2
Number of mature parasitoid larvae being unable to emerge:	110	5.7
Number of unhatched dead eggs:	1	0.1
Number of encapsulation:	38	2.0

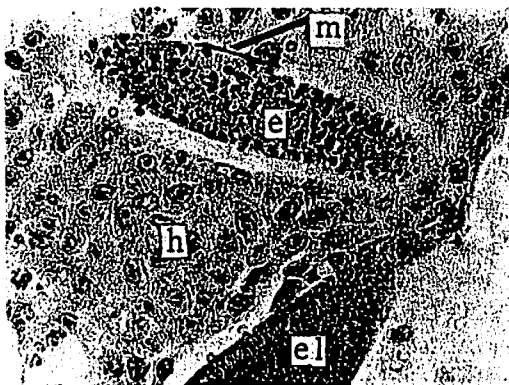


図7 自然状態でアオムシコマニバチの寄生をうけたモンシロチョウ幼虫体内で観察された防御反応。未知の要因で、誘起されたコマニバチの発生阻害卵 (e) に対する宿主血球 (h) の防御反応。卵殻表面の一部にメラニン様物質が沈着している (m)。el: 正常な胚子発生を続けているコマニバチ卵。(×400, ハイデンハイン・鉄ヘマトキシリン染色)

在しないように思われるが、何種類かの人為的宿主への寄生実験では、ハチの産下卵ははげしい防御反応を被る事実が知られており (北野, 1968, 1969c), 無制限な宿主種の存在はない。また、モンシロチョウ幼虫に対して、このハチは極めて高度に適応している (表10) が、アオムシ体内でも、なんらかの原因によってその胚子発生に乱れが生じた卵には防御反応の生起する事実をみている (図7)。

実験結果 (表1) から、ハチ卵は卵嚢内にあるときに、すでに、防御反応を免れうる特性をもっているが、卵細胞の表面を被覆する物質の化学的特性を変化させないであろうと考えられる方法で殺した卵には、防御反応が生起する (表4, 5, 6)。一方、卵表面物質に幾分なりとも変化を与えるであろうと考えられる処理を施した卵には、卵が生きてさえいれば防御反応は生起しない (表2, 3)。これらの事実および自然状態でも発生が阻害された卵には防御反応が生起すること (図7), ま

た、アオムシコマニバテと近縁な種である *Apanteles militaris* の被寄生宿主 *Pseudaletia unipuncta* 幼虫(ヤガの1種)を24時間 35°C で飼育した場合には *A. militaris* 産下卵は致死卵となり、すべて宿主の防御反応を被るという KAYA and TANADA (1969)²²⁾ の実験結果などから考えて、ハチ卵の防御反応阻止要因 Encapsulation-inhibitory factor (以下、EIF と略記する)は卵細胞表面(chorion の外側)の抗原性物質にあると考えるよりは、生きている卵細胞が生成するなんらかの物質にあると考える方が妥当であるように思われる。そして、この EIF はハチ幼虫を被覆する漿膜細胞(表7)および胚の頭端と尾端の漿膜細胞塊に由来する“巨細胞”(表8、図4)の生成する物質にも存在すると考えられ、この物質が宿主血球の異物への接触(contact)→接着(adhesion)の過程を阻害しているのではなかろうかと考えられる。この意味において、宿主体内に散在する“巨細胞”は、このハチの寄生成功にとって大きな生物学的意義をもつものと思われる。すなわち、ハチの幼虫は多数の“巨細胞”を宿主体内に放出散在させることにより宿主血球の異物に對する感受性を低下せしめていると解釈することができる(表4、9)。

いずれにせよ、現段階では EIF の実体はまったく未知である。今後、筆者の考え方を確めるための傍証実験を続けると同時に、EIF の実体究明に努力したい。

文 献

- 1) SALT, G., 1967: In 51st Annual Meeting of the Federation of American Societies of Experimental Biology' Cellular defense mechanisms in insect, Fed. Proc., 26(6), 1671.
- 2) 北野日出男, 1970: 動雑, 78, 1.
- 3) 北野日出男, 1967: 東京学芸大紀要, 19, ser. 4, 34.
- 4) RICHARD, F., 1947: Lambillionea, 47, 7.
- 5) SALT, G., 1955: Proc. Roy. Soc. Lond. ser. B., 144, 380.
- 6) 北野日出男, 1962: 動雑, 71, 262.
- 7) 北野日出男, 1965: 動雑, 74, 192.
- 8) KITANO, H., 1969a: Appl. Ent. Zool., 4, 51.
- 9) KITANO, H., 1969c: Bull. Tokyo Gakugei Univ., 21, 4, 95.
- 10) SALT, G., 1965: Proc. Roy. Soc. Lond. ser. B., 162, 303.
- 11) GRANDORI, R., 1911: Redia, 7, 363.
- 12) SLUSS, R. R. and LEUTENEGGER, R., 1968: J. Ultrastructure Res., 25, 441.
- 13) SALT, G., 1968: Biol. Rev., 43, 200.
- 14) SALT, G., 1966: Proc. Roy. Soc. Lond. ser. B., 165, 155.
- 15) LEWIS, W. J. and BRADLEIGH VINSON, S., 1968: J. Insect Physiol., 14, 613.
- 16) TIMBERLAKE, P. H., 1912: U. S. Dept. Agric. Bur. Ent. Bull. Tech. ser. 19, pt. 5, 71.
- 17) SCHNEIDER, F., 1950: Vjschr. naturf. Ges. Zürich, 95, 22.
- 18) SCHNEIDER, F., 1969: Ann. Rev. Entomol., 14, 103.
- 19) VAN DEN BOSCH, R., 1964: J. Insect Pathol., 6, 343.
- 20) 北野日出男, 1968: 応動誌, 12, 95.
- 21) 安松京三・渡辺千尚編, 1964: 日本産害虫の天敵目録, 第1編, 九州大学農学部昆虫学教室.
- 22) KAYA, H. K. and TANADA, Y., 1969: Ann. Entomol. Soc. Amer., 62, 1303.

川口 進 (京大・理・動物): 生きた卵をうえつけたアオムシに、死んだ卵などの異物をうえつけた場合には、後者に対する防御反応はおこるか。またその反応は、アオムシ中の卵の発生段階の影響をうけるか。

答: 死卵に対する防御反応はおこるが、被寄生宿主の防御反応発現能力は低下していると思われる。すなわち、未寄生宿主の死卵に対する防御反応発現率は89%(第4表)であったのに対し、被寄生宿主のそれは38%(第9表)を示している。この際の被寄生宿主体内のハチ幼虫令は、2令初期であるが、ハチが、まだ、卵期にある場合については、この種の実験を行っていないので、防御反応が宿主中の卵の発生段階の影響をうけるかどうかはわからない。

齊藤和久 (慶大・微生物): 宿主細胞は寄生虫卵をとりこむのか。もし、とりこまないとするば、くっつく細胞と寄生虫卵細胞の表面だけの問題ではないだろうか。もちろん、食細胞のとりこみの場合にも、*in vitro* の実験で polystyrene 粒子は血清成分の関与なしにとりこまれるが、他の粒子は血清成分がないととりこまれぬというように表面の問題がからむが、とりこみの場合は食細胞のエネルギーに依存している。

答: 宿主細胞(血球、径 10~20 μ)は自身より大きなハチ卵(胚卵囊内成熟卵で、長径平均 188.6 μ 、短径平均 16.5 μ)をとりこむことはできない。多くの血球が、死卵のまわりに集まって、それを被包する(encapsulation)。Encapsulation に関与する血球が高い phagocytic activity をもつかどうかは、現在のところ不明である。今後、被寄生宿主血球の phagocytic activity と未寄生宿主血球のそれとを比較検討してみようと思っている。

木下喜博 (大阪市立大・医・生理): 今後の研究計画の中に“巨細胞”を集めたいとのことだが、次の3因子

が判明すれば、“巨細胞”の分離が可能か否かの推定ができる。参考になれば、幸いである。1) 存在する“巨細胞”の数は？ 多いほど、分離が容易。2) “巨細胞”が組織内で free cell として存在するのか、fixed cell として存在するのか？ free cell の方が分離しやすい。3) “巨細胞”以外の細胞との間に細胞比重の差があるか？ 比重差があれば、適当な比重の分離液を使用すると、不連続性密度勾配法（重層遠心分離法。次演題参照）により純度高く“巨細胞”を分離できる。

答：御教授ありがとうございます。“巨細胞”は御指摘の 1) と 2) の条件をそなえております。3) で御指摘いただいた点は、“巨細胞”の比重を測定して、早速、不連続性密度勾配法を使用してみたいと思います。

村松 繁（京大・理・動物）：細胞性反応を抑止している物質が卵から分泌されていて、しかもそこに著しい特異性を想定することには無理があるのではないか。やはり、宿主と寄生体の共通抗原性を考えた方がよいのではないか。

答：アオムシコマユバチ（分布域は日本全土、ヨーロッパ、アジア、インド、北米、北アフリカ）の宿主を世界的にながめた場合、本種は比較的 polyphagous なヤドリバチであると考えられる。すなわち、宿主は鱗翅目幼虫にかぎられるが、日本からは3種、世界からは58種（THOMPSON, W. R., 1953）もの記載がある。したがって、ご指摘の通り著しい特異性を想定することは無理と考えられますが、人為的寄生実験の結果からは、ある程度の宿主“特異的”関係が存在すると考えられる。この“特異的”成立の要因にご指摘されたような宿主と寄生体の共通抗原性を考える研究者もいるが本種を用いた今までの実験結果からは、防御反応阻止に共通抗原物質が関与しているとは考えにくいように思われます。今後、ご指摘の点に留意しながら仕事を進めてみたいと思います。

三橋 進（群馬・医・微生物）：動物に対し病原性が低い細菌の一つの原因として、容易に食細胞に取りこまれてしまうことが知られている。このときムチンを加えるとその菌の病原性が高まる。その原因は食菌されないためである。肺炎球菌も表面にカプセル多糖体があって、なかなか食菌されず、腹腔に感染させると高い病原性を示す。カプセルの厚い菌をつくと、容易に食菌されて病原性を示さない。

答：ご教授ありがとうございます。死んだヤドリバチ卵はアオムシ血球によりとりこまれることはなく、多数の血球により encapsulate される。ハチ卵表面には、たん白を含む酸性粘液多糖類が被覆しているようであるが、今までの実験結果（第2, 4, 5, 6表）からは、この物質が encapsulation 阻止に関与しているとは考えられない。

山本 茂（群馬・医・法医）：防御反応と結びつけなくても、コマユバチの卵細胞表面とモンシロチョウ血球表面に共通抗原物質が存在するものとして考えても良いのではないか。それぞれに対応する抗体を作成し、交差反応をさせれば、この間の事情を肯定か否定できると思う。hyaluronidase や trypsin 処理だけでこのような、もしあれば、共通抗原物質をこわしたという直接的証明を与えるには少し早過ぎると思う。

答：ご教授いただいた考え方で、ハチ卵細胞表面およびアオムシ血球表面に存在すると考えられる“抗原物質”に対応する抗体を作成し、交差反応を試みれば、この種の疑点はなくなると思うが、今のところ、多数サンプルの収集が難しい点、卵表面または血球表面から“抗原物質”のみをとりだすことが技術的に困難であるなどの点から、この種の実験は不可能であるように思われる。それよりも、卵を被覆する物質（図1）の酵素処理による消失を電顕像で確認しながら、種々の酵素で処理した卵を、宿主に注入する実験を試みてみたいと考えている。

重層遠心分離法によるマクロファージの分離と 分離マクロファージの異種赤血球処理

木 下 喜 博 (大阪市大・医・生理)

マクロファージ (以下 MP と略) は抗体産生機構に参加するのであろうか? 参加するとすれば、その機構のどの段階で、どのように関与するのか? これらの課題は医学生物学領域で極めて重要で、魅力的なテーマである。しかし、先人の努力にもかかわらず、今日まで、未解決のままになっている。

抗原とともにインキュベートした腹腔浸出細胞群より抽出した RNA は非刺激性リンパ節細胞に抗体産生を誘導しようと FISHMAN 等¹⁾ が報告し、以来、MP が抗体産生の始動に積極的に関与するという考えが生じた。これに対し、MP の異種赤血球貪食率と溶血素産生能とは相反する関係にあることを見出した PERKINS ら²⁾ は「MP は抗原を貪食後、その免疫原性の消失するまで分解し、むしろ、抗体産生を抑制する」と反論した。このように、根本的に対立する両説の正否につき、その後、多くの研究者³⁻⁹⁾ により追試されたが、決定的な実験結果は得られなかった。

著者は、全く相反する結果が生じた理由を文献¹⁰⁾ の調査とわれわれの知見¹¹⁻¹³⁾ とから検討し、その原因として数種の因子を選出し (考察参照)、それらのうち、試料中の MP の純度が実験結果を左右する最大の因子であると推定した。すなわち、多くの研究者は MP の純度が80%以下の分画を試料としており、しかも、その分画には抗原のもつ免疫原性を崩壊させる顆粒球¹²⁾ や抗体産生細胞の由来が host のものか donor のものかを不明瞭にするリンパ球の混在がかなりみられる。著者は抗原の処理能を持ち、生物学的な活性をもった MP を純粋に分離し、これを試料として抗体産生機構における MP の役割を追究すべきことを提唱したい。

われわれは特定細胞の純粋分離について、工夫・改良を重ねているうち、次の知見を得た^{10, 13-16)}。

1) 特定細胞が単一細胞浮遊液の状態で存在するよう操作し、これを試料として重層遠心分離^{9, 11, 13-16)} (細胞間の細胞比重の差を利用する分離法) すれば、その種の細胞を一定の界面に純度高く、しかも、機能障害をほと

んど招くことなく分離できる。

2) 個々の細胞は種類や分化の段階に応じ、一定の細胞比重を保持している。

これらの知見をもとに、著者らは腹腔浸出細胞群から MP を純度高く分離するのに成功し、すでに報告した¹¹⁾。この論文では、MP の純粋分離に関して前の実験結果に、その後の知見を加え、まとめてみた。また、MP 分離のための理論と実際を併記し、さらに、重層遠心分離法で分離した MP が非分離性 MP と同程度の異物処理能を持っていることが報告される。なお、抗体産生組織 (脾臓) や末梢血液から MP を分離する方法も略記した。

材 料 と 方 法

マクロファージ分離法

抗体産生機構解析のための試料として MP を純度高く分離するためには、次の諸条件が要求される。

- 1) MP は採集母組織により機能が異なる¹⁷⁾。肝臓内 MP のごとく¹⁸⁾、抗原を貪食するが、その免疫原性を破壊する MP であってはならない。
- 2) 採集部位での MP 構成率が高いこと。
- 3) 母組織で MP が fixed cell として存在するより free cell として体液中に浮遊している方が分離しやすい。

著者は上の諸条件を満足できる採集部位は腹腔浸出液であると考えている。腹腔浸出液中には MP の他に、リンパ球が20~30%、顆粒球が10~15%含まれている。腹腔液より MP を分離する際、それらの細胞の混在を避ければならない。この観点から、考察で説明するが、分離法として粘着法より細胞比重差法がすぐれていると思われる。

腹腔浸出細胞採集法 (表1参照)

実験動物として Wistar rat を使用。無菌的処理した0.1% グリコーゲン、3% thioglycollate、流動パラフィンなどの刺激剤の5~10 ml を腹腔内に注射する。48~

表1 腹腔浸出細胞群より macrophage の分離、細胞比重差法の操作過程。

実験動物腹腔内へ、無菌的処理したグリーゲン溶液または流動パラフィン (irritant) を投入し、浸出液内の MP 構成率を高める。

48時間後、開腹。出血なきよう注意。

ペーパリンと抗生物質含有の等張液で腹腔を洗滌し、駒込ビベットで腹腔液を採取し、それを試験管へ移す。

ビベットで攪拌、混和。

2枚の局方ガーゼで濾過。

濾液を 1,000 rpm ($160 \times g$) 20分間、分離。

上清 除去
沈渣の上部 (黄白色部, buffy coat) を採取し、3倍容の等張液に浮遊。
上と他の分離管の buffy coat より得た細胞浮遊液を1本の分離管に混合。

2,000 rpm ($650 \times g$) 15分間、分離。

沈渣の buffy coat 部を採取し、5倍容の等張液を加える。(重層用試料)

重層遠心分離の実施。(図1参照)

図1の I, II 分画は純粋な macrophage の分画である。

72時間後、出血死させた後、腹腔を消毒し開腹する。凝固阻止剤を含む等張溶液 5 ml を腹腔に入れ、消化管の損傷なきよう注意しながら、先端を鈍にした駒込ビベットで腹腔液を出し入れし、浸出細胞をできるだけ多く遊出させ、次いで腹腔液を採取し試験管に入れる。さらに、凝固阻止剤含有等張液 5 ml を腹腔に入れ同様の操作を行ない、液を同じ試験管に集める。刺激剤の注入は腹腔液中の MP の構成率を高めるためである。非刺激性の腹腔液中には約 2×10^7 個、刺激性のそれには約 5×10^7 個の有核細胞が含有されている。次に、2枚の局方ガーゼで濾過し、濾液を 1,000 rpm ($160 \times g$) 20分間遠心分離し、上清を除去後、沈渣の上部黄白色層 (buffy coat) を採取し、3倍容の等張液 (Hanks 液, 生理的食塩水など) を加えて攪拌し、細胞浮遊液を作る。これと他の分離管の buffy coat より得た細胞浮遊液を1本の分離管に集め、2,000 rpm ($640 \times g$) 15分間遠心沈する。厚くなった buffy coat を駒込ビベットで採集し、等張液の中に入れる。これが重層遠心分離用試料である。試料中の細胞濃度を $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml に調整する。この濃度は MP の分離純度や分離操作時間の短縮のため重要な要因である (考察の項参照)。

重層遠心分離法による MP の分離

著者^{9,11)}は先に、MP の細胞比重の幅は極めて広く

1.035~1.070であることを明らかにしたが、顆粒球のそれは1.065~1.070、リンパ球では1.060~1.075であるから、細胞比重差法を用いて MP の純粋分離が可能である。今回は次の比重 (15°C) の分離溶液を使用し、重層遠心分離を実施した。すなわち、1.075 (A液), 1.065 (B液), 1.055 (C液), 1.045 (D液)。分離液はアラビアゴム末の水溶液で pH や滲透圧を生理的に調節したもので、作成法は木村と木下の論文^{9,10,12)}を参照された。図1のごとく、重層用肉厚分離管 (内径 13 mm,

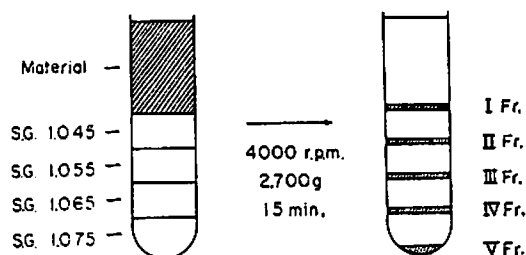


図1 重層遠心分離法によるマクロファージの分離：模式図。

左・分離前

右・分離後

S. G. 分離溶液の比重 (15°C)

Material・腹腔浸出細胞群から精製した重層遠心分離用試料。

10 ml 容) に A, B, C, D 各分離溶液を約 1.3 ml ずつ、順次重層し、さらに、D液上に、上記の重層用試料約 4 ml を積み重ねる。重層する際、駒込ビベットを分離管の管壁につけ、徐々に液体を注入することが必要で、これにより、比重の異なる分離液や試料との間に肉眼的にも確認できる明瞭な界面ができる。これを水平架卓型遠心分離器で 4,000 rpm ($2,700 \times g$) 15分間分離すれば、試料を構成する細胞が個々の細胞比重に応じた界面に分離され、図2と図3の右の管のごとく、肉眼的にも、はっきり認知できる細胞帯を形成する。上清とD液との界面にできた細胞帯をI分画、D液とC液との界面のそれをII分画、以下、III, IV, V分画とする。まず、上清を除去後、各分画を駒込ビベットで採取し、等張液中に浮遊させ、ビベットで攪拌後、遠沈 ($640 \times g$, 15分間) し、細胞に付着している分離溶液を除去する。各分画の沈渣に等張液を加え、それぞれを攪拌して、細胞浮遊液を作る。各分画の浮遊液の一部を形態学的に検討し、細胞分類を行なう。次いで、重層用試料と各分画での各種細胞の数を算定し、特定細胞の分離純度や回収率を求める。なお、MP の同定には、形態学的手法のみならず、異種赤血球や墨粒子等の異物貪食能の有無やガラス面への伸展性と粘着性を検討し、参考資料とした。

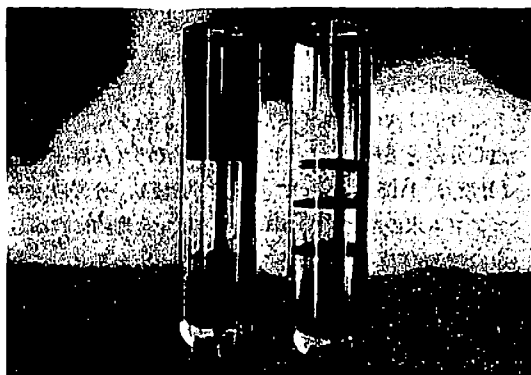


図2. 重層遠心分離法によるマクロファージの分離の実際
試料：流動パラフィン刺激による腹腔渗出細胞群
1分画の細胞層の厚さは、図2と図3とで、はつきり違う。流動パラフィン刺激例では、細胞比重が1.045より小さいMPがグリコーゲンの場合より多く出現するのがひとめでわかる。(本文参照)



図3. 重層遠心分離法によるマクロファージの分離の実際
試料：グリコーゲン刺激による腹腔渗出細胞群

脾臓内 MP 分離法

抗体産生機構におけるMPの役割を追究するには抗体産生のものである脾臓やリンパ節などからMPを分離するのが理想である。しかし、次の諸理由により、脾臓からMPを純度高く分離することは決して容易でない。1) 脾臓内MPはfixed cellとして存在する。2) 赤血球の構成率が有核細胞のそれより大きく、赤血球除去のため分離時間を長くし、MPの活性や純度を不良に

する。3) 脾臓内MPの構成率は全有核細胞の1%以下である²⁾。それゆえ、抗体産生組織内のMPの分離のため新方法の開発が切望されるが、現時点では粘着法以外にない。その操作過程を略記すると表2のa, bのごとくである。ただし、脾臓内溶血が病的に亢進した動物では赤血球処理のため脾臓内MPの構成率が高くなる。この脾臓よりわれわれのサンドイッチ法^{13,16,20)}で細胞浮遊液を作り、重層法により分離すると、MPを分離前試料より高濃度に集めることができ、次いで、この分画を37°Cで3時間培養し、MPを培養瓶底に粘着させ配在するリンパ球は液交換により除き、MPの純度をさらに

表2のa 造血組織よりfixed macrophageの分離、
その1

脾臓の場合、臓器灌流を行ない、貯留血液を排出する。	
組織をスライスにする。	
スライスの一片を2枚のスライドガラスの間にはさみ、サンドイッチ法にて、細胞浮遊液を作成。	
1枚の局方ガーゼで濾過。	
濾液を800 rpm (100×g) 20分間、分離。	
上清 (血小板含有)	沈渣
除去	沈渣 (脾臓の場合沈渣表面のbuffy coat) に培養液 (Eagle's MEM + 非凝固血清 + 抗生物質) を加え、細胞濃度を $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml に調整。
	37°Cで培養。
	MPとPMN (顆粒球) は培養瓶底に粘着。
	培養液を24時間毎交換、このさい、底面に粘着している細胞がはがれないようピペットで軽く攪拌し、浮遊しているリンパ球、赤血球を除去する。
	PMNの骨髄外での寿命は3～5日と考えられ、培養中に自然崩壊する。
	培養5～7日、MP以外のほとんどすべての白血球消失。ただし、脾臓の場合、赤血球の完全除去困難。

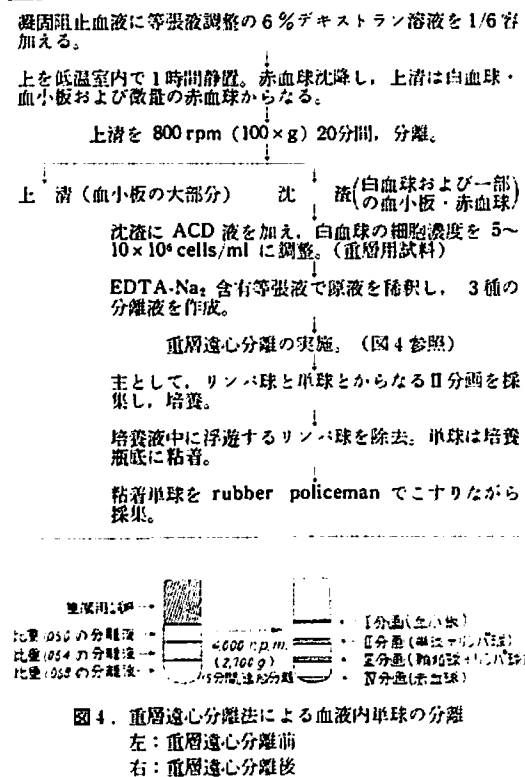
表2のb 造血組織よりfixed macrophageの分離、
その2

脾臓の場合、脾動脈に等張液を圧入し、貯留血液を除く。	
組織を鋭利なカミソリで切り薄小片を作成。	
この組織小片を37°C加温培養瓶の底に静置し、ガラスとの接触面に粘着させる。	
培養液を静かに注入する。	
培養1～2日後より、組織小片の周囲より細胞遊出がみられhalo状となる。	
haloに障害を与えないよう培養液の交換 (24～48時間毎)	
培養液交換時、浮遊しているリンパ球、赤血球の除去。	
PMNの自然崩壊。	
培養6～7日では、培養瓶底の粘着細胞はMPが主体、ただしfibroblastの増殖に要注意。	
培養7～10日に、rubber policemanで粘着細胞を瓶底よりはがす。	
fixed MPの分離、その1、2ともに、分離に長時間を要する故、macrophageの性状の変化の可能性大。	

高めることができた。この際の MP は自己赤血球を食食し、細胞比重が大となったと推定され、腹腔液中にみられたような、細胞比重 1.060 より小さい MP を見出し得なかった。

血液内単球分離法は紙数の都合上、その詳細を割愛する。表 3 と図 4 を参考とされ、別の論文¹⁰⁾を一読願いたい。

表 3 血液内単球分離法。
(細胞比重差法と粘着法の併用)



分離マクロファージの異種赤血球処理

上記の方法で分離された MP 分画を等張液で洗浄し 640×g, 15 分間遠沈し、上清を除去後、MP の分離管壁への粘着を避けるため、直ちに、異物処理能、抗体産生機構の解析、などの研究試料として用いる。

分離 MP による羊赤血球処理過程の位相差顕微鏡下の観察

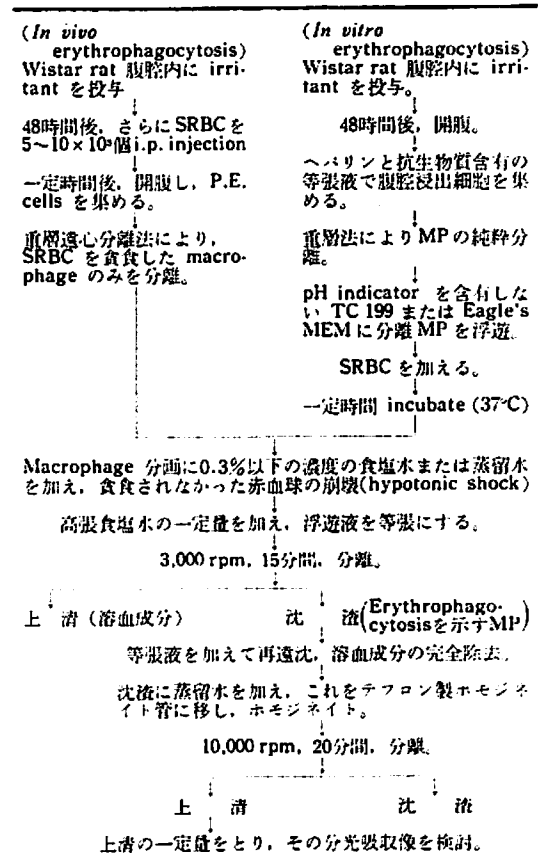
TC 199 液中に分離 MP を $1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml の濃度に調整した細胞浮遊液を培養瓶に入れ、これに MP と同じ細胞濃度のヒツジ赤血球 (以下 SRBC と略) 浮遊液を同容加え、37°C で 3 時間インキュベートした後培養液を除去し、TC 199 液 1~2 ml を静かに加え、

ラバークリーナーで培養瓶底を軽くこすり、液中に遊離した細胞器を駒込ピペットで採取し、それをスライドグラス上に滴下し、ガバークラスでカバーし、その周囲をパラフィンで包み試料の乾燥を防ぐ。位相差顕微鏡下に分離 MP の異種赤血球処理過程を観察する。対照は非分離腹腔浸出細胞浮遊液で、上と同様の処理をして観察し、MP の分離操作による影響を検討する。次の事項を観察の指標とした。1) 偽足および線維状突起の出現とそれらの運動。2) SRBC の食食と、その前後における MP 胞体内の Phase-contrast 顆粒の律動的運動。3) 分離 MP による SRBC の鈴なり状吸着 (rosette formation) と赤血球内容の吸引。

食食した SRBC 内容の処理、ヘモグロビン分解過程の分光学的解析

分離 MP の中にとりこまれた SRBC やその内容が如何に変化を受けるかを知る目的で、まず、SRBC 内色素の分解過程を検討するため、表 4 のような実験系を案

表 4 Macrophage による食食性異種赤血球の oxy-haemoglobin 処理 (分光学的解析)



出した。この系で留意すべきことは MP 内にとりこまれた SRBC 内色素の分解過程を追究するのであるから、培養液中に浮遊する非貪食性 SRBC の混在は許されないことである。混在 SRBC の除去は表 4 にあるごとく、低張食塩水を 1 分間作用させ、その液を除去後(溶血成分の完全除去)、培養瓶の底に粘着する MP をラバークリーナーで採集する。SRBC 貪食 MP より色素とその分解物を抽出後、その分光吸収像を日立 124 型 Spectrophotometer で検討した。SRBC 貪食率が小で、MP 内の SRBC およびその分解物の吸光度が低く解析が困難であれば、ホモジネートする MP の数を増加させる。

分離した SRBC 貪食 MP とリンパ球との相互関係

SRBC をラット腹腔内に投与し、15 時間後、腹腔細胞群を採集し、SRBC 貪食 MP を分離する。これを TC 199 液中に浮遊させ、さらに、リンパ球分画を加える。37°C、2 時間、インキュベートした後、培養瓶の底を軽くこすり、上記と同じ方法で細胞標本を作り、位相差顕微鏡下に SRBC 貪食 MP とリンパ球との間のブリッジ形成など、両者の相互関係を観察する。

実験結果

マクロファージの分離結果

腹腔浸出液を集めて調製した重層遠心分離用の試料中の細胞種類と構成率は表 5 のごとくである。それによれば、流動パラフィン (以下 Lpa) で刺激した時はグリコーゲン (以下 Gly) の場合に比べて、MP の構成率が約 10% 高いことがわかる。両群とも、リンパ球と顆粒球の混在がかなりみられ、Lpa ではそれぞれが 20~25%、10~15%、Gly では 30~35%、10~15% の混在率である。多くの研究は上のように不均一な組成をもつ細胞群を MP 分画として使用しているが、この分画を試料とする実験系では抗体産生機構における MP の役割を正確に解析できない。著者はこれらの試料に重層遠心分離操作を加え、MP を I、II 分画へほとんど純粋に、混在細胞を III、IV 分画に、それぞれ分離した。試料を構成する

表 5 重層遠心分離前試料中の各種細胞の構成率

cell type	刺激剤	流動パラフィン	グリコーゲン
Macrophage		60~65%	50~55%
Lymphocyte		20~25	30~35
Granulocyte		10~15	10~15
Mast cell + Erythrocyte		2~5	2~5

細胞は、それらの細胞比重に応じた界面に分離され、明瞭な細胞帯を作るが、特に興味深いことは、I 分画の細胞帯の幅を Lpa, Gly 刺激のそれぞれにつき比較検討すると、前者が後者より厚く、肉眼的にもその差をはっきりと認めることができる (図 2 と 3 の比較検討)。これは Lpa 刺激により細胞比重の 1.045 より小さい MP が多く出現したことを示し、それらは比重の小さい流動パラフィンを貪食した結果であると想定される。この現象は各分画における MP の回収率からも裏付けることができる。すなわち、前者では分離前試料中の MP の 40~45% が I 分画に回収されるのに比し、後者ではその 10~20% が回収されるにすぎない (表 8 参照)。

図 5 および 6 は Lpa, Gly でそれぞれ刺激後、出現する腹腔浸出細胞を重層法で分離した各分画の位相差顕微鏡写真像である。これらより明らかなように、MP がほぼ純粋な状態で I、II 分画に分離される。III 分画には、試料中の混在細胞であるリンパ球と顆粒球が分離されてくるが、細胞比重の大きい MP も、この分画の一部を形成している。IV 分画の細胞構成は III 分画のそれに類似しているが、顆粒球の構成率が大となるのが特徴である。

表 6 各分画総細胞数の分離前試料中の総細胞数に対する割合

Fraction	刺激剤	流動パラフィン	グリコーゲン
I		25~30%	5~10%
II		25~30	30~35
III		35~40	35~40
IV		10~15	25~30
V		2~5	2~5

表 7 各分画における各種細胞の純度

Fraction	Cell type	流動パラフィン刺激	グリコーゲン刺激
I	Macrophage	99~100%	99~100%
	Lymphocyte	0~1	0~1
II	Macrophage	99~100	99~100
	Lymphocyte	0~1	0~1
III	Macrophage	35~40	30~35
	Lymphocyte	45~50	45~50
	Granulocyte	10~15	15~20
IV	Macrophage	15~20	15~20
	Lymphocyte	35~40	40~45
	Granulocyte	40~45	35~40

なお、V 分画の構成は脂肪細胞と赤血球とからなり、省略した。

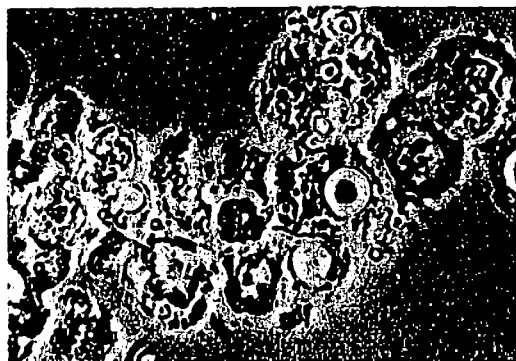


図5のa



図5のb

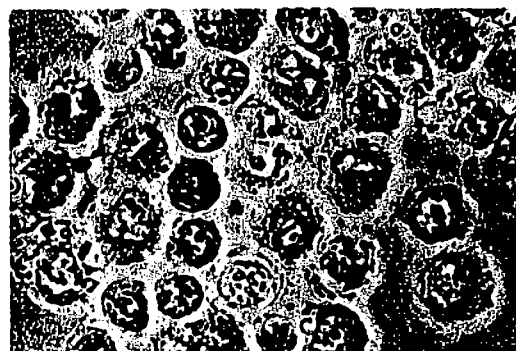


図5のc

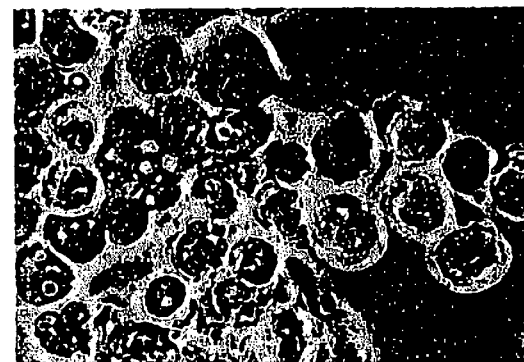


図5のd

図5. 重層遠心分離法により分離された各分画構成細胞の位相差像(×1,000)

試料：流動パラフィン刺激による腹腔渗出細胞群

a: I分画 b: II分画 c: III分画 d: IV分画

I, II分画は、ほぼ純粋なマクロファージ分画。それらは流動パラフィンを食食し、多くの油球を胞体内に保持する。(本文参照)

試料中の混在細胞であるリンパ球、顆粒球はIII, IV分画に分離される。

図5のc, d参照。

表6は各分画総細胞数の分離前試料中の全細胞数に対する割合である。

表7は各分画における各種細胞の純度を求めた結果をまとめたものである。

表5, 6, 7から各分画でのMP回収率を算定することができ、その結果を表8に示した。Lpa刺激の場合、I, II分画に試料中のMPの80~90%が回収され、Gly

刺激の場合でも、その両分画に60~75%回収されることが判明した。

さらに注目すべきことは、図5, 6で、両刺激の場合ともに、細胞比重が大となるにつれて(IからIV分画へと移行するとともに)MPの細胞直径が小となることである。著者ら¹²⁻¹⁴⁾は、先に、赤血球系、顆粒球系などに属する細胞は分化過程の進行とともに細胞比重が増大することを明らかにした。これらの細胞系では分化が進むとともに細胞直径が小さくなることが知られている。以上の知見から腹腔渗出液中のMP群にも著者らの創案した原則があてはまるかもしれない。

図7aは、前述したようにMPの構成率が病的に増大した脾臓から作成した細胞浮遊液の位相差像である。脾臓内赤血球の除去のため、表2のaに従って処理したが、なお、相当数の赤血球が残存しているのが認められる。中央右に自己赤血球を食食したMPがある。これ

表8 各分画における Macrophage の回収率

Fraction	刺激剤	流動パラフィン	グリコーゲン
I		10~15%	10~20%
II		40~45	50~55
III		10~20	25~30
IV		5~10	5~10



図 6 の a

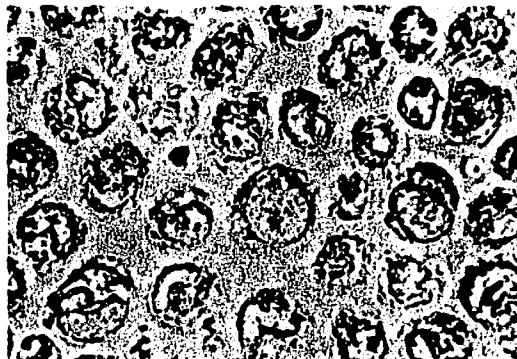


図 6 の b

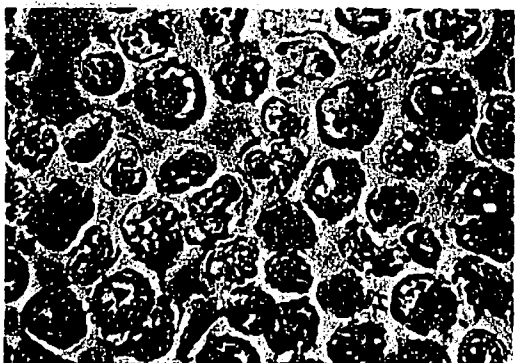


図 6 の c

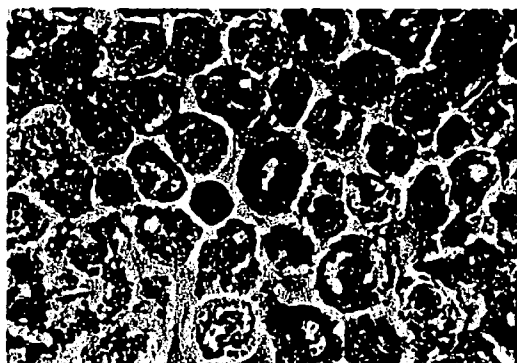


図 6 の d

図 6. 重層遠心分離法により分離された各分画構成細胞の位相差像 ($\times 1,000$)

試料: グリコーゲン刺激による腹腔渗出細胞群

a: I 分画 b: II 分画 c: III 分画 d: IV 分画

図 5 でもそうであったが, I 分画から IV 分画へと移るとともに macrophage の細胞直径が小となるのがわかる (本文参照)。リンパ球, 顆粒球は III, IV 分画に分離される。図 6 の c, d 参照。

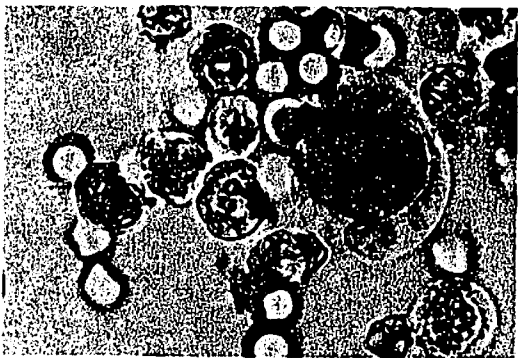


図 7 の a

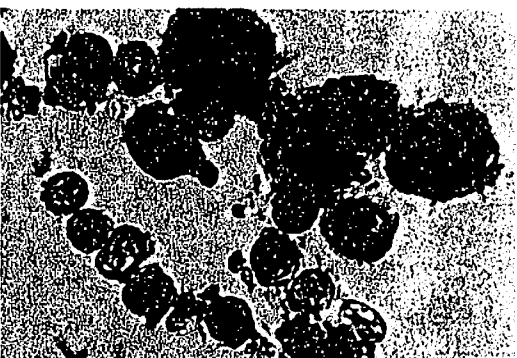


図 7 の b

図 7. 重層遠心分離法による脾臓内マクロファージの分離

試料: マクロファージ構成率の病的に増大した脾臓

a: 重層遠心分離前試料。中央右に自己赤血球を食したマクロファージあり。なお, かなりの赤血球が混在している。

b: 分離後, マクロファージとリンパ球からなる。
リンパ球除去法は本文参照。

a, b とも, 試料をブリリアント・クワジル・ブルーで超生体染色し, 光学顕微鏡 ($\times 1,000$) で撮影した。

を試料として重層法を実施すると図7bのごとき分離が得られる。これは混在した赤血球が除去され、MPとリンパ球のみからなっている。前者は培養瓶の底に粘着し、後者にはその活性がないので、培養液交換によりリンパ球が除去され（理論的には除去されそうだが、実際はそうでない。考察参照）、MPの純度が良好となる。すなわち、この例では分離法として、細胞比重差法と粘着法とを併用したものである。

分離MPによる異種赤血球処理能、位相差顕微鏡下の観察

1) 幅 $1\sim 2\mu$ 、長さ 50μ 以上におよぶ偽足を振動させ、SRBCを抱く様にしてとらえ、胞体内にとりこむ。

2) 分離MPのあるものは数本以上の線維状突起を出し、SRBCを突起の一部に吸着し、次いで赤血球の殻(ghost)が突起に付着したままであるのが観察できる。

3) MPの細胞表面に多くのSRBCが“鈴なり状”に吸着され、いわゆる rosette formation がみられる。しかし、それを示すMPは少く、観察した全MPの約1%である。4) rosette formationを示すMPの観察を続け、次の知見を得た。吸着SRBCに接する部位に近いMPの胞体内に phase-dense な顆粒が相当数集まり、律動的な運動を行なう。次いで、その赤血球膜が一部破壊され、内容が水の流れのごとく瞬間的にMPの胞体内に吸引される。時間の経過とともに、rosetteを形成していたSRBCの内容が次々と吸引される（図8および9参照）。MP胞体内に内容吸引後 phase-dense な膜に包まれた黄色い顆粒が出現する（図9のb）。この色調は血色素に由来すると想定している。また、図8の矢印および図9Cのごとく ghostの中に、MPの胞体内でみられた phase-dense 顆粒に類似した粒子が律動

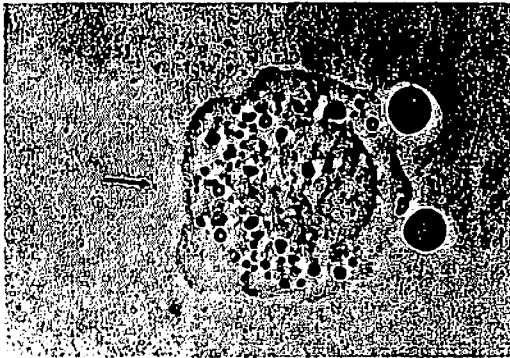


図8のa

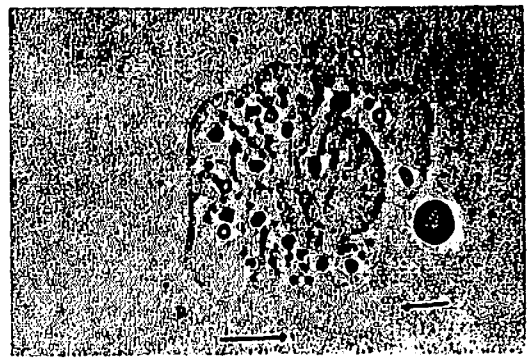


図8のb

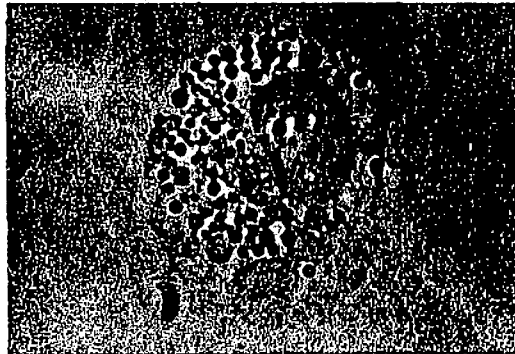


図8のc

図8. 分離マクロファージによる赤血球の鈴なり状吸着 (rosette formation)

- a: rosette formation 後、吸着されたSRBCが、次々とMPの胞体内へ吸引され、後、2個残っている像
- b: 後1個のSRBCが intact のまま、MP表面に吸着されている
- c: すべてのSRBCの内容がMP胞体内へ吸引される。
- a, b, cは位相差顕微鏡写真 ($\times 1,000$)
- a, bの矢印は、MP内に見られるのに類似する phase-dense 顆粒。MP胞体内より Ghost 内に侵入したか? (図9の模式図および本文参照)

的に運動しているのが見出された。これより MP と SRBC との内部的流通のあることを推察させる。

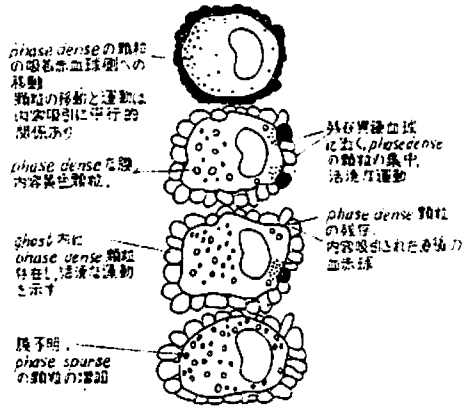


図9. 分離マクロファージによる異種赤血球の吸着 (rosette formation) とその内容の吸引。

分離 MP によるヒツジ赤血球内血色素の分解

図10 a, b, c, dは, SRBC を貪食した MP を経時的に分離し, それらのホモジネートを遠沈し, 上清の分光吸収像を示したものである。これらの吸収曲線の変化から, MP がどのように SRBC 内血色素を分解するか推測できる。MP が SRBC を貪食した直後では, aのごとく, oxy-haemoglobin (oxy-Hb) の吸収曲線を示し, ほとんど変化を受けていない。次いで, bのように, oxy-Hb の吸収極大の他に 630 m μ および 500 m μ で極大が見られ, met-haemoglobin (met-Hb) の部分的出現を示す。これより, 貪食された SRBC 内の met-Hb 還元酵素の機能低下が予想される。次に MP 内での分解が進行すると, cのごとく, Soret 帯 (410 m μ 前後の吸収極大) のみ存在し, 前段階でみられた oxy-Hb や met-Hb の吸収極大は全く消失し, 血色素がヘムとグロビンとに完全に分解されたことを示している。さらに, 分解処理の進展とともに dのごとく, Soret 帯の光学的密度が低下し, これよりヘムそのものが分解されつつあると考えられた。遂には, Soret 帯の吸収が完全になくなる。図10 a, b, c, dにおける血色素分解の過程で, 280 m μ の吸収の変化を追跡すると, Soret 帯のその減少とは逆に, 増加しているのが認められる。この 280 m μ における吸収極大は血色素の分解により生じたグロビンが一因であると考えている。以上の分離 MP による血色素分解の過程は *in vivo* erythrophagocytosis では72~96時間で完了するが, *in vitro* のそれでは前者に比し遅延する。

分離した SRBC 貪食 MP とリンパ球との相互関係

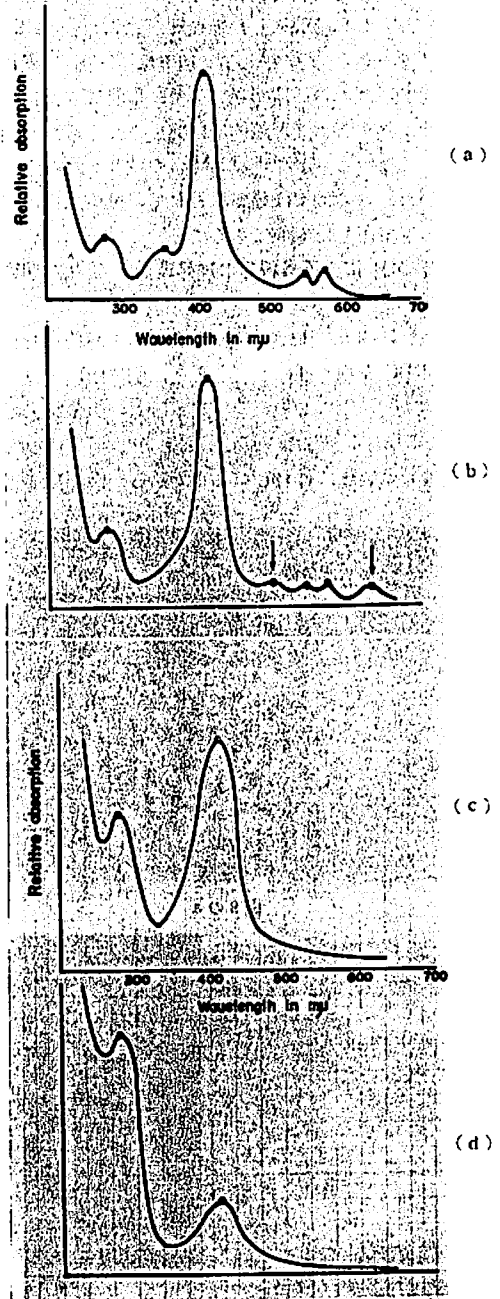


図10. 分離マクロファージによる羊赤血球内血色素の分解
(1) a, b, c, dは MP による血色素分解の経時的变化である。
(2) bの矢印は Met-haemoglobin の特徴を示す吸収極大。
(3) a, b, c, dで 280 m μ の吸収の変化を追跡すること。(本文参照)

前記の方法に従って作成した細胞標本から、両者の密接な関係を想定させる次のような像をとることができた。1) SRBC 貪食 MP とリンパ球、相方の胞体が接触、融合するものがある。2) MP とリンパ球とを結ぶ bridge の形成。図11は2)の顕微鏡写真であるが、1個のリンパ球が2個の SRBC 貪食 MP と bridge により連絡され、左側 MP の下端より phase-dense 顆粒が bridge 内に入り、リンパ球へと移動しつつある瞬間をとらえたものである。これらは SRBC の持つ抗原情報が MP の phase-dense 顆粒の中に濃縮され、それらが bridge を介して、MP より直接的にリンパ球へと移される可能性を示唆している。



図11. 羊赤血球貪食性マクロファージとリンパ球間の bridge 形成

- ・MP 胞体内に色素分解物含有の顆粒や液泡が多数見られる。
- ・左側 MP の下端より、phase-dense 顆粒が bridge 内に入ろうとする。(矢印)
- ・右側の bridge 内で phase-dense 顆粒(矢印)が移動中。

以上のように分離した MP が活発に SRBC を処理することが判明したが、非分離 MP につき、その処理能を追究し、前者と比較検討したところ、ほとんど差が認められなかった。また、他の MP 活性判定法として、ガラス表面への伸展性と粘着性があるが、これらについても分離 MP と非分離 MP との間に差を見いだしなかった。上述の結果より、分離操作による MP への影響はほとんどないとみなされる。

考 察

FISHMAN ら¹⁾は腹腔浸出細胞等とともに T₂ フェージをインキュベートし、これより抽出した RNA 分画は非刺激性リンパ節細胞に抗 T₂ フェージ抗体の産生を誘導することを見出し、腹腔浸出細胞群中の MP は抗原の貪食・分解にとどまらず、抗原情報を抗体産生細胞に伝

達する役割を持つと想定した。ここに、MP の抗体産生始動説が生まれたが、FRIEDMAN ら²⁾、ASKONAS ら³⁾は FISHMAN と同じく MP から抽出した RNA レベルから、ARGYRIS⁴⁾、GALLILY ら⁵⁾、MOSIER⁶⁾は MP そのもの、すなわち、細胞レベルの研究から、MP が抗体産生の始動に重要な役割を演ずるという考えを肯定している。しかしながら、PERKINS と MAKINODAN⁷⁾は腹腔浸出液中の MP による SRBC 貪食率と溶血素産生能とは相反する関係にあるという実験結果を得、MP は抗原のもつ免疫原性が消失するまで分解し、抗原情報を抗体産生細胞に伝えることができないと推定し、上記の抗体産生始動説に反対し、MP は抗原の分解と処理を行なう scavenger cell (清掃細胞) であると提唱した。MOORE ら⁸⁾も家兎リンパ節細胞による抗ウマフェリチン抗体産生系で MP の介在は抗体産生を抑制する結果を得、清掃細胞説を支持している。

上記のごとく、抗体産生機構における MP の役割に関し、根本的な対立が見られるが、諸家の報告¹⁻⁸⁾の解析と筆者らの知見⁹⁻¹¹⁾より、対立の原因として次の諸因子をあげることができた。1) 実験動物の相違、2) 実験条件の差(1次刺激であるか、2次刺激であるか)、3) 使用抗原が不定、4) 腹腔内へ投与する刺激剤の違い、5) MP の採集母組織の相違、6) 試料中の MP の純度、など。今後、抗体産生機構における MP の役割を検討するとき、上の因子のうち 1) ~ 5) の因子を統一して実験することが望まれる。問題は因子 6)、すなわち実験試料中の MP の純度である。諸家はグリーゲン、thioglycollate などの刺激剤を滅菌し、腹腔内へ注射し、MP の構成率を高めた腹腔浸出細胞群を MP 分画としている。その分画の MP 純度は最良の試料でも 70~80% であり、他の構成細胞はリンパ球と顆粒球である(表参照)。この分画を試料とする実験系で産生された抗体は、投与した分画に混在していたリンパ球によるのか、host のリンパ球によるのか判然としない。また、COHN¹²⁾によれば、顆粒球は抗原のもつ免疫原性を完全に破壊すると考えられるので、顆粒球の混在は避けねばならない。この分画に適当な操作(細胞比重差法、粘着法)を加え、混在細胞を除去し、MP の構成率をより高めた分画を実験用試料とするといふ。

MP の純粋分画を計画する際、実験方法で一部記載のごとく、次の諸事項に留意せねばならない。1) MP は存在組織により機能差がある：BENNETT¹³⁾によれば、MP は存在母組織により、抗原処理能、分裂能、異物表面への伸展性と粘着性、などの機能が異なるらしい。それゆえ、MP 分離のための試料採集部位につき考慮が必

要である。2) 採集母組織における MP の存在状態: MP が free cell であるか, fixed cell であるかが, 分離結果を左右する大きな因子である。ことに, 個々の細胞の細胞比重差に基づいて特定細胞を分離する細胞比重差法では, fixed cell の場合, 操作を加えて free cell として後, 分離せねばならないから, MP が fixed cell として存在する組織は好適な部位ではない。3) 採集部位での MP の構成率: MP の構成率が高ければ, 分離操作過程が簡便となり短時間で分離完了し, 活性度の高い MP を純度高く分離できる。

抗体産生機構における MP の役割追究を研究目的とすれば, 抗体産生場である脾臓やリンパ節から MP を分離し, これを実験試料とするのが理想である。しかし, それらの組織での MP は上の 2, 3 の事項を満足しえない。それゆえ, 著者は研究目的を重視し, 抗原性物質処理能でリンパ組織内 MP と同程度の活性を示し, しかも 2), 3) の事項を満足できる腹腔浸出細胞群を MP 純粋分離のための試料とした。末梢血液も MP 分離の試料として 2), 3) の事項をほぼ満足できるが次の理由から, 純粋な MP (単球) を得るのは容易でない。1) 赤血球除去操作の困難性。2) 腹腔浸出細胞群のように刺激剤での構成率を高めることができない。

腹腔浸出細胞群から MP を純度高く分離する諸方法のうち最も効率のよいのは細胞比重差法と粘着法とである。前者は試料を構成する細胞間の細胞比重差にもとづき, 比重の異なる分離溶液を重層し, それに試料を積み重ね, 遠心力により特定細胞を一定の界面に純度高く分離する方法である。MP の細胞比重の幅は広く, 1.035 から 1.070 におよぶが, 混在するリンパ球・顆粒球は, ともに細胞比重が 1.060 より大であるので, 1.055 より小さい分離液を使用し, 生じた界面 (I, II 分画) には MP が 100% に近い純度で分離される。I, II 両分画合わせて, Lpa 刺激による腹腔液では試料中の 80~90% が, グリコーゲンでは 60~75% がそれぞれ回収される。この方法によれば, 試料採取後 3 時間以内に分離が完了するのも長所である。しかし, 細胞比重の大きい MP が図 5, 6 の c・d, 表 7 に示されるように, III, IV 分画にリンパ球と顆粒球と混在した状態で分離される。これらの分画では構成細胞間に比重差がないから, 粘着法を併用して純度を良くする以外, 方法はない (図 7 a, b の脾臓内 MP の分離参照)。ただし, III, IV 分画に分離される MP の回収率は Lpa で 10~20%, グリコーゲンで 30~40% にすぎず, 大部の MP は I, II 分画に分離されていることがわかる。粘着法は, 細胞の種類によりガラスや合成樹脂の表面への粘着能に差があること

にもとづいて特定細胞を分離する方法で, 試料を培養液中に, インキュベートし, 培養液を交換しながら非粘着細胞 (リンパ球) を除く。顆粒球は MP と同じく異物表面への粘着能を保持しているが, 培養 3~5 日で死滅し, その後の培養細胞は MP のみとなるはずである。しかし, 培養中, リンパ球と MP との間に胞体融合や図 11 のように bridge 形成がみられ, これら MP と密接に連結するリンパ球を培養液の交換だけでは除去できない。さらに顆粒球の死滅を待ため, 培養期間が 5 日以上におよぶ。それゆえ, 粘着法で分離された MP が生体内で示す機能とは異った働きをするのでないかと懸念される。実際, CLINE 等²¹⁾によれば, MP が抗原を貪食後, 小リンパ球の幼若化を惹起する実験系で, インキュベーションの時間が 48 時間以上におよぶ場合, 幼若化惹起能の低下が著しいという。これらが粘着法の主要な短所であるが, 細胞比重差法に比し, 分離操作上, 機械的影響が少い点が長所であると思われる。

実験法で記したように, 重層遠心分離用試料の細胞濃度 ($1 \sim 5 \times 10^6$ cells/ml) が分離効果をあげる重要因子である。この濃度は比重の異なる分離液の界面に, 肉眼的に認知可能な細胞帯を作るために必要なものである。これより稀薄な細胞濃度では, 次のような理由で望ましくない。

1) 細胞帯を界面に認知できなくなる。2) 特定細胞を一定数以上分離するためには分離回数を多くせねばならず, 分離時間の延長を招き, これと平行して細胞の活性を低下させる。逆に, 細胞濃度が濃くなると, 細胞間の相互作用による凝集の発生頻度が大となり, 細胞の凝集片は構成細胞の平均的な細胞比重に相当する界面に分離され, 構成細胞個々の持つ細胞比重を反映しない。それゆえ, 分離純度が悪くなる。

MP の異種赤血球処理法の一つに “鈴なり状吸着” (rosette formation) があるが, その MP は SRBC の吸着にとどまらず, 赤血球膜の一部を破壊し, 図 8, 9 のごとく, 内容を吸引する。その直前, MP の胞体内で SRBC との接触部位に phase-dense 顆粒が近接し, ダイナミックな運動を示すが, この現象が異種赤血球膜の破壊に密接な関係があると想定され, それらの顆粒は lysosome 顆粒であろうと推定している。

図 8 a, b, c に示されるように, anti-SRBC 抗体の関与なしに, 分離 MP が SRBC を吸着し, rosette を形成した。BOYDEN²²⁾によれば, その種の抗体がなければ, rosette formation は見られないという。しかし著者らは, その出現率が小さいが (約 1%), その形成を確認している。この実験系に自然抗体が介在し, それ

が分離 MP に影響していることも考えられる。腹腔液中に存在する自然抗体は分離・精製の過程で除去されたものと推定しているが、自然抗体が MP の表層に分離前から強固に結合している可能性を否定できない。

図10 a, b, c, d で示された分離 MP による羊赤血球の血色素分解は、MP が腹腔内に存在する時の方が *in vitro* でインキュベートされている時より短時間で終了する。考えられる理由として、1) 前者に、SRBC に対する自然抗体の関与が考えられる。2) MP は *in vitro* で比較的短時間内に生物学的活性が低下するらしい²¹⁾等があげられる。

SRBC を腹腔内に投与後、15時間で SRBC 貪食性 MP を分離し、これにリンパ球分画を加えて混合培養すると、図11のごとく、両者の間に幅 1~2 μ 、長さ 50 μ 以上の bridge が形成されているのを見出すことができる。MP の胞体内より、phase-dense な顆粒が bridge の内部を通過し、リンパ球へと移動する。これらの顆粒の中に SRBC の持つ抗原情報浓缩され、それがリンパ球に伝達される機構が存在するのかもしれない。

現存するあらゆる研究法のうち、位相差顕微鏡下の観察法以外の如何なるものも、分離 MP が示した諸現象の律動的瞬間をとらえ得ない。しかし、位相差顕微鏡法も顆粒内物質の性状や顆粒の役割、偽足による異種赤血球とりこみ機構、MP による異種赤血球の吸着・吸引の機構などについてなんらの解答をも与えてくれない。顕微分光測光法が生きている細胞にも応用可能となるよう工夫・改良が切望される。

上記の実験結果や考察から明らかなように、適当な刺激剤を用いて誘導した腹腔浸出細胞を試料とし、重層遠心分離すれば、純度 100% に近く、回収率 60% 以上で、MP を分離することができた。また、それら分離 MP の異物処理能や異物表面への粘着性・伸展性は非分離 MP とほとんど変わらない。著者らはこの分離 MP 分画を用いて抗体産生機構における MP の役割を検討する実験計画を立案中である。

最後に、この研究報告のチャンスを与えて下さった免疫生物学研究会の皆様、研究完成のため激励して下さいました木村英一先生、ならびに終始御協力いただいた木村修平技術員に心から感謝致します。

文 献

- 1) FISHMAN, M. and ADLER, F. L., 1963: J. Exp. Med., 117, 595.
- 2) PERKINS, E. H. and MAKINODAN, T., 1955: J. Immunol., 94, 765.

- 3) FRIEDMAN, H. P., STAVITSKY, A. B. and SOLOMON, J. M., 1965: Science, 149, 1106.
- 4) ASKONAS, B. A. and RHODES, J. M., 1965: Nature, 205, 470.
- 5) ARGYRIS, B. F., 1967: J. Immunol., 99, 744.
- 6) GALLILY, R. and FELDMAN, M., 1967: Immunology, 12, 197.
- 7) MOSIER, D. E., 1967: Science, 158, 1573.
- 8) MOORE, R. D. and SCHOENBERG, M. D., 1968: Nature, 219, 297.
- 9) 木村英一, 木下喜博, 印刷中: 免疫学・アレルギー学実験法, 細胞レベルにおける分離法と検出法. 文光堂, 東京.
- 10) 木村英一, 木下喜博, 印刷中: 医化学実験法講座, 臨床化学, 材料採取法. 中山書店, 東京.
- 11) 木下喜博, 1969: 第3回免疫生物学研究会シンポジウム講演予稿集, P5~9.
- 12) COHN, Z. A., 1962: Nature, 196, 1066.
- 13) KIMURA, E., SUZUKI, T. and KINOSHITA, Y., 1960: Nature, 188, 1201.
- 14) KIMURA, E., ENOMOTO, I., AWANE, H. and KINOSHITA, Y., 1960: Osaka City Med. J., 6, 49.
- 15) 辻 健三, 木下喜博, 1962: 日本血液学雑誌, 25, 491.
- 16) 木下喜博, 木村修平, 越川 恵, 木村英一, 1964: 日本血液学雑誌, 27, 309.
- 17) BENNETT, B., 1966: Amer. J. Path., 48, 163.
- 18) FRANZL, R. E., 1962: Nature, 195, 457.
- 19) 木村英一, 1967: 蛋白質・核酸・酵素, 12, 338.
- 20) 木下喜博, 辻 健三, 1963: 日本生理学雑誌, 25, 63.
- 21) CLINE, M. J. and SWETT, V. C., 1968: J. Exp. Med., 128, 1309.
- 22) BOYDEN, S. V., 1963: In 'Cytophilic antibody', Cell-Bound Antibodies (ed. by B. AMOS and H. KOPROWSKI), p. 7, Wistar Institute Press, Philadelphia.

笠原四郎(北里大・薬, 北里研・ウイルス部): 1) 実験に使用した動物の種類は?

2) ウサギ腹腔内に流動パラフィンを注入後、採取される腹腔浸出細胞は塩類溶液におくだけで、インターフェロンを産生する(長野ら)。この場合、使用された腹腔細胞の種類については、約85%はマクロファージであるが、リンパ球や顆粒細胞の混在がある。インターフェロンを産生するのは、おそらくマクロファージであると推論できると思われるが、これを確証するためには純粋に分離されたマクロファージを用いて実験を行なう必要に迫られた。この意味で私どもはウサギ腹腔マクロファージの分離を企てた。たまたま貴教室の重層法の業績を知ったので、木村教授に問合せたのは、2年前のことであったが、お答は当時まだマクロファージについては実験をしていないとのことであった。教室で発表ずみの論

文別刷を頂いた。ここに改めて御好意に感謝したい。早速私も流パラ注入後腹腔浸出液採集の日数やアラビヤゴム溶液の比重などを検討した。術式の細かいことは御発表のものと若干の相異はあるが、御質問があれば、担当した小山からお答えしたい。その結果、ウサギ腹腔マクロファージはアラビアゴム重層遠心法で単離でき、その純度は99.8%で、2層に分布し、比重は1.04と1.06であって、重いマクロファージは軽いものよりインターフェロンを2〜3倍よく産生することを知った(医学のあゆみ、70巻、11号、532〜533、昭和44年9月)。

答：1) Wistar rat である。

2) 重い MP が軽いものに比し、インターフェロン産生能が大であるという御報告は極めて興味深い。筆者も細胞比重の大きい小リンパ球群に種々の免疫活性が集中するという知見を得ている。MP 群や小リンパ球群以外で、細胞比重の違いによる機能差がみられるような特定細胞群が存在するかもしれない。

森沢成司(大市大・医・生化)：1) ④流動パラフィンあるいはグリコーゲンを使用して得られたマクロファージが、それぞれ異なった分画に存在するのは、流動パラフィンを貪食したためか。⑤流動パラフィンの刺激によって得られたマクロファージで、二つの異なった分画にあるものは、たがいに異なると考えるか。

2) もし分画した比重の違うマクロファージが生物活性をそれぞれ異にすると考えれば、それをどのようにチェックするつもりか。

答：1) の a. 流動パラフィン刺激例では細胞比重の小さい(1.045 より小) MP がグリコーゲン刺激例に比し多く出現する。これは御指摘のように、MP が比重の低い流動パラフィンを貪食したためと考えている。

1) の b. 私は、小リンパ球群の細胞比重の相違により機能が異なることを明らかにしたが(木下喜博、1969：最新医学、24、1372)、MP にも、このことが言えるのではないかと考えている。実際、笠原さんが重層遠心分離法により分離した重い MP が軽いものより、インターフェロンを2〜3倍多く産生することを報告されている。

2) I および II 分画は、それぞれ、100%に近い純度の MP population である。両者の acid phosphatase 活性を検討し、MP の細胞比重の差による lysosomal enzyme activity の差を追究したい。

和氣 朗(予研・細菌)：分離溶液の比重の数字はマウス、ラット、ウサギなど各動物種に共通のものか。つまりこの数字は理論的なものか。経験的なものか。

答：腹腔浸出細胞群中の MP に関するかぎり、動物

種の違いにより、MP の細胞比重が大きく変るとは思えない。ただし、1.060 (15°C) より小さい比重の分離溶液を何層も重層し、どの比重が最適であるか、予備的に検討されることを希望する。分離溶液の比重決定は経験的である。

吉田 彪(予研・結核)：1) 分画 I と II の MP の回収率はどの位か。

2) K. SHORTMAN らの浮遊法(Buoyant density gradient)による分画と比べて分離能はどうか。

答：1) 表8を参照されたい。

2) SHORTMAN らの浮遊法が MP 分離に応用されたという報告を知らない。それゆえ、比較できないが、リンパ組織内リンパ球群の分画実験から、浮遊法と著者らの方法とをくらべ、後者がすぐれているように思われた。その理由は、1) 浮遊法では、細胞比重の小さい大リンパ球がかなり多数に、比重の大きい分画に分離されてくる。2) 浮遊法により分離された各分画の各種リンパ球の純度は重層法に比し不良である。3) 浮遊法では、操作過程で遠心力を加える時間が長すぎる(Y. KINOSHITA *et al.*, 1970 : Exp. Cell Res. 59, 299)。

大滝研也(予研)：1) 流パラ、グリコーゲンなどの刺激剤を全く使わないほうがよいのでないか、刺激剤を与えれば、当然マクロファージの生理的状态、活性を変化させることが考えられる。

2) 重層遠心法は、よく用いられるガラス壁に粘着させて他の細胞と分ける方法にくらべて格段にマクロファージの分離がよいのか。その際、マクロファージの純度が高くなるか。

答：1) 御指摘の通りだと思う。非刺激性腹腔細胞群の MP 構成率は20〜30%であり、これを試料として本文の方法に従い、MP をより純度高く分離することができる。ただし、MP の構成率が高い程、分離が容易であることは本文に指摘した通りである。

2) 重層遠心分離法により、MP の分離純度がほとんど100%に近い状態で、しかも、60%以上の回収率で分離できる。この方法は著者の経験では、次の理由から、粘着法よりすぐれていると思う。粘着法では MP と密接に連結しているリンパ球を除去することは容易でない。また、顆粒球除去のため培養期間が5日以上におよび、MP の生物学的活性の著しい低下を招く(考察の項を参照されたい)。

斎藤和久(慶大・微生)：大滝さん、森沢さんの附議に関連するが、私のモルモット腹腔マクロファージの経験では、粒子を与えたときの酸素消費の増加はグリコーゲンまたは caseinate 誘出細胞のときは著しいが、流

動パラフィン誘出細胞ではうまく見られない。だから、できれば刺激剤を用いないほうがよく、また、実験目的により刺激剤を選ぶ必要があると考えている。

答：御説の通りである。筆者も刺激剤の相違により、遊出 MP の機能に違いのあることを見出している。す

なわち、流動パラフィン誘導による MP はグリコーゲンによるものに比べ、異種赤血球内血色素処理活性が低い。腹腔浸出細胞群中の MP の構成率を高めるため、各種刺激剤のうち比較的生理的なものとして何がよいか検討中である。

食細胞, 血液細胞と抗原抗体補体結合物の反応

関根 暉 彬, 西岡 久 寿 弥 (国立がんセンター)

吉 田 孝 人, 今 井 邦 之 (愛知県がんセンター)

抗原が生体内に入ったとき, その抗原に対応する抗体が生体内に存在する場合は, その抗原はすみやかに流血中より消失することは一般によく観察されてきた。またその抗原が不溶性物質の場合は貪食能を有する細胞, マクロファージ, 顆粒白血球などに抗原の集積が見られる事実も多く報告されている。一方 *in vitro* において抗原抗体結合物に補体の第3成分 (C3) まで反応すると IA (Immune Adherence) レセプターを有する細胞と粘着反応をおこすようになる^{1,2)}。さらに結合した C3 の量が増すと被貪食能が非常に増強する³⁾。一方貪食能を有する細胞, マクロファージ, 顆粒白血球には非常に強い IA reactivity が検出される。これらのことから有型抗原の流血中よりの elimination には IA 現象が関与しているのではあることは十分想定される。食細胞, 血液細胞と抗原抗体補体結合物の相互作用について, 細胞側の反応にあづかる因子と, 結合物側の反応にあづかる因子, 特に補体成分について基本的な理解が必要で, それについて論述し, さらにその定量的測定の一つの試みをあわせて記述する。IA レセプターを有する細胞としては, 霊長類の赤血球, 非霊長類の血小板および各種哺乳動物の骨髄系の白血球, 単球などが知られている。霊長類の血小板, リンパ球, 非霊長類の赤血球, 胸腺中のリンパ細胞および大部分のリンパ節中のリンパ球などには IA レセプターは検出されていない, これらから IA レセプターは細胞のマーカーとしても使う。

ヒトの血液細胞における IA レセプターの分布

IA レセプターの検出法としては⁴⁾, セッジ赤血球 (E) を IgM 溶血素 (A_{IgM}) で懸濁し (EA_{IgM}), 精製した補体成分 C₁, C₂, C₃ を順次じゅうぶん量反応させた後, EDTA を含む緩衝液中で 37°C 120 分間インキュベートすることにより C₁, C₂ を除去した EA_{IgM} C₄,₃ 細胞を指標細胞として用いた。この EA_{IgM} C₄,₃ 細胞の IA レセプターに対する反応性は非常に安定である。この EA_{IgM} C₄,₃ 細胞を被検細胞 1 個に対して 20 個以上の割合で加えて反応させ, 被検細胞 1 個あたりに結

合している EA_{IgM} C₄,₃ 細胞の数をとってその分布をみた。対照としては EA_{IgM}, EA_{IgM} C₁,₂ などを用いたがこれらは全く反応しなかったもので, IA 以外の要素はこの結合に関与しなかったものと考えられる。常に同一人から採取した O 型 Rh (+) の赤血球をコントロールとして用いた。

赤血球: 全く反応しない赤血球が一般に約 30% ぐらいある。ほとんどが EA_{IgM} C₄,₃ 1 個または 2 個と反応しているが, 4 個以上と結合しているものはまれである (図 1), EA_{IgM} C₄,₃ 細胞を減少させる方法で赤血球の IA レセプターを小学生から成人にわたり約 1,000 名調べた結果では, 1 名をのぞいて, その反応性には大差なかった。胎児より得た有核赤血球でも成人の赤血球と同程度の反応性を示した (図 2)。

リンパ球: ヒトのリンパ球には IA レセプターが存在しないと一般にいわれていたが, われわれのデータでもほとんどのリンパ球が反応を示さなかったが, 20% 内外のものが 1 個または 2 個の EA_{IgM}, EA_{IgM} C₁,₂, EA_{IgM} C₄,₃ 細胞と結合していた。この反応したリンパ球に

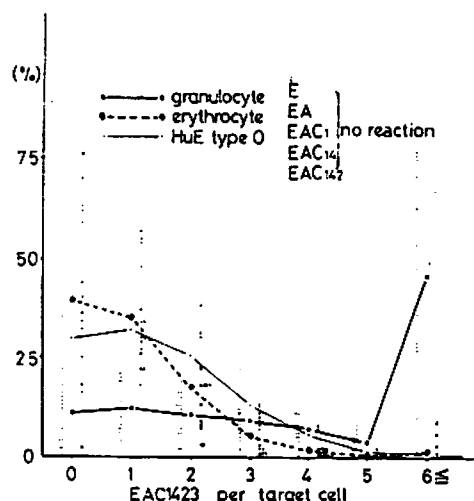


図 1 Distribution of IA Receptor on the Blood Cell Membrane

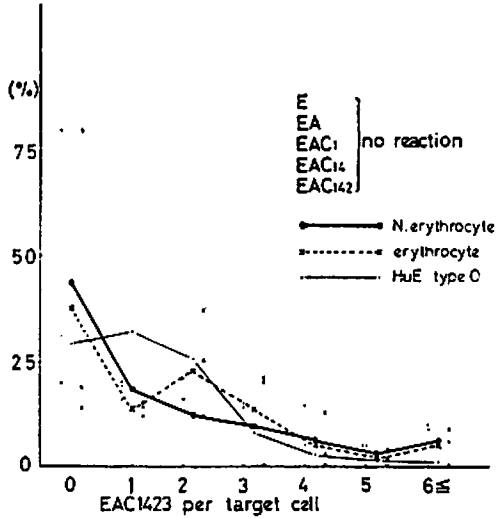


図2 IA Receptor on Nucleated erythrocyte and Erythrocyte

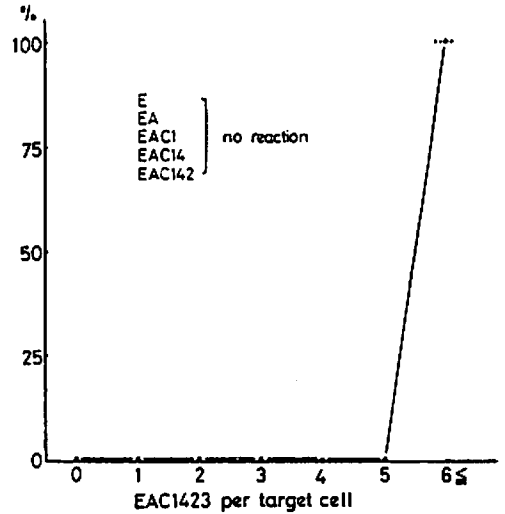


図4 IA Receptor on the surface of Macrophage (ascites) case 1

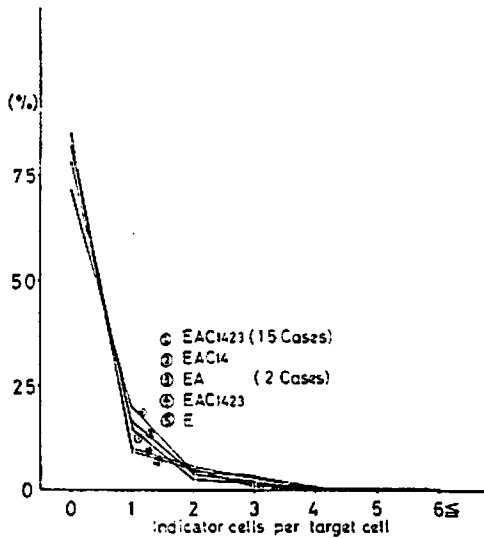


図3 IA Receptor on the surface of Lymphocyte

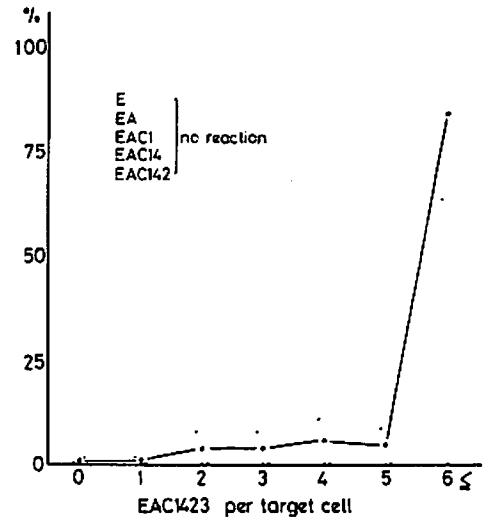


図5 IA Receptor on the surface of Macrophage (pleural effusion) case 1

については現在研究中である(図3)。

マクロファージ：腹腔および胸腔より得られたマクロファージは $EA_{IgMC_{11}}$ 細胞に強い反応性を示した(図4, 5)。マクロファージ、顆粒白血球などは IgG と反応する site を有するが、この IA レセプターの検索には IgM 抗体を用いており、かつ EA, EAC₁₄₂₃ などは反応しないことから、この系には IgG との反応は関与してないと考えられる⁶⁾。

顆粒白血球：(図1)に示したように顆粒白血球も強い反応性を示している。モルモットの腹腔より得られた

顆粒白血球も同様であった。

IA レセプターの性質

ヒト赤血球の IA レセプターは表1に示すような性質がある。蛋白質分解酵素に対しては非常に labile である。界面活性剤によって活性の低下がみられる。DOC や非イオン性界面活性剤で赤血球や白血球を処理すると、IA を阻害する作用が上清に認められることがあるが、この作用は D.F.P. で阻害されるので、IA レセプ

表1 ヒト赤血球の IA receptor におよぼす各種処理の影響

処 理	濃 度	温 度	pH	時 間	処理後の反応性
ブ ロ ナーゼ 7000PKU/mg	200 μ g/ml	37°C	7.4	0分 5分 10分 30分	冊 冊 ± —
トリプシン	10 μ g/ml	37°C	7.4	60分	—
蛇 毒 naja naja	500 μ g/ml	37°C	7.4	60分	冊
ニチアルアルコール	50%	4°C		overnight	±
	80%	4°C		overnight	—
phenol	45%	室温		120分	—
	3%	37°C		30'	冊
D. O. C.	0.2%	4°C	7.4	overnight	±?
加 熱		56°C	7.4	30'	±

ターが遊離したものではない。IA レセプターは SH 試薬の影響を受けない。

ヒト赤血球と EA₁MC_{1.3} 細胞との反応は非常に早い。顕微鏡下での観察では両者の衝突と同時に結合するのがみられる。低温では多少遅くなる。表2に示した範囲内ではイオン強度、pH の影響はうけにくい。

IA 反応の測定法

IA 反応の測定法としては、顕微鏡による方法管底像による方法、アイソトープラベルによる方法などが報告されているが、今回示したように、EAC_{1.3} 細胞が結合している数により分類する方法も細胞のマーカーとして IA を用いる場合は有用である。毛細管で凝集反応を測定する方法を IA に適用した²⁾。方法は、EA と補体を

表2 IA におよぼす pH と食塩濃度の影響

pH	4.0	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	7.0	7.5	8.0	8.5	9.0	9.5	10.0
IA reactivity	lysis	lysis +	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
食塩濃度	0M	0.03	0.06	0.09	0.12	0.15	0.3	0.6	0.9	1.2	1.5		
IA reactivity	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+

0.15 M 以下については蔗糖で等張にしている。

表3 毛細管法による IA モルセット血清の IA₅₀ 価測定

希釈	時間	20'	40'	60'	90'
4,000倍	0*	0	0	0	0
8,000	3	6	17	26	
16,000	4	13	26	40	
32,000	5	11	25	38	
buffer	4	11	25	38	

EA 1 $\times$ 10⁵/ml, HuE 4 $\times$ 10⁵/ml

* 流れ出しの長さ。

EA とモルセット血清の希釈サンプルとを混合、30°C 30分反応後へマトクリット用毛細管に 6cm だけすいあげ一端をとり 10000 rpm 1分間遠心後、45度にてたてかけておき、一定時間後に血球の流れ出した長さを測定する。buffer のみの値の半分を end point とすると40分で8,000倍である。

反応後ヒト血球と混じへマトクリット用毛細管にすい上げた後一端をとじる。10,000 rpm, 1分間遠心後45度の傾斜で保持しておくで血球が管底より流れ出す。その長

さを測定する。EA と HuE の系では 1 $\times$ 10⁵/ml の濃度の EA と 4 $\times$ 10⁵/ml の HuE との割合が最も判定しやすい。コントロールの流れ出した長さの半分を end point とすると表3で40分値をとると8,000倍が end titer である。この方法は抗原が腫瘍細胞の場合でも適用しうる。

補体成分との関係

IA に必要な補体成分は C₁, C₁, C₂, C₃ であることが西岡らによって示された²⁾。次いで C₁, C₂ を intermediate 上から除去しても、反応性は変わらないことが明らかとなった³⁾。この EAC_{1.3} 細胞上から C₁ を除去することはできなかったが、著者らは蛋白質分解酵素によりこの EAC_{1.3} 細胞上から C₁ を除去した後でも IA reactive であることを証明した(表4)⁹⁾。最少限の C₁ site を有する EAC_{1.3.2} 細胞に過剰の C₃ を作用させた後、EDTA を含む反応液中で 37°C に加温することにより C₁, C₂ を除去した。この EAC_{1.3} 細胞にトリプシンまたはブローナーゼを作用させた後よく洗い、IA reactivity 溶血反応による C₁ site, C₃ site および抗体活性を測定した。抗体活性はこの程度の処理ではあまり

表4 C₄ site と C₃ site におよぼストリプシンとプロナーゼの影響

assay		30°C 30'		30°C 90'	
		EAC ₄ C ₄ (IA) HL	EAC _{4,3} C ₄ (IA) C ₃ (HL)	EAC ₄ C ₄ (IA) HL	EAC _{4,3} C ₄ (IA) C ₃ (HL)
Trypsin 20 µg	IA	0	±		
	HL	1.3%	1.2%		
Trypsin 4 µg	IA	+	±	+ ~ ±	±
	HL	10%	95%	19%	14%
Pronase 200 µg	IA	0	±		
	HL	0.9%	0.4%		
Pronase 40 µg	IA	0	±	0	±
	HL	1.3%	2.1%	0.6%	1.6%
Control	IA	±	±	±	±
	HL	98.7%	89.0%	100%	89.1%

表5 酵素処理による C₄ および C₃ 分子の遊離

	酵素処理後*		酵素処理前	
	EAC ₄ または EAC _{4,3}	上 清	EAC ₄ または EAC _{4,3}	上 清
EAC ₄ *	0**	100%	100%	0%
EAC _{4,3} *	0	100%	100%	0%
EAC _{4,3} *	22.8%	77.2%	98.5%	1.5%

** 各部分のカウントの割合

* プロナーゼ 40 µg/ml 30°C 30'

影響はみられなかったが、トリプシン 4 µg/ml またはプロナーゼ 40 µg/ml で90分間処理したものは、IA reactivity はほとんど変化を受けていないが、C₄ site はほとんど検出されなかった。C₃ site も溶血反応では検出されず、C₃ 分子も酵素処理により一部影響を受け、溶血反応には必要であるが、IA には関与しない C₄ 分子の成分があるらしいことが示される結果が得られた。さらに C₄, C₃ を ¹²⁵I でラベルして同様の実験を行った(表5)。この実験でも C₄ 分子はプロナーゼによりすみやかに血球より除かれるが、C₃ 分子もかなりの部分が血球上よりはなれてしまうことが示された。これにより、C₄ 分子のプロナーゼにより血球上より遊離する部分に溶血反応に必要な部分があり、IA に必要なのは酵素処理によって血球上に残る部分であると思われる。従って IA に必要なのは C₃ だけで、さらに C₃ 分

子の中でもその一部分のみが IA 反応にあづかっているものと考えられるデータを得た。

考 察

Immune adherence (IA) に必要な補体成分は C₃ 分子の一部であることが示されたが、このことは岡田らにより別な方法で確かめられた¹⁰⁾。すなわち岡田らは C₃ をタンニン酸処理血球に結合させることにより IA reactive な cell を得ることに成功した。また C₄ をトリプシンで処理することにより得られた C₄ フラグメントの一部でも同様のことが認められた。最近 EAC_{4,3} のみの IA reactive な cell が得られたとの報告がみられたが¹¹⁾、C₄ site の数が増すと C₃ を非常によく検出できるようになる。すなわちごく少量の C₄ でも IA reactive となる。このことは C₄ 分画中にわずかに C₂, C₃ が混入していても溶血反応や沈降反応では検出できないが IA では検出可能であり、その危険も大きい。一方 C₄ が IA に何らの影響を与えているのではないかという考えも否定できない、しかし、C₄ がなくても C₃ のみで IA が起こることは確かである。マクロファージ、顆粒白血球などには¹²⁾、IgG と結合する site があり、IgG による感作血球とこれらの細胞を混合すると IA とまったく区別できない凝集像を示す。しかし、この IgG と結合する site は次の点で IA レセプターと異なっている。蛋白質分解酵素によって分解されず、IgM とは反反せず遊離の IgG により阻害を受ける、反応には補体を必要とせず、ヒト赤血球上には検出されない、などである。両者とも細胞のマーカーとして用いうる。

文 献

- 1) NELSON, R. A. JR., 1963: Science, 118, 733.
- 2) NISHIOKA, K. and LINSKOTT, W. D., 1963: J. Exp. Med., 118, 767.
- 3) GIGLI, I. and NELSON, R. A. JR., 1968: Exp. Cell Res., 51, 45.
- 4) 吉田孝人, 今井邦之, 関根輝彬, 西岡久寿弥, 1969: 第6回補体シンポジウム, 日本網内系学会誌, 19, 144.
- 5) 吉田孝人, 1969: アレルギー, 18, 199.
- 6) HUBER, H., POLLEY, M. J., LINSKOTT, W. D. and MÜLLER-EBERHARD, H. J., 1968: Science, 162, 1281.
- 7) JOHNSON, H. M., PEELER, J. T. and HALL, H. E. 1968: J. Immunol., 101, 868.
- 8) TAMURA, N. and NELSON, R. A. JR., 1968: J. Immunol., 101, 1333.
- 9) SEKINE, T., MAYUMI, M. and NISHIOKA, K., 1968: 第5回補体シンポジウム.

- 10) OKADA, H., KAWACHI, S. and NISHIOKA, K.: B. B. A. in press.
- 11) COOPER, N. R., 1969: Science, 165, 396.
- 12) HOWARD, J. G. and BENACERAF, B., 1966: Brit. J. Exp. Path., 47, 193.

藤原道夫 (東大・医科研): 1) 私の行なった elimination test で抗原が非常にすみやかに体外に排除される例で, radioimmuno-electrophoresis で調べる範囲で抗体的みしかみつかからない例があったが, これをどのように解釈されるか。2) マウスの系で (マウスの血球や, マウスのリンパ球など) IA という現象が起こるのか。3) IA receptor を考える根拠は何か。

答: 1) IA のみが elimination の唯一のメカニズムであることは考えられないこと, radioimmuno-electrophoresis でつかまらない程度の抗体でも生体内で有効に働くのではないかと考えられる。2) マウスでも白血球, マクロファージなどは IA をおこすが, 赤血球, リンパ球はおこさないようである。3) pH イオン強度などの影響を受けにくく, C_0 がなければまったく反応しない, もっている細胞が明らかに別れていることから考えてレセプターが存在するものと思う。レセプターでないとするとなどのような状態が考えられるのでしょうか。

マウス腹腔内のマクロファージ-マクロファージ, マクロファージ-リンパ細胞間のブリッジ 形成反応と抗体産生

横室 公三, 木村 義民 (日医大・微生物・免疫)

緒 言

生体内における細胞間の情報伝達に極めて重要な生物現象である。遊走性とその著明な貪食能に特徴を持つマクロファージに関しても、マクロファージ-マクロファージ、マクロファージ-リンパ細胞間にいわゆるブリッジ形成、アイリット形成と呼ばれる現象が認められ^{1,2,3,4)}、マクロファージに付着したリンパ細胞の¹⁴C-チミジンのとり込みが著しく亢進する⁵⁾ことと併せて考え、この現象を免疫現象の一過程と考えるものが多くなってきた。

われわれはこのような細胞相互の関連を形態学的に観察するとともに、関連細胞の機能変化をリンパ節細胞の抗体産生能を示標として検討し生体内における細胞間の相互作用を追求した。

抗体産生にマクロファージが関与するという報告は、FISHMAN⁶⁾を始めとし、多くの報告⁷⁻¹²⁾があり、マクロファージが抗体産生に対して抑制的に働くというPERKINS and MAKINODAN,¹³⁾ COHN, Z. A.¹⁴⁾等の報告と対立しており、抗体産生場におけるマクロファージの役割を明らかにすることは重要なことと思われる。

材料および方法

動物: C₅₇H 系マウス♀, 8週令

腹腔細胞の培養と観察: でん粉注入72時間後のマウス腹腔細胞を集め、培養ビン中のカバーガラス上に播種、0~4°C で接着させる。30分後付着せずに浮遊している細胞を培養液と(LE)ともに除去した後よく洗滌し、培養液を加え、37°C, 5% CO₂ 添加空气中で培養し、マクロファージ相互の関係を観察した。マクロファージ-リンパ節細胞間の関連を観察するためには、さらにリンパ節細胞を添加した。観察は培養下、あるいは1.25%グルタルアルデヒド¹⁵⁾固定後に行なった。

³H-ウリジンによる腹腔細胞の特徴: カバーガラスに

付着した腹腔細胞を³H-ウリジンで標識後、よく洗滌して遊離のウリジンを除去し、さらに無標識の腹腔細胞あるいはリンパ節細胞を添加培養し、標識粒子がブリッジを介して無標識細胞へ移入するのをオートラジオグラフィで観察した。

Primed LNC-¹LNC²の作製: 前記の方法で刺激誘発したマウス腹腔細胞3匹分を培養液(Hanks液)で採取し、溶解ヒツジ赤血球抗原を加えて、37°C, 30分振盪貪食させた。このものを培養ビンに播種接着させ、遊離抗原および浮遊細胞を除去、よく洗滌し、リンパ節細胞を添加、37°C 5% CO₂ 空气中で5時間培養後、培養ビンを振盪しリンパ節細胞を浮遊させ、このリンパ節細胞をPBSで充分洗って、primed LNC-¹LNC²とした。

⁶⁰Co 照射マウスへの細胞移入: 24時間前に⁶⁰Coで700レントゲン照射したマウスの尾静脈に骨髓細胞とともに¹LNC²を注入した。

抗体産生細胞の算定: 脾臓の抗体産生細胞数をJERENの直接溶血ブラック法¹⁶⁾で算定した。

IgM memory cellの算定: SERCARZの方法¹⁷⁾に従って、¹LNC²移入のみによって生じる脾臓中の溶血ブラック数をA、抗原の再刺激を行なったもののそれをB、再刺激抗原のみ静注した場合をCとすれば、IgM memory cell 数はB-(A+C)で表わしうる。

結 果

I 細胞間相互の形態学的観察

1. マクロファージ細胞間のブリッジ形成

写真1: 培養後3時間、培養下の観察、拡大400倍、マクロファージ細胞3個と小型腹腔細胞1個とが細いブリッジで結ばれている。十数分後、ブリッジは切れて各々の細胞は分離し、異なった方向に移動して行なった。

2. マクロファージ細胞間の網状構造

写真2・3: 腹腔細胞培養後3時間、ギムザ染色 拡大

400倍。(写真2)を位相差顕微鏡で観察すると細胞間には普通の検鏡方法では認められなかった著明な網状構造を認める(写真3)。

写真4・5・6:腹腔細胞培養後3時間 ギムザ染色 拡大1000倍 位相差顕微鏡による観察 普通の検鏡によって認められなかった網状突起がリンパ様細胞にも認

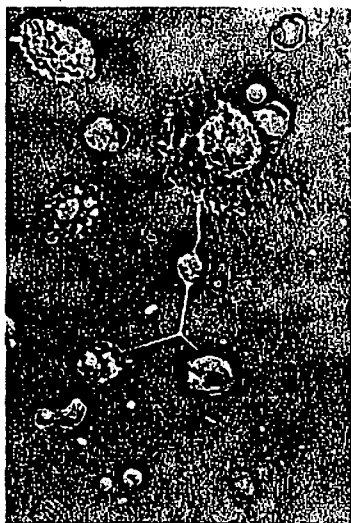


写真 1

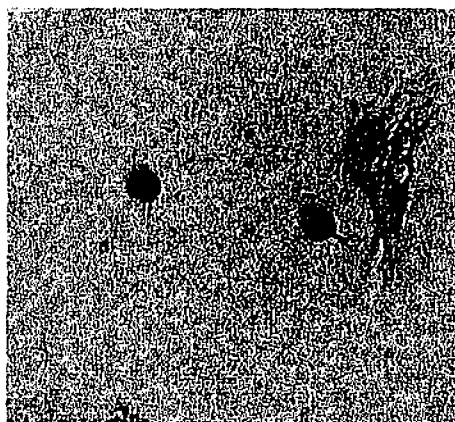


写真 4

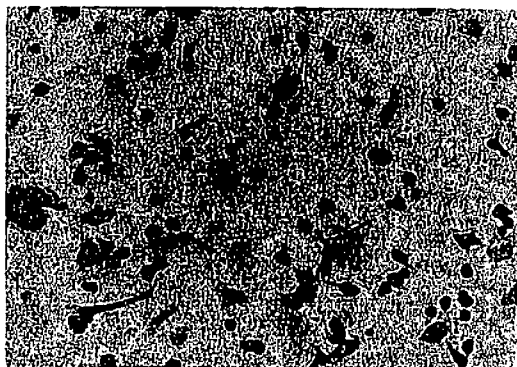


写真 2

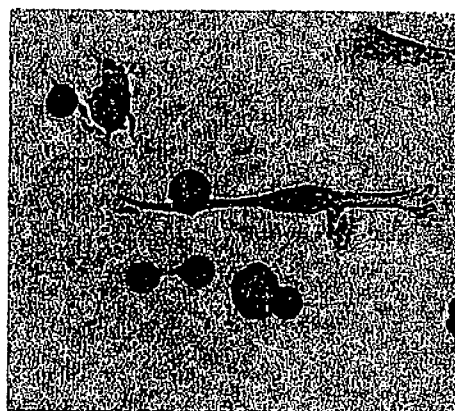


写真 5

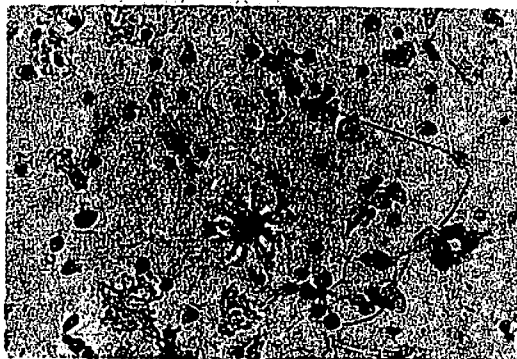


写真 3

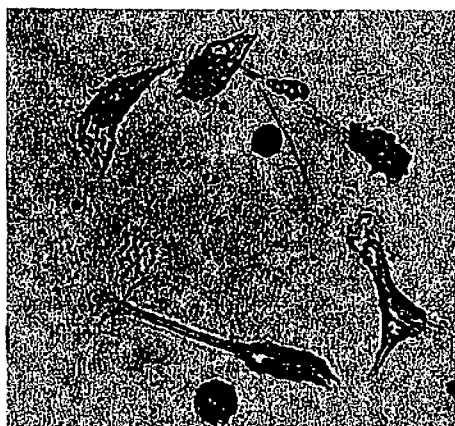


写真 6

められ(写真4)互いに連絡し合ったり(写真5)マクロファージ様細胞に由来すると思われる網状構造と接合したり(写真6)する像を認める。

3. マクロファージ様細胞とリンパ節細胞間のブリッジ形成

写真7：マクロファージ様細胞播種後ただちにリンパ節細胞を添加，培養3時間後，グルタルアルデヒド固定，拡大1000倍

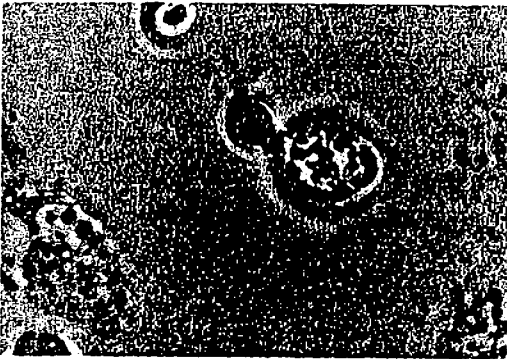


写真 7

マクロファージ様細胞とリンパ節細胞はいわゆるウロボッドで連絡している。カバーガラスを圧迫すると両細胞の位置は変るがウロボッドの連絡には変化がない。

4. ブリッジ内の細胞質流動

写真8・9：腹腔細胞培養3時間，培養下の観察，拡大400倍

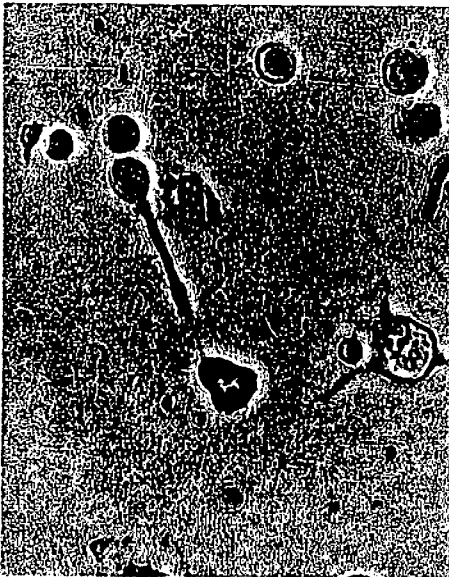


写真 8

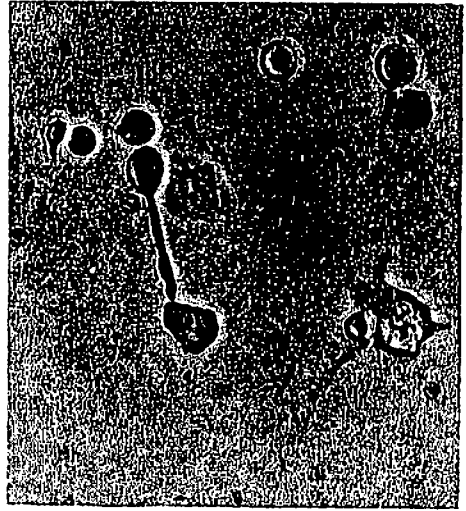


写真 9

大400倍

ブリッジの膨大部が一方の細胞から他方の細胞へと移行し，ブリッジ内部に細胞質流動があると考えられる。

5. ^3H -ウリジン標識物質のブリッジを介しての移入

写真10： ^3H -ウリジン標識マクロファージ様細胞と無標識マクロファージ様細胞のラジオオートグラフィー，拡大1000倍。

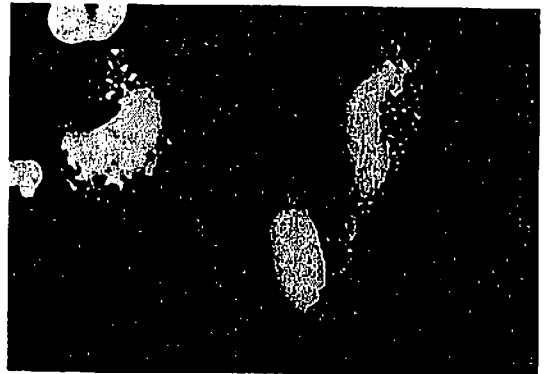


写真 10

^3H -ウリジンで標識された粒子がブリッジを介して無標識細胞の細胞質内に移行している。

写真11： ^3H -ウリジン標識マクロファージ様細胞と無標識リンパ節細胞のラジオオートグラフィー 拡大1000倍

標識された粒子がマクロファージ様細胞のブリッジを介して無標識リンパ節細胞に到達している。

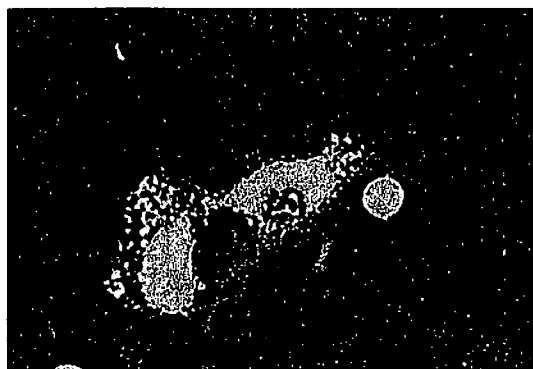


写真 11

II 関連細胞の機能的変化

1. 抗原の再刺激の時期と IgM memory cell 数

‘LNC’ 注入後再刺激を行なう時期と溶血ブラックを算定する時期を検討したのが表1である。IgM memory cell 数の著しく多いのは、3・4系と5・3系であるが、3・4系では再刺激抗原のみの処理の場合にも多数の溶血ブラックを生じ、かつその数の変動の激しいことから、以後の実験では5・3系を用いた。

表1 Influence of the days between ‘LNC’ or SRBC injection and assay on the establishment of IgM memory.

Days between ‘LNC’ injection and assay	Kind of cell	X*1 (days)	Y*2 (days)	Plaques Spleen	Memory cells
6	‘LNC’	3	3	13	---
	‘LNC’	—	—	37	
7	‘LNC’	3	4	3811	1591
	‘LNC’	—	—	196	
	‘LNC’	—	4	2024	
7	‘LNC’	4	3	267	197
	‘LNC’	—	—	37	
	‘LNC’	—	3	33	
7	‘LNC’	5	2	156	—
	‘LNC’	—	—	—	
	‘LNC’	—	—	—	
	‘LNC’	5	3	1207	1047
	‘LNC’	—	—	40	
	‘LNC’	—	3	120	

*1 Days between ‘LNC’ and SRBC injection

*2 Days between SRBC injection and assay

2. 溶解 ‘LNC’ を用いた場合の影響

‘LNC’ 中の遊離抗原の影響を検討する目的で、 3×10^7 個の ‘LNC’ を溶解し腹腔内に注入する一方、同数の正常リンパ節細胞を静注した結果が表2である。

凍結融解、あるいは音波処理いずれの方法でも融解した ‘LNC’ では memory cell がほとんど生じないこと

が明らかとなった。このことから memory cell は生きた ‘LNC’ によって生じ、‘LNC’ 中の遊離抗原によるのではないことが証明された。

表2 Effect of injection of lysed ‘LNC’ on the establishment of IgM memory

No. of memory cells	Lysed ‘LNC’	Living ‘LNC’
	Freeze and dissolve, repeat 5 times	Sonication for 15 min
	0(0%)	21(1.7%)
		2119(100%)

3. 培養マクロファージ剥離の影響

‘LNC’ 作製の過程で抗原を貪食したマクロファージが剥離混入する可能性は否定できない。そこで、培養マクロファージから遊離抗原を除去後、0時間、4時間、5時間にリンパ節細胞を添加し培養マクロファージと接触する時間をそれぞれ5時間、1時間、0時間とした。接触時間以外はいずれも同様操作で ‘LNC’ を作製したにもかかわらず、短時間接触では IgM memory cell は生ぜず、抗原貪食マクロファージの剥離による影響は否定される(表3)

表3 Effect by the change of incubation time of LNC and Mφ* on establishment of IgM memory.

Incubation time of LNC and Mφ*	No. of IgM memory cells
5 hrs	416(100%)
1	0 (0%)
0	0 (0%)

* Macrophages which phagocytosed lysed SRBC.

4. 培養マクロファージの細胞内消化の免疫原性におよぼす影響

マクロファージに貪食されたヒツジ赤血球の免疫原性が培養時間とともにいかなる変化をうけるかを検討した。培養マクロファージから遊離抗原を洗滌除去後、0時間、2.5時間、5時間にリンパ節細胞を添加し、各々5時間培養した。抗原除去後直ちにリンパ節細胞を添加した群の memory cell 数に比し、2.5時間後添加群では23.9%の減少を示し、5時間後添加群では memory cell は全く生じなかった。

5. 移入 ‘LNC’ 数と IgM memory cell 数

移入 ‘LNC’ の細胞数と memory cell 数との関係を検討する目的で 3.0×10^7 個から 3.0×10^8 個までの種々

の数の 'LNC' に全移入細胞数が 3.0×10^7 個になるように正常 LNC を加えて静注した。図 1 のように memory cell 数は移入 'LNC' 数の関数として表わしうることが明らかとなった。

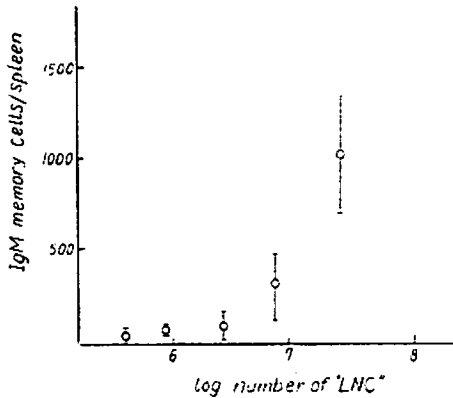


図 1 Relation between number of injected 'LNC' and of IgM memory cells

考 察

細胞間のブリッジ形成とその意義に関する報告は多数あるが^{1-3,11)}、貪食能をもった細胞の場合には、それが情報伝達として意義をもつものであるか、あるいは単に貪食へ移行するものであるかを固定標本の上で物質移入によってのみ決定することは困難である。われわれは培養下で継続的に観察することによって、ブリッジを形成したマクロファージ-マクロファージ、あるいはマクロファージ-リンパ節細胞が一定時間後に分離移動して行くこと、ブリッジ内に cytoplasmic flow が認められること、RNA の移入がありうる等からこのような形式の情報伝達もありうることを明らかにした。

ギムザ染色標本を位相差顕微鏡で観察することによって始めて認められる網状構造は、ヘパリン 10 単位を添加しても完全に抑制されぬことから、腹水中のフィブリンのみでなく、腹腔細胞自身に由来するものも存在すると思われ、これが contact guidance¹²⁾ 等の機作によって細胞相互の接合率を充めていると思われる。

FORD¹³⁾ らは ^{60}Co 照射ラットに 'LNC' を移入するのみで、抗体産生に成功しており、われわれの再刺激が必要であるのと異なった結果を得ている。この点に関しては、実験に用いた動物の過去におけるヒツジ赤血球抗原との接触の有無、動物種の相異等によると思われる。

IgM memory cell 産生に溶解 'LNC' が無効である点は FORD¹³⁾ らの結果と一致する。また 'LNC' 中に混

在する遊離抗原によるのでないことは、抗原の注入経路が静注の場合と経腹腔の場合で免疫応答に著明な差が認められないこと²⁰⁾を考慮にいれば明らかである。

マクロファージの抗体産生における役割は貪食された抗原の細胞内での修飾による免疫原性の変化と深く関係している。PERKINS and MAKINODAN¹³⁾、COHN¹⁴⁾ 等はマクロファージ内にとりこまれた抗原は免疫原性を減弱するといひ、FISHMAN⁹⁾、GOTTLIEB ら²¹⁾、ASKOŃAS ら⁸⁾ などは増強すると報告している。一方 MITCHISON¹⁰⁾ は、抗原の種類によって増強する場合と変らぬ場合があると述べている。われわれはマクロファージ内でヒツジ赤血球がその免疫原性を次第に減弱することによって、マクロファージが抗体産生に抑制的に働く面と、抗原情報を immunological competent cell に能率よく移入することによる促進的な面があることを明らかにした。このような二面性がマクロファージの抗体産生における役割を混乱させる一つの原因と考えている。

要 約

1. マウスの腹腔内マクロファージ、マクロファージ-リンパ節細胞間にブリッジを介して物質の移入のあることを、オートラジオグラフィーを用いて明らかにした。

2. マクロファージ間に、検鏡方法を変えることによって、ブリッジ以外に著明な網状構造を認めた。

3. ヒツジ赤血球を貪食したマクロファージとリンパ節細胞を培養し、リンパ節細胞のみを ^{60}Co 照射マウスに移入した所、多数の IgM memory cell を作りえた。

4. IgM memory cell の数はこの移入リンパ節細胞数と関数関係にあり、溶解リンパ節細胞では全く効果がない。

5. マクロファージにとりこまれたヒツジ赤血球の免疫原性は細胞内で次第に減弱する。

6. 以上の結果からマクロファージは抗原情報を能率よく immunological competent cell に伝え、抗体産生を促進する面と、貪食抗原の免疫原性を細胞消化によって減弱するという抑制面を持つことを明らかにした。

終りにのぞみ本研究を終始御指導、御支援下さいました京都大学ウィルス研究所、野島徳吉教授に深く感謝致します。

(なお本研究の一部は第20回日本細菌学会関東支部例会昭和42年6月、において発表した。)

文 献

- 1) ARONSON, M., 1963: J. Exp. Med., 118, 1083.

- 2) MACFARLAND, W., HEILMAN, D. H. and MOREHEAD, J. F., 1966: J. Exp. Med. 124, 851.
- 3) SCHENBERG, M. D., MUMAW, V. R., MOORE, R. D. and WEISBERGER, A. S., 1964: Science, 143, 964.
- 4) SHARP, J. A. and BURWELL, R. G., 1960: Nature, 189, 474.
- 5) CLIN, M. J. and SWETT, V. C., 1968: J. Exp. Med., 128, 1309.
- 6) FISHMAN, M., 1959: Nature, 183, 1200.
- 7) FRIEDMAN, H. P., STAVISKY, A. B. and SOLOMON, J. M., 1965: Science, 149, 405.
- 8) ASKONAS, B. A. and RHODES, J. A., 1965: Nature, 205, 470.
- 9) FELDMAN, M. and GALLILY, R., 1967: Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, 32, 415.
- 10) MITCHISON, N. A., 1969: Immunology, 16, 1.
- 11) MOSIER, D. E., 1969: J. Exp. Med. 129, 351.
- 12) PIERCE, C. W., 1969: J. Exp. Med. 130, 345.
- 13) PERKINS, E. H. and MAKINODAN, T., 1965: J. Immunology, 94, 765.
- 14) COHN, Z. A., 1964: J. Exp. Med. 120, 869.
- 15) COHN, Z. A., 1966: J. Exp. Med. 124, 557.
- 16) JERNE, N. K. and NORDIN, A. A., 1963: Science, 140, 405.
- 17) SERCARZ, E. E. and BYERS, V. S., 1967: J. Immunology, 98, 836.
- 18) WEISS, P., 1965: Exp. Cell Res. Suppl. 8, 260.
- 19) FORD, W. L., GOWAN, J. L. and McCULLAGH, P. J., 1966: Ciba Foundation Symposium: The Thymus, Experimental and Clinical Studies (Ed. by G. E. W. Wolstenholme, and R. Porter,) p. 58, Churchill, London.
- 20) DRAPER, L. R. and SUSSDORF, D. H., 1957: J. Infect. Disease, 100, 147.
- 21) GOTTLIEB, A. A., GLISIN, V. R. and DOTY, P., 1967: Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 57, 1849.

三橋 進(群大・医・微生): 抗原刺激を受けたマクロファージとリンパ球をまぜると、リンパ球が芽球化するというわれている。このプラスト化が免疫反応に大切であることも予想される。貴方の仕事の中でリンパ球がどの位芽球化したかをチェックしたか。例えば別の抗原で刺激したマクロファージとリンパ球をまぜ貴方のいう primed のリンパ球を動物に入れ、血球で刺激するというコントロールは必要ないだろうか。

答: 貪食細胞の存在がリンパ球の芽球化に影響を与えるという報告は多数あるがいずれも両者を長期間混合培養したもののものである。われわれの場合は、極めて短時間であるので影響は少ないのではないかと考えているが、現在、移植抗原の場合について検討中である。貪食抗原と再刺激抗原との特異性については、検討の必要性があると考えている。

木下喜博(大市大・医・生理): 1) viable な状態のマクロファージやリンパ球を、みごとに顕微鏡写真でとらえているが、特別な手技を用いて観察されていると推察される。そのヒケツをお教え願いたい。2) ヒツジ赤血球を貪食したマクロファージを *in vitro* で5時間インキュベートしたものはブラック形成の活性低下が著しいという結果の解釈で、マクロファージによるヒツジ赤血球の免疫原性の破壊を主原因とされているが、マクロファージの *in vitro* での培養時間延長による機能低下が主因であると考えられないか。

答: 1) マクロファージの付着したカバーガラスを細胞面を下にして穴あき小角にはりつけ、培養下で、位相差顕微鏡によって観察した。2) われわれの実験系では、マクロファージを10時間以上培養しても、抗原の貪食を示標としてみた場合、その機能はほとんど変っていない。

免疫生物学研究会
シンポジウム3,
45~52 (1969, 大阪)

マクロファージの免疫反応

三橋 進・大沢 伸孝・斉藤 和子 (群馬大・医・微生物)

かつて、ヒトの細菌感染症の中では、チフス症は罹患率が高く、死亡率が高いことから注目されていた疾患であった。したがって、当然、この疾患の予防を目的とする研究は1900年の初め頃活潑に行なわれ実験用小動物とサルモネラグループの組み合わせの実験が試みられた。

TOPLEY¹⁾, JENSEN²⁾, LEE³⁾ などとともにわが国の故小林六造教授もその中心的な研究を進めたグループであった。小林教授が明らかにした結果を要約すると次のようにまとめられる。

(1) ヒトにチフスをおこす *S. typhi* のマウス、ウサギ、ラットなどに対する病原性は著しく低い。これに反し *S. typhimurium*, *S. enteritidis* のマウスに対する病原性は著しく高い。すなわち感染症の実験において host-parasite の重要性を強調した。

(2) 弱毒生菌免疫はすぐれた感染死防御効果を示すが、死菌ワクチンは血清抗体価の上昇をうながすにもかかわらず感染死防御効果を示さない。

(3) 弱毒生菌免疫動物の血清中には、感染死防御を説明することのできる抗体は証明されない。

したがって、これに対し小林らは、実験チフス症における弱毒生菌免疫は、おそらく組織性であろうと推論した⁴⁾。

われわれも本研究の細菌感染症における意義に着目し、1954年以降この研究に従事しており、マウス対 *S.*

enteritidis の系を用いこの研究をスタートした。まもなく、弱毒生菌ワクチンの効果を確認することが出来たが、弱毒生菌の感染死防御能は40~60% (表1) であることを知った。この程度の免疫ではこの後個々のマウスの個体ごとに、さらに進んで細胞レベルで防御の本体を追うためには不十分であることに気づき次の免疫方法を採用した。

(1) *S. enteritidis* 弱毒株 10^{-3} mg 投与3週後に *S. enteritidis* 強毒株 10^{-1} mg を追加する。

(2) *S. enteritidis* 強毒株 10^{-1} mg を与えたのちカナマイシンを投与し臓器内の菌数のコントロールを行なうと6週後に強い免疫が得られる。これらの動物は安定した感染死防御力を示し、*S. enteritidis* 強菌株の1000 MLD の静注攻撃にはほとんど100%耐過する。このようにしてはじめて安心して免疫終了後の動物を一匹一匹解析することができるようになった (表2)。

表2 *S. enteritidis* 生菌および死菌ワクチンの感染死防御能

免疫方法	使用マウス	攻撃量 (MLD)	生存率 (%)
生ワクチン	10^{-3} mg 弱毒株 + 10^{-1} mg 強毒株	200	100
	10^{-3} mg 強毒株 + カナマイシン治療	179	99
死菌ワクチン	加熱死菌ワクチン	50	0
	ホルマリンワクチン	50	0
	クロームワクチン	50	10
		20	0

1マウス MLD は 3×10^5 生菌、 10^{-4} mg (乾燥菌体) に相当する

弱毒株: *S. enteritidis* SER

強毒株: *S. enteritidis* 116-54

先にのべたように死菌免疫では抗O抗体価や抗H抗体価を示すにもかかわらず、強毒菌の攻撃に対し対照に比し僅かに生存日数の延長が見られるがすべてのマウスは死亡する。われわれはこのようにしてつくられた強力生菌免疫マウスを用いて実験をはじめ、免疫マウスの血清中に感染死防御の主役を演ずる因子のないことを知ることができ、小林らのいう“組織性免疫”の実態を知る研

表1 *S. enteritidis* 弱毒株 (SER) による生菌免疫マウスの感染死防御能

使用マウス	生存マウス	生存率 (%)
945	502	53.4 ± 10.4^a
597	335	57.2 ± 12.9^b
96	62	64.5 ± 14.0^c
434	223	51.3 ± 12.7^d

攻撃には *S. enteritidis* 116-54 の 10^{-1} mg (10 MLD) の静注攻撃を用いた。

a) 1956~1960年9月までの105回の平均値

b) 1960年10月~1961年10月までの25回の平均値

c) 1961年11月~1961年12月までの10回の平均値

d) 1964年11月~1965年3月までの24回の平均値

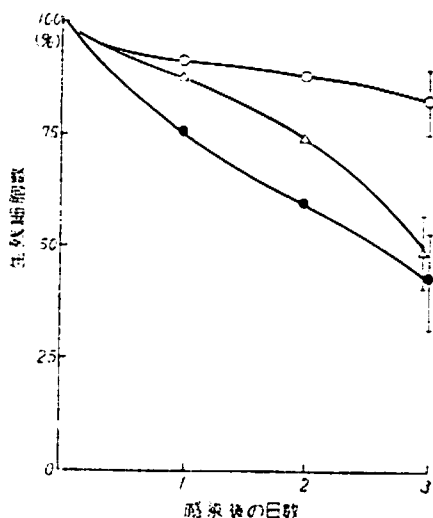
究方向にむかった。

病理学的解析から生菌免疫の主な姿は細網内皮系細胞に富む臓器におけるチホーム形成に関与する細胞にあることが明らかで、腹腔感染においてもこの感染の主役は腹腔マクロファージであることが予想された⁹⁾。

戦後組織培養法の発達によって *in vitro* において細菌感染が細胞レベルで観察することが可能になり、最初に BCG 免疫モルモットと結核菌の研究が米国で行なわれた⁷⁾。

この培養法を採用して、われわれはすぐにマクロファージの培養法としては不適當であることに気づいて、マウスの腹腔マクロファージの培養法に研究を集中した。多くの失敗を経たのち、静置培養法でこれを1週間程度培養できて、細胞感染の実験に供し得るようになった。この方法を用いて、強力生菌免疫マウスの腹腔マクロファージに *S. enteritidis* 強毒株を感染させると、菌体は縮少し細菌の増殖がおさえられる。これに対照動物由来の正常マクロファージあるいは死菌免疫マウスマクロファージに *S. enteritidis* を感染させると、菌は細胞内で増殖し遂には細胞はガラス面から剥離し脱落する (図1, 2)。この現象をマクロファージの細胞性免疫と名づけた⁹⁾。この細胞性免疫には免疫血清抗体を外部から加えることを必要としない。生菌免疫マウスと死菌免疫マウ

スの病理組織像については小此木らのすぐれた報告がある¹⁰⁾。



○—○ 強力生菌免疫マウス由来のマクロファージ
△—△ 死菌ワクチン免疫マウス由来のマクロファージ
●—● 正常マウス由来のマクロファージ

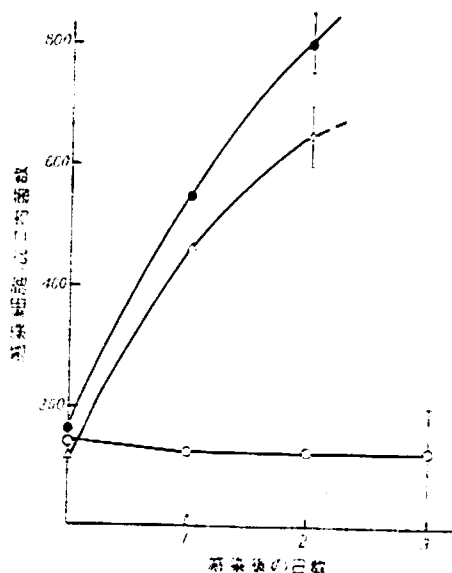
図2 免疫マウス、正常マウス由来のマクロファージにおける *S. enteritidis* 感染後の細胞数の変化

サルモネラ感染症でみられたこのような細胞免疫は結核症^{7,10)}、ブルセラ症¹¹⁾、野兔病¹²⁾、リステリア症¹³⁾などのごとき細胞親和性細菌に起因する感染症で見られている。

細胞性免疫の本態

われわれの研究でサルモネラ症において免疫マクロファージから細胞抗体の抽出が可能になった。NELSON および西岡^{14,15)}らの Immune Adherence hemagglutination 法によって腹腔浸出細胞に *S. enteritidis* に対する抗体が見出された。尿素を用いて抽出すると、この抗体はマクログロブリンに属する。この抗体は死菌で吸収されず、リゾチムと補体との共同作用で強毒菌の発育をおさえる作用があることが明らかにされた¹⁶⁾。

先に述べたマクロファージの示す細胞抵抗が、免疫マクロファージで証明されたこの抗体によって、すべて説明がつくか否かはさらに次の解析が必要である。なお免疫動物の腹腔マクロファージにおそらく19Sに属すると思われる抗O抗体のあることは牛場¹⁷⁾によって証明され、この抗体は菌の clearance に重要な働きをすることが報告されている。



○—○ 強力生菌免疫マウス由来のマクロファージ
△—△ 死菌ワクチン免疫マウス由来のマクロファージ
●—● 正常マウス由来のマクロファージ

図1 免疫マウス、正常マウス由来のマクロファージ内の *S. enteritidis* 強毒株の増殖態度

免疫伝達因子

実験サルモネラ感染症において、免疫終了後の抗感染抵抗の持続は極めて長期にわたって観察され¹⁹⁾、繰り返し同じマウスの腹腔から採取した腹腔マクロファージに細胞免疫がみられることから¹⁹⁾、われわれは免疫の全身細胞へのひろがり、あるいは免疫の新生細胞へのうけわたしになんらかの因子の介在していることを予想していた。1961年われわれは生菌免疫マウスマクロファージの培養液中に細胞免疫を他の細胞に伝達する因子 (Transfer Agent: TA) のあることに気づいた。RNA 分解酵素で失活し、DNase, 蛋白分解酵素に抵抗を示すことから RNA 性のものであることが推論された^{20, 21)}。この物質は更に免疫の完成した動物の脾、腹腔浸出細胞、あるいは *in vitro* で抗原と接触したマクロファージからも得られる²²⁾。同年、FISHMAN も腹腔浸出細胞と抗原を *in vitro* で混合し、一定時間後にフェノール抽出した RNA 画分に抗体産生をひきおこす因子のあることを報告した。

われわれはこの免疫伝達因子 (免疫 RNA) と培養された細胞を用いた実験でマクロファージを抗体産生系の一員に加え得る可能性のあることを述べたい。

in vitro における抗体産生

マクロファージには形態学的に次の特徴がみられる。(1) 大きい一つの核と細胞質に富んだ細胞で、(2) 培養するとガラス壁にはりつき、(3) 貪食能をもち細菌や炭素粒子をとりこみ、(4) lysosomal enzymes 活性が高い。なお、この他に cytophilic antibody をつける receptor が発達している。特に 7S γ をつけることが、モルモットのマクロファージの細胞表面に知られている。われわれの用いたマウスの腹腔マクロファージも IgG をつけることが証明された (未発表)。リンパ球もフィトヘモアグルテンや抗原刺激をうけたマクロファージと接触すると細胞の若返りをおこす現象が知られている。リンパ球は、その経過の中で貪食能が認められるが、cytophilic antibody をつける receptor はないとされている。以上のことからわれわれが *in vitro* で用いたマクロファージ集団がどの程度に純粋であるかが問題となる。これまでの諸外国の研究でもこの点を強く問題にした研究は少ないように思われる。さいわい、マクロファージは培養するとガラス壁に固くはりつき性質がある。培養12時間後に培養液を交換する際、かなり強く液を振盪してガラス壁にはりついていない細胞を洗い出すことが出来る。このようにして、培養12時間と24時間

に2度の培養液交換をすることによって、形態学的にはほとんど98~100%に純粋なマクロファージ集団が得られる。さらに、この細胞集団における細菌やカーボン末 (ペリカンインク) の貪食能を検査すると、100%の細胞に貪食能のあることが証明された (写真1)。

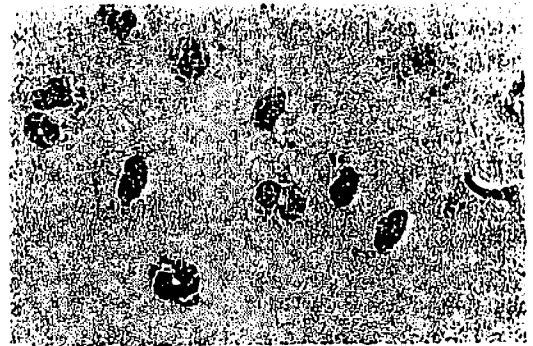
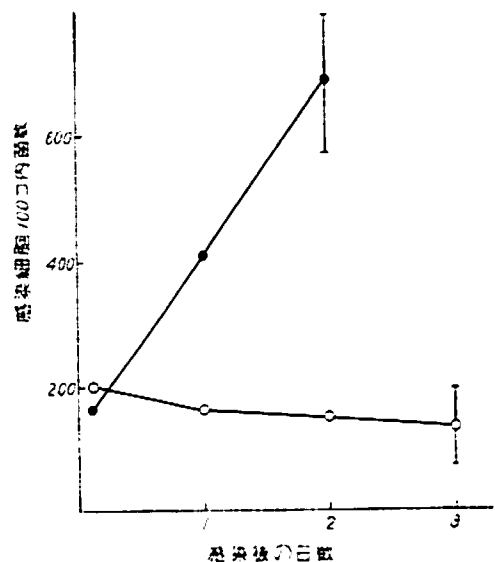


写真1 マクロファージの細菌貪食像を示した

以上のような状態のマクロファージ集団を用いて次の実験を行なった。

(1) *S. enteritidis* 感染免疫

強力生菌免疫の成立したマウスの腹腔細胞、あるいは脾から免疫伝達因子を抽出し、*in vitro* に培養されたマクロファージに、TA を 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で3日間作用させたのちに *S. enteritidis* 強毒株を食菌させ、日を迫って細胞内の菌の増加を観察した。図3に示されるよ



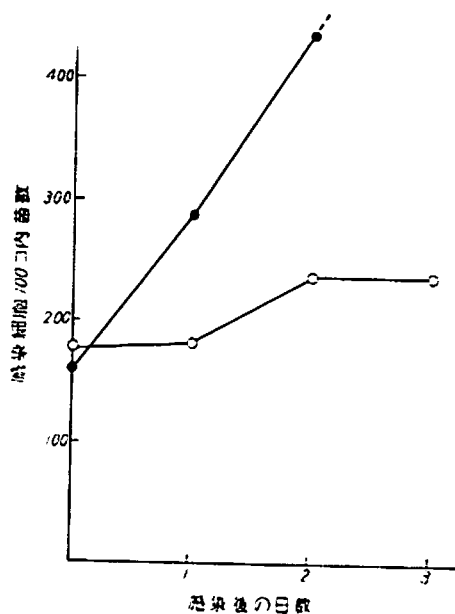
○ 正常細胞に TA 処理
● 正常細胞 (対照)

図3 *In vitro* における TA による細胞性免疫の伝達

うに、免疫を与えられた正常細胞内で強毒菌の発育はおさえられる。これに反し、正常細胞内では強毒菌は増殖し細胞は破壊される。

(2) *S. enteritidis* を抗原として diffusion chamber 法を利用した実験

diffusion chamber 内にマクロファージを入れ、*S. enteritidis* のストレプトマイシン依存菌を感染させた。3日後にさらに強毒菌を感染させた。この diffusion chamber をあらかじめ培養しておいた正常マクロファージの培養ビンにうつし、3日間同時培養を行なった。3日後 diffusion chamber を除き、培養ビン内のマクロファージに強毒菌を感染させ、その抵抗性を調べた。同時培養を行なったマクロファージに抵抗の増加が認められ、細胞内の菌増殖を阻止した(図4)。対照として chamber 内にマクロファージを入れないで菌のみを加えたものを正常マクロファージと同時培養しても、マクロファージが抵抗性を獲得することはなかった²²⁾。



○—○ 正常細胞を感染細胞と同時培養
●—● 正常細胞を *S. enteritidis* と同時培養
図4 *In vitro* における Diffusion chamber との同時培養による細胞性免疫の発現

diffusion chamber 内で感染を受けたマクロファージが産生する物質は RNase で不活性化されることから免疫伝達因子と考えられる。

このようにして感染マクロファージと同時培養されたマクロファージには IAHA 法 (Immune Adherence

Hemagglutination) で抗体が見いだされ(図5)、この抗体も補体とリゾチームとの共同作用で *S. enteritidis* 生菌の増殖をおさえる。

反応に用いた細胞	抗体価 反応に用いられたマクロファージ数 (×10 ³)			
	10	5	25	125
正常マクロファージと感染細胞を同時培養				
正常マクロファージ				

図5 *In vitro* における細胞抗体の発現 (Immune adherence hemagglutination : NELSON, 1957 による)

(3) 血球を抗原とした場合

マウスをウマ血球で免疫し、抗体の産生された動物の腹腔からマクロファージを取り出し、これを培養し純粋な細胞集団を集める。このようにして得られたマクロファージに、抗原として用いたウマ血球を加えると、抗体をもつ細胞表面にヒマワリの花のように附着したロゼット (rosette) を形成する(写真2)。この反応は特異的

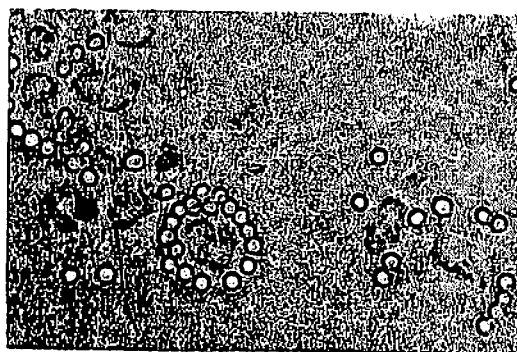


写真2 ロゼット陽性マクロファージ

である。これを *in vitro* の系におきかえるために次の実験を行なった。ウマ血球で十分な免疫を行なったマウスの脾からフェノール法で免疫伝達因子を抽出する。一方正常マウスの腹腔マクロファージを培養によって純粋に集める。このようにして得られた純粋なマクロファージ集団を、免疫 RNA の 50 mg/ml を加えた培養液で培養する。日を追ってマクロファージを培養管からはずし、ウマ血球に対するロゼット形成細胞数を観察した。表3に示すごとく、免疫 RNA で48時間処理されたマクロファージには著明な rosette-forming cell の増加がみとめられた。

表3 RNA 免疫による培養マクロファージの抗体産生

	免疫 RNA	24時間	48時間	72時間
実験1	+	1.48×10^4	2.76×10^4	2.8×10^4
	-	8.0×10^3	<64.5	10.0×10^3
実験2	+	5.9×10^3	1.6×10^4	2.2×10^4
	-	$<6.0 \times 10^3$	$<6.0 \times 10^3$	$<6.0 \times 10^3$

抗原：馬血球

培養液：30%馬血清加・ハンクス液。

ロゼット形成細胞は免疫 RNA 50 μ g/ml を与えたのち経時的に測定した。ロゼット形成細胞数は 10⁴ 個観察細胞数当りの値で示した。

この反応は抗原特異的でウシ血球を反応用の抗原とした場合、ウマ血球のそれに比し著明な差がみられた（表4）。

この粗抽出免疫 RNA は *in vitro* の実験では 12.5~25 μ g/ml が最少有効量であった（表5）。

表4 免疫 RNA による培養マクロファージの抗体産生の特異性

免疫に用いた抗原	ロゼット形成に用いる血球	ロゼット形成細胞/10 ⁴		
		実験1	実験2	実験3
馬血球	馬血球	2.5×10^4	2.43×10^4	4.6×10^4
	牛血球		$<4.3 \times 10^3$	<70
(-)対照	馬血球	2.5×10^4	$<4.15 \times 10^3$	1.5×10^4
	牛血球		$<4.38 \times 10^3$	<80

培養液：30%馬血清加・ハンクス液。

ロゼット形成細胞は免疫 RNA 添加3日後測定した。

表5 免疫 RNA による培養マクロファージの抗体産生

免疫 RNA (μ g/ml)	実験1	実験2
50	3.92×10^4 ^{a)}	1.2×10^4
25	1.01×10^4	1.06×10^4
12.5	5.6×10^3	7.9×10^3
6.25	6.0×10^3	9.0×10^3
対照	9.0×10^3	1.0×10^4

抗原：馬血球。

培養液：30%馬血清加・ハンクス液。

ロゼット形成細胞は免疫 RNA 添加3日後に測定

a) ロゼット形成細胞数は 10⁴ 個の観察細胞数当りの値で示した。

考 察

マクロファージの抗体産生の役割に関しては、抗体産

生細胞とする考えとこれを否定する考え方とがある。BURNET はマクロファージは過剰な抗原を処理して抗体産生細胞を保護する考え方を述べている。

これまでの実験から細胞親和性細菌の感染症においてマクロファージが抗感染抵抗の主役を演じていることが知られている。

一方 FISHMAN は腹腔浸出細胞（おそらくマクロファージ）が抗原と接触すると免疫 RNA が生産されることを報告している。われわれの用いた純粋に近いマクロファージ集団も、抗原と接触することによって免疫伝達因子を生産することが明らかにされた。浜岡²¹⁾も抗原抗体結合物を取りこんだマクロファージでは抗体産生に重要な役割を果たしていることを報告している。以上のことからマクロファージは抗原を取りこんで抗体産生系にいたるまでに一つの重要な役割を果たしているものと予想される。

われわれは、その役割の一つは免疫伝達因子の産生と考えている。一方、これが抗体産生細胞であるか否かについてはその細胞の純度と、示される反応が抗体を介しての免疫反応であるか否かを決定しなくてはならない。われわれがこれまで、実験サルモネラ症、血球を抗原とした実験では、常にマクロファージに菌の増殖阻止、特異的なロゼット形成がみられ、これを *in vitro* の培養細胞と免疫 RNA を用いた実験でも、菌の増殖阻止、IAHA 反応の陽性、特異的なロゼット形成が証明された。したがってわれわれは、マクロファージも生体内で抗体産生に関与する一員であると推論したい。今後われわれに残された課題としては、培養マクロファージから抗体を抽出し、免疫化学的に研究する問題、培養マクロファージの生産する抗体内にラベルされたアミノ酸をとりこませる方法などがある。一方細胞培養という技術上の壁をのりこえ、多量の細胞をいかにして実験に供するかの問題がさしせまったわれわれの問題である。

結 論

1) 免疫されたマウスから得られた培養マクロファージに免疫反応が見られる。

2) 培養マクロファージを免疫 RNA で処理すると抗感染抵抗、IAHA 反応陽性を示し、血球に対し特異的にロゼット形成を示す。

以上の結果からある種のマクロファージは生体内でも抗体産生系の一員になりうることを示唆するものと思われる。なおマクロファージは抗原を取りこんで抗体産生系にもちこむ重要な細胞であることが、ほぼ純粋に近い細胞集団を用いた実験で確かめられた。

文 献

- 1) TOPEY, W. W. C., 1929 : Lancet, 1, 1337.
- 2) JENSEN, K. A., 1929 : Immunitaet Fsch., 63, 298.
- 3) LEE, C., 1929 : J. Exp. Med., 50, 767.
- 4) 羽生秀吉, 1929 : 慶応医学, 9, 1.
- 5) KOBAYASHI, D. and USHIBA, D., 1952 : Keio J. Med., 1, 35.
- 6) 三橋 進, 1964 : 医学生物学最近の展望, 2, 17.
- 7) SUTER, E., 1952 : J. Exp. Med., 96, 137.
- 8) MITSUHASHI, S., SATO, I. and TANAKA, T., 1961 : J. Bact., 81, 363.
- 9) OKONOJI, T., FUKAI, K., MITSUHASHI, S. and KAWAKAMI, M., 1959 : Japan. J. Exp. Med., 29, 71.
- 10) FONG, J., SCHNEIDER, P. and Elberg, S. S., 1957 : J. Exp. Med., 105, 25.
- 11) POMALES LEBRÓN, 1952 : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 78, 94.
- 12) THORPE, B. D. and MARCUS, S., 1964 : J. Immunol., 92, 657.
- 13) MACKANESS, G. B. 1959 : J. Exp. Med., 116, 381.
- 14) NELSON, R. A. and WOODWORTH, H. C., 1957 : Conference on Complement, Walter Reed Institute of Research, Washington, D. C.
- 15) NISHIOKA, K., 1963 : J. Immunol., 90, 86.
- 16) KURASHIGE, S., OSAWA, N., KAWAKAMI, M. and MITSUHASHI, S., 1967 : J. Bact., 94, 902.
- 17) SAITO, K., NAKANO, N., OTITSU, F. and USHIBA, D., 1962 : Japan J. Bacteriol., 17, 797.
- 18) HASHIMOTO, H., HONDA, T., KAWAKAMI, M. and MITSUHASHI, S., 1961 : Japan. J. Exp. Med., 31, 187.
- 19) 田中徳満, 佐藤一英, 齊藤和子, 三橋 進, 1962 : 日細誌, 17, 321.
- 20) MITSUHASHI, S. and SAITO, K., 1962 : J. Bact., 84, 592.
- 21) SAITO, K. and MITSUHASHI, S., 1965 : J. Bact., 90, 629.
- 22) OSAWA, N., KURASHIGE, S., KAWAKAMI, M. and MITSUHASHI, S., 1968 : Japan. J. Microbiol., 12, 479.
- 23) JACHERTS, D., 1965 : Z. Med. Microbiol. and Immunol., 152, 1.
- 24) 浜岡利之, 1969 : アレルギー, 18, 485.

木下喜博(阪市大・生理) : 腹腔浸出細胞を5~7日培養していると顆粒球の寿命が終り、非粘着細胞のリンパ球は大部分、培養液の交換により除去される。しかし問題となるのは、*in vitro* の長目の培養で、そのマクロファージの性状が *in vivo* のものとはかなり違ってくる可能性があることです。この点が粘着法によるマクロファージの限界で注意されたい。

答 : 御説の通りと思う。したがってわれわれが *in vitro* でこれまでに得られた結果から、そのまま生体内で行なわれている反応と連断することには注意しなくてはならないと思う。ただ、これまで得られた結果から、マクロファージでも生体内で抗体産生の一員になりうる可能性のあることを示唆したい。

木下喜博 リンパ球からマクロファージへの転化の可能性が MAXIMOW により指摘され、これに、かなりの反論もある。しかし、この問題は免疫現象を細胞レベルから解析するのに重大である。花岡さんの御意見を聞きたい。

花岡正男(京大・ウィルス研) ヒトの小リンパ球を出来るだけ純化して、PHA を加え培養した(筒井)ときも、リンパ球はリンパ球の幼若形へ転化して再びリンパ球になってゆく。この間、リンパ胚球となったとき、一部突起を出したりして、あたかもマクロファージ様の所見をとることもあるが、実際にはリンパ球の性格を保っていた。マクロファージは種々の条件で抵抗性が強いから、少数の混入でも *in vitro* で生成して目立って来ることがありうる。

横室公三(日医大・微生物・免疫) マクロファージが抗体産生を行なうという証明のために、マクロファージに抗体を検出する方法はあまり適当な方法とは思われない。培養マクロファージに抗原を添加して抗体産生がおこるか否かの方向で検討するのがよりよい手段ではないかと思うがどうか。

答 : 今まで、ある細胞に抗原を与え、その細胞が抗体をつくったという証明があったらどうか。もしあれば御教示願いたい。ただ、ある種の腫瘍細胞でそのようなことがみられるという発表があったように記憶している。

私自身、ある細胞が抗原をとりこみあるいは抗原刺激によってその細胞自身が抗体をつくるという考えより、抗原の処理細胞と、抗体産生細胞とを、営む役割を別にするという考え方をとりたい者で、その考え方から実験を進めている。免疫 RNA を与えられたマクロファージに、これまで述べたような免疫現象と思われる反応がみられてきたが、これが免疫であるというためには、免疫化学的に進めなくてはならない多くの課題が残されている。技術上の最大の問題は、純粋なマクロファージを実験に供しうるだけ多量に集め、培養するという技術にかかっている。

尾上 薫(九大・歯・生化) : 1) 純粋な感染マクロファージ培養から cellular antibody を分離されたことがあるか。また、マクロファージを殺すような処置を行

うことにより cellular antibody が細胞外に遊離してくることはないか。

2) 死菌で免疫した場合にも、死菌に対して特異性を有する cellular antibody を証明出来るか。

答：1) 生体に抗原を与えたり、免疫 RNA を与え、その動物から集めたマクロファージに抗体を証明し、抗体を抽出したことがある。しかし、純粋に培養したマクロファージに免疫を与え、免疫反応が証明された細胞から抗体を抽出したことはない。これは実験に供しうるだけの大量のマクロファージを培養し、純化し、これを感作するという技術上の困難によるものである。

マクロファージを殺したために、抗体が外に出てくるというデータを持ちあわせてはいない。ただ試験管内で菌と混ぜあわせて、しばらく振盪すると菌体に抗体が移行することから可能性はあるように思われる。

2) 可能だと思う。抗O抗体など可能と思う。この際マクログロブリン抗体になる可能性が強いと思う。

新家荘平(阪大・微研) マクロファージの免疫活性の時期的消長と“booster”効果についての知見をえたい。

答：大切な問題を含んだ質問だが十分のデータを持ちあわせていない。

1) マウスに *S. enteritidis* の生菌免疫をすると、菌は全脾臓を培養する方法をとっても6～8カ月には消失してしまう。しかしマクロファージ免疫は、さらにそれより1カ年近くみられる。また腹腔にグリコーゲン、ペプトン水などを入れ、時をおいて繰り返し(3, 6, 8, 12, 18カ月など)誘発し、新たに分裂してくるマクロファージを調べると免疫がみられる。

2) マクロファージ免疫の成立に血球抗体にみられるようなブスター効果があるかどうか、詳しい data が無い。ただ、感じでは血清抗体にみられるようなブスター効果は、一個の細胞当りの免疫を示標とすると、ないように思われる。ただ、細胞免疫が、全身に波及するという効果はあるのではなからうか。したがってマウス個体レベルにすると、免疫が全身におよんで、ブスター効果は現われたと申されるかも知れない。詳しいデータがなく、お答えできなくて申し訳ない。

和氣 朗(予研・細菌)：マウスに腸炎菌を感染させてからカナマイシン処理する条件を聞きたい。私のバスター菌マウスの経験では、菌を感染させてから処理をはじめまでの時間が免疫の成立に関係があるようだし、菌は薬剤処理後も簡単に死なないように思う。

答：カナマイシンを利用した生菌免疫法：マウスに

1000 MLD 量 (10^{-3} mg) の *S. enteritidis* 強毒株を尾静脈から感染させる。このままでは4～6日でマウスは死亡する。カナマイシン5ミリグラムを前日に1回、感染後7回を18日まで与えると菌密度の多い脾臓で 10^3 /gにおさえられる。6週後に1000 MLD 量の攻撃すると99%のマウスはこの攻撃に耐過する。(文献 J. Bact. 93, 1534, 1967)

マウスに対する *S. enteritidis* の病原性は非常に高いがカナマイシン投与によって臓器内菌数はコントロールされる。

KM 治療の場合、早期に大量の KM を与えて治療し菌量を著しく減らすか、治療せしめてしまうと免疫の成立はよくない。感染をうけながらある期間持続させることが大切である。マクロファージ内に食菌された菌に対しては外から与えた抗生剤(SM, PC)が効きにくいことは、われわれの細胞培養の条件で経験している。

和氣 朗：腸炎菌の生菌で免疫すると成立し、死菌ですると成立せず、血球で免疫すると成立するということは、腸炎菌の生菌と血球に共通して死菌に共通しないなにかがあると考えておられるのか？

答：*S. enteritidis* の死菌で細胞に免疫が成立しないというのではなく、感染死防御の免疫が成立しないということを示しただけである。牛場教授のところでは、マクロファージに19Sに属すると思われる抗O抗体を証明しておられる。

血球を抗原とすれば血球に対する抗体がつくられることを示したので、血球と *S. enteritidis* 生菌との間になんの関係もない。

佐藤勇治(予研・細菌)：1) 培養液中に抗体活性物質が検出できないか？濃縮して調べたことがあるか。2) Transfer agent を入れてどの位の時期で活性物質がマクロファージに現われるか。3) 血中の19S抗体と、マクロファージ結合活性物質(19S?)の性質の違いがあるか。4) FISHMAN の仕事では Transfer agent に2種類あって RNA+抗原は7S, free の RNA は19S抗体の産生を導くということだが、先生の場合はこのようなことについて、何か御意見をおきかせ願いたい。

答：1) 証明しにくいので、濃縮して積極的にチェックするという方法を試みたことはない。

2) 抗原によって差違があると思うが、培養マクロファージを用いた実験では2～5日目と思う。血球を抗原とした場合2日で充分である。

3) マクロファージに証明されたものをとり出して、免疫化学的に充分検討したことはない。ぜひやらなければ

ばならない問題だが、純粋にマクロファージを大量に集めて、培養するという技術上の制約からである。

4) 私はこの RNA に抗原がないものと考えている。FISHMAN ならびに欧米の学者の多くは、腹腔浸出細胞に抗原を加え、一定時間後にフェノールで抽出しています。従って抗原のコンタミネーションは必ず起こると思う。私は、免疫の成立した動物から抽出する方法をとっている。FISHMAN に会って話しあった時も、彼は前者の RNA 中の抗原は混入の可能性のあることを申ししていました。私達がこの RNA に抗原の関与がなさそうだというのには、次の 2 つの実験データがあるからである。

a) 免疫 RNA は動物体内では増える可能性がある。この決定的なデータは今実験中で近く発表できると思う。

b) 免疫 RNA を注射された動物に一定期間をおいて微量の抗原を注射すると、免疫 2 次反応と思われる抗体産生がみられることがジフテリアトキソイド、サルモネラの鞭毛を用いた実験で明らかになった。この際 (RNA × RNA) (抗原 × RNA) の組み合わせでは、RNA 量を先に用いた実験の 10~100 倍量に増やしても、2 次反応は起こらない。したがって免疫 RNA の中には免疫の 2 次反応をおこすに足る抗原はないことは確かです。しかし RNA をあらかじめ注射し、一定期間をおいて微量の抗原を注射すると、非常に高い血清抗体の産生がみられる。免疫の準備状態、あるいは免疫の memory 状態をつくる役割をもっているのかも知れない。このデータも詳細を近く発表するので、御批判を願いたい。

マクロファージと抗体産生

ーリンパ節の酵素免疫細胞化学および酵素組織化学的観察ー

渡辺 慶一, 増淵 誠夫, 大谷 武彦,
鈴木 裕, 影山 圭三 (慶大・医・病理)

はじめに

マクロファージが抗体産生という現象のなかで果たす役割が、はっきりとした形で現わされたのは、そう古いことではなく、1959年、FISHMAN¹⁾が、抗原を貪食したマクロファージ中に RNA 様物質が生じ、これがリンパ節細胞に移された時、ここに抗体産生が起こるという事実を明らかにした時に始まると思う。この事実は、FISHMAN 自身ら^{2,3)}によって、さらに確かめられ、その後この種の実験は、ASKONAS⁴⁾、FRIEDMAN⁵⁾によって引き継がれ、免疫されたマクロファージの RNA 分画には、活性化された抗原が混在し、これが抗体産生に重要な意義を持つという理論に発展した。この他、抗体産生におけるマクロファージの必要性は、大量のカーボンを用いて、マクロファージの貪食能をブロック (RES 'Blockade') することにより、抗体産生の低下を見られるという事実⁶⁾や、抗体産生には、マクロファージとリンパ球の二細胞系が必要であるという培養脾細胞を用いた一連の実験⁷⁻¹¹⁾により主張され、証明されて来ている。そればかりか、三橋ら^{12,13)}は、動物をサルモネラで免疫した場合、マクロファージ自身に細胞性抗体の産生が見られると主張している。このように、免疫におけるマクロファージの必要性は確立されたかに見えるが、一方 PERKINS¹⁴⁾らのように、マクロファージは単に抗原の“清掃人”にすぎず、抗体産生を低下させこそすれその必要性は認められないときめつけるむきもある。RICHTER¹⁵⁻¹⁷⁾のウサギの免疫に関する精力的な研究でも、抗原と特異的に反応する骨髄由来の抗原反応細胞 (ARC) が考えられ、マクロファージの役割には余り重きがおかれず、抗原と ARC との反応を調節する二次的な意義を持たせているように受け取られる。またマクロファージの必要性を説くなかにも、FISHMAN らのように、抗原がマクロファージ内でなんらかの process を受けるものと、ROELANTS¹⁸⁾、UNANUE¹⁹⁾、CATANZARO²⁰⁾らのように、抗原を細胞膜または、リボソーム (ribosome)

に結合させるだけの役目しかないとするものなど、意見が分かれている現状である。

マクロファージの役割について、このような種々の見解が生ずる原因を考えてみると、一つには、マクロファージのとりえ方に、それぞれ差があること、また、ここ1〜2年抗原刺激を受けたリンパ節を、形態学的、酵素細胞化学的に、また免疫組織化学的に観察して来た結果わかったことだが、マクロファージ自身も、免疫の各時期において種々の変化を示す可能性があり、このような動態の把握にも欠ける点があるためと思われる。

われわれは、本シンポジウム発表を機会に、局所リンパ節のマクロファージに焦点を絞り、抗原刺激後、経時的に、リンパ節内での抗原の局在、さらに抗体の局在の変化を連続的に観察し、その間マクロファージと抗原および抗体局在との関連、さらに、マクロファージ以外の細胞との関係、マクロファージの形態的、細胞化学的变化などについて検索を試みた。

実験材料と方法

動物：ウィスター系成熟雄ラット (体重 200~250gm) を用いた。

免疫方法：抗原としては Horseradish Peroxidase (HrP) を Freund's Complete Adjuvant とよく混じったものを用い、ラットの両足足趾皮下に 1 mg ずつ注射した。ある動物群には 初回注射後 21 日目に 同量の抗原を、両側前腕に、ブースターとして注射した。

リンパ組織試料の採取およびその処理：抗原接種後、6, 24, 48時間、さらに、4, 7, 10, 14, 21日目に各時期2〜3匹の動物を、屠殺し、両側腋窩、鼠蹊、腸骨窩、頸部および腸間膜リンパ節、さらに脾および胸腺をも、試料として採取した。ブースターを受けた動物群は、ブースター後、7, 14, 21日目に屠殺し、前述のリンパ組織を採取した。

光学顕微鏡による抗原および抗体の局在の観察およ

び、酵素組織化学的観察には、採取したリンパ組織を、7%サッカロースを含んだ4%パラホルムアルデヒド燐酸緩衝液(0.1 M, pH 7.4)中に、9時間固定し、その後0.88 M ガム・サッカロース液で、約48時間水洗した。

抗原、抗体局在の電子顕微鏡観察には、試料を、2.5%グルタルアルデヒド燐酸緩衝液(0.1 M, pH 7.4)中に、常時振盪しつつ2時間固定し、その後一晩、0.1 M 燐酸緩衝液(pH 7.4)中で水洗した。

抗原局在の観察：それぞれ、固定、水洗の終了した組織を光顕用には cryostat 内で 8μ に薄切し、電顕観察用には、SMITH-FARQUHAR 型 Tissue Sectioner で 40μ 切片とし、抗原(HrP)のペルオキシダーゼ活性を、GRAHAM-KARNOVSKY²¹⁾ 法による細胞化学的方法で証明した。

抗体局在の観察：抗原局在の観察の場合と同様にして作った切片について、原則として、LE Duc, AVRAMEAS²²⁾ らの方法に従って、抗体局在の観察を行なった。すなわち、それらの切片を HrP 抗原溶液($50\sim 100\mu\text{g/ml}$ in 0.1 M phosphate buffer)中に、 $1\sim 3^\circ\text{C}$ で1時間よく振盪しながら浸漬した。次いで、洗滌、再固定後、抗体に結合した抗原 HrP の活性を前述と同様、KARNOVSKY らの方法で証明した。

酵素組織化学による観察：光顕用に作製した切片について、acid phosphatase (AcP), β -glucuronidase (β -G), N-acetyl- β -glucosaminidase (NGA) などの lysosomal enzymes および alkaline phosphatase (AlP) の酵素活性を、それぞれ BARKA-ANDERSON 変法²³⁾, HAYASHI-FISHMAN²⁴⁾ 法, HAYASHI²⁵⁾ 法, および BURSTONE 変法²⁶⁾により、組織化学的に観察した。

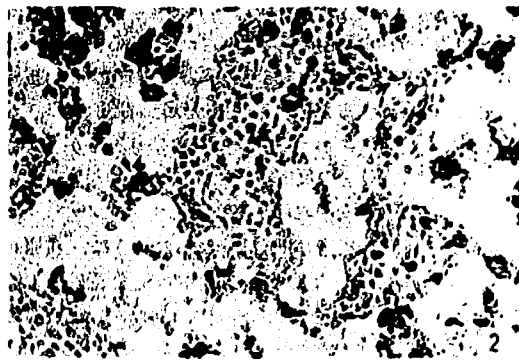
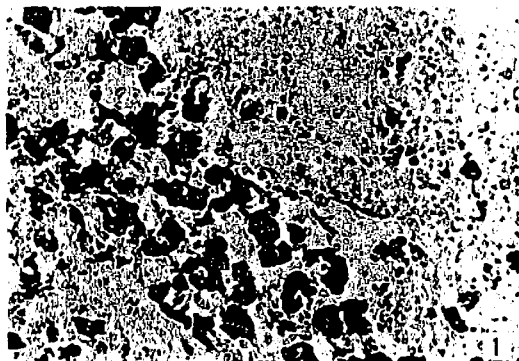
血清抗体価の測定：実験に用いたすべての動物について、その屠殺に際し、採血を行ない、血清抗体価を赤血球凝集反応により測定した。

実験結果と考察

リンパ節のマクロファージ：マクロファージ(M ϕ)については、まだ定まった概念、定義がなく、どれを M ϕ と考えるか、人によってまちまちである。どの細胞を M ϕ とするかによって、実験結果の判定およびそれにつづく論議にも大きな差異を生じて来る。研究者の中には、M ϕ という時、血液単球およびそれに由来する細胞を想定するものもあり、一方腹腔内 M ϕ のみを考える人もある。本論文では、リンパ節の髄洞、または辺縁洞に散在し、突起をもって洞壁と連なる強力な食作用を持つ細胞を M ϕ と呼ぶことにする。髄洞壁の細胞細胞

も、その食作用、電顕観察による形態、および組織化学的性状(強い lysosome 系酵素活性を示す)などの点で M ϕ と似かよっており、同等に扱ってよいものと思われる。STRAUS^{27,28)} は、家兔を peroxidase で免疫した実験で、髄洞の lining cells と、髄索内の細胞細胞(reticular cells)とでは、血清抗体の有無によって食作用の態度が異なるとして区別し、後者のみを M ϕ と呼んでいるが、ラットでは電顕観察でも、組織化学的観察でも両者の間に差はなく、食作用の態度も、むしろ後者の方が、腹腔内 M ϕ のそれにより類似している。

抗原の局在：抗原を足趾に接種した場合30分後には、局所リンパ節の髄洞リンパ節髄洞の M ϕ にもっとも強く貪食されている。その後、6時間目位にピークに達し(写真1)局所から胸管に至るまでのリンパ流路にならぶ鼠蹊、腸骨リンパ節の髄洞の M ϕ にも強い貪食像が見られる。(写真2)。その貪食の強さは、求心性の順序に準じている。しかし、このリンパ流路に配列しない腋窩、頸部(写真3)、腸間膜リンパ節、胸腺などには、24、48時間を経過しても、そのいずれの細胞にも貪食は見られない。また脾では、24時間経過したものでは、わずかながら脾髄洞の M ϕ に貪食が見られるが、もともと胞体内に peroxidase を含んでいる細胞が多く、対照



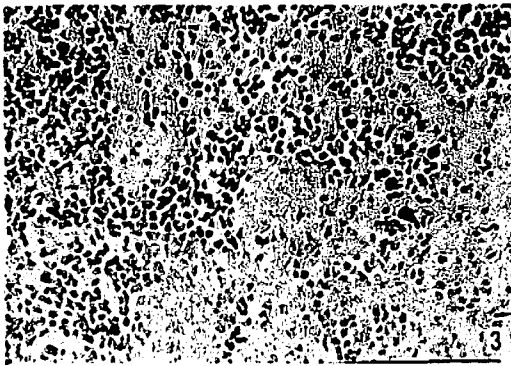


写真1～3：マクロファージ (Mφ) による (peroxidase, HrP) 抗原の食食。足趾への抗原注射後6時間後の食食された HrP を、KARNOVSKY 法により、組織化学的に黒褐色に発色させた。1：膝窩リンパ節の髄洞および髄索。多数の髄洞 Mφ が強い HrP の食食像を示す。髄洞の lining cell も食食像を示している。散在する白血球には、内在する peroxidase があり、弱いながら発色している。(400×)。2：腸骨リンパ節。膝窩リンパ節よりは少ないが、Mφ には著明な HrP 食食像が見られる。(100×)。3：頸部リンパ節。HrP の食食像は全く見られない。peroxidase をもっている白血球が散見される。(400×)。

脾との差が判然としない場合が多い。抗原の二次接種を前腕に行なった時には、腋窩リンパ節の Mφ にも同様に抗原の食食が見られる。これらの食食像を模式化して図示したのが、図1である。これら Mφ 中の抗原は、接種後6時間位をピークとして、漸時減少していき、7～10日目には、ほとんど消失する（少なくとも抗原 HrP の酵素活性が検出できなくなる）。しかし、光顕観察では気づかなかったことだが、電顕観察により、髄索内の Mφ に、接種後数週しても、抗原を保持しているものがあることがわかった。写真20は、抗原の足趾への一次接種後5週間たっている膝窩リンパ節の髄索だが、抗原は、Mφ（あるいは細網細胞）の中の一種独特な phagosome（内部には small vesicles が充満している）と、このような phagosome の内容が消化されて出来たと思われる巨大空胞の膜面にも局在しているのがわかる。さらに注目をひくのは、同じリンパ節からの切片を、抗体産生細胞観察のため抗原溶液中に浸漬したものを電顕で観察すると、上記のような抗原を保持する Mφ のごく近辺に、抗体産生細胞が多いことである（写真15）。

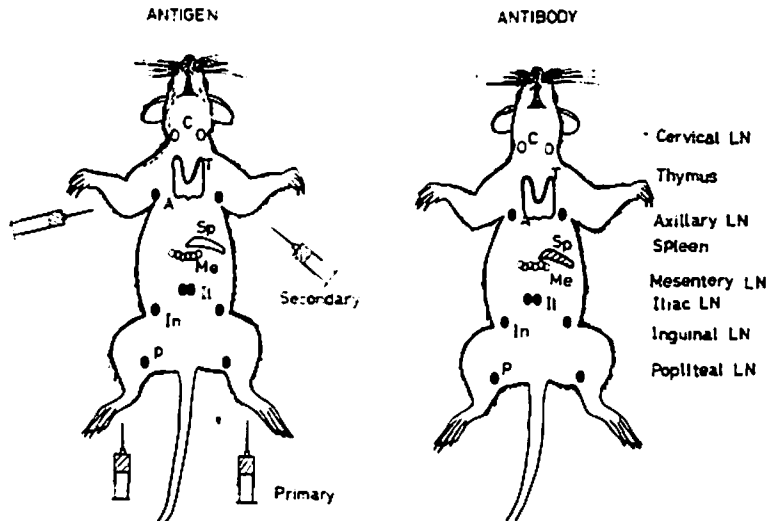


図1：抗原および抗体のラットリンパ節内局在。

左図で黒く塗りつぶしたリンパ節は、そのマクロファージ (Mφ) に、抗原食食像の認められたものを意味する。
右図の黒いリンパ節は、抗体産生細胞の出現したもの

マクロファージおよび抗体産生細胞の β -G 活性：Mφ はもともと lysosome 系の酵素に富んでおり、成熟ラットのリンパ節では、抗原接種前でも髄洞の Mφ には、組織化学的に強いそれらの酵素活性が証明される（本実験では AcP と NGA）。然し、同じ lysosome 系酵素の中でも β -G の活性は、抗原接種前、および接種後数時

間まではごく弱く（写真4）、その後、24、48時間と時を経るに従ってその活性は強くなる。そうして、光顕観察で、Mφ 中の抗原の peroxidase 活性が消失する4日目頃に β -G 活性は最も強くなる（写真5）²⁰⁾。また、一度この時期に髄索内に生じて来る抗体産生形質細胞にも、強い顆粒状の β -G 活性が認められる（投与された

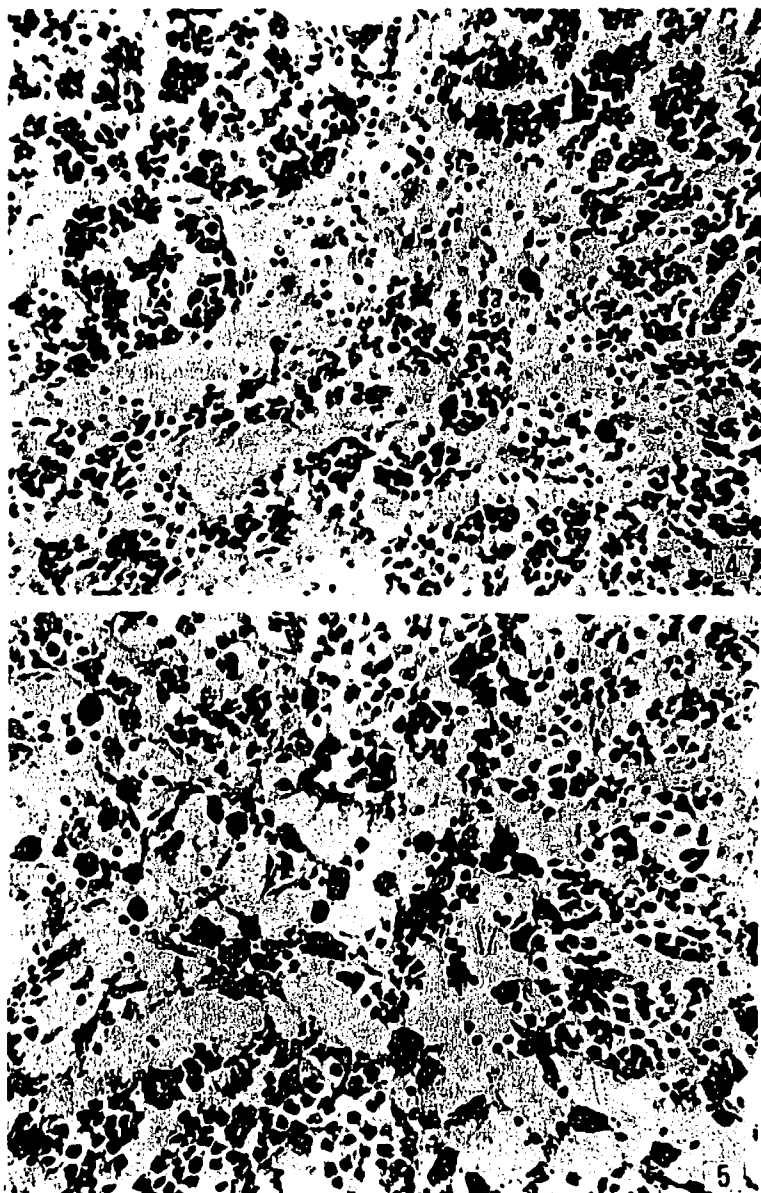


写真4～5：脾臓リンパ節結洞 Mφ の β -グルクロニダーゼ (β -G) 活性。Naphthol AS-BI glucuronide を基質とするアゾ色素法 (HAYASHI-FISHMAN) で、 β -G 局在は、Mφ 細胞質に黒色小顆粒として見える。核染色は Azure-Schiff 法。4：抗原 (HrP) 接種後6時間のリンパ節結洞および結索。 β -G 顆粒はほんの数カ所に認められるのみである。Azure 色素に胞体が濃染する肥肝細胞が2カ結洞に見られる。(400×)
5：抗原接種後4日のリンパ節。結洞に突起を伸ばした Mφ の胞体内に、大小様々な β -G にもとづく顆粒が多数みられ、著明な活性上昇を示している。(400×)

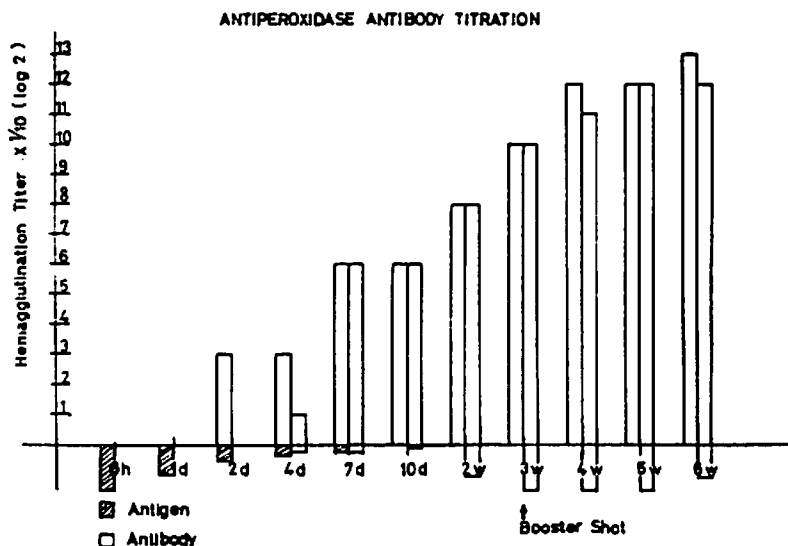


図2：血清抗体価および抗体産生細胞数の経時の変化。
横軸より下の棒グラフは、斜線のあるものは、リンパ節内の抗原食 Mφ の数を示し、斜線のないものは、抗体産生細胞の数を表す。

抗原に対する抗体を産生していない形質細胞は β -G 活性は陰性⁴⁹⁾。さらに paracortical area (あるいは、びまん性リンパ組織) には、 β -G 活性をゴルジ野にもったリンパ球が増加して来ている。写真21に見られるよう

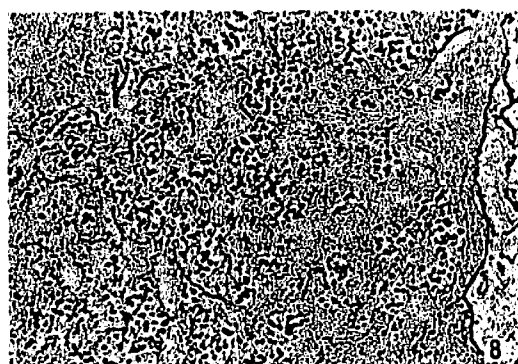
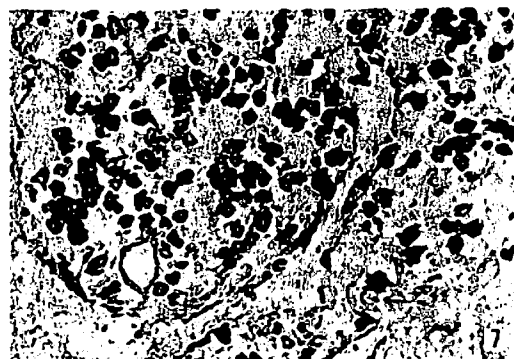
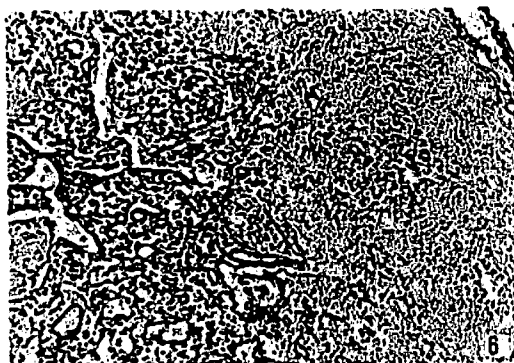


写真6～8：局所リンパ節の抗体局在。 Freund's complete adjuvant とともに抗原を足趾に接種した後3週の脾臓および腸骨リンパ節で主として髄索に抗 HrP 抗体を保有する形質細胞と思われる細胞が多数集合している(細胞質が黒く濃染している細胞)。髄索壁および皮質内の細胞突起に沿った部分にも抗体の局在が見られる。6：脾臓リンパ節。写真8の腸骨リンパ節と比較して、抗体産生細胞の数は、はるかに多い。(100×) 7：脾臓リンパ節。(400×) 8：腸骨リンパ節。脾臓リンパ節内の抗体産生細胞の数の差は、写真1, 2の抗原食 Mφ の数の差とよく対応する。(100×)

に、通常の phagolysosome は、AcP 活性を示すのに反し、前述の抗原を保持する独特な phagosome および巨大空胞には AcP 活性は見られない場合が多いが、これらの小器官には、 β -G 活性が存在することが想像される。しかし電顕レベルでの β -G の細胞化学的方法が確立されていない現在では何ともいえない。

抗体の局在：図2に示されるように、血清抗体価は、接種後2日目より、僅かながら上昇し始め、2次接種後3週目に最高値に達するまで漸増する。リンパ節内抗体局在は、早いもので接種後2日目、多くは4日目には膝窩リンパ節髓索の形質細胞にみられる。このような抗体産生細胞の数は、時とともに漸増し、接種後3週目にはほとんどピークに達する(写真6, 7)。このような抗体産生細胞は、髓洞マクロファージによる抗原貪食像を示した膝窩、鼠蹊、腸骨リンパ節 (iliac lymphnode) (写真8) には見られたが、Mφによる抗原摂取像を示さない他の遠隔リンパ節、あるいは、その他のリンパ組織にはその出現を見なかった。(写真9) また、前胸への抗原二次接種前には、腋窩リンパ節に抗体産生細胞の出現は見られぬが、二次接種後は、膝窩リンパ節と同様の抗体局在を示した。図1は、抗原の分布と抗体産生細胞の分布を模式化して示したものである。

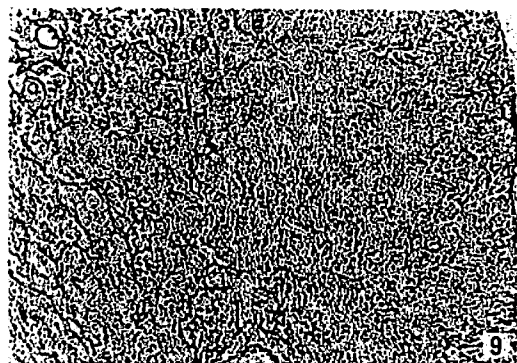


写真9～10：遠隔リンパ節（抗原接種局所から胸管に至るまでのリンパ流路から外れるリンパ節—本文参照）の抗体局在。抗体産生（または保持）細胞は全く見られず、皮質、髓質の細胞網細胞によって織りなされる network に抗体の吸着を認める。9：頸部リンパ節。抗原接種後3週。写真右側は皮質、左側に髓索、髓洞が見られる。(100×) 10：写真9の強拡大。細胞間スペース、若しくは銀銀染色で染まる線維の走向に一致して抗体局在が見られる。(400×)

リンパ節内の抗体産生細胞の数は、(写真6および8に見られるごとく) 抗原接種時の Mφ による抗原貪食の強度とはほぼ比例する。すなわち、腸骨リンパ節の抗体産生細胞は、膝窩リンパ節のそれよりはるかに少ない。

脾では、脾胞周辺にわずかながら抗体産生細胞の出現を見るが、前に述べたように、もともと peroxidase を持つ骨髄系の細胞、赤血球 (pseudo-peroxidase reaction) が多いため判然としない。

Anti-HrP 抗体は、光顕写真6, 7, 8, ならびに電顕写真15, 16に見られるように、成熟諸段階の形質細胞の核被膜核膜小胞体と細胞質内の粗面小胞体 (r-ER) の cisternae およびゴルジ装置 (とくに Golgi lamellae) 内に局在するのみでなく、髓索および皮質の細胞網細胞の突起に沿った部分にも存在している。これを電顕でみると写真18に示すように、細胞網細胞の間隙の granular な物質および膠原線維様の構造に付着しているのがわかる。このような細胞網細胞の突起間の抗体局在は、写真9, 10が示すように、抗体産生細胞の出現を見ない遠隔リンパ節および、胸腺にも見られる。このような抗体局在は、この部位で抗体が産生されるのではなく、リンパ行性、あるいは血行性に運ばれる抗体が吸着したものであることは、HrP で免疫していない動物に、リンパ行性に投与した、Anti-HrP 抗体が、全く同様な部位に吸着することを観察した報告¹⁰⁾によっても証明される。

抗体産生細胞およびマクロファージの AIP 活性 (Mφ→抗体産生細胞の可能性)：写真11に見られるように、抗原接種前、あるいは直後のリンパ節では、AIP 活性はほとんど毛細血管の内皮のみに見られる。ところが、抗原投与後2日から4日にかけて、髓索の形質細胞およびその周囲の細胞網細胞に、著明な AIP 活性の上昇を見ようになる (写真12)。同じ個体でも抗体産生が見られないリンパ節 (抗原が髓洞 Mφ に貪食されていないリンパ節) には、このような AIP 活性の上昇は見れないから、AIP の組織化学的活性は、少なくともラットでは抗体産生の有無の marker となり得ると思う。

抗原投与前、またはその初期では、髓洞の Mφ には全く AIP 活性はみられない。しかし抗原投与後2～4日を経ると、髓洞内には Mφ、リンパ球が数を増し、Mφ のあるものは、弱い AIP 活性を持つようになる。これは Mφ から AIP 陽性の細胞網細胞、あるいは形質細胞系の細胞への転化を意味するものか、それとも、単に Mφ に AIP 活性が現われるようになっただけのことかは、一瞬に断定出来ない。何らかの転化を思わせる根拠としては、それまで伸ばしていた細胞の突起が縮んで、比較的丸型の細胞になることである。また、このよ

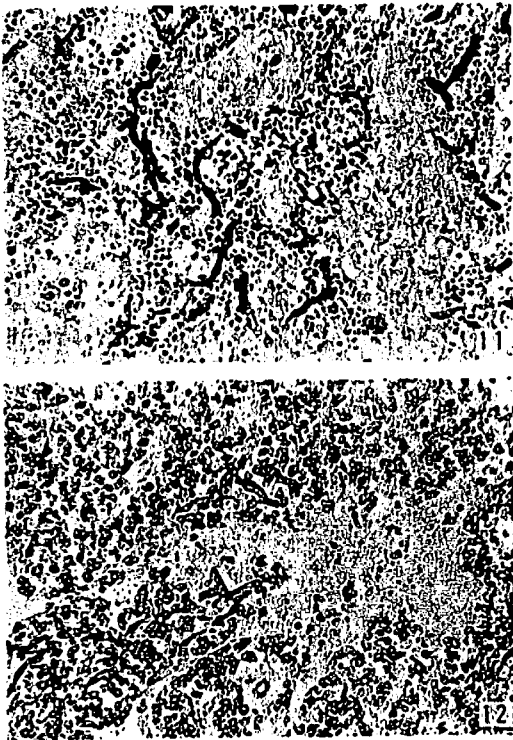


写真11～12 脾臓リンパ節髄索のアルカフォスファターゼ (AIP). Naphthol AS-BI phosphate を基質としたアノ色素法 (BURSTONE 変法) によって局在証明を行なった。AIP 局在は黒色、均質な反応産物の沈着によって示される。11: 抗原接種後6時間の脾臓リンパ節髄質。AIP 活性は、主として髄索の毛細血管に見られる他、浸潤している多核白血球にも認められる。(100×) 12: 抗原接種後4日の脾臓リンパ節髄質。髄索の毛細血管のみならず、髄索に増殖した形質細胞、細胞細胞にも強い活性が見られる。(100×)

うな $M\phi$ に抗体産生性があるかどうかということが問題となる。MITSUHASHI らは^{12,13)}、サルモネラ糞毛、ジフテリアトキソイドなどで免疫した動物、あるいは、“免疫伝達因子”を授与した動物の脾の $M\phi$ には、細胞抗体の産生性があるとしている。本実験で用いられたテクニックをもってしては、血清抗体が現われ始める2～4日目には、 $M\phi$ 中には未だ授与された抗原 (peroxidase) が貪食されて残っており、ここに抗体の局在があるかどうか、判定するのはむずかしい。しかし、光顕観察では、この期にすでに、未熟な形質細胞様細胞に抗体産生が見られており、さらにその後の時期では、抗体局在は明らかに形質細胞系の細胞に見られ、髄洞の $M\phi$ には全然見られない。従って、髄洞に散在するような $M\phi$ 自体には、抗体産生があるとは思えぬが、上述のように、 $M\phi$ から何らかの形で転化した細胞には、抗体産生

のある可能性はあると思われる。事実、写真19が示すように貪食作用をもつと思われる細胞様細胞にも抗体局在が認められる。この点に関しては、電顕レベルで、免疫後比較的初期 (2～7日) のリンパ節の抗体局在、AIP 活性の観察を試み検討中であり、どの細胞が7Sあるいは19S抗体を産生するかという問題を含めて別報にて報告したい。

マクロファージと抗体産生細胞との関係：以上の結果からわかるように、リンパ節で産生される (あるいは、リンパ節に抗体産生細胞が出現する) には、そのリンパ節内の $M\phi$ による抗原の貪食がなければならない。抗体産生に関する $M\phi$ の必要性、およびその役割について述べた報告は、枚挙にいとまがない位に多い。

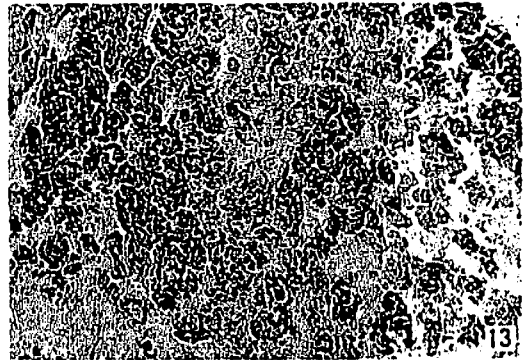


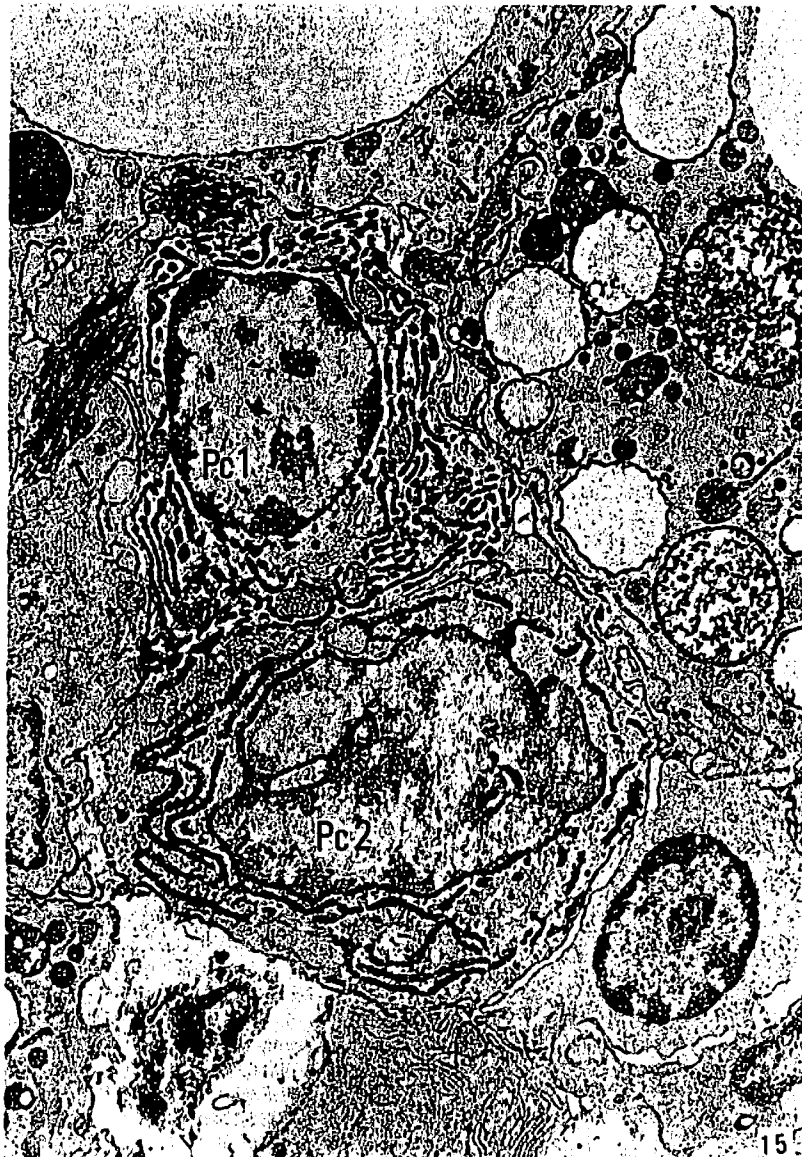
写真13～14: Hydrocortisone の投与を受けたラットの脾臓リンパ節。Hydrocortisone acetate を 2.5 mg づつ、両足足趾に注射後24時間して、HrP を adjuvant とともに接種した。13: 抗原 (HrP) 接種後6時間の脾臓リンパ節内の抗原局在を peroxidase の組織化学的方法 (Graham-Karnovsky) で示したもの。髄洞の $M\phi$ に顕著な抗原貪食が認められるが、写真1のように、強く aggregate していない。(400×) 14: 抗原接種後4日 (hydrocortisone 投与後5日) の脾臓リンパ節。peroxidase の組織化学反応を行なっている。皮質からのリンパ球脱落が著明で、その部には、細胞質の明るい膨化した細胞細胞が認められる。HrP は拡張した辺縁洞の細胞細胞に残存している (100×)

FISHMAN¹⁻³⁾らは、抗原を貪食した $M\phi$ 内に抗原に特異性を持った RNA 様物質が産生され、それが、抗原情報をリンパ球系の抗体産生細胞に伝達すると報告している。さらに ASKONAS⁴⁾ら、および FRIEDMAN⁵⁾は、そのような RNA 分画には、活性化された抗原が含まれていると述べている。いずれにせよ、これらの物質が、いかにして $M\phi$ から抗体産生細胞に伝達されるかについては、まだ定説がない。本実験の結果からすると、これら $M\phi$ 内に生じた情報伝達物質は、リンパ行性、あるいは血行性に遠隔のリンパ組織に運ばれて、そこで抗体産生細胞（あるいは、その前駆細胞）に伝達されるという可能性

は考えられず、両者はもっと直接的なつながりを持っているものと思われる。

一方、*in vitro* の免疫反応でも、MOSIER⁷⁾、PIERCE⁸⁾、多田⁹⁾らは、培養マウス脾細胞を、ヒツジ赤血球で免疫した場合、抗体産生には、 $M\phi$ とリンパ球の二細胞系の関与が不可欠の条件であることを述べている。さらに MOSIER¹⁰⁾、PIERCE¹¹⁾らは、細胞相互の "cluster formation" が必要であり、これがあって始めて $M\phi$ によるリンパ球の活性化が起こると説明している。

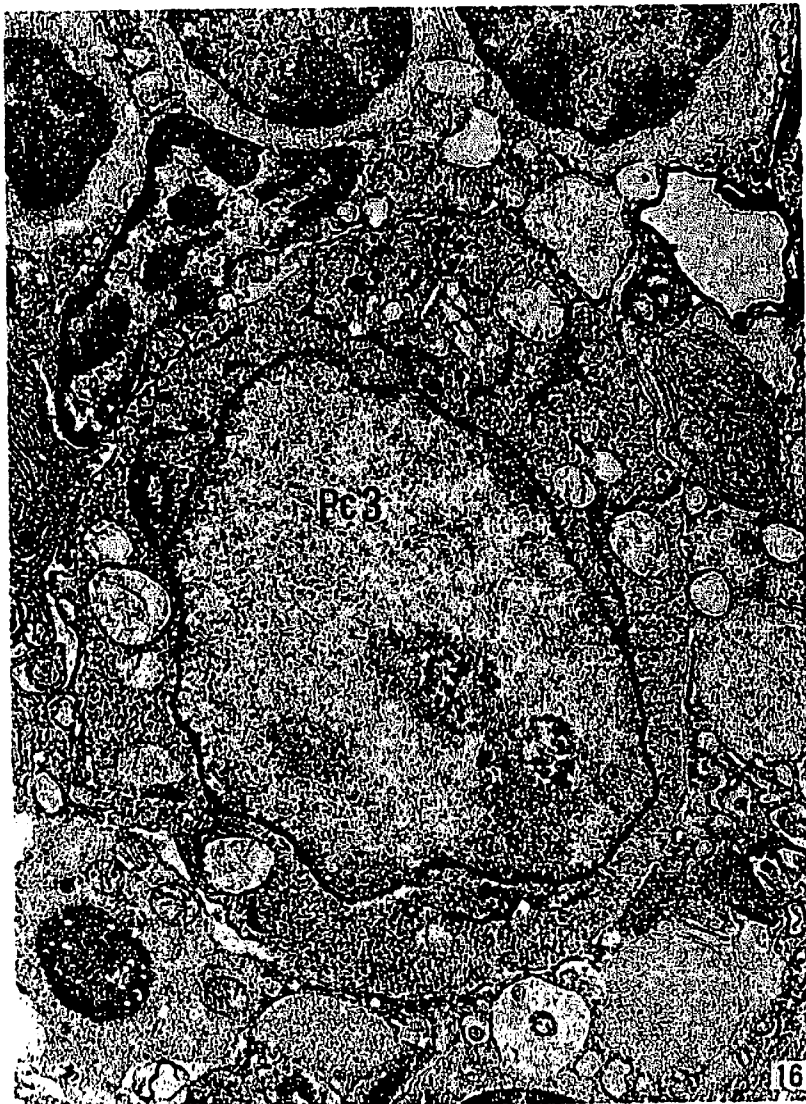
以上の事実から、 $M\phi$ とリンパ球系細胞との直接の相互作用が、抗体産生に必須であることがわかるが、それ



がどのような様式で行なわれているかは、前にも述べたように、未だ、はっきりとしていない。SCHOENBERG³¹⁾ら、および MACFARLAND³²⁾らは、Mφ とリンパ球系細胞の細胞膜の間に bridging (橋渡し) があることを電顕で観察し、お互いの中で原形質内物質の交換が行なわれ得る可能性を指摘しているが、その後多くの研究者によって、同じような観察が試みられているが、確証を得た例は少ない。われわれの電顕的観察でも、そのような像は、現在までの所、見当たらなかった。

以上述べたように、Mφ とリンパ球系との間に直接的な共同作用があるとして、2 者間を運搬される物質が、FISHMAN らの主張する RNA 様物質¹⁻³⁾か、ASKONAS

のいうような RNA 分画に含まれた活性化された抗原 ("super antigen") か、あるいは、Mφ に長期間保持された抗原そのものであるかは^{19,33)}、議論の多いところである。本実験では、抗原接種後 5～6 週間を経過したリンパ節に、peroxidase の組織化学反応をほどこしたものを電顕で観察したが、前述のように、抗体産生細胞の周辺に、必ずずといっていいほど、peroxidase 抗原を含んだ phagosome と巨大空胞を持った Mφ が存在する (写真15)。このような peroxidase は、免疫されない対照リンパ節、または、腸炎菌 クロームワクチンや、HSA (human serum albumin) で免疫されたリンパ節には見られないので、Mφ 中の endogenous peroxi-



dase ではなく、抗原として摂取されたものである。これらをよく観察すると、peroxidase 抗原は前述したように、phagosome の膜、およびその中に充滿した小胞 (vesicles) の膜に一致して存在し、新たに投原 peroxidase を貪食して出来た phagosome あるいは、phagolysosome とはかなり趣きを異にする。また、巨大空胞のあるものは、細胞質と連絡し、中にリンパ球系細胞を入れるものさえある。以上のような観点から、このような抗原を保持した構造は、KOLSCH と MITCHISON¹²⁾ のいう "storage compartment" あるいは UNANUE¹³⁾

らのいう "cell membrane fraction" に属するもので、抗体産生に直接関連するものといえるかも知れない。CATANZARO²⁰⁾ らは、接種後15分で、抗原 peroxidase は腹腔内 Mφ の perinuclear space および、γ-ER の cisterna 内に局在し、これが lysosome による崩壊を免がれ、長期間 Mφ 内に "storage" され、また cell membrane fraction として現われる抗原の細胞内局在であろうと述べており、われわれの観察と一致しないが、本実験では、未だ接種後15分という、ごく初期の Mφ 内の抗原局在の電顕観察を行っていないの



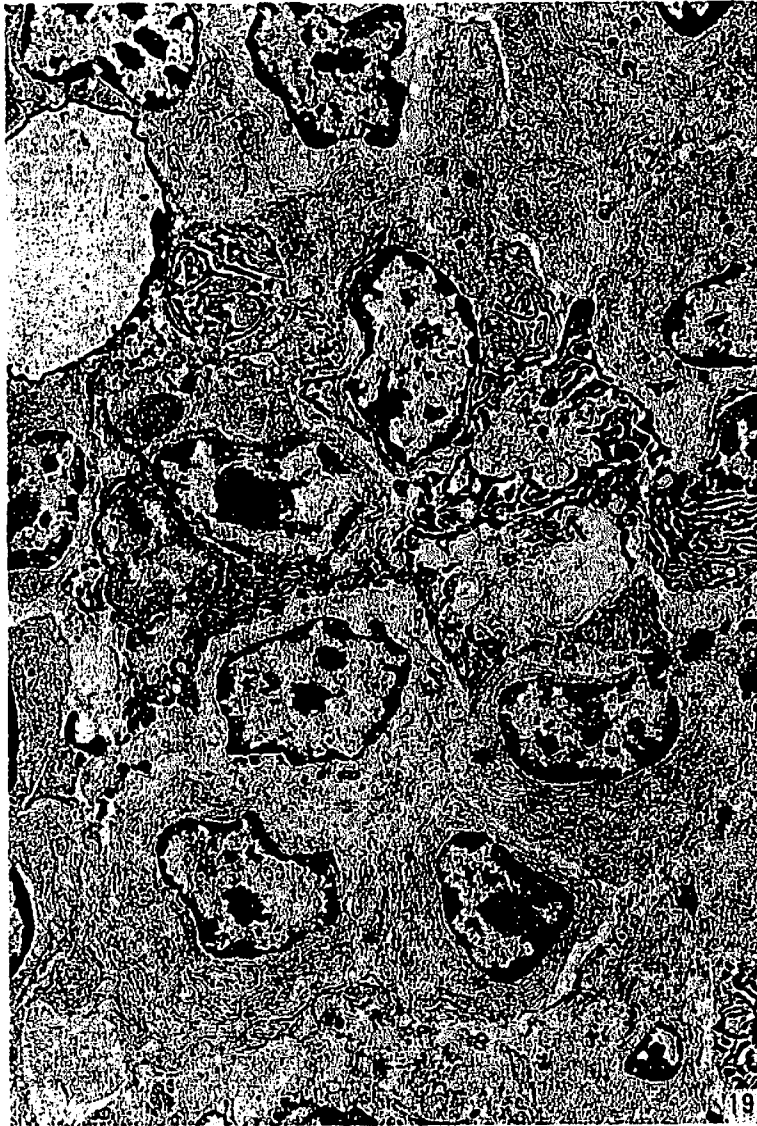


写真15～19：抗原(HrP)二次接種後2週の時鼠リンパ節内の抗 HrP 抗体局在を示す電顕写真。発育諸段階の形質細胞(Pc 1～3)の核被膜(nuclear envelope), γ -ER の cisterna に electron dense な peroxidase 反応産物として抗体の局在が示される。

(方法は本文参照) Pc 1～3 は、その核の性状, free ribosome の量, γ -ER または、ゴルジ装置の発育状態から、形質細胞の発育の系列に並ぶものと思われる。抗体も、まず nuclear envelope に現われ、次いで γ -ER に認められ、順次 nuclear envelope から消えてゆく。15：右上辺の Mφ は、抗原 HrP を保持する特有な phagosome および巨大空胞を持つ(本文参照)。(--) は、細胞間隙の線維様および微細顆粒状の構造に抗体の吸着を見る。(12,000 $\times$) 16：Pc 3 は、細胞質を島状に取囲む γ -ER の形状から、花崗岩らが主張する IgM 産生のリンパ胚球または、リンパ細胞細胞といえるかもしれない。(17,000 $\times$) 17：nuclear envelope, γ -ER の他、Golgi 装置(G)にも抗体の存在が認められる。G=Golgi lamella (14,000 $\times$) 18：写真15の(--)で示したものと同様な抗体吸着が、細胞細胞間に認められる。(11,000 $\times$) 19：中央部に見られる抗体産生細胞は、核は形質細胞の核に似ているが、細胞質が突起状に周囲の形質細胞間隙に伸びており、(--)の部位では、細胞質が線維を包み込むようにしている。変った形の形質細胞とも、また細胞細胞ともいえる細胞である。(7,200 $\times$)

で何ともいえない。また、ここで興味をひくのは、上記のような、抗原 peroxidase を含む phagosomes が、明らかに抗体産生（または保持）していると思われる形質細胞様の細胞の胞体内に（写真22）、時には、2つの形質細胞の間にはさまって（写真23）存在する像が、時々見られることである。このようにして、Mφ から直接抗原が、抗体産生細胞に移されるともみられるし、ま

た、突起を伸ばした細網細胞様の細胞に、明らかな抗体産生（または保持）像が見られる（写真19）ことから、抗原を貪食した Mφ が、抗体産生細胞に変形したとも考えられる。いずれにせよ、そうなると、MILLER^{14,15)} らや、RICHTER¹⁶⁾ らが説なえる胸腺由来、あるいは、骨髓由来の抗原反応性細胞 (antigen reactive cell-ARC) が関与するスキがなくなるし、実際それらの細胞はどこ

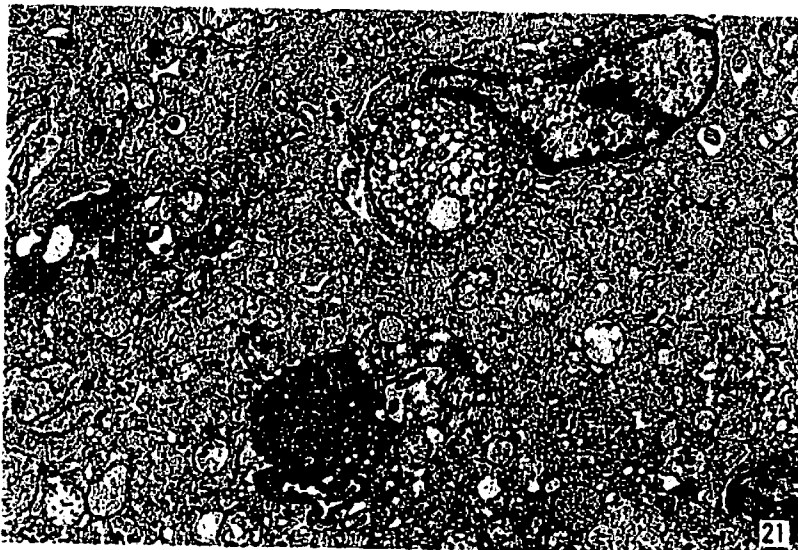


写真20～21：同上のリンパ節の特有な phagosome。20：リンパ節切片を抗原溶液中に浸漬することなく、peroxidase の組織化学反応のみを行なったもの。保持されている抗原は、巨大空胞の膜面、phagosome の膜および小胞状の構造に強く黒く染まった沈着物として見られる。phagosome 周囲の無構造の部位には AcP 活性強く（一）phagosome 自身には、活性が見られない事が、写真21と対比して見ると判かる。（9,000×）21：同上リンパ節の AcP 活性の局在。AcP 活性は、黒い磷酸鉛の結晶として認められる（一印）。（10,000×）

に位置するのかわからなくなる。ほとんどの研究者は、この抗原反応細胞 (ARC) を、リンパ球系の細胞を考えており、これが MITCHISON¹¹⁾ が主張するような $M\phi$ に storage された抗原と反応し、さらに、この ARC が PIERCE¹²⁾ らも述べているように、骨髄由来の抗体産生前駆細胞 (antibody forming precursor cell AFPC) と反応するか、あるいは ARC からはなれたる活性化された抗原が、リンパ節や脾の抗体産生細胞 (AFC) と反

応して抗体産生に到るものと思われる^{16,17)}。しかし、ここでわれわれの実験結果を考慮にいれると、リンパ節で抗体産生が起こるには、当該リンパ節の髄洞の $M\phi$ による抗原の貪食の見られないリンパ組織には抗体産生細胞は現われないのだから、あるリンパ節で $M\phi$ を経た抗原と反応した ARC が、リンパ行性、あるいは血行性に他のリンパ組織に行き、抗体産生細胞の発現を促すということは、あり得ないと思う。すなわち、ARC は

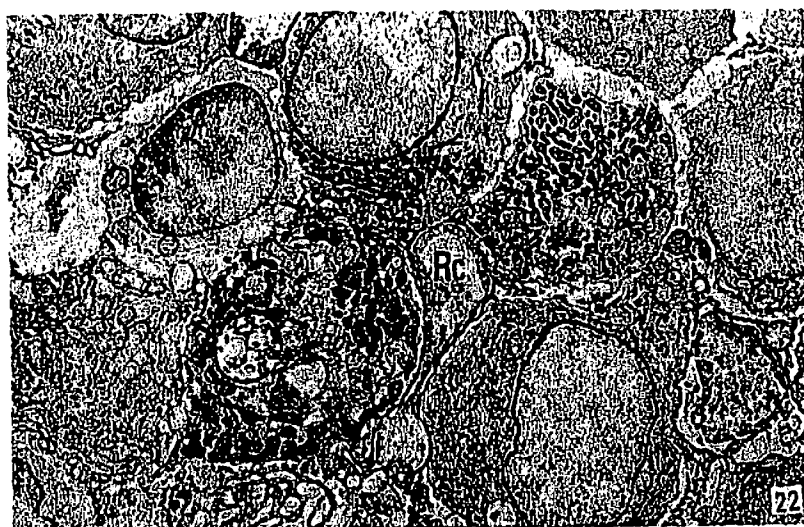


写真22～23：同上リンパ節の抗原を保有する phagosome 22：切片を抗体局在追求のため、抗原液中に浸漬した後、peroxidase 反応を行なったもの。拡張した α -ER の cisterna に抗体を持った細胞中に、写真20に示したと同様 phagosome が認められる（矢印）。形質細胞にはさまれて存在する細胞細胞のものと思われる核 (Rc) の周囲は、抗体の局在が認められる。Rc=細胞細胞様の細胞。(9,000 $\times$) 23：同上リンパ節切片に、peroxidase 反応のみを施したもの。抗原の附着した phagosome が、二つの形質細胞の間に介在する。(20,000 $\times$)

必ずしも、循環性のリンパ球である必要はなく、リンパ節に固定化した細胞や、Mφであってもよいように思われる。このようなARCは、MILLER¹⁵⁾, RICHTER^{15,16)}らによれば、X線照射に感受性が強いはずであり、この点については現在検討中である。

抗体産生とリンパ節リンパ球：ここで問題となるのはリンパ節の髄質や、びまん性リンパ組織 (para cortical area) にあるリンパ球が、抗体産生に関して、どのような役割を果たしているかである。予備実験として、hydrocortisone acetate (コトソン、メルク社) 2.5 mg づつを、抗原 (peroxidase + adjuvant) 接種前24時間に、両側足趾に注射し、抗原の局在、リンパ節の形態学的変化を酵素組織化学的に観察した。接種された抗原は、hydrocortisone 非投与群と変わらず、ほとんど髄質のMφに貪食されるが、異なる点は、貪食された peroxidase がMφの中で、aggregateした大きな顆粒を作らないことである (写真13)。

抗原投与後24~48時間 (hydrocortisone 投与後48~72時間) 経つと、リンパ節皮質、ことに、いわゆる "para cortical area" から、著明なリンパ球の脱落が起こる (写真14)。hydrocortisone 非投与群では、免疫後4日目にすでに抗体産生細胞の出現を見るが、上記のようなリンパ節には、全然その出現を見ない。そればかりか、免疫後2週、3週を経過しても、抗体産生細胞は現れない。写真13に示されるように、抗原が髄質のMφに貪食されるにもかかわらず、抗体産生細胞は現れないわけで、この場合、リンパ球の脱落消失に原因が求められるのではないかと思う。髄質Mφで抗原貪食が起こらないと、そのリンパ節には抗体産生細胞が現れないという事実を考え合わせると、局所リンパ節でも、*in vitro* の実験で証明された、Mφ-リンパ球の二細胞系が必要である^{7,10)} という事実を裏付けることになる。

このようなリンパ球は、ARCとして、あるいは免疫記憶細胞として、さらにまた、AFPC (抗体産生前駆細胞) として、抗体産生に関与するものと思われるが、その機能は、まだ完全には明らかにされていない。この点に関しては、ARC、記憶細胞、AFPCなど理論上の細胞の、X線感受性、非感受性などの性格を利用して、リンパ節内での、それらの細胞のはっきりした位置づけをすべく、現在検討中である。

おわりに

本実験で、抗原を接種してから、抗体産生に至るまでの種々の時点で、局所リンパ節内の抗原および抗体局在

を光顕ならびに電顕レベルで追求し、さらにこの免疫反応に関与するマクロファージおよび、抗体産生細胞の変化を、組織化学的に観察した。その結果、(1)、まず、局所リンパ節で抗体産生が行なわれるには、そのリンパ節の髄質、髄質のマクロファージに抗原が貪食されねばならない。(2)、そして、抗原を貪食したマクロファージは、単に変性していくだけではなく、抗原が消化され消失しかける4日目頃には、強いβグルコニダーゼの活性を示すようになるばかりか、あるものは、アルカリフォスファターゼの活性を示すものも出て来る。これらの酵素活性は、抗体産生細胞に強く現われるものであり、マクロファージも抗体産生に、何らかの形で能動的に働きかけていることを想定させる。

また、(1)に掲げた事実は、PERKINS¹⁰⁾ らの実験では、脾細胞とともに生体内培養した腹腔マクロファージが、単に抗原の "清掃人夫" でしかなかったのに対し、MOSIER^{7,10)} らの実験では、脾のMφと脾のリンパ球系細胞の二者が不可欠であり、"cluster formation" による両者の密接なつながりが抗体産生に必須の条件であったことを考え合わせ、あるリンパ組織で、その中に一定期間定着し、ある特定の生物学的反応の中で、周囲細胞と関連を持ちつつ、一定方向に動き出したMφへの抗原貪食が、抗体産生には必須の条件であるという結論を導くものと思われる。PERKINS らの実験と、MOSIER, PIERCE らの実験との間にある矛盾は、PERKINS らの実験で、抗原と合わせてからある期間を経たMφを用いることによって取りのぞかれるのではないだろうか。

文 献

- 1) FISHMAN, M., 1959: Nature, 183, 1200.
- 2) FISHMAN, M., 1961: J. Exp. Med., 114, 837.
- 3) FISHMAN, M. and ADLER, F. L., 1964: J. Exp. Med., 117, 595.
- 4) ASKONAS, B. A. and RHODES, J. M., 1965: Nature, 205, 470.
- 5) FRIEDMAN, H. P., STAVITKY, A. B. and SOLOMON, I. M., 1965: Science, 149, 1106.
- 6) SABET, T., NEWLIN, C. and FRIEDMAN, H., 1969: Immunology, 16, 433.
- 7) MOSIER, D. E., 1967: Science, 158, 1573.
- 8) PIERCE, C. W., 1969: J. Exp. Med., 130, 345.
- 9) TADAKUMA, T., MITSUMA, T. and SAITO, K., Japan. J. Microbiol. in printing.
- 10) MOSIER, D. E., 1969: J. Exp. Med., 129, 351.
- 11) PIERCE, C. W. and BENACERRAF, B., 1969: Science, 166, 1002.
- 12) MITSUHASHI, S., 1966: Proc. Japan Acad., 42, 184.
- 13) MITSUHASHI, S., 1966: Proc. Japan Acad., 42,

- 280.
- 14) PERKINS, E. H. and MAKINODAN, T., 1965: *J. Immunol.*, **94**, 765.
 - 15) ABDU, N. I. and RICHTER, M., 1969: *Int. Arch. Allergy*, **35**, 330.
 - 16) ABDU, N. I. and RICHTER, M., 1969: *J. Exp. Med.*, **130**, 141.
 - 17) ABDU, N. I. and RICHTER, M., 1969: *J. Exp. Med.*, **130**, 165.
 - 18) ROELANTS, G. E. and GOODMAN, J. W., 1969: *J. Exp. Med.*, **130**, 557.
 - 19) UNANUE, E. R. and ASKONAS, B. A., 1968: *J. Exp. Med.*, **127**, 915.
 - 20) CATANZARO, P. J., GRAHAM, R. C. JR. and SCHWARTZ, H. J., 1969: *J. Immunol.*, **103**, 618.
 - 21) GRAHAM, R. C. and KARNOVSKY, M. J., 1966: *J. Histochem. Cytochem.*, **14**, 291.
 - 22) LEDUC, E. H., AVRAMEAS, S. and BOUTEILLE, M., 1968: *J. Exp. Med.*, **127**, 109.
 - 23) BAARKA, T. and ANDERSON, P. J., 1962: *J. Histochem. Cytochem.*, **10**, 741.
 - 24) HAYASHI, M., NAKAJIMA, Y. and FISHMAN, W. H., 1964: *J. Histochem.*, **12**, 293.
 - 25) HAYASHI, M., 1965: *J. Histochem. Cytochem.*, **13**, 355.
 - 26) WATANABE, and FISHMAN, W. H., 1964: *J. Histochem. Cytochem.*, **12**, 252.
 - 27) STRAUS, W., 1970: *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 120.
 - 28) STRAUS, W., 1970: *J. Histochem. Cytochem.*, **18**, 131.
 - 29) WATANABE, K., MASUBUCHI, S. and OHTANI, T., 1969: *Japan J. Med. Sci. Biol.*, **22**: 128.
 - 30) WATANABE, K. and MASUBUCHI, S., 1970: *Proceeding for the 7th Int. Congress on Electron Microscopy at Grenoble, to Printing*.
 - 31) SCHOENBERG, M. D., MUMAW, V. R., MOORE, R. D., and WEISBERGER, A. S., 1964: *Science*, **143**, 964.
 - 32) MACFARLAND, W. and HEILMAN, D. H., 1965: *Nature*, **205**, 887.
 - 33) KÖLSCH, E. and MITCHELL, J. A., 1968: *J. Exp. Med.*, **128**, 1059.
 - 34) MILLER, J. F. P. and MITCHELL, G. F., 1967: *Nature*, **216**, 659.
 - 35) MILLER, J. F. R. and MITCHELL, G. F., 1968: *J. Exp. Med.*, **128**, 801.
 - 36) 花岡正男, 1969: 免疫の病理 (三橋進, 相沢幹, 花岡正男編集) p. 261. 朝倉書店, 東京

木下喜博 (大市大・医・生理): マクロファージが H^2D-A -phage をとりこみ, それを modify して抗体産生母細胞へ transfer する可能性が, かなりある。これより, マクロファージが抗体産生母細胞へと直接転化するとは考え難いが, どうか。

答: 本実験を通して, まず第一に主張したいのは, リンパ節で抗体産生が起こる場合, 必ず, その当該リンパ節の髄洞, 髄索の (Mφ) マクロファージによる抗原の貪食が起こらなければならないという事である。つまり, Mφ と抗体産生前駆細胞の間には, 何か密接した Contact と共同作用が必要であると思われる。PERKINS らの実験のように, 腹腔と, 脾細胞を混合したのでは, Mφ は抗原の清掃人としかならないが, 同じ脾の Mφ とリンパ球系細胞との間には, 密接な共同作用が起こって抗体産生が生ずるという事実に匹敵するだろう。この点に関しては貴方の意見にまったく賛意を表します。しかし, Mφ 自身, 周囲の細胞と関連を持ちつつ, 変化をとげて行くのも事実で, これが β -G, AIP 活性上昇という形で現わされたものと思う。このような Mφ が, それでは直接抗体産生細胞になるかという点, その証拠になるはっきりしたデータは持ち合わせていない。組織化学的な変化から髄洞の Mφ が, 髄索の中の抗体産生細胞と密接する細胞細胞に類似して来ることは事実のようである。これは, 本文の電顕写真でも示されている。

藤原成子 (東大・医科研・病理): 馬フェリチンを抗原として, 蛍光抗体法で抗原を, 蛍光抗原法で抗体を検出すると, 第二次抗原刺激 (0.1 mg i.v.) の後, 脾臓の胚中心に両者の活性が認められた。

答: 脾の胚中心とリンパ節の胚中心は, 構造上も, また反応の上からも, 必ずしも同一に論議は出来ないものと思われる。HANNA らの labeled antigen を使った精力的仕事でも, 免疫の特異的な反応とは別に, 脾の胚中心への抗原の局在を認めているし, 私も否定はしない。リンパ節では, われわれの行なった実験では, ^{31}H -A-phage が 2~4 日目頃にわずかながら胚中心に認められるが, ごくわずかで, 髄質の Mφ の抗原と比べれば, その周囲に抗体産生細胞が, 最も多数現われることと考えると, 免疫反応上意義のうすいものと思われた。Peroxidase で免疫した時には, 抗原はまず認められなかったが, 抗体産生細胞の現われない遠隔リンパ節でも, 皮髄質の細胞間と同時に, 胚中心にも認められた。ここでの抗体産生というよりは, 血行またはリンパ行性に運ばれた抗体の付着と考えられた。しかし, 動物差, 免疫の仕方の差は考慮に入れる必要があるだろう。

花岡正男 (京大・ウィルス研・病理): 抗ペルオキシターゼ抗体産生細胞の電顕像について, リンパ節の paracortical area の周辺部とくに胚中心外側部あるいは洞内で, その小胞体像はどうであったか。この部分では, γ M 産生細胞がよく発生し, γ G または A をもつ形質細胞はあまりみられないから。

答：ペルオキシターゼ (HrP) で、ラットを免疫した場合、抗体産生細胞は、ほとんど髄索に現われ、ごくまれにしか paracortical area の方には出現しない。したがって、電顕観察では、未だこの部位に現われる抗体産生細胞に行き当たっていない。抗体産生細胞の現われ方にも動物差、免疫の仕方による差があるようで、モルモットではこの部位に抗体産生細胞がよく見られたが、電顕観察を行っていない。

貴方の主張される特徴のある r-ER を持った rM 産生の RLS 細胞に似た細胞が髄索にも見られ、その写真は本文に掲載してある。このような細胞は、免疫の比較的早い時期に高頻度に現われる。これが他の典型的な形質細胞と異なり、rM を選択的に作るかどうかは現在検討中である。

吉田 彪 (予研・結核)：1) 全体のリンパ節内での

抗原の分布は一様か。2) Germinal Center 付近に抗原が Check できるときはどの辺から現われて来るか。

3) 抗原を静注した場合の分布はどうか。その場合、脾でも同様の分布が見られるか。

答：1) 局所リンパ節での抗原の分布には非常なかたよりがある。髄洞、髄索のマクロファージにほとんどの抗原は貪食されている。貪食しつくされなかったものは、リンパ流路を伝わり、次のリンパ節の同じ部位に集まっている。2) われわれの観察では、いわゆる crescentic cap といわれる部位である。3) 抗原を静注した場合、リンパ節に現われる抗原の量は非常に減りますが、やはり貪食の生体は、髄質の Mφ であった。2 次刺激の時は、多少様相が異なり、皮質、髄質内の細網細胞にかなり貪食されている。これらの細網細胞近辺には、抗体の吸着が認められる (本文参照)。

遅延型アレルギー感作動物細胞から放出される マクロファージ遊走阻止因子について

橋本達一郎, 綿貫まつ子, 吉田 彪 (国立予防衛生研)

即時型アレルギーにおけるマクロファージの意義はほとんど重視されていないが、遅延型アレルギーにおけるその役割には常に大きな関心が払われている。その理由は次のような観察にもとづくものであろう。すなわち、遅延型アレルギー感作動物から分離される細胞でアレルギーの受身感作を可能にするものは多くのマクロファージを含んでいること、感作動物体の細胞のなかではマクロファージが特に抗原に敏感なこと、および遅延型アレルギー反応の組織像ではマクロファージの参加が特徴とされることなどがあげられる。これらの事実は一見、遅延型アレルギーにおけるマクロファージの免疫学的重要性を示唆するかにみえる。

しかし遅延型アレルギーの研究を動物体レベルから *in vitro* の場に移し、細胞レベルでの、さらに今まで全く不明であった物質レベルでの研究に進むことが、このアレルギーの本態、ひいてはマクロファージ関与の真の意義を明らかにする上で必要である。この意味から遅延型アレルギーに関連する *in vitro* の反応として最も期待されるマクロファージ遊走阻止反応をとりあげ、マクロファージに働く物質を介して遅延型アレルギーにおけるマクロファージの役割を検討したいと思う。

1. 組織片からのマクロファージの遊走阻止

遅延型アレルギーに感作された各種の実験動物の各種臓器小片からの細胞遊走が抗原によって阻止される現象はこれまで多く観察されているが、阻止される細胞の種類については必ずしも所見が一致していない。吉田は¹⁾ まづ組織片の培養に新たな工夫を加えて、抗原の添加により遊走の阻止される細胞は遅延型アレルギー感作動物由来のマクロファージに限られることを観察した。

その方法はすでに他に発表した²⁾、感作モルモットから脾およびリンパ節を摘出し、1 mm 立方前後の小片にして正常モルモット血漿の薄層に浸してそのまま固定し、さらに培養液 (コウチン血清20%添加 Eagle 培地) を加えて CO₂ (5%) ふ卵器内で培養し小片の辺縁から

の細胞遊走を測る。測定には倒立顕微鏡を用いてそのままの遊走距離を抗原を加えなかった場合 (MD₁) と加えた場合 (MD₂) について測り、次式によって遊走指数 (MI) を求め、%で抗原添加の影響をあらわした。

$$MI = MD_2 / MD_1 \times 100$$

1つの MI 値を得るには、6~12小片を用いて平均値から計算した。

表1に示すように、正常およびツベルクリン感作モル

表1 BCG 感作モルモット脾からの試験管内細胞遊走に対する PPD の阻止作用

脾の由来	培養液内 PPD ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	培養開始後日数					
		1 日		4 日		10 日	
		MD	MI	MD	MI	MD	MI
正常脾	0	127		223		78	
	10	122	95.3	193	86.6	54	68.7
BCG 感作脾	0	155		258		41	
	10	115	74.2	24	9.3	28	68.3

MD: 遊走距離

MI: 遊走指数 (%)

モットの脾小片を PPD 10 μg 添加の有無で培養し、培養開始後 1, 4, 10 日目に遊走距離を測定した結果、1 日目のリンパ球、多形核白血球などの遊走については正常と感作脾との間に抗原添加による影響に有意差はなかった。しかし 3 日目の培養液交換後に残る細胞はほぼ 100% マクロファージで、4 日目の観察では PPD の存在下において強い遊走阻止が認められた。さらに 10 日目にみられる線維芽細胞様の細胞群については正常、感作脾間に再び差が見られなかった。

リンパ節小片からの細胞遊走では、いずれの時期においてもマクロファージ遊走の観察は困難で、しかも遊走には正常、感作脾組織間に有意の差がなかった。培養 1

表2 リンパ節細胞の遊走に対する抗原の影響
(PPD 50 μ g/ml) (培養後24時間目)

リンパ節 の由来	遊走指数 (%)		
	実験1	実験2	平均
正常動物	81.0	64.3	72.6
BCG 感作動物	112.5	78.5	95.5

日目の感作リンパ節からの著明なリンパ球の遊走は、50 μ g/ml PPD の添加によっても、表2に示されるように全く阻止を受けなかった。これらの結果から、遅延型アレルギー感作動物の組織から遊走する細胞の中で、抗原の添加によって遊走阻止をうけるのはマクロファージのみで、他の細胞、ことにリンパ球の遊走はほとんど影響をうけないことが明らかになった。同時にこの結果は遅延型アレルギーにおけるマクロファージの免疫学的重要性を示唆したといえよう。

そこで次にマクロファージの遊走を指標にして、その遊走阻止現象が細胞提供動物の遅延型アレルギー感作と密接な関係にあることを確かめようとした¹⁾。BSA (ウシ血清アルブミン) で遅延型アレルギーに、BSA および EA (卵白アルブミン) によって即時型アレルギーにそれぞれ単独感作したモルモットからの脾小片を用いて、抗原添加によるマクロファージの遊走阻止をみたところ、表3に示すように、即時型アレルギー感作脾からのマクロファージは抗原による遊走阻止をうけなかったが、遅延型アレルギーのみに感作された動物の脾からのマクロファージは抗原の存在下で特異的に遊走を阻止された。この確認によって、マクロファージの抗原による特異的遊走阻止は遅延型アレルギーを反映する *in vitro*

表3 遅延型あるいは即時型アレルギー感作モルモット脾からのマクロファージ遊走に対する抗原の影響
(培養後4日目)

感作 型	抗原	培養液内抗原 (50 μ g/ml)	遊走指数 (%)
即時型	無	EA	80.8
		BSA	90.0
	EA	EA	90.0
		BSA	108.7
遅延型	BSA	EA	90.9
	BSA	BSA	38.0

の反応であるという根拠がいくつか認められた。

2. 毛細管口からのマクロファージ遊走の阻止

マクロファージ遊走阻止の本態をさらに詳細に分析するために、GEORGE および VAUGHAN の方法¹⁾をすこし修飾し、遅延型アレルギー感作動物から分離した細胞浮遊液を毛細管につめ、管口からの細胞の遊走が抗原存在の有無によってどう変化するかを観察した²⁾。

方法：遅延型アレルギー感作モルモットの腹腔内に流動パラフィン注射後4日目に採取した腹腔浸出細胞や、抗原感作領域のリンパ節細胞を感作細胞材料とし、これらの細胞浮遊液を小試験管に入れ、これに一方の口を閉じたガラス毛細管を開口部を下向きにして入れ、全体を陰圧として毛細管内の空気を除去後、平圧にもとして毛細管のほぼ90%に細胞液をつめた。これらの毛細管を次に閉管部を下にして 800 rpm、3 分間遠心して細胞を毛細管閉管部 6~7 mm のところまでつめた。ついで細胞と上清との境界面でガラス管を切断し、これを小シャーレの底に2本ずつ微量のシリコン・グリースで固定した。20%にコウシ血清を加えた Eagle 基礎培地に抗生物質を加えた培養液を小シャーレに注ぎ、カバーガラスでふたをして5% CO₂ ふ卵器内で37°C で培養(1~2日)した。細胞の遊走は毛細管口から細胞遊走最外縁部までの距離を測定した。MI の算出は上述の通りであるが、それぞれ4~5個の小シャーレ(8~10本の毛細管)について MD₁ および MD₂ を測り、その平均値をもとめた後に計算した。

A. 感作動物マクロファージの遊走阻止

ツベルクリン感作動物および正常動物由来の腹腔浸出細胞に、50 μ g/ml および 5 μ g/ml の濃度に PPD を加えた場合の遊走阻止現象を表4に示す。正常細胞の遊走は 50 μ g/ml のによっても阻止されなかったが、感作細胞は 5 μ g/ml の抗原添加によって強く遊走阻止をうけた。この場合、遊走を阻止される細胞は腹腔浸出細胞

表4 流動パラフィン刺激腹腔浸出細胞の遊走に対する PPD の影響

添加 PPD の 濃度 μ g/ml	腹腔細胞採取動物	遊走指数 (%) *
50	正常動物	89.0
	感作動物	23.0
5	正常動物	93.8
	感作動物	13.7

* 各群とも3回の実験平均値

中のマクロファージであることが、上記の組織片での観察からも推定される。

一方、正常およびツベルクリン感作モルモットのリンパ節細胞を用いると、感作の有無、感作期間の長短、添加抗原濃度の大小にかかわらず、PPD 添加による細胞の遊走阻止はみとめられなかった⁹⁾。ツベルクリンアレルギーを受身伝達しうるリンパ節細胞によっても、抗原による遊走阻止はみられなかった。これは遊走細胞の主体はリンパ球のため、組織片において観察したと同様、抗原による影響をうけなかったためと考えられる。

B. 正常動物マクロファージの遊走阻止

遅延型アレルギー感作動物のマクロファージの遊走阻止は細胞自体と抗原との直接作用によるかもしれないという見方に後退を余儀なくさせたのは次のような DAVID¹⁰⁾の実験であった。かれらは感作動物細胞を 2.5% に混合した正常動物腹腔浸出細胞の遊走が抗原存在下で阻止されることを見出した。この事実は同じ細胞材料を用いて直ちにわれわれによっても確認された⁹⁾。すなわちツベルクリン感作および正常モルモットの腹腔浸出細胞の混合物の遊走を毛細管法でみると、感作細胞の比率を 1% まで下げて PPD 添加群では正常マクロファージの遊走阻止がみとめられた。この結果はマクロファージの遊走阻止は少なくともマクロファージ自体の遅延型感作を必要とせず、免疫学的重要性をになうものは小部分を占める感作細胞であることを示したと思われる。

正常マクロファージの遊走を *in vitro* の遅延型アレルギー反応の指標として用いるという発見により、リンパ球が多いためにマクロファージの遊走が検出できなかった脾やリンパ節などの細胞について混合法によって感作細胞の検出を行なうことが可能になった。そこでわれわれは腹腔浸出細胞のほか、遅延型アレルギーの受身伝達能をもつことを確認しているリンパ節および脾（い

表5 ツベルクリン・アレルギー受身伝達能をもつ感作細胞を低比率に含む正常腹腔浸出細胞の遊走に対する PPD の阻止作用

感作細胞	遊走指数 (%)				
	正常腹腔浸出細胞 100 に対する各細胞の混合比				
	0	1	5	10	20
腹腔浸出細胞	89	59(+)	43(+)		
肉芽腫脾細胞	104	79	59(+)	15(+)	33(+)
種系リンパ節細胞	90	122	79	72(+)	31(+)

(+) : 遊走阻止効果ありと判定 (P=0.01)

ずれも肉芽腫形成による腫脹の著明なもの)の細胞^{10,11)}がいずれも混合法によって遅延型アレルギーの免疫情報をもつ感作細胞を含むことを明かにした⁹⁾。すなわち表5に示すように感作動物由来の脾およびリンパ節細胞は抗原存在下ではそれぞれ 5% および 10% の比率の混合で正常マクロファージの遊走を阻止した。なおツベルクリン・アレルギーの受身伝達能が検出できない感作動物脾についても、混合法によると脾細胞 9% の混合比率でマクロファージ遊走阻止が認められた。このことはマクロファージの遊走阻止を指標とする *in vitro* の反応は遅延型アレルギー感作細胞の検出にかなり敏感であることを示唆している。

C. マクロファージ遊走阻止をおこす感作細胞の同定

マクロファージ遊走阻止を指標とする *in vitro* の遅延型反応において、抗原と特異的に作用する感作細胞の同定が免疫学的に重要なことになってきたが、DAVID¹⁰⁾はまず正常マクロファージに混合する少数の感作細胞として感作動物リンパ節細胞を用いても遊走阻止がみられることから、抗原と作用するのはリンパ球であろうと推定した。BLOOM および BENNETT¹¹⁾はさらに、遅延型感作動物腹腔浸出細胞をガラス粘着法を用いて人為的にできるだけ単一の細胞成分に分け、99% のマクロファージ成分は抗原添加によっても遊走阻止を示さないこと、約

表6 腹腔浸出細胞のガラス粘着法による分画法

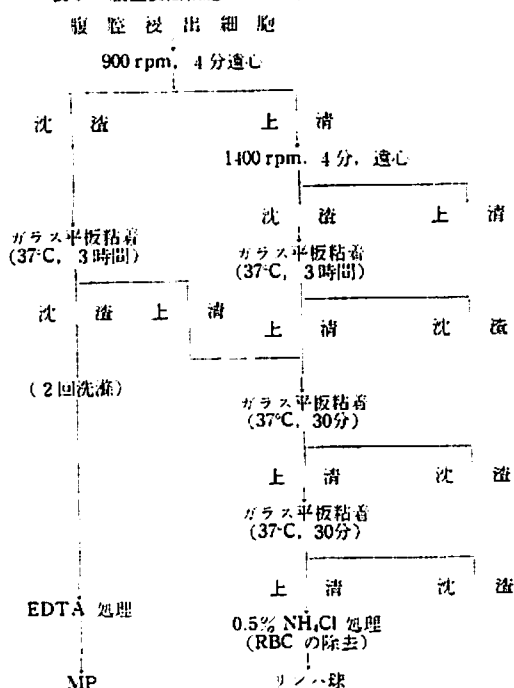


表7 ツベルクリン・アレルギー感作動物からえた腹腔浸出細胞遠心分離のアレルギー受身感作能および正常食細胞遊走阻止能

腹腔浸出細胞 遠心分離	分別染色 (%)		ツベルクリン・アレルギーの受身感作能		細胞遊走指数 (%)			
	MIF	リンパ球	細胞数	40 μ g PPD への 反応 (mm)	正常腹腔浸出細胞 100 に対する混合比			
900-1400 R	79	12	1.02×10^6	18.7 ± 0.5	1	10	20	50
900 R	86	6	1.42×10^6	12.8 ± 2.5	98 (-)	114 (-)	93 (-)	39 (+)

注: 900-1400 R: 900 rpm, 4 分間の遠心沈降の 1400 rpm の遠心沈降
900 R: 900 rpm, 4 分間の遠心沈降

表8 ツベルクリン・アレルギー感作動物からえた腹腔浸出細胞ガラス結着法分離のアレルギー受身感作能および正常食細胞遊走阻止能

ガラス粘着法 分 西	分 別 染 色 (%)		ノ・ア・レ・キ・ーの受身伝達			細胞遊走指数(%)			
	MP	リンパ球	細胞数	40 μ g PPD への反応(mm) 24時間値	48時間値	正常腹腔浸出細胞 100 に対する混合比			
						: 1	: 5	: 10	: 50
分 西 前	86	7	1.6×10^6	11.5 ± 1.1	9.7 ± 1.6			54 (+)	
リンパ球分西	80	10	2.2×10^6	7.0 ± 1.7	11.0 ± 0.3	38 (+)	42 (+)		
MP 分 西	93	3	2.0×10^6	5.2 ± 1.3	2.8 ± 0.8			88 (-)	38 (+)

90%のリンパ球成分は混合法によって比率の大きいほど強く正常マクロファージの遊走を阻止することから、*in vitro*の遅延型反応ではリンパ球が免疫細胞として、マクロファージが免疫学的反応の表示細胞として働き、反応は2種の細胞の協力によって構成されると考えた。

われわれは表6に示すガラス結着法を用い人工的に分離して均一性をたかめた細胞成分につき、遅延型アレルギーの受身感作能と *in vitro* のマクロファージ遊走阻止能との関連をみようとした。腹腔浸出細胞を材料として、すでに遠心による分離法のみで表7に示すように、マクロファージの多い成分(900 R)ではツベルクリン・アレルギーの受身感作能が低下し、正常マクロファージの遊走阻止能も減少していることが認められた。さらにガラス結着法によってツベルクリン感作モルモットの腹腔浸出細胞を分けると、表8に示すようにマクロファージ93%の成分はほぼアレルギー受身感作能を失ない、同時に正常マクロファージ遊走阻止能の著しい減退を示した。この実験では細胞成分の純化が充分でなかったが、両活性の保持に必要なのは少なくともマクロファージでなく、リンパ球のように見える。また両活性の平行性は、マクロファージ遊走阻止が遅延型アレルギーを表明する *in vitro* の反応として有望であることを裏がきす

る。一方、遅延型アレルギーの免疫学的情報になる細胞はマクロファージでないことがますます明らかになってきたように思われる。

D. マクロファージ遊走阻止因子の細胞外放出

わずかな比率で混入された感作リンパ球成分が抗原と作用して他の大部分の正常マクロファージに遊走阻止効果をおよぼすことは、感作細胞から培養液中に放出される拡散性物質の存在を考えればもっとも合理的に説明されるであろう。この考えを支持する実験はすでにいくつか行なわれ、遅延型アレルギー感作動物のリンパ球含有材料を抗原とともに培養し、その培養上清中に正常マクロファージの遊走を阻止する因子(MIF: Migration Inhibitory Factor)が cell-free で証明されている。われわれも MIF の精製とマクロファージに関連した作用を含むその生物学的活性の研究を意図し、まずわれわれの材料につき、MIF 純化のための種々の条件を検討した。

MIF の産生と検定: 遅延型アレルギー感作モルモットから分離した細胞をよく洗滌し(脾細胞浮遊液はさらに 0.5% NH₄Cl 処理で赤血球をのぞく)、コウシ血清を20%に加えた Eagle 培地(抗生物質含有)で 2×10^6 ml の濃度とし、抗原(PPD は通常 50 μ g/ml)の添加

または無添加の下に CO_2 ふ卵器で 37°C 、約20時間培養した。培養液は 3000 rpm、30分の遠心を行なって上清を得た。この培養上清を、流動パラフィンで浸出させ毛細管につめた正常腹腔浸出細胞をいれた小型シャーレに加え、カバーガラスでふたをして 5% CO_2 ふ卵器内で 24~48時間培養した。遊走指数 (MI) が80%以上の場合は遊走阻止効果がないと判定した ($P=0.01$)。

われわれは表9に示すように、ツベルクリン・アレルギー

表9 ツベルクリン感作動物細胞+PPD培養20時間の培養液上清の示す正常腹腔浸出細胞の遊走阻止効果

感作動物細胞	培養液上清添加後の各時期における正常腹腔浸出細胞の遊走阻止効果			
	24時間値		48時間値	
	MD ₂ /MD ₁	MI	MD ₂ /MD ₁	MI
所属リンパ節細胞	26/57	46%(+)	63/116	54%(+)
肉芽腫脾細胞	16/39	41%(+)	33/47	70%(+)
腹腔浸出細胞	34/41	83%(-)	35/49	71%(+)

MD₁: PPD なしの場合の遊走距離

MD₂: PPD ありの場合の遊走距離

MI: 遊走指数 (+): 遊走阻止陽性 (-): 遊走阻止陰性

ギーの受身伝達^{10,11)}および混合法による正常マクロファージの遊走阻止を示したツベルクリン・アレルギー感作動物細胞を材料として MIF の分離を試みた¹²⁾。その結果、リンパ節および脾細胞からは表9に示すように満足すべき MIF の分離をみとめたが、腹腔浸出細胞は MIF の分離に不適であることがわかった。この理由としては、リンパ球成分から放出された MIF が腹腔浸出細胞の多くを占めるマクロファージによってとりあげられるためかもしれない。この結果から、われわれは大量に MIF を分離する目的で、肉芽腫脾細胞を材料にすることにした。この場合モルモットの感作は流動パラフィンに浮遊させた結核死菌を筋肉内注射後4週以上を経過させて十分強く行ない、これに BCG 生菌約 0.5 mg (湿量) を静脈注射し1週後に腫大した肉芽腫脾をえた。

所属リンパ節細胞を MIF 分離の材料とするときには、100 μg の結核死菌を流動パラフィンに浮遊させ分割して正常モルモットの四肢 foot-pads に注射、11日目から35日目の各時期にわたって所属リンパ節細胞を分離し、いずれも MIF の遊離を証明することができた。このような感作動物所属リンパ節細胞を抗原なしに培養してえた培養上清に、単に相当量の抗原を添加したものでは正常マクロファージの遊走を阻止することはできなかった。

現在、MIF の部分的精製はかなり試みられ、腹腔浸出細胞リンパ球成分^{7,13,14)}、リンパ節細胞^{6,15)}などの材料から放出される MIF はほぼ同じ性状をもつことが報告されている。それらを要約すると MIF は Sephadex ゲル濾過法によると約7万の分子量^{13,15,16)}をもち、非透析性^{6,7,14)}で 56°C 、30分の処理^{6,14)}、DNase および RNase によっては失活しないが¹⁴⁾、トリプシンでは失活¹⁴⁾、蛋白質であろうと推定されている¹⁷⁾。肉芽腫脾細胞+PPD の培養からえたわれわれの MIF もほぼ同様な性質を有するが、われわれはさらに精製をすすめるに当り、MIF と同時に同じ培養上清中に証明される皮膚反応惹起因子との関連を究明することを目標にした。*in vitro* でマクロファージに作用する MIF が *in vivo* の遅延型アレルギー反応で演じられるマクロファージの役割に関連をもつかどうかを明らかにしたいためである。

3. マクロファージ遊走阻止因子と皮膚反応惹起因子との関係

遅延型アレルギー感作動物細胞と抗原を培養して得られる培養上清は、MIF 活性のほかに正常動物に皮膚反応をも惹起しうることが最近確認^{13,15,16,18,19)}された。われわれは血清を加えない培地で培養された所属リンパ節細胞、肉芽腫脾細胞は、表10に示すように抗原存在下に

表10 感作動物リンパ節細胞を抗原 PPD の存在、不在のもとに血清なし培地で培養した培養上清の正常モルモットに惹起する皮膚反応

PPD	正常動物に皮内注射後の各時期における反応 (mm)		
	3時間	6時間	24時間
+	12.3 $\pm$ 1.6	15.5 $\pm$ 2.6	14.0 $\pm$ 3.1
-	3.0 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 1.1	3.8 $\pm$ 0.8

おいてのみ、皮膚反応を起こす因子を産生することを確認した。すなわちこの MIF 活性をもつ培養上清を約10倍に濃縮してその 0.1 ml を正常モルモットの皮内に注射すると、3時間目には発赤、硬結を示すツベルクリン反応様の炎症がみとめられ、それは6~9時間をピークとして経過し、24時間後にはむしろ消褪することが観察された。この型の皮膚反応は組織学的には単核細胞の参加が著しく、遅延型アレルギーの皮膚反応と似ていることが主張され¹⁸⁾、*in vivo* アレルギー反応の mediator の存在が培養上清中に推定された。そうであれば、これが MIF と同一物質か否かは興味ある点である。

そこでわれわれはまず図1に示すように、ツベルクリ

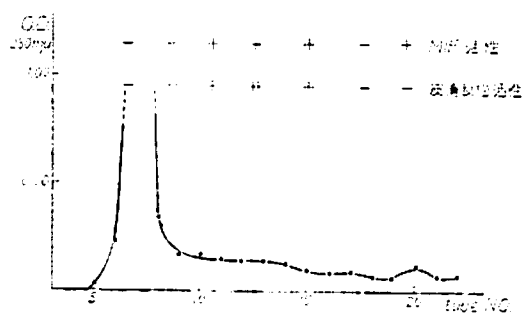


図1. ツベルクリン感作動物肉芽腫細胞+PPD培養上清の Sephadex G-100 各分画の示す生物学的活性

ン感作モルモットの肉芽腫細胞を PPD 存在下に培養して得た培養上清を Sephadex G-100 ゲル濾過にかけて各分画の MIF 活性と皮膚反応惹起力を同時にしらべた。その結果、MIF 活性は他の報告と異なり、血清アルブミン相当の分子量をもつ分画のほか、さらに分子量の小さい分画にもみとめられ、吉田および REISFELD²⁰⁾も独立に同じ結果を得て小さい分子量の方は約12,000と報告している。しかしいずれの場合も、皮膚反応惹起力は分子量約7万の分画には認められたが、分子量の小さい分画には検出されなかった。両活性を示す分子量約7万の Sephadex 分画は、さらに種々の分析にかけられているが^{20,21)}、MIF と皮膚反応因子の異同は今後進められる精製の結果をまたねばならぬであろう。

表11 肉芽腫細胞培養上清およびその分画とツベルクリン抗原 (TAP, PPD) によるモルモット皮膚反応の経過

ツベルクリン感作動物	皮内注射材料	皮内注射後各時期における反応 (mm)			
		3	6	9	24時間
正常動物	培養上清 (PPD -)	5.0	5.8	5.3	3.0
	培養上清 (PPD +)	13.6	15.2	16.0	10.0
	Sephadex G-100 分画	11.1	12.8	11.8	8.0
	TAP	3.0	5.5	4.5	2.0
	PPD	3.5	4.5	4.0	2.0
感作動物	TAP	5.5	7.0	9.5	13.0
	PPD	1.0	7.5	8.5	11.0

註：培養上清：PPD なしまたは PPD ありで細胞培養を行なった培養液上清

Sephadex G-100 分画：培養上清 (PPD +) からえたもの

TAP: Tuberculin Active Peptide, 1 μg 注射

PPD: Purified Protein Derivative, 0.1 μg 注射

上記の両活性を示す Sephadex 分画の惹起する皮膚反応は、分画前の上清および感作動物に注射した精製ツベルクリン PPD、ツベルクリン活性ペプチド TAP による皮膚反応と表11に示すように比較し、各時間で反応の組織学的検査も行なった。その結果、分画による皮膚反応は肉眼的にも組織学的にもほぼ活性上清によるものと同じであったが、24時間目に PPD や TAP によって感作動物に惹起されたツベルクリン反応とくらべると、組織学的にみて単核細胞の外に多形核白血球の参加が多かった。すなわち、MIF 活性分画による皮膚反応が典型的な遅延型アレルギー反応と全く同一か否かはまだ検討を要すると思われる。

考 察

In vitro のマクロファージ遊走阻止現象は、最終的には cell-free でえられた MIF による正常マクロファージの遊走阻止という形で表現されるようになり、MIF の産生は抗原と特異的に作用する感作リンパ球に帰せられるようになったため、*in vitro* の遅延型アレルギー反応におけるマクロファージの役割は、免疫学的重要性をもたない指標細胞にとどまるのみとなった。さらに遅延型アレルギーの受身伝達の面からも、マクロファージが免疫学的情報をにやう細胞である可能性が小さくなった。われわれの実験では感作動物由来のリンパ球の純化がはなはだ不十分であるため、それが MIF 産生およびアレルギー受身伝達能のいずれについても責任ある細胞とはまだ決定できないが、腹腔浸出細胞中の多形核白血球はすでに受身伝達能のないことが明らかにされているので^{22,23)}、腹腔浸出リンパ球が感作細胞である可能性は大きい。

MIF の正常マクロファージに対する作用様式はまだ不明の点が多いが、抗体および抗原-抗体複合物の関与しない²⁴⁾非特異的薬理作用と解される。MIF の作用で遊走マクロファージの凝集塊が生ずる現象は²⁵⁾われわれもしばしば観察しており、その形成によりマクロファージの移動が阻止されると考えている。凝集塊の形成はマクロファージ細胞表面の変化によって相互に粘着したためとも推定されているが確かではない。

上述のような MIF によるマクロファージの変化が、生体内の遅延型アレルギー反応に多数のマクロファージが参加して炎症反応をおこしていることに関連をもつならば、MIF が実際の生体内遅延型アレルギー反応の惹起にかなり重要な役割を演じているといえよう。代表的な生体内遅延型アレルギー反応としてのツベルクリン反応では、受身感作実験にもとずき反応参加細胞の大部分

正常細胞で感作細胞（おそらくはリンパ球）はわずかな比率を占めるにすぎないことが観察されており²⁶⁾、さらにその大部分をしめて反応惹起にあずかる非感作細胞は主として骨髄から血流を介して反応の場に来るマクロファージであることが見出されている^{27,28)}。すなわちこの生体内反応においてもマクロファージは免疫反応を表現する細胞として働いており、その役割は *in vitro* の遅延型反応と極めて類似しているが、生体内ではさらに感染免疫、移植免疫などの分野でその意義が拡大されると思われる。現在の研究段階では約7万の分子量の分画に集中している MIF と皮膚反応惹起因子との異同はまだ今後の検討をまたねばならない。

文 献

- 1) 吉田 彪, 1968: 医学と生物学, 77, 123.
- 2) GEORGE, M. and VAUGHAN, J. H., 1962: Proc. Soc. Exptl. Biol. & Med., 111, 514.
- 3) 吉田 彪, 綿貫 まつ子, 1968: 医学と生物学, 77, 131.
- 4) DAVID, J. R., LAWRENCE, H. S. and THOMAS, L., 1964: J. Immun., 93, 274.
- 5) 綿貫 まつ子, 吉田 彪, 橋本達一郎, 1969: 医学と生物学, 78, 129.
- 6) DAVID, J. R., 1966: Proc. N. A. S., 56, 72.
- 7) BLOOM, B. R. and BENNETT, B., 1966: Science, 153, 80.
- 8) HALPERN, J., STORF, U. and FRAY, A., 1967: Nature, 215, 400.
- 9) SVEJCAR, J., PEKÁREK, J. and JOHANOVSKÝ, J., 1968: Immunol., 15, 1.
- 10) 橋本達一郎, 三浦 肇, 1964: 医学と生物学, 69, 291.
- 11) HASHIMOTO, T., MIURA, K., YOSHIDA, T. and NAGAI, R., 1967: Proc. Jap. Soc. R. E. S., 7, 48.
- 12) 綿貫 まつ子, 吉田 彪, 橋本達一郎, 1969: 医学と生物学, 79, 67.
- 13) DUMONDE, D. C., HOWSON, W. T. and WOLSTENCROFT, R. A., 1968: Immunopathol. Intern. Symp., 5 th, 263.
- 14) DAVID, J. R., 1968: Fed. Proc., 27, 6.
- 15) BLOOM, B. R. and BENNETT, B., 1968: Fed. Proc., 27, 13.
- 16) BENNETT, B. and BLOOM, B. R., 1968: Proc. N. A. S., 59, 756.
- 17) DAVID, J. R., 1965: J. Exptl. Med., 122, 1125.
- 18) KREJCI, J., PEKÁREK, J., JOHANOVSKÝ, J. and SVEJCAR, J., 1969: Immunol., 16, 677.
- 19) PICK, E., KREJCI, J., CECI, K. and TURK, J. L., 1969: Immunol., 17, 741.
- 20) YOSHIDA, T. and REISFELD, R. A., 1970: to be published.
- 21) REMOLD, H. G., HABER, E. and DAVID, J. R., 1969: Fed. Proc., 28, 629.
- 22) KIRCHHEIMER, W. F., HESS, A. R. and SPEARS, R. G., 1951: Am. Rev. Tuberc., 64, 516.
- 23) HASHIMOTO, T., MIURA, K. and NAGAI, R., 1965: Proc. Jap. Soc. R. E. S., 5, 116.
- 24) DUMONDE, D. C., WOLSTENCROFT, R. A., PANAYI, G. S., MATTHEW, M., MORLEY, J. and HOWSON, W. T., 1969: Nature, 224, 38.
- 25) DAVID, J. R., AL-ASKARI, S., LAWRENCE, H. S. and THOMAS, L., 1964: J. Immun., 93, 264.
- 26) MCCLUSKEY, R. T., BENACERRAF, B. and MCCLUSKEY, J. W., 1963: J. Immun., 90, 466.
- 27) LUBAROFF, D. M. and WAKSMAN, B. H., 1968: J. Exptl. Med., 128, 1425.
- 28) LUBAROFF, D. M. and WAKSMAN, B. H., 1968: J. Exptl. Med., 128, 1437.

木下喜博（大市大・医・生理）：1) 脾肉芽腫細胞に PPD を与える時、遊走阻止物質が出ることですが肉芽腫の中のどの種の細胞から、それが放出されるのか。2) 肉芽腫細胞を培養中、PPD を与えた時、リンパ球の幼若化がみられるか。また、遊走物質の放出と芽球出現率との間に相関があるか。

答：1) マクロファージが80%におよぶ腹腔浸出細胞を分画して MIF 放出細胞を究明した実験から類推すれば、肉芽腫脾細胞の場合も PPD と作用して MIF を放出するのはリンパ球かもしれない。2) PPD を肉芽腫脾細胞に与える時間は20時間前後なので、さらに時間を要するリンパ球の幼若化はみていない。しかし MIF と同じ培養上清中に芽球形成作用をもつ物質がえられたことは文献にある。³H thymidine のとりこみの増加も平行して認められている。遊走物質の放出と芽球化出現率の相関は不明である。

市丸道人（長崎大・原研内科）：只今、問題になっているリンパ球の幼若化現象と遊走阻止現象との関係について、ヒト末梢血リンパ球を Streptolysin O や PPD、喘息アレルギー、薬物アレルギーの際の薬物アレルギーで培養するとそれぞれ感受性のあるものに種々の程度の幼若化現象がみられる。この際の培養液、あるいは上清がセルモット、およびヒトの腹腔マクロファージの毛細管よりの遊走を、大体幼若化の程度に比例して阻止する成績が得られた。本因子は幼若化に多少先立って産生されるもののようである。

答：遅延型アレルギー感作動物由来のリンパ球を抗原とともに培養するとその培養上清中には MIF 活性の外に皮膚反応惹起、細胞毒性、リンパ球幼若化などの生物学的活性が観察されており、かかる活性がそれぞれどういう物質に帰着されるかは、物質の精製の進められる将

米にかかっているだろう。

市丸道人：秋山先生に対するコメントとして。喘息アレルギーや薬物アレルギーの場合もアレルギー培養によりリンパ球の幼若化がみられるものがある。この場合もやはりモルモットマクロファージの遊走を阻止する因子を産生する成績が得られた。しかしこれはそのままこの遊走阻止現象が即時型アレルギーでもみられるということにはならないと考えられる。すなわち幼若化現象と即時型アレルギーの発現との間にはなお未解決の多くの問題が残されていると思われる。例えば、リンパ球幼若化の程度と血清抗体価との間には必ずしも平行関係はみられないかも知れない。

新家莊平（阪大・微研）：マクロファージ遊走阻止分画および皮膚反応惹起物質の各種酵素に対する抵抗性について知見があれば教えていただきたい。

答：MIF 分画に関しては、DAVID の報告 (Fed. Proc. 27: 6, 1968) に、トリプシンで不活化されるが、DNase, RNase の作用はうけないとある。われわれはトリプシンに対しては同様な結果をえている。

深尾 孝（シオノギ研）：皮膚反応惹起分画に関する質問。D. A. WILLAUGHBY らは Delayed-type hypersensitivity の mediators として lymph node permeability factor (LNPF) なるものを提案して、RNA 類似の性質をもっているなど若干の性質を報告しているがこれとの上記分画との関連性について、また、上記分画が毛細血管透過性亢進作用があるかどうか。

答：MIF は LNPF と異なって抗原との特異的作用の下に産生され、RNase に抵抗性をもつなどの報告もあり、互いに関連はないように思われる。毛細血管透過性亢進作用についてはみられていない。

紺田 進（北野病院）：感作動物腹腔浸出液内細胞による MIF の現象は、感作後何日目より認められるか。

答：感作動物所属リンパ節（抗原注射領域）細胞を用いて感作後7日または11日目に cell-free で MIF を証明した。腹腔細胞では感作後12日から15日のものも使用されたが、それ以前は検討されていない。

森沢成司（大市大・医・生化）：1) MIF と皮内反応活性物質は Sephadex G-100 で分けられて前者では 70,000 と 12,000、後者では 70,000 という分子量をもつものことだが、この実験材料はイーグル培地に血清を入れないもののみで行われたのか。2) 70,000 の分子量をもつといわれている分画は血清全蛋白質の何%に当るか。3) 活性物質は温度やその他の条件でどの位安定であるか。

答：1) イーグル培地に血清をいれたものでは培養上清濃縮物の皮膚反応活性が対照でも強すぎるので、皮膚反応活性をテストする場合には全く血清を含まぬイーグル基礎培地を培養に用いている。2) 血清は分子量 10 万以上のところにかんがりのピークを示すが、分子量 7 万あたりは OD も低く蛋白量は少ない。塩析によるロスを選けた場合は約 10% である。3) われわれの成績では 56°C, 30 分では安定、70°C, 30 分では活性を失った。氷室保存では安定（約 1 週）の場合も不安定の場合もある。凍結乾燥では安定である。

中野康平（東大・医科研）：MIF のマクロファージ以外の細胞についても作用をしらべたか。例えば、リンパ球の芽球化を起すというような可能性はないか。もしあるとすればマクロファージに対するものと同一のものと考えられるか。

答：Migration 阻止については、リンパ球、多形核白血球には作用しなかった。芽球化はしらべていない。文献的には芽球化作用はみられているが、MIF と同一物質によるか否かは断定できない。MIF の精製をまたねばならない。

免疫生物学研究会
シンポジウム 3,
77~81 (1969, 大阪)

マクロファージ遊走阻止試験と細胞性免疫—第2報

秋山 武久, 内山 竹彦 (慶大・医・微生)
大村 敏郎 (同 外科) 笠原 四郎,
小山 弘之 (北里研・ウイルス部)

マクロファージ遊走阻止試験は試験管内の反応として、遅延型のアレルギー反応性を観察すべく考案されたものである。ところで、わたくし達は、特殊な感染症に罹患した後に成立する、いわゆる“二度なし免疫”と移植免疫の主体は、体液性抗体の作用として理解し得ないところから、細胞性免疫と呼んでいるが、その本態が遅延型アレルギー反応のそれと本質的に同一であろうと考えるところから、これらを広義の細胞性免疫という概念のもとに総括的に理解したいと思っている。したがって、前報¹⁾に引き続いて、本報でも、マクロファージ遊走阻止試験を通じて、遅延型アレルギー反応と感染症ならびに移植における細胞性免疫とを相互比較しながら、広義の細胞性免疫の本態を明らかにする手掛りを得ることを究極の目的としている。

実験方法

原法は前報¹⁾に詳説しておいたが、流動パラフィンで封出した腹腔腔細胞を遠沈洗浄するに先立って、ナイロンガーゼ・ナイロン製靴下を洗濯乾燥したもの一通すという操作を加えた。こうすることにより、腹水中のフィブリン塊を取り除くことができ、ガラス毛細管に詰めた細胞浮遊液を遠沈して細胞成分のみを集める際に、細胞成分が毛細管の途中にひっかかる例が減少した。

本報では原法のほかに2種類の変法を用いた。その一つは前処置動物のリンパ節細胞—主として腸間膜リンパ節を使用した—に未感作モルモットの腹腔腔細胞を1:4の割合に混合したものを毛細管につめ、以後の操作を原法と同様に行なうもので、リンパ節細胞の提供動物としてはモルモット以外の動物でもよいことは前報で確かめた。

変法の二は前処置動物のリンパ組織細胞—実際には、脾臓と各所のリンパ節の細胞を一括にしたものを用いた—に一定量の抗原を添加して、炭酸ガス培養器の内で、37°C に3~48時間保った後で遠心沈澱して得た上清部分に未感作モルモットの腹腔腔細胞の遊走を阻止する

物質—migration inhibitory factor 略して MIF と称する—があるかどうかを、腹腔腔細胞の培養液の内に一定量の遠沈上清を加えてマクロファージの遊走状態を調べることによって判定する方法である。

実験結果と考察

1. MIF の安定性

BCG 株の加熱死菌 5 mg を Freund のアジュバントに浮遊してモルモットの大腿筋肉内に接種してから6週後に、または、腸炎菌 *Salmonella enteritidis* の R 型弱毒である RB1 株の生菌 10^{-3} mg を DK1 系マウスの皮下に接種して7週後に、それぞれの動物を屠殺してリンパ組織細胞を集め、前者の場合には旧ツベルクリン、後者の場合には RB1 株の生菌を培養液—ストレプトマイシン 100 μ g/ml とペニシリン 100 u/ml を含有—に添加して4時間培養した上清を MIF 原液としてその安定性を調べた。トリプシン・DNase・RNase 処理は既報²⁾の方法にしたがい、透析は PBS 中で3時間、外液を交換しながら実施した。

結果は表1、2に示すごとくで、RNase 処理で完全

表1 前処理エキス (MIF) を加えた環境での
正常モルモット腹腔腔細胞の MI

エキスの前処理	遊走円直径 mm	面積	比
—	2.50×1.80	32.2	
56° 30分	2.65×2.25	42.7	
60° 60分	3.45×4.15	102.7	
BCG生菌で吸収	1.70×1.45	17.6	
トリプシン	1.85×1.70	22.5	
透析	3.80×2.20	59.9	
DNase	1.45×1.30	13.5	
RNase	3.95×3.45	97.7	
エキスを非添加	4.10×3.40	100.	

エキスの最終濃度 1:2

エキスを 1:25 に OT を添加, 37°C, 4 hrs

感作リンパ球: 加熱 BCG 死菌 in 完全 adjuvant を接種したモルモットの脾、腸間膜

表2 前処理ニキスを加えた環境での正常
モルモット腹腔細胞の MI

ニキスの前処理	遊走円直径 mm	面積比
—	2.00×1.35	30.7
56° 30分	2.10×1.50	35.9
60° 30分	2.55×2.10	61.0
RB1 生菌で吸収	1.80×1.20	24.6
トリプシン	1.85×1.25	26.3
透析	1.90×1.60	34.5
DNase	1.45×0.75	12.3
RNase	2.95×2.55	85.7
ニキス非添加	3.25×2.70	100.

ニキス最終濃度 = 1 : 2

ニキス : 0.05 mg/ml の割合に生 RB1 株を添加, 37°C, 4 hrs.

抽出用細胞 : 生 RB1 免疫マウスの脾, リンパ節の細胞

に失活するだけでなく, 60°C で30~60分加熱することによっても活性が滅弱する事が確かめられた。

2. 腸炎菌感染マウスのリンパ組織細胞よりの MIF の誘出

前項の方法に準じて, 弱毒 RB1 株を接種して7週後のマウスのリンパ組織細胞に RB1 株・腸炎菌 S 型強毒 No. 11 株・腸炎菌 S 型弱毒 Jena 株・豚コレラ菌 *Salmonella choleraesuis* S 型強毒北海道株・チフス菌 *Salmonella typhi* Ty2 株の生菌と 58°C あるいは 100°C で60分間加熱した死菌とをそれぞれ 0.2 mg/ml の割合に細胞浮遊液に添加して 37°C に48時間培養し, その遠沈上清の MIF 活性を調べた。この際, 上清部分をモルモットの腹腔細胞の培養液に 1/3 の割合に混合した。

その結果は表3に示すごとくで, MIF を誘出する能力は菌を加熱死させることによって明かに滅弱し, 特に 100°C で60分間加熱した場合には極度に滅弱することが確かめられたが, 生菌であれば, 少なくとも KAUFFMAN WHITE によって規定されているサルモネラの抗原性とは無関係に MIF を誘出することができることも判明した。

なお, ここで注目されるのは, Jena 株の生菌を添加した場合の MIF の誘出能が他の株の生菌を添加した場合のそれに比べて有意に弱い点である。Jena 株はマウスに接種した後, 長期間にわたって肝・脾内に生残しているにもかかわらず, 細胞性免疫を付与し得ないという毛色の変った株であり³⁾, その他の株はいずれも感受性動物にチフス症を起して強い細胞性免疫を付与し, しかも, それらの細胞性免疫は菌間に多糖体抗原の共通性がなくとも交叉的に反応し得ることが知られている⁴⁾。こ

表3 様々な腸内細菌で誘出した MIF を加えた環境
での正常モルモット腹腔細胞の MI

添加菌株	菌株の前処理	遊走円直径 mm	面積比
腸炎菌	—	2.75×2.25	31.6
RB1 株	58°C 60分 100°C 60分	4.35×4.15 4.25×4.10	92.4 89.2
腸炎菌	—	2.25×1.85	21.3
No. 11 株	58°C 60分 100°C 60分	3.70×3.35 4.00×3.85	63.4 78.8
腸炎菌	—	3.05×2.90	45.2
Jena 株	58°C 60分 100°C 60分	3.95×3.75 3.35×3.15	75.8 54.0
豚コレラ菌	—	2.00×1.85	18.8
北海道株	58°C 60分 100°C 60分	3.35×3.10 3.65×3.55	53.1 66.3
チフス菌	—	2.60×2.15	28.6
Ty2 株	58°C 60分 100°C 60分	4.10×3.70 4.15×4.05	77.6 86.0
菌液を添加せず培養した上清		4.65×4.20	100.
MIF や培養上清を加えず		4.85×4.70	116.7

感作リンパ球 : 生 RC1 株 10⁻³ mg s.c. 接種 DK1 マウスの脾, 腸細胞, 菌液を 0.2 mg/ml の割合に添加し, 37°C で2日間培養する

これらのことを思い合せると, MIF の誘出にあずかる抗原と細胞性免疫の成立にあずかる抗原との間には, 質的の類似が存在する可能性があるように思われる。

3. トキソプラズマ感染マウスにおけるマクロファージ遊走阻止

前報¹⁾ではマウスの腸炎菌感染症をとりあげて, マクロファージの遊走阻止現象が認められるのは, 生菌を接種するか, 58°C 加熱死菌を完全 Freund アジュバントに浮遊して接種した場合だけで, 加熱死菌単独を繰返し接種しても遊走阻止現象は決してもたらされなかったことを報告した。

表4 トキソプラズマ免疫マウスリンパ節細胞と
混合した正常モルモット腹腔細胞の MI

	抗原濃度	遊走円直径 mm	面積比
弱毒生虫免疫マウスリン パ節細胞+	1 : 2	1.25×0.90	26.6
正常モルモット腹腔細胞	1 : 10	1.35×1.00	31.9
	—	2.40×1.80	100.
完全 Fr. adj. 死虫免疫 マウスリンパ節細胞+	1 : 2	0.85×0.55	18.5
正常モルモット腹腔細胞	1 : 10	1.10×0.65	28.3
	—	1.80×1.40	100.
死虫免疫マウスリンパ節 細胞+	1 : 2	1.90×1.25	78.9
正常モルモット腹腔細胞	1 : 10	2.30×1.50	114.6
	—	2.15×1.40	100.

弱毒生虫 : S-273 株 cysts

死 虫 : RH 株虫体を含むマウス腹水の音波破砕

リンパ節細胞 : 腹腔細胞 = 3 : 7

抗 原 : RH 株虫体の音波破砕

マウスのトキソプラズマ感染に際しても、全く同じことが観察された。すなわち、表4に示すごとく、マクロファージの遊走阻止は弱毒生虫を感染させた群と音波破砕死虫を完全 Freund アジュバントに浮遊して接種した群にのみ認められ、死虫単独を頻回接種したマウスでは遊走阻止は全く陰性に終始した。

なお別に、これら前処置マウスに強毒の RH 株の 2×10^4 個を腹腔に攻撃して斃死状態を観察したところ、弱毒生虫接種群では6匹全例が生残したのに対して、死虫接種群ではアジュバントの有無にかかわらず、攻撃後7日目に全員が一斉に斃死した。この斃死状態は攻撃のみの対照群のそれと全く一致していた。

かかる成績をマクロファージ遊走阻止試験のそれと合せ考察すると、感染死防御能を味意する細胞性免疫の成立には、特殊の抗原物質が、特殊の方法で、特殊の経路から接種されることが必須の条件であるように思われるが、その真偽の程は今後の検討にまたなければならないであろう。

4. 単純ヘルペスウイルス感染マウスにおけるマクロファージ遊走阻止

リフトバレーウイルスやアデノウイルス—慶大医学部微生物学教室の橋本一男博士がマウス腸管より分離したもの—を感染させたマウスでは、マクロファージ遊走阻止現象が認められなかったことは前報で述べたが、単純ヘルペスウイルスを感染させたマウスでは遊走阻止が明らかに観察された(表5, 6)。

この実験では、感作はすべて生ウイルスを使っており、不活化ワクチンを接種した場合の成績が揃っていないので類推の域を出ないが、生ウイルス前処置マウスは強毒株の脳内攻撃によく耐過し得るところから、単純ヘルペス感染症の免疫には細胞性の因子が介入してくる可

表6 単純ヘルペスウイルスで誘発した MIF を加えた環境での正常モルモット腹腔細胞の MI

MIF 産生法	MIF 濃度	遊走円直径 mm	面積比
HF 株感染マウスの脾、腸管細胞に HF 添加, 37°, 2 日	1 : 5	2.60 × 2.20	26.2
	1 : 25	3.80 × 3.55	61.9
SKa 株感染マウスの脾、腸管細胞に HF 添加, 37°, 2 日	1 : 5	2.30 × 2.10	22.1
	1 : 25	2.70 × 2.50	30.9
対 照	—	5.25 × 4.15	100.

感染: HF, SKa 腸管尿膜増殖, マウス脳内 7×10^4 および 7×10^5 LD₅₀ を 2 回 i.p., ddy マウス, 初回接種後23日に屠殺

MIF: 生 HF を 10^4 LD₅₀/ml に感作マウス細胞浮遊液に添加, 遠沈上清を MIF とする

能性が少くないように思われてならない。

なお、今回の実験では感作に使ったウイルスと抗原として細胞培養液に添加したウイルスとは由来を異にし—前者は鶏尿尿膜に増殖, 後者は HeLa 細胞に増殖—, ウイルス浮遊液中に混在する動物細胞に対する遅延型のアレルギー反応をマクロファージ遊走阻止として捕えることのないように配慮した。

5. 異種移植マウスにおけるマクロファージ遊走阻止

ラット由来の腹水肝癌 AH39 株の細胞 10^4 個をマウスの腹腔に接種して、経時的に腹腔局所での癌細胞の消長を追跡していくと、7~10日頃に増殖は最高値に達し細胞数は 10^4 に近づく。ところが、10数日を過ぎる頃に突如として拒絶反応が顕現して、個体差として数日の開きはあるが、結局は例外なく、癌細胞は消失していく。

このような経過を採る一群のマウス群から、移植後10・14・20・36・50・61日目に3匹づつを屠殺して腸間膜リンパ節細胞を集め、各個体ごとに、マクロファージ遊走阻止能を調べた。その成績は図1に示すごとくで、癌

表5 単純ヘルペスウイルス感染マウスのリンパ節細胞と混合した正常モルモット腹腔細胞の MI

封入細胞	添加抗原	遊走円直径 mm	面積比
HF 株感染マウス腸管細胞 1: 未感作モルモット腹腔細胞4	+	3.15 × 3.05	50.7
	—	4.35 × 4.35	100.
SKa 株感染マウス腸管細胞 1: 未感作モルモット腹腔細胞4	+	3.26 × 3.13	57.8
	—	4.30 × 4.10	100.
未感作モルモット腹腔細胞	—	4.17 × 4.05	

感染: HF, SKa 腸管尿膜増殖, マウス脳内 7×10^4 および 7×10^5 LD₅₀ を 2 回 i.p., ddy マウス, 初回接種後23日に屠殺

添加抗原: HF, HeLa 細胞増殖, マウス脳内 10^4 LD₅₀/ml 感作リンパ節細胞: 各群3匹分をプール

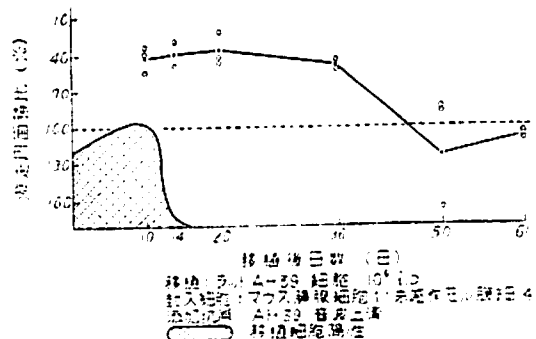


図1 異種移植後における MI 値の消長 (DK1 マウス)

細胞が未だ腹腔内に充満している10日後のマウスから、早くも強い遊走阻止能の発現が観察され、阻止能は14日・20日後と一層亢進していくが、36日を過ぎる頃より低下の徴を示し始め、50日、61日後には遊走阻止を全く認め得ないまでにいった。なお、この際、抗原として培養液中に添加したものは、AH39細胞浮遊液の音波破碎上清液であった。

ここで特に興味深く思い出されたことは、同じ移植癌株とマウスの組合せで、移植後マウスの細胞性と体液性の抗移植性の消長を、それぞれ、細胞移入による“adoptive immunity”の成立の程度と血清移入による“passive immunity”のそれとを比較検討した成績²⁾であった。そこでは、血清移入で表わされた体液性の抗移植性は移植後50日以上も減弱を示さなかったのに対し、細胞移入で表わされた細胞性の抗移植性は、違った経過をとった。すなわち、その経過は今回のマクロファージ遊走阻止能の消長と全く同一の傾向を示しており、両者の曲線は寸分の相違もなく重なりあった。

このことは、元来、遅延型のアレルギー反応性を測定すべく開発されたマクロファージ遊走阻止試験の成績が、特殊感染症における細胞性免疫のみならず、移植免疫にあずかる細胞性因子の強さをも正確に反映していることを、さらには、これら3種類の免疫反応の本態が互に類似していることを示唆しているように思われる。

ところで、この図に示された遊走阻止能の消長曲線には2つの重要点が秘められているのではなからうか。その一は、未だ移植癌細胞が腹腔内に充満している頃から遊走阻止能の成立していることが観察されたことであり、その二は、移植片が完全に脱落した後では、甚だ速かに、遊走阻止能が消退してしまうことであると思われる。

マウスをヒトに、移植癌を自家発生癌に置き換えてみれば、上述の重要性はより明瞭となろう。すなわち、癌組織が大きくなって外科的に切除されるようになる以前から、遊走阻止が観察されるとすれば、癌の早期発見がこの方法によってもたらされ得るという可能性が生れよう。もっとも、それには、拒癌を疑われるヒトのリンパ球の培養液に添加して、MIFを誘出するような抗原が常時備えられていることが前提条件となるが、抗原の確保については次項で言及したい。

つぎに、癌組織が余すところなく切除されるか、放射線・制癌剤あるいは免疫力によって完全に破壊しつくされた場合に限って、マクロファージ遊走阻止試験の成績が陰性化すると仮定すれば、患者のリンパ球の遊走阻止

能を経時的に追跡することによって、手術の予後を占うことは容易となろう。

6. 癌患者におけるマクロファージ遊走阻止

現在までに結腸癌患者2名、乳癌患者1名、胃癌患者5名の計8名については、剔除術の施行以後、経時的に採血して末梢血中の小リンパ球を仕るの方法³⁾で採取して、マクロファージ遊走阻止能を調べたが、悪性絨毛腫患者1名の場合には、手術直前に採血しておき、切除した自家癌より抽出した抗原—音波破碎上清—と反応させた。

その成績は表7のごとくで、自家癌抗原に対しては、全例が強度の遊走阻止を示したが、2名の胃癌患者では組織癌には隣接するがみかけ上正常と思われる組織から抽出した抗原と反応させたところ、3例中2例において遊走阻止試験が完全に陰性に止まった。残る1例の陽性例は、正常と思われた組織の内部に癌細胞が浸潤していたためであるかどうかについては検討中である。なお、13例では他人の癌抗原と反応させる機会を得たが、そのうち8例では強度の遊走阻止が認められた。

表7 癌患者の末梢リンパ球と癌組織抗原との間のMI

被採血者	自家癌抗原	自家正常組織(?)抗原	他家癌抗原
結腸癌 2	14/14 陽性	1/3 陽性	8/13 陽性
乳癌 1	面積比(平均) 23.7%	陽性例面積比 33.8%	陽性群面積比 25.1%
胃癌 5		陰性群面積比 93.5%	陰性群面積比 89.5%
悪性絨毛腫 1			
健康者 2	—	—	0/10 陽性 面積比 77.5%

かかる交差性の遊走阻止を示した症例は、今までに、上行結腸癌と横行結腸癌の間、上行結腸癌と乳癌の間、横行結腸癌と乳癌の間、上行結腸癌と胃癌の間および胃癌どうしの間などに観察されたが、癌組織の病理像と交差反応性との間にいかなる相関関係があるかどうかについては、現在、調査中である。

なお、健康者の末梢血リンパ球と癌抗原と合せた10例では全例が陰性であった。

結腸に原発する腺癌の間には、抗原的に共通性があるという報告⁴⁾があるが、かかる抗原とわたくし達が観察した癌共通抗原との間の異同については今後検討していきたい。

癌組織が完全に剔除された後ではマクロファージ遊走阻止試験の成績が陰性化するかどうかについては、何分にも、癌剔除後採血までの期間が最も長いものでも24日

であるので、未だ、結論は得られていない。

文 献

- 1) 秋山武久, 1969: モダンメディア, 15, 648.
- 2) 秋山武久, 前田勝利, 1962: 癌の臨床, 8, 628.
- 3) 茅野秀孝, 1955: 日本細菌学雑誌, 10, 945.
- 4) 秋山武久, 多田隈卓史, 1967: 日本細菌学会誌, 39, 39.
- 5) 辻 公義ほか, 1969: 臨床病理, 17 (総会号), 171.
- 6) GOLD, P. and FREEDMAN, S. O., 1965: J. Exp. Med., 121, 439.
- 7) GOLD, P. and FREEDMAN, S. O., 1965: J. Exp. Med., 122, 467.

中野康平(東大・医科研) トキソプラズマ死虫アジュバンド(完全)免疫では、MI はあっても強毒株に対する抵抗性は獲得していないとのことだが、この両者には本質的な差があるのだろうか。MI は敏感な反応で、一方 RH (強毒株) 2×10^4 というような強い抵抗に対しては、抵抗性の若干の獲得は観察しにくいこともあると思う。本質的な差をいうには、抵抗性の程度を測定できるシステムを工夫する必要があると思うが如何。

答: 実験的チフス症の成獣も合せ考えると、どうしても MI 陽性で細胞性の感染死防御陰性という例があってもよいと思う。感染死防御と MI にあずかる抗原が違うことを考えると、私には当然そうあるべきであろうと思われる。RH 株 2×10^4 個の腹腔内攻撃はさ程大量に過ぎる量とは思っていない。

吉田 彪(予研・結核): 透析の結果についていえばわれわれの結果では透析されない。ただし、粗製の上清では 4°C での保存で安定なのは3~4日で、割合安定だが、1週間も保存すると危ないようである。もちろん凍結しておくとも相当長い間(少なくとも数カ月)安定で

ある。また、Sephadex で分画後のものは更に安定になっているようである。

尾上 薫(九大・歯・生化): 1) 抗原との培養上清中の MI 作用はトリプシンで不活化されないということだが、他の蛋白分解酵素でも不活化されないかどうか。2) RNase sensitive な因子であるとすればどのような因子を想定されますか。リンパ球感作の状態を伝達するような因子としての可能性があるか。

答: トリプシン以外の蛋白分解酵素についてはまだ検査していない。MIF の安定性に関する成績については何分にも被検体が粗製であり、有効物質が単一でないという可能性も否定できないので、まだ特定の物質を想定していない。MIF がリンパ球の感作状態を伝達する物質である可能性を考慮して現在検討中である。

野本龜久雄(九大・医・細菌): モルモットとマウスにおける遅延アレルギー反応のおこり方の差は感作の成立にあるのか、マクロファージの性状にあるのか。

答: 分らない。ただし、従来、皮膚を使つての遅延型アレルギー反応の観察には不適当であるといわれてきたマウスでも、MI 現象を利用すれば、あきらかに遅延型アレルギーの成立がうかがわれた。もっとも、モルモットの反応に比較すると、マウスの MI 現象の成立の程度はかなり弱かった。

マウスの遅延型アレルギー反応が比較的弱いことが、そのマクロファージの特性であるという可能性も、私には否定できない。というのは、感作マウスのリンパ球に未感作モルモットの腹腔渗出細胞を混ぜて MI の起り方を観察してみると、感作マウスの腹腔渗出細胞だけでこの現象を観た時に比べて、よりあきらかな阻止が認められたからである。

移植免疫および遅延型過敏症における マクロファージの役割

野 本 亀 久 雄 (九大・医・細菌)

はじめに

いわゆる細胞性免疫に依存する免疫現象として、1) 移植片に対する拒絶反応、2) 各種の抗原に対する典型的な遅延型過敏症反応、3) 腫瘍免疫、4) 一部の自己免疫病など多くの免疫反応があげられている。細胞性免疫といわれる現象に共通に確認された事実は、生きた感作リンパ系細胞によって感作状態が正常動物に passive transfer されるということのみであろう。免疫学全体の重要な分野をしめる細胞性免疫の本態がむしろ概念的な程度のものであったことが、免疫学の発展の大きな障害になっている。最近、DAVID¹⁾およびBLOOM、

BENNET²⁾の研究グループが、感作動物の腹腔細胞の運動性が抗原の存在によって変化する現象をより定量的に観察する方法 (migration inhibition test) を用いて、いわゆる遅延性過敏症の解析を行なっている。それらの成績から、感作リンパ球が特異的抗原と結合した後 migration inhibitory factor (MIF) を産生し、この因子が抗原注射部位にマクロファージの集積をひき起した結果が硬結を中心とする遅延型皮内反応であると考えられるようになった。

一方、移植免疫においては、その作用機序にさらに複雑な面が含まれている。表1に示すように、細胞や組織

表1 細胞の種類による免疫反応に対する感受性の差。

	Normal		Malignant		
	Skin graft	Lymphoid cell	Solid tumor	Ascites tumor	Neoplasm of lymphoid cell
Cytotoxic antibody	-	+	-	- ~ ++	- ~ ++
Sensitized lymphoid cell	+	+	+	+	+

はその起源によって 1) 補体要求性細胞障害性抗体に感受性のあるもの、2) 感作リンパ系細胞の直接的細胞障害作用に対してのみ感受性のあるものに分けられる。一般に、正常リンパ系細胞および一部のリンパ系腫瘍や腹水腫瘍は細胞障害性抗体に感受性があり、その他のほとんどの正常組織や固型腫瘍は感作リンパ系細胞に対してのみ感受性を持ち、これらが細胞性免疫の対象となる。GORER³⁾は同種移植腫瘍に対する反応を組織学的に3つに分類した。1) 小リンパ球の浸潤を主体とするもの。

2) 組織球の集合を主体とするもの。3) 移植片周囲への浸出液の貯留を主所見とするもの。3) は上記の細胞障害性抗体によって破壊される系と考えられる。そこで細胞性免疫としての移植片に対する反応においては、

1) と 2) の小リンパ球およびマクロファージの役割が問題となる。

感作リンパ系細胞による target cell destruction の

表2 感作リンパ系細胞による同種移植片拒絶反応の機序の可能性

1. Small sensitized lymphocytes.
 - a. lymphocytes kill the target cells by cytotoxic factor.
 - b. lymphocytes work as the transporters of antibody.
2. Sensitized macrophages.
 - a. cytophilic antibody.
 - b. activation of macrophages by MIF or MIF-like factor.

作用機序として、表2に示すような考え方が主要なものであろう。リンパ球を effector cell と考える立場からは、1) 感作リンパ球が antibody-like receptor によって抗原細胞と特異的に結合し、その結果感作リンパ球が細胞障害性因子を産生し、細胞破壊を起こす。2) リンパ球は特殊な細胞障害性抗体の transporter として働

くという考えが提出されている。一方、マクロファージを effector cell とする立場からは、1) 他の抗体産生細胞で作られた cytophilic antibody がマクロファージに付着し、その抗体を介して、phagocytosis-indigestion の過程が進行する。2) MIF によって反応部位に集められたマクロファージは phagocytosis の能力や酵素活性の上升した活性化マクロファージであり、非特異的作用として target cell destruction に働くという考えが提出されている。著者らの研究目的は、ハムスターの同種移植腫瘍を用い、この腫瘍の周因に集まるリンパ球とマクロファージの役割を解析し、さらに同種移植片拒絶の機序をしることである。

実験方法および実験結果

1. 同種移植片拒絶反応の effector cell.

ゴールデンハムスター由来のリンホーマを MHA ハムスターに移植し、その拒絶反応に関する細胞の種類を決定するのがこの実験の目的である。このリンホーマは抗体に対して感受性を持たず、感作リンパ球によってのみ破壊される。また MHA ハムスターに同種移植した際、腫瘍は生着増殖するが、同時に損傷ハムスターには強い免疫反応が生じ、腫瘍周囲にはマクロファージを主体とする強い細胞浸潤がみとめられる。腫瘍移植8日以後の腹腔細胞、リンパ節細胞、脾細胞にはリンホーマに対する細胞障害作用がみとめられる。この同種移植の系では、マクロファージの腫瘍周囲への集合は免疫反応の成立と並行して出現し、組織学的所見からみると拒絶反応の主な effector cell はマクロファージであろうと考えさせる系である。

リンホーマで免疫したいろいろの条件のハムスターから抗血清を採取し、正常マクロファージの活性化(cytotoxic)を試みたが、cytophilic antibody によるマクロファージの活性化を示す結果はえられなかった。この系では、マクロファージに対する cytophilic antibody が target cell destruction に働いている可能性は少ないと考えられる。

リンホーマ移植12日目の MHA ハムスターの腹腔細胞、局所リンパ節細胞または脾細胞をリンホーマと混合し、胸腺摘出後 850 R 照射し免疫能力をなくした MHA ハムスターの皮下に注射し、感作リンパ系細胞による腫瘍増殖抑制効果を観察した(表3)。腫瘍増殖の完全抑制に必要なリンパ系細胞の数は、腫瘍細胞に対し腹腔細胞では1~2倍、局所リンパ節細胞では8~10倍、脾細胞では15~30倍であった。

recipients として、胸腺を摘出し 850 R 照射した群

表3 感作リンパ系細胞の種類による腫瘍増殖抑制効果の系。リンホーマ 2×10^6 を感作リンパ系細胞とまぜ、recipients の皮下に注射。

供 給 源	細胞数	recipients	
		胸腺-X線群	胸腺-X線一群
	0	5/5*	5/5
腹腔浸出細胞	2×10^6	0/5	0/5
	2×10^5	5/5	4/4
局所リンパ節細胞	2×10^7	0/10	0/8
	2×10^6	9/12	6/8
	2×10^5	9/10	5/6
脾細胞	2×10^6	0/5	0/4
	2×10^7	1/5	1/4
	2×10^6	5/5	4/4
	2×10^5	5/5	4/4

* 腫瘍増殖数/移植されたハムスター数

(胸腺-X線群)と同処置後同系の骨髓細胞を移入した群(胸腺-X線一群)を用い、感作リンパ球によるリンホーマの増殖抑制効果を比較した(表3)。腫瘍細胞と感作リンパ球を混ぜ皮下に注射した場合も、腫瘍細胞を皮下に移植し、感作リンパ球を静注した場合も、両群において増殖抑制に同数の感作リンパ球を要した。さらに、腫瘍細胞と感作リンパ球の混合液中に、直接多数の正常マクロファージ(4×10^6)を加えて recipients の皮下に移植した場合にも、感作リンパ球による抑制効果はマクロファージの存在によって促進されなかった。

腫瘍細胞皮下-感作リンパ球静注の場合にも腫瘍細胞、感作リンパ球混合皮下の場合にも、胸腺-X線一群においては、腫瘍移植部位にマクロファージの集合がみとめられた。また、腫瘍細胞と感作リンパ球の混合液中に正常マクロファージを直接加えた場合、注射部位に24~48時間つづく硬結発生がみとめられた。

2. 損傷ハムスター腹腔細胞の遅延型過敏症反応。

リンホーマを移植した MHA ハムスターから、5日、8日、12日、20日後に腹腔浸出細胞を採取した。腹腔浸出細胞 1.5×10^7 に対しリンホーマ細胞 5×10^6 を 1 ml に混合し、ガラス管法による migration inhibition test を行なった。正常ハムスター腹腔細胞にリンホーマを加えた場合や損傷ハムスター腹腔細胞にリンホーマを加えない場合には、マクロファージはガラス管から同心円状の migration を示したが、リンホーマ移植8日以後に採取した腹腔細胞にリンホーマ細胞を加えた場合には migration の完全抑制がみられた。

損傷ハムスターの腹腔マクロファージをプラスチックディッシュにまき、表面上で偽足をだしてひろがる状態

を観察した。著者らは、本来一般の細胞が付着しにくい細菌培養用のプラスチックディッシュを用いて、感作状態におけるマクロファージの粘着性の変化を観察し、表面上に細胞質の偽足を出してひろがる状態を spreading (+) とした。正常ハムスターの腹腔マクロファージ(刺激剤は使用せず)は 30 分後から spreading を示し、6 時間でピークとなり 20~30% が spreading を示した。一方、リンホーマ移植 8~12 日後に採取したマクロファージは 10 分以内に spreading を示し、50~70% が spreading (+) となった。しかし、移植 20 日後に採取した腹腔マクロファージは 15~20% の spreading 率を示した。

3. 感作リンパ球とリンホーマ細胞混合培養上清中の活性因子

担癌ハムスターの局所リンパ節細胞 1.5×10^7 とリンホーマ細胞を 5×10^6 混合培養し (1 ml), 4,000 rpm 15 分遠心後上清を採取した。マクロファージの機能変化の指標として、正常腹腔マクロファージの migration inhibition, spreading および酵素活性の変化を観察した。移植 12 日目の担癌ハムスターの感作リンパ節細胞とリンホーマの混合培養上清 (18 時間培養) を、培養液中に 1/4 の割合で加えると、マクロファージの migration を抑制し、spreading の率を上升させ、さらに acid phosphatase 量を増加させた。しかし、この濃度では 6 時間以上観察をつづけると、むしろマクロファージへの細胞障害作用がみとめられた。一方、1/8~1/16 に加えた場合、細胞障害作用はみられず、マクロファージ機能の上升のみみとめられた。これらの実験成績をまとめると表 4 の通りである。

表 4 感作リンパ節細胞 (感作上清) および正常リンパ節細胞 (正常上清) とリンホーマの混合培養上清の正常マクロファージに対する作用。

	Migration inhibition	Spreading	Acid phosphatase
上 清 (-)	-	--	--
正 常 上 清	-	--	--
感 作 上 清	+	+	+

感作リンパ球がマクロファージ活性化因子を産生するに要する培養時間をみると、培養 2 時間では活性因子はみとめられず、3 時間培養ではじめて活性化因子がみとめられた。最も効率よく活性化因子が採取される培養時間は 12~20 時間であり、20 時間以上培養した場合には細胞障害性因子が増加し、マクロファージ活性化因子はむしろ減少する傾向がみられた。

上記のようにして採取した混合培養上清の細胞障害作用を同系、同種および異種の各種培養細胞を用いて観察した。子ウシ血清 5% を加えた M 199 に 1/4 の培養上清を加え、CO₂ incubator で 24 時間培養し、培養細胞の状態を観察した。ハムスター胎児初代培養細胞では、12 時間培養ですでに 30~40% の細胞が破壊され、24 時間後には 50% 以上の細胞が破壊された。しかし、継代培養細胞であるハムスターの BHK 細胞やリンホーマ細胞に対しては、障害性作用はみられなかった。同じ培養上清はマウスの胎児初代培養細胞、乳癌初代培養細胞および MCA 肉腫初代培養細胞にも強い障害性作用を示した。

表 5 同種および異種免疫の感作リンパ球と抗原細胞の混合培養上清の細胞障害作用。

	indicator の種類	同 系 培 養 上 清	異 種 培 養 上 清
ハムスター	胎 児 初 代 培 養 細 胞	++	++
	BHK 細 胞	±	+
	リ ン ホ ー マ	-	++
マウス	胎 児 初 代 培 養 細 胞	++	++
	乳 癌 初 代 培 養 細 胞	+	++
	MCA 肉腫初代培養細胞	+	++

(表 5)。混合培養上清の細胞障害性作用は、リンパ球を採取したハムスターの免疫状態と並行し、リンホーマ移植 5 日後の局所リンパ節細胞を用いたときにみとめられた。この細胞障害性作用および前述のマクロファージ活性化因子は、担癌ゴールデンハムスターの局所リンパ節細胞を用いても得られたが、その活性は担癌 MHA ハムスターのリンパ節細胞を用いた場合よりも低かった。

さらに強い培養上清を採取するため、マウスにリンホーマを移植し、8 日後の局所リンパ節細胞を用いた。マウスの感作リンパ球とハムスターリンホーマの異種の系で得た混合培養上清は強い細胞障害作用を示し、同種の系で得た混合培養上清の細胞障害作用に対して抵抗性を示したハムスター BHK 細胞やリンホーマ細胞も破壊した。また、マウスの各種細胞に対しても障害作用を示した。

4. 結核菌感作リンパ球による indirect target cell destruction.

感作リンパ球が抗原と接触した後産生する細胞障害性因子が、抗原に特異的なものかまたは非特異的に働くものかを明らかにすることが本実験の目的である。ゴールデンハムスターを結核死菌 (heat-killed H₃₇ RV in paraffin) で免疫し、2 週後、3 週後に 2 回 BCG 生菌で追加免疫した。追加免疫 7 日後にリンパ系細胞を採取

し、結核菌の抗原である PPD で coat したリンホーマ細胞に対する障害性作用を観察した。リンホーマ細胞を $1/20,000$ のタンニン酸で処理し (37°C , 20分), PPD $50 \mu\text{g/ml}$ で感作した (室温, 30分)。この処理によって、リンホーマの viability はほとんど低下しなかった。リンパ節細胞 2×10^5 とリンホーマ細胞 1×10^6 をまぜ、正常ゴールデンハムスター皮下に移植し腫瘍増殖を観察した。正常リンパ節細胞とタンニン酸処理のみのリンホ

ーマまたは PPD で coat したリンホーマをまぜて移植した際、全例に腫瘍増殖がみとめられた (表6)。感作リンパ節細胞とタンニン酸処理のみのリンホーマをまぜて移植した場合も全例に増殖がみとめられた。感作リンパ節細胞と PPD で coat したリンホーマをまぜて移植した場合4/16に完全抑制が、また5/16に不完全な増殖抑制がみられた (表6)。一方、腹腔浸出細胞を用いた場合には、 1×10^6 または 8×10^6 をリンホーマに加えて

表6 結核菌感作ハムスターのリンパ節細胞 (2×10^5) による indirect target cell destruction (リンホーマ 1×10^6)

混合移植した細胞	移植10日目の腫瘍の直径 (mm)				例数
	0~3	4~7	8~12	≥13	
正常リンパ節細胞+タンニン酸処理リンホーマ	0	0	0	8	8
正常リンパ節細胞+タンニン酸-PPD 処理リンホーマ	0	0	1	13	14
感作リンパ節細胞+タンニン酸処理リンホーマ	0	0	1	9	10
感作リンパ節細胞+タンニン酸-PPD 処理リンホーマ	4	2	3	7	16

もまったく増殖抑制がみられなかった。

考 察

最近、ツベルクリンその他の抗原に対する遅延型過敏症の皮内反応が、感作リンパ球と抗原の特異的反応の結果ひきおこされたマクロファージの浸潤によることが DAVID¹⁾, BLOOM²⁾ によって示され、概念的な存在に近かった遅延型過敏症の本態に多少とも光があてられはじめた。同じ細胞性免疫に属するものでも、移植免疫についてはさらに不明の点が多い。細胞レベルにおいても、effector cell として小リンパ球をあげるものとマクロファージをあげるものがあり、target cell destruction の機序の解析がさまたげられている。

WAKSMAN³⁾ はラットを用いて、recipient として胸摘-X線群を用いると感作リンパ球を passive transfer し、抗原を皮内に注射しても遅延型皮内反応はみられないが、同処置後骨髓細胞を移入した群 (胸摘-X線-骨髓) を用いると抗原注射部位に遅延型反応が起こることを示した。さらに、反応部位の浸潤細胞の多くは骨髓細胞由来のマクロファージであることを示し、胸摘-X線群に骨髓を移入することによって遅延型過敏症の反応性 (感作リンパ球と抗原の存在下) が回復することを明らかにした。そこで、演者らは彼らの系を利用し、感作リンパ球とマクロファージの target cell destruction における役割を研究した。

演者らの使用したハムスターの同種移植リンホーマの周囲に集まるマクロファージの意味として、次の可能性があげられよう。1) 特異的活性を持つマクロファージ

(cytophilic antibody) が拒絶反応に働いている。2) いわゆる遅延型過敏症の反応として、MIF によって単に集められただけである。3) MIF によって反応の場集まり、活性化マクロファージとして target cell destruction に働く。感作リンパ系細胞とリンホーマをまぜて移植し、腫瘍増殖抑制効果を観察した結果では、マクロファージを多く含む腹腔浸出細胞が最も強い抑制作用を示し、マクロファージが effector cell である可能性を大いなものにした。ところが、感作リンパ球と腫瘍の反応の場に、いろいろの組合せでマクロファージが集合する系と集合しない系を作り、感作リンパ球による増殖抑制効果を比較したが、マクロファージの存在は抑制効果を促進せず、マクロファージが target cell destruction の主な effector cell である考えとは相反する成績がえられた。この成績から考えると2)の遅延型過敏症の反応としてマクロファージが集まった可能性が強いが、腹腔浸出細胞がもっとも強い抑制作用を持つ事実との関連性が解釈されなければならない。BENNET⁷⁾ も報告しているように、腹腔細胞中のリンパ球 (purified) は局所リンパ節細胞より強い抑制作用を持っている。そこで、局所リンパ節には未熟型から成熟型までの感作リンパ球が含まれ、有効な成熟感作リンパ球は少数であるのに反し、腹腔細胞中の感作リンパ球は成熟型として循環に放出されたものから成り立っており、したがって比較的少数のリンパ球で抑制作用がえられたと考えられる。

以上にのべた結果から、図1に示すような target cell destruction の考え方を提出した⁸⁾。すなわち、感作リ

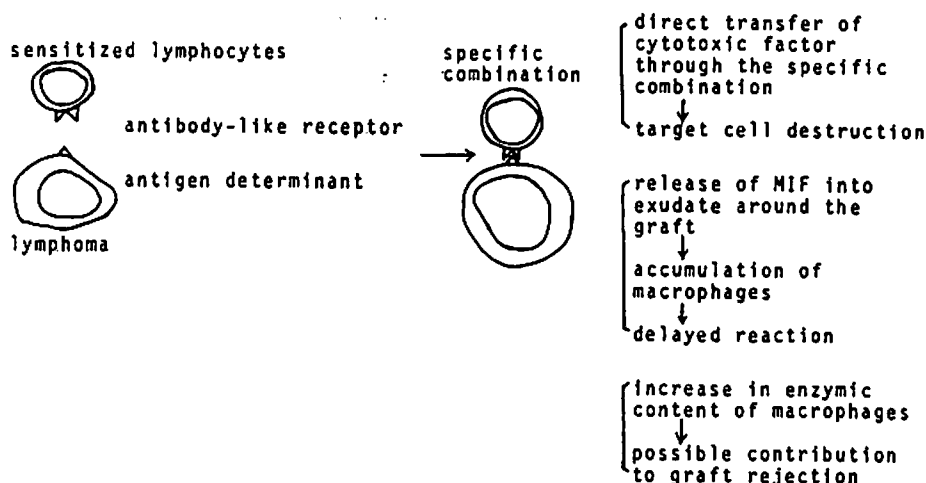


図1 リンホーマ同種移植における拒絶反応の機序

ンバ球が antibody-like receptor を介して腫瘍細胞の抗原決定基と特異的に結合し、細胞障害性因子を産生してその結合を通して高濃度でうけ渡し、細胞破壊を起こす。同時にいわゆる遅延型過敏症の反応として、migration inhibitory factor を腫瘍周囲の浸出液中に放出し、マクロファージの集をひき起こす。この考えに従えば、感作リンバ球の産生する細胞障害性因子は非特異的に働く化学物質であると推測され、免疫反応としての特異性（抗原-抗体の特異的反応）は感作リンバ球と抗原である細胞の結合の点にあると考えられる。

図1に示した考え方を評価するには、次の点を知る必要があろう。1) リンホーマを移植されたハムスターに腫瘍細胞の抗原に対する遅延型過敏症がおきているか否か。2) 感作リンバ球とリンホーマの混合培養上清にマクロファージ活性化因子および細胞障害性因子が検出されるか否か。3) ある特定の抗原に対する感作リンバ球が、その抗原を細胞表面にくみ込まれた腫瘍を破壊するか否か (indirect target cell destruction)。

ガラス管法による migration inhibition test では、担癌ハムスターの腹腔浸出細胞にリンホーマを加えると migration の抑制がみられ、また担癌ハムスターのマクロファージの活性（粘着性、酵素活性）の上昇がみとめられ、ツベルクリン型と同様の遅延型過敏症が発生していると結論されよう。

感作リンバ球とリンホーマの混合培養上清中のマクロファージ活性化因子は1) 正常腹腔細胞の migration inhibition, 2) 正常マクロファージのガラス表面への粘着性の上昇 (spreading), 3) 正常マクロファージの酵素活性 (acid phosphatase) の上昇によって確認され

た。また、混合培養上清を同種および異種の各種細胞の培養液に加え、細胞障害性を観察したが、以下の結果がえられた。1) 感作リンバ球の供給源である動物の免疫状態と混合培養上清の細胞障害作用が並行する。2) 細胞障害作用は混合培養12時間以後の上清にみとめられる。3) 細胞障害作用は感作リンバ球の起源と同系、同種および異種の細胞に対してみとめられた。4) 初代培養細胞は細胞障害作用に対して感受性が高く、一方継代培養または移植腫瘍細胞は感受性が低い。5) 同種免疫の感作リンバ球からとった混合培養上清よりも、異種免疫の感作リンバ球からとった上清に細胞障害作用が強い。6) 同上清は低濃度で作用させると、むしろ細胞分裂促進作用を示す。このように、図1に示した仮説を支持する因子を培養上清中に認め、*in vitro* の実験においてもこの作業仮説に相反する事実はみられなかった。

さらに、結核菌感作リンバ球は PPD で coat されたリンホーマ細胞に対し増殖抑制作用を示し、direct target cell destruction と比較すると弱いけれど、indirect target cell destruction の存在が確認され、この成績も図1に示した仮説を支持している。

ま と め

同種移植片の拒絶反応の機序に関して図1に示すような作業仮説を提出した。すなわち、感作リンバ球が antibody-like receptor を介して抗原細胞と特異的結合を行ない、その結果細胞障害性因子を産生し、特異的結合を通して高濃度でうけ渡し細胞破壊に進め、一方移植片周辺にマクロファージ活性化因子を放出し、マクロファージの集をひき起こす。感作リンバ球と抗原細胞の

特異的結合に免疫反応としての特異性（抗原-抗体反応と同じ）があり、感作リンパ球によって産生される因子は非特異的に働くものである。このような作業仮説に従って *in vivo* および *in vitro* の実験を進め、現在のところこの説に矛盾する事実を経験していない。しかし、反応の場に集まるマクロファージについては、その粘着性や酵素活性が上昇している事実から、非特異的な phagocytosis による target cell destruction への関与も大いに可能性があり、この点については別の実験系を用いて検討中である。

文 献

- 1) DAVID, J. R., 1966: Proc. Nat. Acad. Sci., 56, 72.
- 2) BENNET, B. and BLOOM, B. R., 1968: Proc. Nat. Acad. Sci., 59, 756.
- 3) GORER, P. A., 1956: Adv. in Cancer Res., vol. 4, p. 149.
- 4) ROSENAU, W. and MOON, H. D., 1961: J. Nat. Cancer Inst., 27, 471.
- 5) GRANGER, G. A. and WEISER, R. S., 1964: Science, 145, 1427.
- 6) LUBAROFF, D. M. and WAKSMAN, B. H., 1968: Science, 157, 322.
- 7) BENNET, B., 1965: J. Immunol., 95, 656.
- 8) NOMOTO, K., GERSHON, R. K. and WAKSMAN, B. H., 1970: J. Nat. Cancer Inst., 44, 739.

吉田 彪（予研・結核）：lymphoma を移植した場合、血中に target cell destruction を起こさせるようなものは出てこないか。（免疫血清中 cytotoxic effect をもつものがあるか）

答：免疫血清中には cytotoxic antibody は検出されなかった。感作リンパ球が抗原細胞と結合後産生する細胞障害性因子は血中に認められなかったが、担癌ハムスターの腹腔マクロファージの運動性が、移植8～15日では上昇し、20日以後では逆に低下することから、何らかの因子（MIF or cytotoxic factor）が血中または腹腔内に放出されている可能性は考えられる。

藤井源七郎（東大・医科研）：1) sensitized lymphocytes と target cells を混合して培養すると target cells の障害とともにある程度の sensitized cells の破壊も伴われるといわれており、私もそういうデータをもっている。culture medium 中にみられる cytotoxin は、このようにしてこわれたリンパ球の細胞内物質であるとみられないか。2) このような cytotoxin は、非感作リンパ球にも存在するもので、感作リンパ球で増加しているということはないか。

答：1) culture medium にみられる cytotoxin が、こわれた感作リンパ球から出てきた可能性はあると思う。2) リンパ球内の cytotoxin を定量化していないので、はっきりしない。

板倉克明（北大・病理）：1) マクロファージの働きが非特異的に活性化されて destructive な働きを発揮するのならば target となった腫瘍細胞以外の腫瘍細胞を混合して challenge したならば両方とも増殖は抑制されるか。2) 腹腔細胞が target cell と 1 : 1 で destructive に働きその中の Mφ が実際の effector でないのならば感作リンパ球は 1 コで数コ以上の腫瘍細胞を破壊すると考えられるか。

答：1. 演者は、反応の場に集まったマクロファージの酵素活性が上昇しているので、非特異的な破壊作用を可能性として考えているが、われわれの系ではそのような結果はみられなかった。他の系を用いて検討中である。2. 腹腔内のリンパ球は成熟型感作リンパ球であり、target cell destruction により効率がよいのではないかと考えている。1 コの感作リンパ球が、どれだけの target cell を破壊しうるかについてはデータを持たない。

北川正保（阪大・医・癌研）：1) direct cell destruction の場合の "direct" transfer of cytotoxic factor の "direct" の意味する所は何か。2) target cell を PPD で coat するのではなく sensitized lymphoid cell と target cell を混じて先ず移植してから、recipient に PPD を challenge したとき、target cell に対して効果があるか。3) 私達の研究室で妹尾らが行った実験では蛋白抗原で sensitized した spleen cell と tumor cell を混じて移植すると tumor は増殖するが、このとき蛋白抗原を challenge すると tumor cell の増殖は抑制されることを見ている。4) cytotoxic factor と MIF の作用機構とか物質としての異同はどうか。

答：1) direct target cell destruction とは感作リンパ球が免疫原として用いられた細胞と特異的結合を行ない、細胞破壊力をひき起こすものであり、passive hemolysis と同じ原理で細胞抗原以外の抗原に対する感作リンパ球が、その抗原を細胞表面にくみ込まれた標的細胞を破壊する系（indirect target cell destruction）に對立するものである。direct transfer of cytotoxic factor は、感作リンパ球と抗原細胞の特異的結合の結果産生された cytotoxic factor が、その結合を通して標的細胞に直接的にうけ渡す事を意味し、MIF が周囲の浸出液中に放出され、マクロファージに作用することに対するものである。2) PPD 感作リンパ球と target cell をまぜて移植し、後で PPD で challenge するような場合には target cell destruction がみられなかった。感作リンパ球と target cell の結合が不十分なためではないかと考えている。3) 北川氏の結果との差は、演者の用いた腫瘍が比較的免疫反応に抵抗性のあるものであったことによると考える。4) cytotoxic factor と MIF の異同については十分な実験データを持たない。

マウスの日本脳炎ウイルス感染におよぼすBCGの作用

大 滝 研 也 (国立予防衛生研)

細網内皮系(網内系)ないし macrophage (Mφ) はその特徴的な機能と生体内における配置, 分布から多くのウイルス感染に積極的なかわりを持つことが想像されるが, 事実多くのウイルスについてそのことが観察され報告されている。この問題に関して MIMS¹⁾ は1964年にすぐれた綜説をあらわしている。いま Mφ がウイルス感染に大きな役割を果たしている例を二つあげると, ウイルスに対する動物の系統による感受性の差異がそれぞれの動物の Mφ におけるウイルスの増殖能によって決まると考えられる例^{2,3)}, 動物の年齢による感受性の変化が同じく Mφ の発達にもとづくと思われる例^{4,5)}等があげられる。著者は発病機転に viremia が主要な位置を占めると見做される日本脳炎(日脳), 急性灰白髄炎(ポリオ)等で, それらの発病病理における網内系の果たす役割を明らかにすることを研究の目的としているが, ここでは日脳について網内系, Mφ の活性度(activity)の如何によって個体のウイルス感染, 発症が大きく左右されるのではないかと考え, マウスに Bacillus Calmette-Guérin (BCG), zymosan (Zy) 等のいわゆる網内系刺激剤を与えた場合日脳ウイルス感染がどう変わるか, 変わるものであればこれがどのような機序にもとづくかを明らかにしようとした。

この研究に関係すると思われるこれまでの報告をあげると, 網内系を刺激することによって病原細菌に対する動物の抵抗性が高められるという報告^{16,19,20)}は多数あるがそれはさておき, 日脳については三田村ら⁶⁾は日脳患者に結核にかかっているものが少ないという観察から出発し, マウスに結核菌を接種した後に日脳ウイルスを静脈内注射(静注)すると日脳の発症が抑えられる傾向が見られたと報告している。後藤ら⁷⁾は肺炎球菌の英膜多糖類により, 林ら⁸⁾はグラム陰性菌の菌体内毒素によってマウスの日脳の発症が阻止されたことと述べている。Middlebrooks⁹⁾はコウモリに同じく菌体内毒素を与えて日脳ウイルスを接種すると体組織でのウイルス増殖が昂まることを観察した。菌体内毒素によるこの相反する結果は, この物質が投与方法の如何によって網内系の機能を抑制もし昂進もする³⁰⁾ことのあらわれと思われる。日

脳ウイルス以外では Gledhill¹⁰⁾ はマウスにヒト型結核菌を接種すると ectromelia virus に対する抵抗性が増すと報告している。Old¹¹⁾ はマウスの mengo virus 感染に対する BCG その他多数の網内系刺激剤の影響を観察した。Gorrie¹²⁾ はマウスに foot and mouth disease virus (FMDV) を接種して生ずる viremia が Freund の complete adjuvant を与えることによって抑えられることを報告している。これらの報告ではいわゆる網内系刺激剤によって生体のウイルス感染に対する抵抗性が増大する, あるいはウイルス感染の展開が修正されることは示されても, それが如何なる機序によるものかについての解析は十分ではない。

著者は以下に述べるように BCG をあらかじめ接種することによってマウスの日脳の発症が抑えられることを見出した。そして BCG のこの効果が何によってもたらされるかを考え, ウイルス感染に関しての現在までの知見から抗体あるいはインターフェロン(IF)の産生の促進, 増強にもとづくという可能性と, これらの因子とは別に生体の網内系細胞, Mφ 自身とウイルスとの直接のかかわりあいでの効果があらわれるという可能性をあげ, その可否をみるために実験を行なった。なお日脳ウイルスには末梢からの感染性の高い Jath-160 株をえらんだ。

材料および方法

動物: 市販の dd 系マウスを使用した。

BCG ならびに Zy の投与: BCG は日本 BCG 研究所から贈与された BCG ワクチンを用いた。BCG を湿重量で 80 mg 含むアンプルの内容物を使用時に 8 ml の冷蒸馏水に浮遊させ, 多くの実験ではその 0.1 ml を生後 14日の哺乳マウスに静注した。この 0.1 ml には BCG 湿重量 1 mg, 生菌数約 3×10^7 個を含む。なおこのワクチンには安定剤として sodium glutamate が加えられており, 上記水浮遊液 0.1 ml には 0.6 mg が含まれるが, 予備実験でこの量の glutamate は日脳ウイルスの感染に影響を与えぬことを確かめたので, 各実験対照群は glutamate を与えず無処理とした。Zy は Nutritional

Biochemicals Corporation 製のものを使用した。50 mg を 10 ml の蒸留水に浮遊させ、ガラスビーズを用いて細かく砕き、ビーズを除いた後その 0.1 ml を生後17日と19日に静注した。合計 1 mg の Zy を投与したことになる。

ウイルスならびにウイルス接種：日脳ウイルス Jath-160 株を用いた。マウスへの接種は生後 3.5 ないし 4 週に、♂には $10^{2.5}$ BLU (baby mouse lethal unit), ♀には $10^{1.5}$ BLU を静注した。

ウイルス定量：ウイルスの定量は生後 2 ないし 3 日の哺乳マウスの脳内接種により 50% 致死量すなわち BLU を求めるか、ニワトリ胚単層培養 (CEC) を用いたブラック法によって PFU (plaque forming unit) を求めるかいずれかによった。

抗体価測定：CEC 上のブラック減少法により中和抗体価を求めた。challenge virus には Jath-160 株を用い、非働化した血清の希釈液とあわせて 37°C 1 時間 incubate して中和した。ブラック数を 50% 減少させる希釈倍率を以て抗体価とした。

IF 活性測定：血清および脾臓の homogenate の遠心上清に塩酸を加えて pH 2.0 に下げ、冷所に 3 日間おいた後中性に戻したものを IF 材料とした。その希釈液を L 細胞の培養に加えて一晩 incubate、翌日液を棄て phosphate buffered saline (PBS) で 2 回洗い vesicular stomatitis virus (VSV) を接種した。VSV のブラック数を 50% 減少させる希釈倍率を以て IF の titer とした。

腹腔 Mφ の採取と培養：生後 4 週のマウスの腹腔に 2.0 ml の heparin 2 units/ml を含む 199 培地を注入した後開腹し、腹水を採った。1000 rpm 10 分間遠心し、細胞を 199 培地に $2 \sim 4 \times 10^6$ 個/ml の濃度に浮遊させガラスチューブに分注、1 時間 incubate した後上清を棄てる。PBS を加えチューブを強く振って洗い、ガラス壁に固着した細胞のみを残し、浮遊してくる細胞を除くようにする。この操作を 3 回繰返す。ここまでで投入した細胞の約半数が失われる。次いで glutamine を $292 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、ウシ血清 albumin fraction V (Armour 社製) を $7.5 \text{ mg}/\text{ml}$ 、sodium bicarbonate $2.2 \text{ mg}/\text{ml}$ を添加した 199 培地を分注し、シリコンゴム栓をして 35°C に incubation した。細胞のほとんどは Mφ であるが 10% 内外のリン巴系細胞を含んでいた。BCG 接種マウスからも同様に採取し培養した。ウイルスの接種は上記の培地を加える前に行なった。

結 果

日脳発症におよぼす BCG, Zy の効果

実験群にあらかじめ BCG, Zy を静注し、日をおいて Jath-160 株を接種、その後 3 週間観察した。結果を表 1 に示す。

BCG を生後 14 日に 1 mg 接種した場合は明らかに日脳ウイルスに対する発病死を抑えたが、1 mg を生後 14 日と 21 日に二分して接種した場合は効果はやや減ずるようであり、1 mg を 21 日に与えた場合は効果は明らかに減ずる。Zy は 0.5 mg ずつ生後 17 日と 19 日の 2 回に与えたが効果はほとんどなく、あってもきわめてわずかであった。ウイルス接種を脳内に行なった場合 BCG の効果は見られなかった。以下の実験では組織学的観察を除いて Zy は用いず、もっぱら BCG を使用した。

BCG, Zy 投与によるマウス肝臓における Mφ の繁殖次に BCG, Zy の効果の違いが Mφ の繁殖の程度によるかどうかを明らかにするためマウスに BCG, Zy を与え生後 28 日にウイルスを接種せずに殺し、肝臓をとり出し組織標本を作り観察した。結果を表 2 に示す。

表に見る通り、BCG, Zy の投与によってマウスの肝臓において Mφ のかなりの繁殖がみられ、明らかに網内系が刺激されていることが示されたが繁殖の程度は BCG 接種マウスより Zy 投与マウスの方が著しく、したがって少なくとも肝臓で見える限り Mφ の数の多少と日脳発症の抑制効果とは平行しなかった。

viremia に対する BCG 接種の効果

以上 BCG 接種によって発症が抑えられることから、正常マウスでウイルス接種後数日間にみとめられる viremia が BCG 接種群ではどうなるかをしらべた。結果は表 3 の通りである。表中の各値はすべて個体別のものである。

表に明らかなように対照群においてウイルス接種後 2, 3 日に高い率でおこる viremia が BCG 接種群では著しく抑えられ、ほとんどがウイルスをみとめることが出来なかった。みとめたものも titer は低かった。以上から BCG 接種による発病死の減少は viremia の抑制によるものと考えられる。

抗体産生について

viremia の抑制が BCG の如何なる作用によるのであろうか。可能性として抗体あるいは IF 産生が BCG 接種マウスで促進、増強されることがあげられるが、これをたしかめるためまず血中抗体の産生を追った。

あらかじめ BCG を接種したマウスにウイルスを接種し、24, 48, 72, 120 時間に BCG を接種しない対照群

表1 日脳発症におよぼす BCG, Zy の効果

	前処理			ウイルス接種			死亡率	
	投与日	量	経路	接種日	量	経路	♂	♀
実験-1								
対照				生後28日	Jath-160H ♂ $10^{2.5}$ BLU ♀ $10^{1.5}$ BLU	i.v.	13/16	13/15
BCG接種群	生後14日	1 mg	i.v.	"	"	"	6/16 P<0.05	3/15 P<0.01
Zy投与群	生後17日 と19日	0.5 mg づつ	"	"	"	"	8/15 P>0.2	9/16 P>0.1
実験-2								
対照				生後25日	♂ $10^{2.5}$ BLU ♀ $10^{1.5}$ BLU	i.v.	19/22	21/22
BCG接種群(1)	生後14日	1 mg	i.v.	"	"	"	8/22	7/22
" (2)	生後14日 と21日	0.5 mg づつ	"	"	"	"	12/23	8/22
実験-3								
対照				生後25日	♂ $10^{2.5}$ BLU ♀ $10^{1.5}$ BLU	i.v.	18/20	19/22
BCG接種群(1)	生後14日	1 mg	i.v.	"	"	"	8/21	6/20
" (2)	生後21日	"	"	"	"	"	15/23	9/20
実験-4								
対照				生後25日	♂ $10^{1.5}$ BLU	i.c.	15/17	
BCG接種群	生後14日	1 mg	i.v.	"	"	"	16/17	

表2 肝臓における Mφ の繁殖

対	照	BCG接種群	Zy投与群
G*	S*	G S	G S
C-1	♂ - -	B-1	♂ ++ +
-2	" - -	-2	" ++ +
-3	" - -	-3	" ++ +
-4	♀ - -	-4	♀ ++ +
-5	" - +**	-5	" ++ +
-6	" + -	-6	" ++ +
-7	" + -	-7	" ++ +
-8	" - -	-8	" ++ +
		-9	" ++ +

* G: GLISSON's sheath, S: sinusoid ** 多形核白血球をとまう
BCG接種 Zy投与: 表1実験-1に同じ。観察: 生後28日にと殺し標本作製観察。

とともに5匹づつを殺し、採血、血清分離し非働化して中和抗体価を測定した。各点5匹の値の幾何平均値を表4に示す。0時間はウイルスを接種しない。

さらにウイルス接種後21日目の生残りマウスの抗体価を測定した。結果を表5に示す。

これらの結果は BCG の効果が抗体産生の促進、増強によるものでないことを示している。かえって BCG 接

表3 血清ウイルス量

		24 48 72 96時間			
		♂	♀	♂	♀
対照	♂	$10^{1.5}$	$>10^{3.1}$	$10^{2.0}$	<1
"	"	$10^{0.3}$	$10^{1.5}$	$>10^{3.1}$	$10^{2.5}$
"	"	<1	$10^{2.5}$	$10^{1.5}$	$10^{2.1}$
"	"		$10^{2.4}$		
"	♀	<1	<1	$10^{1.7}$	<1
"	"	$10^{2.5}$	$10^{2.4}$	$>10^{3.1}$	<1
"	"			$10^{2.4}$	
BCG接種群	♂	<1	<1	$10^{0.5}$	<1
"	"	$10^{0.7}$	<1	$10^{0.7}$	$10^{1.0}$
"	"	<1	$10^{0.9}$	<1	<1
"	♀	<1	<1	<1	<1
"	"	<1	<1	$10^{0.3}$	<1
"	"		<1	<1	$10^{1.7}$

* BLU/0.02 ml

BCG接種: 表1 実験-1に同じ。ウイルス接種: 生後25日 量は表1実験-1に同じ。ウイルス定量: 生後2ないし3日の哺乳マウスに検体 0.02 ml を i.c. に接種。

種群では抗体の産生が抑えられている。なお、48時間までの値は大谷ら³¹⁾の報ずる正常マウスが持つ非特異的な inhibitor を示すものと思われる。

IF について

表4 抗体産生

	0	24	48	72	96	120時間
対 照	10 ^{2.5} **	10 ^{2.5}	10 ^{2.5}	10 ^{1.0}	ND**	10 ^{1.5}
BCG接種群	10 ^{1.5}	10 ^{2.5}	10 ^{2.5}	10 ^{1.0}	"	10 ^{1.5}

* 5匹の値の幾何平均値 ** not done

BCG 接種 ウイルス接種：表3に同じ。

表5 生残りマウスの抗体価

	<10 ^{0.5} *	10 ^{0.5-1.0}	10 ^{1.1-1.5}	10 ^{1.6-2.0}	>10 ^{2.1}
対 照	0**	0	1	3	1
BCG接種群	5	6	3	0	0

* 抗体価 ** 匹数

BCG 接種 ウイルス接種：表3に同じ。

検体：ウイルス接種後21日の生残りマウスから採血。

同じくあらかじめ BCG を接種したマウスに日脳ウイルスを接種し、6、12、24、48、72時間後の各点で10匹ずつ殺し、血液ならびに脾臓をとり出し、それぞれを一つにまとめた。0時間はウイルスを接種しない。血液は血清を分離、脾臓は homogenize してその遠心上清をとり、いずれも酸処理をして IF 材料とした。繰返し行なった実験のうち代表的な成績を表6に示す。

表6 IF 活性

	0	6	12	24	48	72時間
血 清						
対 照	<16	<16	<16	<16	<16	<16
BCG接種群	"	"	"	"	"	"
脾 臓						
対 照	<16	<16	<16	64	32	16
BCG接種群	"	"	"	<16	<16	<16

BCG 接種 ウイルス接種：表3に同じ。

標本：血清、脾臓ともおのおの5匹ずつ計10匹分を pool。

この測定法では血清の16倍希釈でウイルス接種後72時まで対照、BCG 接種マウスいずれでも IF 活性は見出せなかった。一方脾臓ではウイルス接種後24時間対照群でわずかな IF の産生がみとめられたが、その値はその後を追って低下した。BCG 接種マウスでは、活性を見出せなかった。これらの結果は IF によって BCG の効果を説明することを難しくする。

腹腔 Mφ の培養における日脳ウイルスの増殖

BCG は網内系細胞の繁殖をもたらすだけでなく個々の Mφ に細胞学的変化をおこさせることから、このよ

うな Mφ ではウイルスの増殖が妨げられ、そのため viremia が抑えられ発病率の減少をもたらすという可能性をたしかめるため、BCG 接種マウスと正常マウスからの腹腔 Mφ の培養をつくり、これにウイルスを接種しその後の増殖を追った。結果は表7の通りである。表中の値はすべて別個のチューブの値を示す。

表7 腹腔 Mφ の培養における日脳ウイルスの増殖

	15	24	48	72時間
実験-1				
対 照	10 ^{2.0} **	10 ^{2.2}	10 ^{2.4}	
	10 ^{2.0}	10 ^{2.1}	10 ^{2.2}	
BCG接種群	10 ^{2.1}	10 ^{2.2}	<10 ^{0.1}	
	10 ^{2.1}	<10 ^{0.1}	<10 ^{0.1}	
実験-2				
対 照	10 ^{2.1}	10 ^{2.0}	10 ^{2.2}	10 ^{2.3}
	10 ^{2.0}	10 ^{2.2}	10 ^{2.1}	10 ^{2.2}
BCG接種群	10 ^{2.2}	10 ^{2.3}	10 ^{2.3}	10 ^{2.4}
	10 ^{2.1}	10 ^{2.2}	10 ^{2.2}	<10 ^{0.1}

* PFU/ml

実験-1 BCG 接種：表1実験-1に同じ。腹腔 Mφ 培養：生後27日に腹水採取。4×10⁶個の細胞をチューブにまき incubate 1時間。ガラス壁に付着しない細胞を洗い落とす。ウイルス接種：Jath-160 株 10^{4.2} PFU を接種。incubate 1.5時間後洗い未吸着ウイルスを除く。培地を加え incubate。

実験-2 BCG 接種：実験-1に同じ。腹腔 Mφ 培養：生後26日に腹水採取。2×10⁶個の細胞をまく。その他実験-1に同じ。ウイルス接種：培地を加えた Mφ の培養に 10^{4.2} PFU のウイルスを接種。洗わずそのまま incubate。

この結果は Jath-160株の熱不活化が著しく、腹腔 Mφ の培養に用いたものと同じ培養液中で 35°C 24時間 incubate して感染価が 1/20~1/30 に低下することを考慮に入ると、正常マウスの Mφ ではウイルスのかなりの増殖がおこるが、BCG 接種マウスの Mφ ではそれが抑えられることを示している。後者では熱不活化以上に Mφ による積極的な不活化があずかっているのかも知れない。

考 察

上述の投与方法で BCG または Zy を与えると日脳ウイルスの接種時にはマウスの肝臓、脾臓は肥大していた。また肝臓の組織学的観察では Mφ の著しい繁殖がみられた(表2)。また BCG 接種マウスの腹腔 Mφ は生体染色色素で細胞内の lysosome と結合することが知られている neutral red⁽¹²⁾ を正常マウスにくらべて強くとり込むことを観察した。これらは従来の多くの観察⁽¹¹⁻¹³⁾ と一致し、明らかに網内系が刺激されていることを示している。ところで肝臓における Mφ の繁殖の程度は Zy 投与マウスの方が BCG 接種マウスにくらべて著しかっ

た。もしこのことが脾臓外の全身の網内系でも同じであるとすれば、日脳ウイルスに BCG には抑制効果があっても Z_y にはほとんどないことから、この効果は Mφ の数の多少で決まるものでなく、むしろ個々の Mφ の状態、活性度の如何によると考えられる。正常マウスと BCG 接種マウスから腹腔 Mφ を採り、ほぼ同数の細胞の培養をつくってそこで日脳ウイルスの増殖を追った結果(表7)はこの考えの妥当なことを裏付けるものと思う。

Z_y の効果はあるいは投与量、投与方法を変えれば強まるのかも知れない。mengo virus 感染に対する作用をみた Old¹¹⁾ の結果では Z_y にも可成の効果がみとめられた。

BCG の効果は接種後短時日ではあらわれず数日の経過を要することは Old¹¹⁾ の結果と一致し、また heterologous な細菌に対する抵抗性を観察した Howard¹²⁾, Mackaness¹³⁾, Blanden¹⁴⁾ の結果とも符合する。Mackaness は BCG による Mφ の細菌に対する抵抗性を高める作用は、BCG と淋巴系細胞との反応を介して徐々におよぶと述べている。

BCG 接種によって抗体あるいは IF の産生が早められたり、高められたりはしなかった(表4, 5, 6)。抗体については Freund の complete adjuvant が結核菌を含むことから抗体産生が増大する可能性が考えられたが、事實は逆に日脳ウイルス接種後21日の生残りマウスについて調べたところ、BCG 接種マウスは対照マウスにくらべて明らかに抗体価が低かった(表5)。これはウイルス接種後おこる viremia がこの群のマウスでは著しく抑えられ、多くはウイルスを血液に見出せないこと(表3)と結びつくものと思われる。すなわち BCG 接種群では体内でのウイルスの増殖はほとんどなく、しかもはじめの接種量も少いので抗原量が不足し、抗体産生が起らないか起ってもわずかな量にとどまると考えられる。

IF については対照マウスの脾臓でのみ若干の IF 活性がみとめられた。これは脾臓でウイルスの増殖がおこるためでないだろうか。ところで六反田¹⁵⁾は viremia をおこしにくい日脳ウイルスの一つの株が IF を多く産生し、その株から由来した viremia を起しやすい変異株が IF をわずかしき産生しないことを報告しており、また Gorhe¹⁶⁾ は Freund の complete adjuvant による FMDV のマウス体内での増殖阻害が IF 産生の促進によると述べているので、既述の実験の外に多量の newcastle disease virus を BCG 接種マウスに静注

して IF 産生を追った。この場合高い titer の IF が産生されるが血中、脾臓とも正常マウスにくらべて低いことはあっても高くはならなかった(未発表)。これは Youngner¹⁷⁾ の同様の実験の結果と一致した。以上あげた結果は BCG 接種が少くとも血中、脾臓等の IF に関する限りそれらの産生を促す作用はなく、したがってそれらを介して BCG の効果があらわれるものでないことを示している。

生体内における日脳ウイルスの感染初期の第一次増殖部位について佐山¹⁸⁾は、マウスの感染実験で蛍光抗体法により接種個所につながる表在性の局所淋巴節であることを明らかにした。同じ arbovirus B 群の yellow fever virus (YFV) でも Theiler¹⁹⁾ は感染早期に淋巴節等淋巴細胞系の組織でふえることを観察している。これらの報告では淋巴節等のどの細胞が増殖を許しているか結論していない。京極²⁰⁾は仔ブタを用いた実験で日脳ウイルスが感染早期にまず全身の網内系の細胞でふえると報告している。なお Wheelock²¹⁾ は血液白血球の培養での YFV の増殖をしらべ、よく増殖するのは単核球であると述べている。

日脳ウイルスの感染初期の増殖部位についての以上の知見と BCG 感染に対する生体の反応が網内系にとくに著しいことから、マウスにおける BCG 接種の日脳ウイルス感染に対する効果について次のような可能性があげられる。すなわち日脳ウイルスは接種後速やかに網内系細胞にとり込まれ²²⁾、そこで増殖するが、BCG 感染によって活性度の始められた Mφ ではウイルスのとり込みは一層つよく行なわれてもその中での増殖は妨げられ、そのためその後の他の組織細胞へのひろがり、そこでの増殖も阻まれ viremia を示さない、したがって発病もしないという可能性である。BCG 接種マウスと正常マウスからの腹腔 Mφ の *in vitro* の培養における Jath-160 株の増殖の相違(表7)はこの可能性を裏付けるものと思われる。BCG 感染マウスの Mφ の細胞学的、生理学的な如何なる変化がウイルス増殖抑制につながるか今後明らかにして行きたい。これに関してウイルスの uncoating に関与すると考えられている細胞の lysosome^{23,24)} が BCG を接種された動物の Mφ で増加し、しかもその中の酵素活性も高まる^{17,20,25)} ということは興味を惹く。

ま と め

あらかじめ BCG を接種したマウスでは正常マウスにくらべて日本脳炎ウイルスの末梢からの感染による発症

が抑えられた。zymosan を投与したマウスではこの効果はほとんど見られなかった。

正常マウスで日本脳炎ウイルス接種後数日間みとめられる viremia が BCG 接種マウスでは著しく抑えられた。

日本脳炎ウイルス接種後産生される抗体、インターフェロンが BCG 接種マウスで、BCG を接種しないマウスより早くあるいは多く産生されることはなかった。

BCG 接種マウスと正常マウスからとり出した腹腔 macrophage の培養での日本脳炎ウイルスの増殖をしらべたところ、前者では増殖が阻止され、後者ではある程度増殖することが示された。

得られた結果からマウスにおける BCG 感染の日本脳炎発症に対する抑制効果の機序について可能性をあげそれについて考察した。

文 献

- 1) MIMS, C. A., 1964 : Bact. Rev., 28, 30.
- 2) BANG, F. B. and WARWICK, A., 1960 : Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 46, 1065.
- 3) GOODMAN, G. T. and KOPROWSKI, H., 1962 : ibid., 48, 160.
- 4) JOHNSON, R. T., 1964 : J. Exp. Med., 120, 359.
- 5) GALLILY, R., WARWICK, A. and BANG, F. B., 1967 : ibid., 125, 537.
- 6) 三田村篤志郎, 北岡正見, 1947 : 日本医学学会誌第12回総会演説抄録, P. 47.
- 7) 後藤正勝, 大久保新也, 1954 : 東京医学雑誌, 62, 199.
- 8) 林江沢, 西村仁, 下田玄里, 井出千代子, 牧野彰子, 1954 : 最新医学, 9, 857.
- 9) MIDDLEBROOKS, B. L., ALLEN, R. and SULZIN, S. E., 1968 : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 127, 886.
- 10) GLEDHILL, A. W. and REES, R. J. W., 1960 : Nature, 187, 703.
- 11) OLD, L. J., BENACERRAF, B. and STOCKERT, E., 1963 : Colloques Internat. Centre Nat. Recherche Scientif. (1962), p. 319, Editions Centre Nat. Recherche Scientif.
- 12) GORHE, D. S., 1967 : Nature, 216, 1242.
- 13) ALLISON, A. C. and YOUNG, M. R., 1964 : Life Sci., 3, 1407.
- 14) BENACERRAF, B., THORBECKE, G. J. and JACOBY, D., 1959 : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 100, 796.
- 15) THORBECKE, G. J., OLD, L. J., BENACERRAF, B. and CLARKE, D. A., 1961 : J. Histochem. Cytochem., 9, 392.
- 16) MACKANESS, G. B. and BLANDEN, R. V., 1967 : Progr. Allergy, 11, 89.
- 17) BLANDEN, R. V., 1968 : J. Reticuloendothel. Soc., 5, 179.
- 18) NORTH, R. J., 1969 : J. Exp. Med., 130, 299.
- 19) HOWARD, J. G., BIOZZI, G., HALPERN, B. N., STIFFEL, C. and MOUTON, D., 1959 : Brit. J. Exp. Path., 40, 281.
- 20) BLANDEN, R. V., LEFFORD, M. J. and MACKANESS, G. B., 1969 : J. Exp. Med., 129, 1079.
- 21) ROKUTANDA, H. K., 1969 : J. Immunol., 102, 662.
- 22) YOUNGNER, J. S. and STINEBRING, W. R., 1965 : Nature, 208, 456.
- 23) 松山繁夫, 山下貞司, 大谷明, 金子源一, 1968 : ウイルス, 18, 396.
- 24) THEILER, M., 1951 : In 'Yellow Fever' (ed. G. K. STRODE), Chapter 2, McGraw-Hill, New York.
- 25) 京極方久, 児玉和夫, 岩本市蔵, 佐々木文存, 1968 : ウイルス, 18, 253.
- 26) WHEELOCK, E. F. and EDELMAN, R., 1969 : J. Immunol., 103, 429.
- 27) 六反田日南枝, 1966 : ウイルス, 16, 314.
- 28) ALLISON, A. C., 1967 : In 'Perspective in Virology V' (ed. M. POLLARD), Chapter 2, Academic Press, New York-London.
- 29) SILVERSTEIN, S. C. and DALES, S., 1968 : J. Cell Biol., 36, 197.
- 30) COHN, Z. A. and WIENER, E., 1963 : J. Exp. Med., 118, 991.
- 31) HEISE, E. R., MYRVIK, Q. N. and LEAKE, E. S., 1965 : J. Immunol., 95, 125.
- 32) SAITO, K. and SUTER, E., 1965 : J. Exp. Med., 121, 727.
- 33) 大谷明, 緒方隆幸, 清水明, 1967 : 日本脳炎ワクチン研究報告集(2) (日本脳炎ワクチン研究会編) P. 11.
- 34) BIOZZI, G., BENACERRAF, B. and HALPERN, B. N., 1955 : Brit. J. Exp. Path., 36, 226.

秋山武久 (慶大・医・微生物) : 1) Zymosan 前処置マウスの網内系細胞の lysosomal enzyme 活性は極度に高まっているにもかかわらず、実験的チフス症における感染死防御能は増進していないことを試験した。2) 特殊の細菌ならびに原虫性感染の間には交差免疫が成立することが知られているが、BCG 感染マウスにおける日本脳炎ウイルスの増殖阻止も同じような機序によると思われる。

答 : BCG による日本脳炎ウイルスに対する抵抗性の増大が、MACKANESS らが hetero な細菌に対する抵抗性の獲得の機序として考えているマクロファージの異物の分解能の増進と同様にもとづいているのでないか、従ってマクロファージの lysosome の変化がおもな問題でない。

かと考えているが、それが正しいかどうかこれから明らかにして行きたいと思っている。lysosome の酵素活性の増大よりも lysosome 膜の変化等が問題なのかも知れない。

斉藤和久(慶大・医・微生): 日脳ウイルスの target cell が脳神経細胞であるとすればマクロファージはウイルスが target cell に達する一つの関門と考えられないか。そうだとすると秋山さんとの討論と少しずれがでるのではないか。チフス症、結核などでは菌はマクロファージ内で増殖し、それが疾病の場であると私たちは考えている。だから、BCG 感染はマクロファージの活性をたかめマクロファージ内でウイルス増殖を阻止してしま

い、ウイルスが target cell に到達するのを妨げ、結果として感染防御効果となっているものと考ええる。

答: その通りに考えている。末梢での、とくにマクロファージでの増殖がおさえられ、それで viremia がおこらず、脳へウイルスが行かない、したがって発症しないと考える。

山内一也(予研): BCG 刺激をうけたマウスでは日脳に対する抗体産生がほとんどみられないが、このようなマウスの日脳ウイルス再攻撃に対する免疫性はどうか。

答: 用いたマウスは生後4週過ぎると末梢からの感染を受けにくくなるので再攻撃の実験はやっていない。

家畜の自己免疫性貧血症におけるマクロファージの役割

大 木 与 志 雄 (家畜衛生試験場)

自己免疫病が自然的に家畜において起るということは長らく証明されていなかったが、1957年 MILLER ら¹⁾によって、イヌにおいて、ヒトのそれに類似した自己免疫性溶血性貧血症が自然的に起り、プラズマ細胞の増殖と網内系による赤血球貪食像を伴う“脾臓性貧血”が死因となることが報告され、最近 LEWIS ら²⁾によって、クームステスト陽性であるところの本症の存在が確認された。また L. E. 因子の証明されるイヌの全身性紅斑性狼瘡 (LEWIS)³⁾ や plasmacytosis と 過グロブリン血症を伴うミンクのアリニューション病 (SAISON)⁴⁾ においても赤血球のクームステストが陽性となることが報告されている。また、ウマの伝染性貧血症においても、古くから自家ないし同種溶血素の存在が FINZI および葛西ら⁵⁾ によって報告されているが、否定的な報告⁶⁾ もあり、その実在性については確証するに至っていなかった。しかしながら最近著者ら⁷⁻¹⁰⁾ によって、諸種の赤血球自己抗体が、本症において同定されると共に、抗グロブリン試験もまた陽性となることが証明された。

これらの家畜の自己免疫性疾患のうち、ウマの伝染性貧血症 (伝貧) は、広く間葉系細胞に親和性を有するウイルス性疾患であり、現在本ウイルスは、少なくともマクロファージ様細胞を主体とする培養白血球中で増殖することが知られている。本症は臨床的には、回帰熱、貧血、黄疸症、ジデロチーテン (損鉄細胞)、フェリチンミアおよび循環障害を特徴とするが、病理学的には、特に肝、脾臓およびリンパ節における網内系細胞の腫大増殖、遊走化、赤血球貪食像、ヘモジデロシスおよび塩基好性のリンパ胚球^{11,12)} ならびに小型リンパ球の増殖像を特徴とし、ウイルスの増殖に伴って、明らかに間葉系の免疫適格細胞群に異常な病変像が認められる貧血症である。これらの所見には、疑念性の自己免疫性溶血性貧血症としての性格が多分にうかがわれる。

そこで、本症における自己免疫的性格を明らかにし、その貧血機構に関連して、マクロファージによる自己赤血球の貪食ならびにジデロチーテン出現機序を明らかにすることを目的として、赤血球自己抗体の性状およびそのオブソニンの性格等について諸種の検討をおこなっ

た。

実験材料と方法

ウイルスを接種した20頭の人工感染伝貧馬の各病的経過時における血液について、自己赤血球の凝集反応および抗グロブリン試験をおこなうとともに、それらの赤血球自己抗体の免疫グロブリンとしての諸性状について検討をおこなった。またそのオブソニンの性状を明らかにするために、自己抗体感作赤血球に対するマクロファージの貪食能をしらべた。

寒冷および温式凝集素：検査用血漿の分離に際しては、凝集素が自己の赤血球と反応して吸着沈澱されるのを防ぐために、採血後直ちに凝固防止剤を加えて、45~47°C に加温し、なるべくすみやかに遠心分離を行ない、血漿と血球を分離した。両凝集素の測定に際しては、2倍段階希釈した各血漿 0.25 ml に0.25%自己赤血球 0.25 ml をそれぞれ添加し、寒冷凝集素価の測定には、4°C の氷室に3時間静置し、また温式凝集素価の測定には、37°C の恒温槽に2時間静置後判定を行なった。

直接抗グロブリン試験：病馬の血液を採血後、直ちに37°C に加温し、生理食塩水 (37°C) で数回洗浄して、2%赤血球浮遊液をつくり、この0.1 ml を抗馬グロブリン血清 (2倍段階希釈) 0.1 ml にそれぞれ添加し、37°C に60分間静置後、1000 rpm 1分間遠心分離して、凝集の有無を判定した。

マクロファージによる赤血球貪食試験：*in vivo* 貪食試験に関しては、病馬血漿中の自己抗体によって凝集感作 (37°C, 60分) された伝貧馬赤血球 (4%) を0.5 ml ずつ、マウス腹腔内に注射し、腹腔内マクロファージによる初期貪食率 (30分後) を健康馬血漿で同様に処理した健康馬赤血球のそれと比較検討した。また *in vitro* の貪食試験に関しては、同様にして自己抗体で凝集感作された伝貧馬赤血球 (0.25%) を0.5 ml ずつ、馬白血球培養細胞 (単球-マクロファージ系) に添加し、培養白血球による貪食率 (37°C, 1~2時間後) を自己抗体で感作されていない健康馬赤血球のそれと比較検討した。

実験結果

1. 臨床症状と赤血球自己抗体

1. 寒冷凝集素と症状

伝食馬においては、いずれもウイルス感染後、発熱するとともに、流血中に自己の赤血球を低温で凝集する病的寒冷凝集素が出現増加し（凝集素価16~256倍）、症

状の軽重とはあまり関係なく漸減する（図1）。いわゆる正常寒冷凝集素は健康馬でも少量検出されるが（2~16倍）、通常氷室内（4℃）において自己の馬赤血球と反応し、室温では反応しない。伝食馬における病的寒冷凝集素は至適反応温度は4℃ではあるが、通常室温でもよく反応する。しかしながら本凝集素は体温と同程度の温度では全く反応せず、貧血の程度ともあまり関連は認め

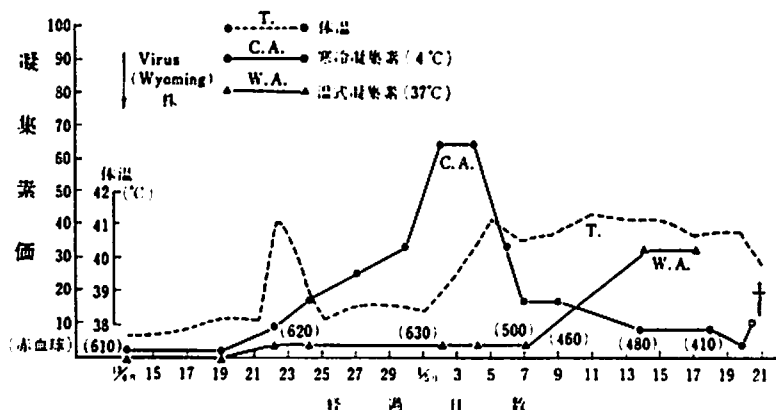


図1 伝食馬血漿中の自己赤血球凝集素の消長

られなかった。

2. 温式凝集素と症状

伝食馬の血液について、最も特徴的な病的所見は、発症と共に体温（37~42℃）においても、自己の赤血球と反応結合し得る温式型の凝集素が出現することであり、またこれと相前後して、貧血、ジデロチーテンおよび遊離フェリチンの出現が見られことである。特に温式凝集素は、健康馬の血漿中には全く検出されないが発熱、中

の伝食馬においては、いずれも陽性に検出される。頸静脈血における本凝集素の消長については、発熱後間もなく微量出現し、症状と比較的密接な関係の下に増減が認められる。すなわち軽度ないし中等度の発症例においては、凝集素価は2~64倍を示したが、高温が長期間つづき、重篤な例においては最高1,024倍に達した（図2）。次いで下熱した場合には、急速に低下して弱陽性となり、2回目の発熱と共に再び著しく増加するのが観

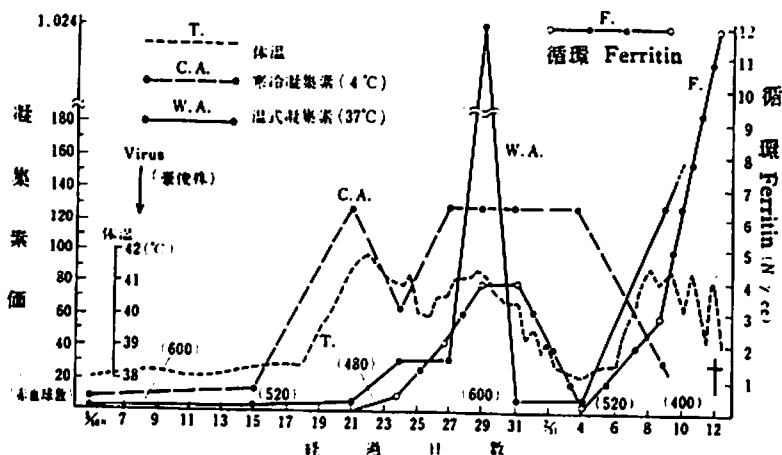


図2 伝食馬血漿中の自己赤血球凝集素の消長

察された。

赤血球数と本凝集素価とは必ずしも比例はしないが、大体その出現を契機として、100~200万の赤血球減少が認められた。ただし症状が急激で、凝集素価が一過的に且つ急速に著しく高い値を示した例においては、そのピークに一致して頸静脈赤血球も一過的に停滯、鬱血の傾向を示し、明らかな末梢血循環障害が観察され、その後において貧血が認められた。各種病型の伝貧馬（20頭）における温式凝集素と赤血球数の関係については、特に経過の比較的長い定型的な回帰熱型、亜急性型および再燃型（慢性型から急性型への移行型）の発熱時から下熱

直後あるいは死亡時にかけて、本凝集素が持続的に証明され、貧血も著しく、300~500万の赤血球減少と著しい貧血性のジデロチテンの出現が認められた。

3. 抗グロブリン試験と症状

定型的な発熱中の伝貧馬の頸静脈における赤血球はいずれも直接抗グロブリン試験が陽性（力価8~2048倍）となることが証明される。その力価は病的寒冷凝集素の消長とはあまり関連は認められないが、温式凝集素の消長とは密接な関係が認められた。すなわち伝貧ウイルス接種後、その潜伏期間中はいずれも陰性であるが、定型的な発熱に伴って、温式凝集素の出現と共に、抗グロ

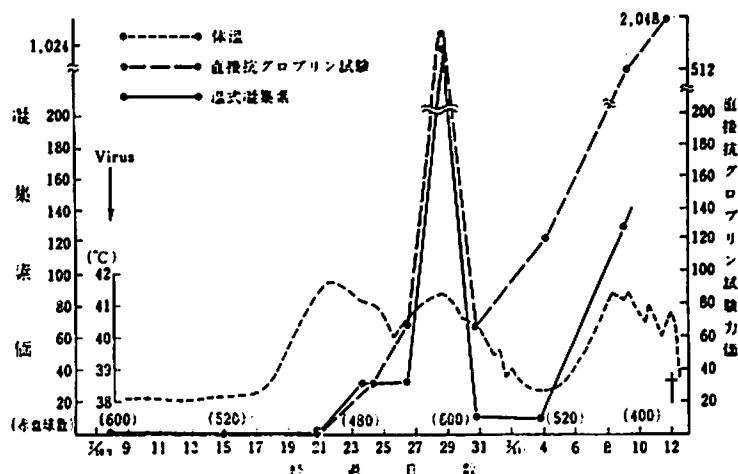


図3 伝貧馬赤血球に関する抗グロブリン試験および温式凝集素の消長

ブリン試験もまた陽性となり、凝集素が急激に増加すると共に、本試験の力価もほぼ並行して増強し、下熱と共にいずれも急速に反応は減弱した。また2度目の回帰発熱と共に、両反応は相前後して強陽性に転化し、死亡時においては著明な貧血と共に、抗グロブリン試験の力価も全例中、最高値（2048倍）を示した（図3）。また末梢血（頸静脈血）と内臓血（肝臓あるいは脾臓血）における赤血球の抗グロブリン試験の力価を比較検討した結果は、潜伏後期から発熱期、下熱後にわたって、いずれの病的経過時においても、常に末梢血よりも内臓血の方が、はるかに抗グロブリン試験の力価の高いことが認められ、従って内臓に停滯している赤血球は末梢循環血液に較べて、はるかに多量の自己抗体によって吸着されていることが観察された（表1）。特に比較的経過の長い定型的な回帰熱型ならびに再燃型（慢性—急性移行型）において、末梢血、内臓血共に比較的高い力価を示し、著しい貧血と共に、肝・脾臓における鬱血、血球凝集、マクロファージによる赤血球貪食ならびにジデロチーテ

表1 伝貧馬における頸静脈血と内臓血の抗グロブリン試験の比較

病的経過	頸静脈血 抗グロブリン 試験	内臓血 抗グロブリン 試験	赤血球数 ($\times 10^4$) (貧食後)
潜伏期 (4日目)	—	—	670 (—)
潜伏期 (7日目)	—	1: 16	710 (—)
発熱中 (初回)	1: 16	1: 256	448 (+)
発熱中 (急性)	1: 16	1: 128	520 (+)
発熱中 (回帰熱)	1: 32	1: 128	168 (+++)
発熱中 (慢性—急性 移行型)	1: 128	1: 512	207 (+++)
下熱後 (6日目)	1: 8	1: 256	300 (+++)
下熱後 (60日目)	—	1: 128	489

ンが多数観察された。

II. 赤血球自己抗体の血清学的性状

1. 寒冷凝集素

健康馬において少量検出される正常寒冷凝集素も、ウイルス感染後伝馬において増加する病的寒冷凝集素も、その免疫グロブリンとしての性状は全く同様のものであるが、反応温度領域と血清学的特異性について若干の

差異が認められた。すなわち両者ともに、免疫グロブリンとしては IgM に属し、0.1M の 2-メルカプトエタノール (2-ME) による還元処理によって不活性化され、また Sephadex (G200) ゲル濾過法による血漿蛋白の分離においても、最もすみやかに溶出・過されるマクログロブリン分画のピークに一致して、その活性が証明され (図 4)、硫酸塩析法では約 40% 飽和で沈澱された。その他両者ともに、至適反応 pH は約 7.4、耐熱性は 56°C、

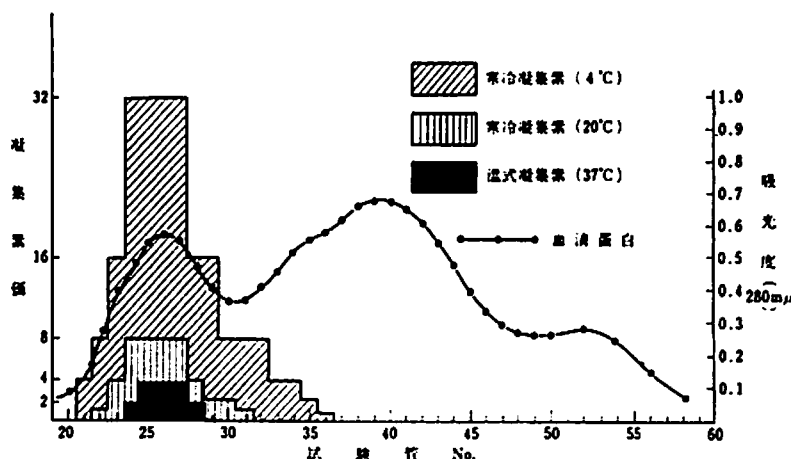


図 4 伝馬血漿における自己赤血球凝集素の Sephadex (G200) ゲル濾過法による分離

30分で約 1/2 に活性が減弱し、63°C、30分加熱で完全に活性が破壊される比較的易熱性のグロブリン蛋白質であった。しかしながら、その反応温度領域については、いずれも至適反応温度は 4°C であるが、正常寒冷凝集素の場合は、15~20°C 以上では全く赤血球と反応しないのに対し、病的寒冷凝集素の場合は約 30°C まで反応するのが認められた。

また血清学的特異性に関しては、正常寒冷凝集素は馬血球以外にモルモット血球とも交差反応を示したが、病的寒冷凝集素は馬血球とのみ反応し、モルモット、家兎、めん羊、豚および鶏などの異種血球とは全く反応しないことが、吸収交差試験によって証明された。

2. 温式凝集素

温式凝集素が寒冷凝集素と最も異なる点は、いうまでもなく、その反応温度領域であって、至適反応温度は 37~38°C であり、30°C 以下あるいは 42°C 以上では急激に反応が減弱する。

しかしながら免疫グロブリンとしての性状は、寒冷凝集素と同様に、IgM に属し、2-ME によって不活性化され、Sephadex (G200) ゲル濾過によって、最初に溶出されるマクログロブリン分画に活性が証明され、また

硫酸塩析法では 40% 飽和で沈澱される。その他、至適反応 pH は 7.4、耐熱性は 56°C、30分で約 1/4 以下に活性が減弱し、63°C、30分加熱で完全に活性が消失し、比較的易熱性の不安定なグロブリン蛋白質であった。

またその血清学的特異性に関しては、自己の馬赤血球によっては完全に吸収除去されるが、ニワトリ、モルモット、メンヨウおよびウサギ (家兎) などの異種赤血球とは全く反応せず、吸収されない (表 2)。すなわち病的寒冷凝集素と同様ウマの赤血球に対して特異性を示す自己血球凝集素であるが、溶血作用は示さない。また本凝集素は通常の免疫反応と同様、凝集素価の高い抗体過剰状態あるいはまた赤血球濃度の高い抗原過剰状態では反応が抑制され、いわゆる血清反応の最適比あるいは当量域が認められた (表 3)。

3. 抗グロブリン試験に關与する自己抗体

直接抗グロブリン試験に關与する伝馬の赤血球の表面に吸着されている自己抗体は、IgM を主体とする免疫グロブリンであるが、一部には IgG (非定型) も關与している可能性も認められた。すなわち抗ウマグロブリン血清を Sephadex (G200) ゲル濾過法による最初のウマ血清マクログロブリン分画 (IgM を含む) で吸収し

表2 伝貨馬における自己赤血球に対する温式凝集素の吸収試験とその特異性

	吸 収 用	凝 集 素 価									
		2	4	8	16	32	64	128	256	512	
伝 貨 馬 血 球	赤 血 球	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	未 吸 収 (対 照)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	馬血球吸収	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	鶏血球吸収	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	豚血球吸収	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	羊血球吸収	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	兎血球吸収	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	ヒト血球吸収	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	牛血球吸収	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
	馬血球吸収	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

* 各種動物赤血球で吸収後、自己馬赤血球と 37°C、2 時間反応した上清を用いて、伝貨馬血球の直接抗グロブリン試験を行なうと、未吸収対照の強陽性から、吸収後は全く陰性となることが証明された。しかしながら第2の蛋白分画(IgGを含む)による吸収中和試験の場合には、その力価は若干減弱するに過ぎず、第3の蛋白分画(アルブミンを含む)によっては、全く中和されなかった(表4)。いつぼうウマの IgM は抗ヒト IgM 血清と強く交差反応を示すことが免疫電気泳動によって証明されるが(図5)、この抗ヒト IgM 血清を用いて、定型的な伝貨馬赤

表3 伝貨馬における自己赤血球と温式凝集素の反応領域

凝集素	血 球	赤 血 球 (%)							
		8	4	2	1	0.5	0.25	0.12	0.06
血 球	1: 1	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 2	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 4	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 8	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 16	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 32	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 64	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 128	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 256	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 512	+	+	+	+	+	+	+	+
凝 集 素	1: 1024	+	+	+	+	+	+	+	+
	1: 2048	+	+	+	+	+	+	+	+

表4 伝貨馬赤血球の抗ウマグロブリン中和試験

免 疫 血 球	吸 収 用 ウマ血清蛋白分画*	直接抗グロブリン試験力価							
		8	16	32	64	128	256	512	
抗 ウ マ グ ロ ブ リ ン	生 理 食 塩 水 (対 照)	+	+	+	+	+	+	+	
	マクログロブリン 分 画	-	-	-	-	-	-	-	
	IgG 分 画	+	+	+	+	+	+	+	
	ア ル ブ ミ ン 画 分	+	+	+	+	+	+	+	

* 抗ウマグロブリンを等量のウマ血清蛋白分画(Sephadex G 200)で中和後、遠心分離上清を使用



図5 抗ヒト IgM とウマ血清 (IgM) との交差反応を示す免疫泳動図

血球と直接抗グロブリン試験を行なうと、抗ウマグロブリン血清の力価と同様、強い陽性反応を示した。ウマとヒトの IgG も同様に交差反応を示すが、抗ヒト IgG 血清と同一伝貨馬赤血球との直接抗グロブリン試験は弱陽性反応を示したに過ぎなかった。また両反応とも、それぞれウマ IgM 分画あるいはウマ IgG 分画によって中和されそれぞれ陰性となることが認められた(表5)。またこの抗グロブリン試験に参与する物質は、56°C、30分加熱によって著しく活性が減弱され(間接抗グロブリン試験)、温式凝集素と同様、比較的易熱性であることが証明される。しかしながら本物質は、加熱後新鮮な健康馬血清の添加によって、活性の回復は認められず、易熱性

表5 抗ヒトグロブリンによる伝貨馬赤血球のクームテストおよび抗グロブリン中和試験

免疫血清*	吸 収 用 ウマ血清蛋白**	直接抗グロブリン試験力価					
		16	32	64	128	256	512
抗 ウ マ グロブリン (対 照)	生 理 食 塩 水	+	+	+	+	+	+
	ウ マ I g M 分 画	-	-	-	-	-	-
抗 ヒ ト I g M	生 理 食 塩 水	+	+	+	+	+	+
	ウ マ I g M 分 画	-	-	-	-	-	-
抗 ヒ ト I g G	生 理 食 塩 水	+	+	+	+	+	+
	ウ マ I g G 分 画	-	-	-	-	-	-

* 健康馬赤血球で吸収した上清血清

** 抗ヒトグロブリン(1:8)を等量のウマ血清蛋白分画(Sephadex G 200)で中和吸収

の補体成分とは異なることが明らかにされた。

Ⅲ. 自己抗体のオプソニンの作用

1. マウス腹腔内マクロファージによる赤血球貪食

温式凝集素の力価の高い伝貨馬血漿と反応して凝集したウマ赤血球の表面上には、自己抗体グロブリンが吸着されていることが蛍光抗体法によっても証明される(図6)。

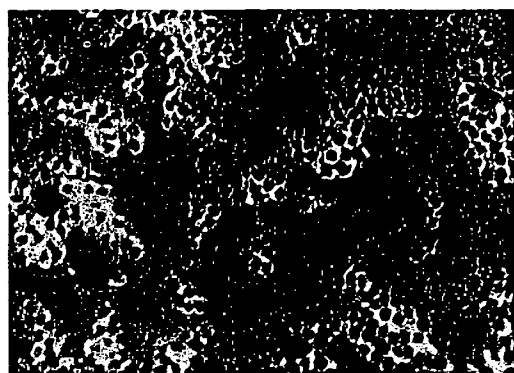


図6 抗グロブリン蛍光抗体法による伝貨馬赤血球上の温式凝集素の染色

このような温式凝集素によって吸着感作された伝貨馬赤血球と、全く感作されていない健康馬赤血球とをそれぞれ、マウスの腹腔内に注射し、腹腔内マクロファージによる貪食能を比較検討した結果、30分後においては、健康馬血球の例は、まだいずれのマウスにおいても、ほとんど貪食が開始されていなかったが(白血球1,000個につき貪食白血球数、平均2個)、伝貨馬血球の場合は、すでにいずれのマウスにおいても、マクロファージによってかなり貪食が進行していることが観察された(同上貪食白血球数、平均51個)。ただし2~6時間後では、両赤血球ともいずれも同様に著しく貪食せられ(貪食白血球数100~250個)、24時間後には、マクロファージに貪食された赤血球は破壊消失し、72時間後においては、多数のマクロファージが赤血球を消化して、ジデオチテンとなっていることが観察された。

2. 培養ウマ白血球による赤血球貪食

マウスにおける *in vivo* の実験と同様の目的で、自己抗体のオプソニンとしての貪食促進効果をしらべるために、ウマ白血球培養細胞(単球-マクロファージ系)を用いて、*in vitro* で血漿中の温式凝集素で凝集感作した伝貨赤血球と、自己の血漿で同様に処理した健康馬赤血球に対する貪食能を比較した結果、伝貨馬赤血球を培養細胞に添加して37°C、1~2時間静置した場合には、い

ずれの例(6例)においても、それぞれかなり多数のマクロファージが赤血球を貪食していたが(白血球1000個につき、貪食マクロファージ数、平均140個)、健康馬赤血球の場合には、赤血球を貪食したマクロファージの数はいずれもわずかな程度であった(同上貪食マクロファージ数、平均22個)。さらに伝貨馬赤血球の場合には、マクロファージ1個あたりの貪食血球数も、健康馬のそれと比較して、はるかに多数の赤血球を貪食しており(図7)、また多数の赤血球がマクロファージの周辺を取り囲むように偽足によって捕捉せられ、同時に多数貪食されているのが観察された(図8)。健康馬赤血球の場合には、このような偽足で捕捉された像はほとんど見られなかった。

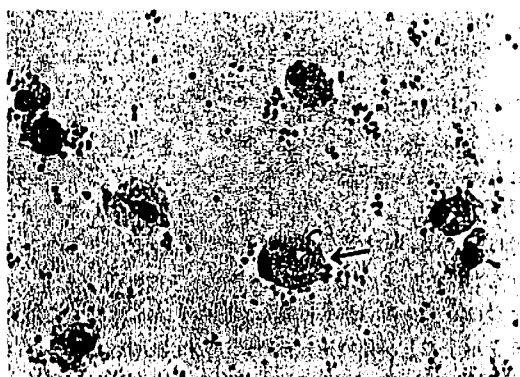


図7 培養ウママクロファージによる自己抗体感作馬赤血球の貪食。偽足による赤血球捕捉と多数の赤血球貪食(約30個、矢印)を示す。

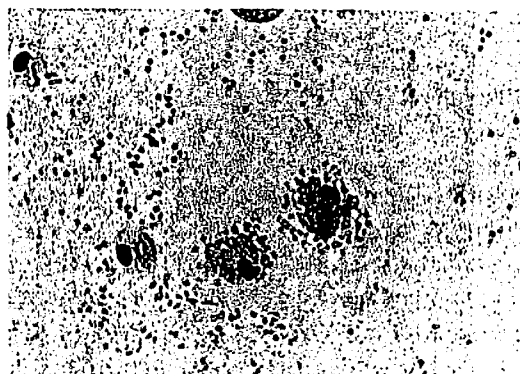


図8 培養ウママクロファージによる自己抗体感作馬赤血球の貪食。多数の赤血球がマクロファージ周辺に捕捉されかつ貪食されている。

このような結果から、自己抗体の中、特に温式凝集素は自己の赤血球に結合して、マクロファージの偽足による赤血球捕捉を容易ならしめ、貪食を促進するものであ

ることが証明された。

考察とまとめ

ウイルス性疾患であるウマの伝染性貧血症においては、発病と共にほとんどすべての例において、その血漿中に自己の赤血球を凝集する病的寒冷凝集素と温式凝集素が証明されるが、これらの凝集素はいずれもその免疫学的ならびに物理化学的性状から、諸種の免疫グロブリンの中、IgM に属する自己抗体であることが証明される。さらに本症においては、赤血球の抗グロブリン試験もまた陽性となるが、このような生体内ですでに自己の赤血球表面に吸着されている物質もまた、その免疫化学的性状から、IgM を主体とする自己抗体であることが証明される。

このような赤血球自己抗体の中、病的寒冷凝集素に関しては、ヒトの疾病においても、非定型肺炎 (PPLO)、伝染性単核球症およびリンパ細胞系増殖性疾患 (リンパ肉腫、細胞肉腫およびリンパ性白血病) 等の患者血漿中に著しく増加することが知られており、寒冷にさらされると末梢血管で赤血球凝集を起し、補体成分 (C'_{3a} および C'_{4a}) の関与の下に、貧血の誘因となることが知られている¹²⁻¹⁵⁾。しかしながら、伝貧馬においては、本凝集素の消長は症状や貧血の程度とは余り関係は認められず、マクロファージによる赤血球貪食との関連も認められなかった。

本症においては、むしろ病的寒冷凝集素の出現より若干遅れて出現増加する温式凝集素が症状や貧血の程度と比較的密接な関係を有しており、その出現を契機として貧血が認められるので、本凝集素が伝貧馬における赤血球の破壊や貪食に最も重要な役割を果たしているものと考えられる。しかし本凝集素はサルモネラやウマの補体と共に、自己の赤血球に対してほとんど溶血作用を示さないもので、これまでに報告された自家あるいは同種溶血素¹⁶⁾とは異なるものと考えられる。伝貧馬における本凝集素は比較的易熱性で、生理的食塩水 (37°C) 中で自己の赤血球を含むウマの血漿を特異的に凝集する IgM 型の定型抗体であるが、このような温式凝集素は、他の家畜の疾病においては報告されていないので、伝貧馬における一つの特徴的な自己抗体であると考えられる。

さらに定型的な伝貧馬においては、この温式凝集素の消長と密接な関係の下に、赤血球の直接抗グロブリン試験もまた陽性となるが、このような伝貧赤血球の表面に吸着されているグロブリンもまた、抗馬グロブリン中和試験および抗ヒト IgM 血清による交差反応等によって主として IgM に属する免疫グロブリンであることが証

明され、また間接抗グロブリン試験の結果から、本試験に関与する物質は、温式凝集素と同様、かなり易熱性ではあるが、補体成分とは異っている所から、伝貧馬の流血中において、血漿中に遊離した温式凝集素自体が、過剰な抗原として存在する自己の赤血球に吸着結合され、直接抗グロブリン試験を陽性ならしめる要因となっているものと考ええる。

いっぽう、ヒトの後天性の自己免疫性溶血性貧血症^{16, 17)}において検出される温式型の赤血球自己抗体に関しては、まれに比較的耐熱性の溶血素が検出されることがあるが、その大部分は耐熱性の非定型抗体 (IgG) であり、自己の赤血球を生理的食塩水中で直接凝集する能力はなく、抗グロブリン試験によって始めて証明される自己抗体である。それゆえ、伝貧馬において証明される大部分の赤血球自己抗体 (IgM) とは性状を異にしている。ただし伝貧馬の抗グロブリン試験には、抗ヒト IgG 血清との交差反応で示されるように、一部非定型抗体 (IgG) が関与する可能性もあるが、温式凝集素の存在のために確証するに至らなかった。

次に温式型の赤血球自己抗体で吸着感作された伝貧馬赤血球は、非感作健康馬赤血球に較べて、マクロファージによって貪食されやすく、少なくとも温式凝集素はオプソニ的な作用を有することが明らかにされたのであるが、実際、伝貧馬における貧血は、温式凝集素の出現の時期と相前後して開始され、ことに自己抗体の出現が比較的高くかつ持続する場合に、肝、脾臓における鬱血と共に、貧血も著しく、またこのような内臓に停滞している赤血球は、頸静脈血に比較して、抗グロブリン試験の力価もはるかに高く、多量の自己抗体が吸着されていることが証明せられ、同時に内臓血流中に遊走化した多数のマクロファージないし組織球様細胞が赤血球を貪食し、さらにこれを消化してジデロチンとなっているのが観察される。

このような血液所見から判断して、伝貧馬においては、温式凝集素によって吸着感作された赤血球は、主として肝、脾臓等の内臓血流中に凝集停滞し易く、またその表面性状の物理化学的な変化に伴い、マクロファージのような食細胞によって捕獲され、最終的には貪食破壊されるものと考えられる。換言すれば、ウマの伝染性貧血症は続発性の自己免疫性溶血性貧血症に属する疾患であると考えられ、ウイルスの増殖に伴って網内系と共に、主としてリンパ細胞系に何らかの変調が起り、赤血球自己抗体 (主として IgM) が産生され、このような物質の働きによって、マクロファージは、いわば赤血球に対する自己と非自己の識別能を乱され、自らの赤血

球を貪食破壊することによって、貧血とジデロチーテン出現に重要な役割を演ずるものと考えられる。

文 献

- 1) MILLER, G., FIRTH, F. W., SWISHER, S. N. and YOUNG, L. E., 1957: Amer. J. Dis. Child., 93, 35.
- 2) LEWIS, R. M., HENRY, W. B., THORNTON, G. W. and GILMORE, C. E., 1963: Sci. Proc. Am. J. Vet. Med. Assoc., 1, 140.
- 3) LEWIS, R. M., SCHWARTZ, R. S. and GILMORE, C. E., 1965: Ann. N.Y. Acad. Sci., 124, 178.
- 4) SAISON, R., KARSTAD, L. and PRIDHAM, T. J., 1966: Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 30, 151.
- 5) 葛西, 小倉, 館沢, 佐藤, 1931: 中央獣医学会誌, 44, 385.
- 6) 添川, 西, 1949: 馬の伝染性貧血, 上巻, 89, 養賢堂.
- 7) 大木, 1967: 化学と生物, 5, 145.
- 8) 大木, 三浦, 1968: 日獣誌, 30, 学会号, 159.
- 9) 大木, 三浦, 1968: 馬伝染性貧血に関する研究報告, 3, 48, 家畜誌.
- 10) 大木, 1969: 獣医産新報, No. 491, 328.
- 11) 山極, 1952: 日獣誌, 14, 学会号, 523.
- 12) 大島, 1954: 日獣誌, 16, 学会号, 67.
- 13) LEWIS, S. M., DACIE, J. V. and SZUR, L., 1960: J. Haematol., 6, 154.
- 14) DACIE, J. V., 1965: Ann. N. Y. Acad. Sci., 124, 415.
- 15) EVANS, R. S., BINGHAM, M. and TURNER, E., 1965: Ann. N. Y. Acad. Sci., 124, 422.
- 16) FUDENBERG, H. H. and KUNKEL, H. G., 1957: J. Exp. Med., 106, 689.
- 17) DACIE, J. V., 1963: Clinical Aspects of Immunology (GELL, P. G. H. and COOMAS, R. R. A., ed.), 654-676, Blackwell Scientific Publ.

岩崎洋治 (千葉大・医・第二外科): ウマの伝染性貧血症のウイルスとウマ以外の動物の赤血球の間(凝集反応を示す動物の)に共通抗原があると考えらる。

答: 本症ウイルスと異種動物赤血球との共通抗原性はこれまで報告されていない。本症においては、発熱と共に、モルモット、ウサギ、ヒツジ、ニワトリおよびヒトその他諸種の異種動物赤血球に対して、それぞれ特異的な凝集素 (IgM) が一過的に増加してくるが、このような異種血球凝集素は健康馬血清中にも、それぞれ少量存在しており、従って健康時に、もともと存在している諸種の異種血球に対するリンパ細胞系系のクローンが、ウイルスによる非特異的刺激によって増加し、その程度に応じて、血清中の諸種凝集素が増加するものと考えられ、ウイルスが赤血球と共通抗原を有するものとは考え難い。

紺田 進 (北野病院): 感染ウマ血清中に証明された抗体のうち、どの抗体が貧血抗体の主役を演じているか。

答: ウマの赤血球に特異的な温式型の凝集素 (IgM) が貧血の主役を演ずるものと考えられる。本凝集素は溶血作用を示さないが、流血中で自己の赤血球に結合し (生体内では抗原としての赤血球が過剰に存在するため、結合しても凝集反応は起り難い)、直接抗グロブリン試験 (クームステスト) を陽性ならしめる原因ともなる。このような温式凝集素感作赤血球は主として肝、脾臓に鬱血停滞し、そのオプソニンの作用により、あるいはまた変性して、最終的にはマクロファージないし網内系細胞に貪食処理されるものと考えられる。

会員の皆様へのお知らせ

1. 昨年のシンポジウムの際に皆様におはかりし、その後、運営委員全員の御賛同により、本誌の活版印刷は今号をもって打ち切り、次号よりは講演者の原稿の写真製版に体裁を改め、予講集として発行します。活版印刷には多くの長所がありますが、費用がかさむこと、編集に労力を要すること、発行が遅れることなどが難点で、これらの点を克服するために、今回の変更に踏み切りました。第4号は、表紙は従来の体裁とし、約100ページのものを、シンポジウムまでに作成いたします。

2. 上記の変更にともない、第3期まで実施してきました年会費制を、今年10月限りで廃止します。今後の運営費用（主として通信連絡費）には、予講集の泥上げ代金による最低限度の利潤を当てたいと思いますので、購入に御協力下さい。また、今号も少し余分に作ってありますので、関係学会や御知り合いの方々への頒布に御協力下さい。なお、第4期会費をすでに御納入の方には、返金いたしますので、今年中に届かないようなことがありましたら事務局へ御申越下さい。

3. すでに御承知の方もあるかと存じますが、近く「日本免疫学会」が設立され、11月29日に「免疫化学—免疫生物学シンポジウム」会場で発足の会が開かれる予定です。この学会は「補体」「免疫化学」「免疫生物学」の3研究会を単に統合したものではなく、一応独立的に新しい組織として作られることになっていて、今後の各研究会の活動や新学会との関連については各研究会の自主性にまかされています。当研究会は元来、学会への発展を目指して結成されたものであり、この時点で発展的に解消するのも一案ですが、新しい学会の事業内容なども未だ決定していませんので、いまだちに解消するのも早計かと思われます。他の研究会ともよく連絡の上、新学会の発展を見守りながら、当分は独自の活動を続ける必要があると考えられます。これらの点につきまして、11月のシンポジウムの際に皆様の御意見をお聞かせいただきたく存じていますが、それまでも討議の資料として建設的な御意見を御寄せ下さることを希望します。

4. 現在、会員は約500名ですが、第2期・3期の会費未納者は延250名に達しています。今号は第3期会費納入者にお送りしました。未納の方は是非とも納入下さって、今号をお受け取り下さるよう御願います。

1970年9月20日

免疫生物学研究会事務局（文責・村松）

免疫生物学シンポジウム

第 3 卷

昭和45年10月1日発行

編集
発行

免疫生物学研究会

事務局 京都市左京区北白川迫分町(〒606)
京都大学理学部動物学教室内

(代表, 村松 繁)

電話 京都 (075) 771-8 1 1 1

(内線 3296)

振替口座 京都 1 5 3 5 0

(三菱銀行出町支店預付)

印刷所 山代印刷株式会社
京都市上京区寺之内通小川西入

第3回免疫生物学会
シンポジウム講演要旨

1969. 11. 18-19. 大阪

免疫生物学会

1. 複合ホヤの“allogeneic recognition”

渡辺 浩，田中邦男*（東教大・理・生物）

向井秀夫（群大・教育・生物）

（＊講演者）

原索動物門 — 尾索綱 — ホヤ類に属するキクイタボヤ (Botryllus primigenus)，イタボヤ (Botrylloides violaceum)，コバンイタボヤ (Symplegma reptans)，メタンドロカルパ (Metandrocarpa taylori)（以上側性ホヤ目），シロウスボヤ (Didemnum moseleyi)，ヘンゲボヤ (Polycitor proliferus)，マメボヤ (Perophora orientalis)（以上内性ホヤ目）は，群体を形成し，いわゆる複合ホヤとよばれる類に属しており，海岸の岩礁地帯の干潮上下の岩や，海藻ときには他動物に付着して棲息している。

群体は，1幼生が変態過程をへて単一の個虫となり，後はひきつづき無性生殖により増殖した各個虫が，独立せずに共同の外皮に包まれていることにより形成される。さらに上記のホヤのうち，シロウスボヤとヘンゲボヤを除いては，群体内の各個虫は血管で結合されて，共通の血管系が存在する。

自然より採集したこれらのホヤの群体を，それぞれ数個の個虫を含んだ群体片に切断して，ガラス板に付着させ飼育すると，増殖させることができる。したがって同一遺伝子を持つ群体を多数作ることができる。また同一群体より分けた群体は，再び切断して切断面 (Cut surface) どうしを合せるか，近接しておいたとき群体の成長により両者の成長端 (growing edge) が接すると癒合して，一つの群体になる (fusion)。しかし起原の異なる群体間では多くの場合癒合しない (non-fusion)。

われわれは上記の複合ホヤを用いて，群体の癒合に関する特異性 (fusibility) について調べた結果，“allogeneic recognition”が存在し，種によりその様式が異なっていることがわかった。

キクイタボヤ：個虫の大きさ約1～2mm，群体の厚さ約1～2mmで群体内の個虫はすべて血管系で連結し，群体の周縁部にはアンブルと呼ばれる血管の盲管端が配列している。アンブルは伸長し，その基部に“vascular bud”を生じ，群体は成長して広がる。無性生殖としては，このほか

に、個虫の囲膵腔側壁からも "rud" を生じ、群体内の個虫の密度も高くなる。自然より得たキクイタボヤ群体間で "fusibility" を調べると、"growing edge"、人為的な "cut surface" のいずれの場合の接触時にも "fusion" の組み合わせは少なく、多くの組み合わせでは "non-fusion" で、接触部域は特異的な反応を生じて脱落する (rejection)。

イタボヤ： キクイタボヤと同じボトリルス科に属し、形態、無性生殖の方法とも類似している。"fusibility" は同一群体より分断して増殖した群体間では "growing edge" の場合でも "cut surface" の場合でも癒合するが、自然から採集した群体間ではキクイタボヤと同様に多くの場合癒合しない。しかし "non-fusion" のとき "cut surface" による実験では "rejection" が生じるが、"growing edge" による実験では、接触したアンプルは互いに強く押し合う形となり、"fusion" も "rejection" も生じない。

コバンイタボヤ： ボトリルス科と近縁のステイエラ科に属し、形態は前記の二種と比較的似ているが、"vascular bud" は作られない。"fusibility" はキクイタボヤ同様 "fusion"、"rejection" を生ずる。

メタンドロカルパ： ステイエラ科に属し、各個虫の大きさは約4～5mmに達する。無性芽は上記3種と同様、囲膵腔壁のふくらみによって作られる。各個虫間は1～2本の共逆血管によって連絡しているが、この複合ボヤは、むしろ単体ボヤと複合ボヤとの中間型に属する。アンプル同志の "fusion" は決して行なわれることなく、また、同じクローンに属する個虫同志が接触すると、皮囊の癒合は認められるが、初期の無性芽はしばしば退化吸収される。一方、異なったクローンに属する個虫間では、皮囊の癒合すら起らない。したがって、一方の個虫、あるいは血管の上を他方のそれが伸長するようになる。

シロウスボヤ： 内性ホヤ目、ディデムニ科に属し、前記の4種とは異なった目に属す。無性生殖の方法、形態も異なる。群体内の個虫はアンプル様突起を持つが、個虫間を連結する血管系はない。各個虫は皮囊の中に独立して存在しているが、テスト細胞は皮囊中に共通に存在している。群体の周縁部には、周縁部の個虫のアンプル様突起が並んでいる。"fusibility" に関してはキクイタボヤと類似し、"fusion" と "rejection" が "growing edge"、"cut surface" の両実験に認められる。

ヘンゲボヤ： ポリキトール科に属し、群体は厚さ6mmに達し、個虫も約4mmに達する。このホヤにも、個虫間を連結する血管系はない。この種では、今までの実験結果では、自然より採集したどの群体間でも "growing edge" による接触では "non-fusion" であり、"cut surface" による接触では "fusion" であった。

マメボヤ： アスキディア科に属し，群体は共通血管系を持つが，その形状は上述の6種のホヤと異なっている。キクイタボヤ，イタボヤ，コバンイタボヤでは，群体内の個虫が網目状に連結し，全体が皮囊にうずまった形状を示すのに対し，マメボヤでは一本のあるいは枝分れした，血管（匍匐芽茎：stolon）に，それから出芽した個虫が付着した形状を呈する。この血管（匍匐芽茎）はうすい皮囊に包まれているだけで，また，分岐しているが決して網目状には連結していない。このことからわかるように，同一群体でも“growing edge”の癒合は認められず，“fusibility”は“non-fusion”である。しかし“cut surface”実験では自然から得た群体間でもすべて“fusion”を示した。

以上の結果をまとめると表 1.の通りであるが群体の“fusibility”と遺伝との関係についてキクイタボヤで調べると次の通りである。すなわち，自然より採集した“non-fusion”の関係にある二群体から有性生殖により多数のF₁，F₂を得て，それらの群体間で“fusibility”の実験を行なった。その結果，現在表 2.の仮説を設けている。

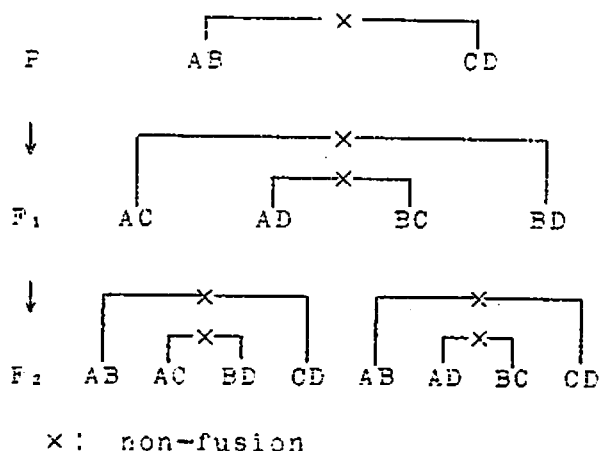
また，キクイタボヤに見られる“rejection”について，電子顕微鏡による観察や，2，3の実験から，その機構の一端について論議したい。

表 1.

Species	Contact between	
	growing edges	cut surfaces
<u>Botryllus</u>	fusion	fusion
	non-fusion(rejection)	non-fusion(rejection)
<u>Botrylloides</u>	fusion	fusion
	non-fusion	non-fusion(rejection)
<u>Symplegma</u>	fusion	fusion
	non-fusion(rejection)	non-fusion(rejection)
<u>Metandrocarpa</u>	non-fusion(rejection*)	
	non-fusion	
<u>Didemnum</u>	fusion	fusion
	non-fusion(rejection)	non-fusion(rejection)
<u>Polycitor</u>	non-fusion	fusion
<u>Perophora</u>	non-fusion	fusion
Interspecific pairing of the 1st 3 species	non-fusion	non-fusion

表 2.

- (1) 自然における各群体は、適合性を支配している遺伝子についてだけいえば、その遺伝子型がヘテロの個体 (heterozygotic) である。
- (2) その遺伝子は、高等植物の自家不和合を支配している S-遺伝子に似たような対立遺伝子 F の系列によって表わされる。



- (3) 少なくとも一つの遺伝子を共通に含んでいる群体どうしでは、互いに適合することができる。

2. 昆虫の寄生卵に対する非特異的細胞性防御反応

北 野 日出男 (東学大・教育・生物)

昆虫はその体腔内に侵入した可視的な異物に対し、遊走性血球による被包化という型でその生体防御機能を発現する。たとえば、ヤドリバチの1種アオムシコマニバチ *Apanteles glomeratus* を、通常の宿主 (モンシロチョウ *Pieris rapae crucivora*) 以外のよそもの宿主、すなわち、アゲハ、ヨトウガ、またはカイコガなどの幼虫に産卵させると、ハチ卵はこれら幼虫の血球によって、2〜3日以内にとりかこまれて被包化される。一方、モンシロチョウ幼虫の体腔内に、よそものの寄生体や熱処理またはシアンガスで殺したコマニバチ卵、活性炭末、シリカゲル粒を注入すると、これらはアオムシの血球によって被包化される。著者は異物に対するこの反応が血球による非特異的な反応であることから、“非特異的細胞性防御反応”(以下防御反応と略記する)と呼んだ。ここで問題としたいことは、アオムシは“自己”にとって本来異物であるコマニバチ卵や幼虫に対し、なぜ、その生体防御反応を発現できないのだろうかということである。この問題に対し、Salt (1965, 1966) や Lewis and Vinson (1968) らは、それぞれ別種のヤドリバチを使ってではあるが、正常なヤドリバチ-宿主関係にあっては、ヤドリバチ卵および幼虫はその体表面に宿主が有するものと同質の抗原性物質を有するために、宿主の防

御反応をうけないのだと考えている。

一方、著者はアオムシコマユバチとモンシロチョウ幼虫を用いて次のような事実を知った。ハチの側輸卵管および輸卵管肥大部（貯卵のう）内にある成熟未分割卵には、すでに、宿主の防御反応を免れることのできる特性があること、そして、この特性はこれらの卵を被覆しているカルボキシル基を含む酸性粘液多糖類およびたん白質のcoatingをtrypsin, hyaluronidaseで処理しても失なわれないが、このcoatingの化学的性質を変化させることなく殺したハチ卵、すなわち、シアンやアザイドガスまたは -15°C で10日間低温処理したハチの貯卵のう内卵では失なわれることがわかった。ハチの幼虫については、その体表を被覆する漿膜細胞を機械的に剝離した場合には、幼虫そのものが生きていても、宿主の防御反応をうけることを観察し、また、この漿膜細胞に由来し、宿主の体腔内に浮遊する“巨細胞”を、シアンガスで処理して、それを宿主体腔内に注入した場合には、これらの“巨細胞”も宿主の防御反応を被ることを知った。

以上のような実験結果から、著者はこのハチの卵または幼虫が宿主の防御反応を免れている要因(encapsulation-inhibiting factor)は、生きている卵、幼虫の体表を被覆する漿膜細胞および胚の頭端と尾端の漿膜細胞に由来する“巨細胞”が、能動的に分泌するなんらかの物質にあり、この物質がハチの各発育段階を通じて継続的に分泌され、それが、宿主特異的に、血球の異物に対する接着能力を抑制しているのではなかろうかと考えている。この意味において、宿主体内に散在する“巨細胞”の生物学的意義は大きい。すなわち、ハチの幼虫は多数の“巨細胞”を宿主体内に散在させることにより、宿主血球の異物に対する感受性を低下せしめていると解釈することが出来る。

3. 重層遠心分離法によるマクロファージの分離と 分離マクロファージの異種赤血球処理

木 下 喜 博 （大阪市大・医・生理）

Fishman^①, Friedman et al.^②, Askonas et al.^③, によれば、マクロファージ（以下MPと略）は抗原をとりこんだ後、部分的に分解、修飾し、免疫原性を高め、その抗原情報を抗体産生母細胞に伝授するらしい。しかし、その化学的性状や伝達方法については未だ確定し

ていない。しかしながら Perkins et al.⁽⁴⁾ はヒツジ赤血球（以下SRBCと略）に対するマウスの抗体産生系にMPの介在することは、hemagglutinin titerの低下をもたらし、MPはSRBCの免疫原性がなくなるまで作用すると推定して、抗体産生母細胞とMPとの共同作用を否定している。又、Moore et al.⁽⁵⁾ はウサギリンパ節細胞のうち、ガラス面粘着細胞（MP）が非粘着性のリンパ球の抗ウマフェリチン抗体の産生を抑制することを見出し、Perkins et al.の解釈に賛同している。一方、Argyris⁽⁶⁾ はSRBCを貪食したMPを正常、同種同系動物に投与することにより、抗体産生を誘導できることから、Gallily et al.⁽⁷⁾ は Shigella 抗原とともにインキュベートしたMPがsublethalのX線照射を受けたマウスに抗 Shigella 反応をおこしうることから、又、Mosier⁽⁸⁾ はマウス脾細胞の抗SRBC抗体産生に際し、ガラス面粘着細胞（MP）と非粘着細胞（リンパ球）との共同作用の必要性を発見したことから、MPの免疫原性伝達説を肯定している。

上記の如く、抗体産生系にMPがどのように関与するかという問題で根本的な対立がみられるが、なにゆえ、全く相反する結果が生じたかを慎重に検討せねばならない。Argyris⁽⁶⁾ は用いた抗原の違いを提示しているが、演者は上記の研究に使用されたMPが、その採集母組織、分離法、分離純度、等で一定でないことを指摘したい。かかる状態ではMPの機能に関する統一見解を与えることが困難である。我々は⁽⁹⁾、特定細胞の機能を検討するとき、その種の細胞をできる限り温和な方法で、純度高く分離し、これを試料として研究すべきことを提唱してきたが、MPの機能追究にさいしても、同様のことがいえるのではないかと思われる。

抗体産生機構へのMPの関与を研究目的とするのであるから、抗原に対応する領域リンパ組織からMPを分離するのが理想であるが、それらにおいてはMPの構成率が小さく（1%以下）⁽⁴⁾、MPを純粋、かつ、多量に分離するのは困難である。そこで、刺激剤の腹腔内投与により、MPの構成率を、さらに高めた腹腔浸出細胞（非刺激時のMPの構成率は10～20%、刺激後30%以上となる。）を分離用試料とした。腹腔浸出細胞よりMPを分離するには、次の2通りの方法が考えられる。①細胞間に異物表面への粘着能に差があり、これを利用する（粘着法）。②構成細胞の細胞比重の差に基づく（細胞比重差法）。

浸出液中には、MPの他に主としてリンパ球、多形核白血球（以下PMNと略）が混在している。PMNはMPと同じく、貪食能を保持しているが、MPと異なる点は、免疫原性が消失するまで、抗原を分解することであるといわれている⁽¹⁰⁾。MPの抗原情報伝達が研究の焦点となっているから、分離したMP分画にPMNの混在は許されない。MPのみならず、PMNにも異物面への粘着性があるから、粘着法ではMP分画へのPMNの混在はさけ難い。Fitzgeorge et al.⁽¹¹⁾ は、

10日以上培養することにより、PMNの細胞死を招き、その後、培養瓶の底に粘着する細胞はほとんどMFからなると報告しているが、長期間のin vitro 培養で分離したMFが生体内にあるMFと機能的に同一かどうか疑わしい。

最近、演者ら^⑫はMFの細胞比重の幅が極めて広く、1.035～1.070であることを明らかにしたが、PMNのそれは1.065～1.070であり、リンパ球では1.060～1.075であるから、比重差法を用いるとMFの純粋分離が可能である。すなわち、表1および図1のように、比重1.055の分離溶液を用いた重層遠心分離法^{⑨⑬⑭}により、1.055より小さい細胞比重を示すMFを純粋に分離できる。

分離されたMFは同種同系動物の非働化血漿を10%含有する磷酸緩衝食塩水中で、SRBCを偽足によりとりこんだり、細胞表面に吸着後(rosetteの形式)、SRBCの内容を吸引するなどの活潑なerythrophagocytosisを示し、分離操作による機能障害の少いことを推定させた。演者は、さらに、貪食されたSRBCの中の酸素ヘモグロビンがMF内でどのように変化するかを次の方法で検討し、興味ある知見を得た。すなわち、SRBCを貪食したMFを経時的に集め、そのホモジネートの上清の分光吸収曲線を解析する。

今後、此の分画を用いて、MFの抗体産生始動に対する影響を追求し、確定的な結論を出したい。なお、細胞比重が1.055より大きくて重いMFをPMNと分離することは困難であるが、このような重いMFが軽いMFと機能的に差があるか将来の問題である。

文 献

- ① Fishman, M. : J. Exp. Med., 114, 837, 1961.
- ② Friedman, H.P., Stavitsky, A.B. & Solomon, J.M. : Science, 149, 1106, 1965.
- ③ Askonas, B.A. & Rhodes, J.M. : Nature, 205, 470, 1965.
- ④ Perkins, E.H. & Makinodan, T. : J. Immunol., 94, 765, 1965.
- ⑤ Moore, R.D. & Schoenberg, M.D. : Nature, 219, 297, 1968.
- ⑥ Argyris, E.F. : J. Immunol., 99, 744, 1967.
- ⑦ Gallily, R. & Feldman, M. : Immunology, 12, 197, 1967.
- ⑧ Mosier, D.E. : Science, 158, 1573, 1967.
- ⑨ 木村英一, 木下喜博 : 免疫学・アレルギー学実験法, 細胞レベルにおける分離法と検出法. 文光堂, 東京(印刷中).

- ⑩ Cohn, Z.A. : Nature, 196, 1066, 1962.
- ⑪ Fitzgeorge, R.B., Solotorovsky, M. & Smith, H. : Brit. J. Exp. Path., 48, 522, 1967
- ⑫ 木村英一, 木下啓博 : 医化学実験法講座, 臨床化学, 材料採取法, 中山書店, 東京, 印刷中.
- ⑬ Kimura, E. : Jap. J. Physiol., 3, 25, 1952.

表 1. 腹腔滲出細胞よりマクロファージの分離: 操作過程

動物腹腔内へ, 無菌的処理したグリーゲン溶液(刺激剤)の注入。

↓
48時間後, 開腹。

↓
ヘパリンと抗生物質含有の等張液で腹腔を洗滌し, 駒込ピペットで腹腔液を採取し, それを試験管へ移す。

↓
ピペットで攪拌, 混和。

↓
2枚の局方ガーゼで濾過。

↓
濾液を1,000 r.p.m. (160g) 20分間, 分離。

↓
上 清

↓
除 去

↓
沈 渣

↓
沈渣の上部(黄白色部, buffy coat)を採取し, 3倍容の等張液に浮遊。

↓
上と他の分離管のbuffy coatより得た細胞浮遊液を1本の分離管に統合

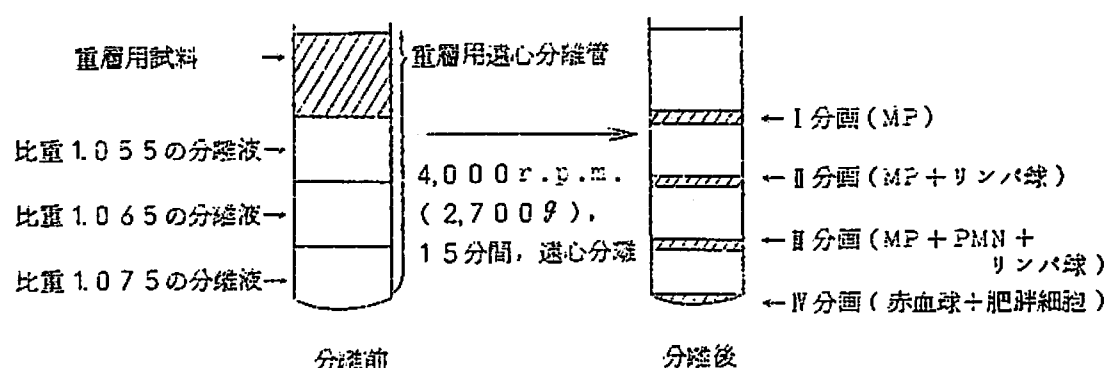
↓
2,000 r.p.m. (650g) 1.5分間, 分離。

↓
沈渣のbuffy coat部を採集し, 5倍容の等張液を加える。(電解用試料)

↓
重層遠心分離(図2参照)

↓
図2のI分画は純粋なマクロファージの分画である。

図 1. 重層遠心分離法によるマクロファージの純粋分離



4. 食細胞，血液細胞と抗原抗体補体結合物

関 根 暉 彬 (国立がんセンター)

吉 田 考 人 (愛知県がんセンター)

西 岡 久寿弥 (国立がんセンター)

抗原が生体内に入ったとき、その抗原に対応する抗体が生体に存在する場合はその抗原はすみやかに流血中より消失することは一般によく観察される。又その抗原が不溶性物質の場合は貪食能を有する細胞、マクロファージ、多形核白血球等に抗原の集積が見られる事実も多く報告されている。一方、*in vitro* において抗原抗体結合物に補体の第3成分 (C3) まで結合すると IA (immune adherence) receptor を有する細胞と特異的に凝集をおこす、更に C3 の量が増すと被貪食能が非常に増強する。この貪食能を有する細胞、マクロファージ、多形核白血球には非常に多くの IA receptor が検出される。これらのことから有型抗原の流血中よりの消失には IA 現象が関与しているであろうことは想像にかたくない。IA receptor を有する細胞としては、造血系の赤血球、非造血系の血小板および各種動物の白血球などが知られている。一方、マクロファージ、多形核白血球等には IgG と結合する部位が存在する。この部位は、たん白質分解酵素によって分解されず、IgM とは反応しない。EA IgG とは補体の関与なしに反応して IAH と同様な像を呈するが、この反応は IgG によって阻害をうける。IA receptor は

蛋白分解酵素により失活し、IgGでもIgMでも補体が結合すれば反応し、この反応はIgGでは阻害をうけない。このようなことから両者はまったく異なるものである。我々はEA IgMC4,3を用いて色々な血液細胞のIA receptorを検索した。ヒト赤血球の中に、その約50%程度はまったくEA IgMC4,3と反応しないが、多くの赤血球は1につきEAC4,3 1と又は2と反応する。又健康な日本人約1,000名についてEAC4,3を減量する方法でIA receptorを測定したが、1名をのぞいて全員がほぼ同じ値を示した。一方、末梢血中の顆粒球では50%以上が6以上のEA IgMC4,3と結合し、立体的に可能なかぎり結合しているものも多い。白血球に対して対照として用いたEA IgM, EA IgMC1,4,2などとはまったく反応しなかった。すなわち白血球には多くのIA receptorが存在する。ヒトの腹腔及び胸腔よりえられたマクロファージも非常によくEA IgMC4,3と反応する。ヒトの胎児よりえられた有核赤血球も成人の赤血球と同じ反応性を示した。EAC4,3にトリプシンあるいはプロナーゼを作用させてIAには反応するが他の補体成分を加えても溶血しない複合体がえられた。又C4及びC3をラベルして行った実験から、EAC4,3をプロナーゼで処理するとC4が血球上から遊離すると同時にC3分子も一部失なわれることがわかった。したがって結合したC3分子の一部のみがIAに必要なが、溶血反応にはすべてが必要なものと考え。C3部位とIA receptorとの反応はイオン強度(0.001~0.3) pH(5.0~10.0)の影響をほとんどうけず、0°Cでも反応する。IAの反応を特異的に阻害する物質は見つかっていない。生体内におけるImmune adherenceの役割はあまり解明されていないが、更に研究を進めたい。

この研究の一部は愛知ガンセンター、今井邦元博士との共同研究によるものである。

5. マウス腹腔内のマクロファージ — マクロ ファージ, マクロファージ — リンパ細胞 間のブリッジ形成反応と抗体産生

横 室 公 三 , 木 村 義 民 (日医大・微生物・免疫)

生体内における細胞間の相互作用は種々重要な問題を含んでいる。マクロファージの関連細胞への情報伝達は、生体防禦機構 — 自然抵抗性や免疫 — の解明のための重要な鍵となるのみならず、この観点からすればきわめて重要な生物学的現象と考えられる。

私たちは、マウスの腹腔内マクロファージのマクロファージ相互、あるいはリンパ節細胞間の関連を形態学的に観察すると共に、その結果を細胞の免疫学的機能の変化を示標として検討した。

マウスの腹腔内にデンプン、あるいはヒツジ赤血球浮遊液を注入刺激すると、腹腔細胞間のBridge formation, Islet formation が対照に比し時間的にも、量的にも著しく亢進すること、細胞間のブリッジ内に原形質流動が認められること、この原形質流動に伴って、 ^3H -ウリジン標識物質が一方のマクロファージからもう一方のマクロファージ、あるいはリンパ節細胞に移入されること、食作用をほとんど抑制する濃度のハイドロコルチゾン $3 \times 10^{-3} \text{ mg/ml}$ 注入30分後にもブリッジの新生するのが認められるが、2,4-ジニトロフェノール、フ化ソーダでは両者いづれに対しても、弱い抑制力を示すのみで顕著な差を認めないことなどを発表してきた。

今回、マクロファージ間にはいわゆるブリッジ以外に、検鏡方法を変えることによって明らかな網状構造の存在することを認めた。このものはマクロファージ播種後60分ですでにかなり形成され、その後次第に密になって行くようである。リンパ節細胞のあるものは、リンパ節細胞自身の形成したと思われるブリッジによってこの網状構造と連絡している。

以上の細胞相互の接触付着と細胞の機能変化との関連を解明する目的で次のよう実験を行なった。

マウス ($\text{C}_{57}\text{H}/\text{He}$, C_{57}BL) の腹腔マクロファージに *in vitro* でヒツジ赤血球を吞食させてからガラス面に播種し、充分洗滌して抗原及び付着しない細胞を除去する。この培養マクロファージに同系のリンパ節細胞を添加し5時間培養後リンパ節細胞のみを集めて、 ^{60}Co 照射マウスの尾静脈に骨髓細胞と共に注入した。経日的に脾の抗体産生細胞をJerneの直接法によって測定した所、対照に比して、Sercarz のいわゆる 19S Memory cell が多数生じていることを認めた。現在、細胞間の接触付着と情報伝達の機作に関して、さらに詳細に追求中である。

6. マクロファージによる抗体産生

三 橋 進 (群大・医・微生)

実験的サルモネラ感染症としては、マウス対 S. enteritidis の組みあわせが賞用されている。マウスを S. enteritidis の生菌で免疫するか、強毒菌に感染せしめた後カナマイシン治療を施すと、強力な免疫が成立し、強毒菌の 1,000 MLD の静注攻撃に 100% 耐えるようになる。

すでに小林(六造)らの指摘したごとく、このマウスの血清中に、感染防御に関係すると思われる抗体は証明できない。このマウスのマクロファージは *in vitro* において、外部からの抗体の関与なしに食菌した強毒菌を細胞内で消化する事実が発見され、この現象はマクロファージの細胞免疫によると結論した。この細胞免疫は全身の恐らく間葉系由来のマクロファージにみられ、この細胞には生菌免疫にのみみられる抗体が証明され、免疫マクロファージから抽出した抗体は補体とリゾチームの関与で菌を溶解する。この抗体は超遠心的にはマクログロブリンに属する。

このようなマクロファージの示す免疫現象は、結核、ブルセラ症、野兔病などでも知られ、マクロファージの免疫への関与を強く示唆するものと考えられる。

その後、われわれの研究室では、RNA 性の免疫伝達因子があることが発見され、実験的サルモネラ症の他に、サルモネラ鞭毛、赤血球、ジフテリア毒素を抗原とした場合にも、免疫伝達に有効な RNA が証明された。一方、マクロファージは培養によって、ガラス壁にはりつき、その特有な核、貪食能によって他の細胞から区別できると共に、培養管壁をくりかえし培養液で洗うことによって、混在する他の細胞をほとんど完全に除去することができる利点がある。このような純粋な細胞集団と、免疫 RNA を用うることによって、特異的に抗原を膠着する (immunocytic adhesion) マクロファージを検出することができた。感染免疫実験、*in vivo* における RNA による免疫賦与、*in vitro* における実験から、ある種のマクロファージは、抗体産生系の一員であることを強く示唆するものと思われる。

7. 抗体産生とマクロファージ

渡辺 慶一， 増淵 誠夫， 大谷 武彦，
鈴木 裕 （慶応大・医・病理）

マクロファージ（Mφ）による抗原の貪食は，抗体産生に必要不可欠の現象であり，抗原がMφに取り込まれることなく直接リンパ球に触れると，むしろimmunoparalysisを招く結果になるということは，誰もが一致して認める所である。然し，Mφによる抗原貪食から，形質細胞系による抗体産生にいたるまでの段階については，諸論あって未だ一致した定説を見ていない。また，Mφ内における細胞抗体の証明，あるいはその抗体産生についても，論は定まっていないうである。

我々は可溶性，あるいは不溶性抗原をもって，動物を免疫し，抗原接種後，局所および遠隔リンパ節内に於ける抗原の局在，更に抗体の局在をも，免疫組織化学的手技ならびにオートラジオグラフィによって経時的に検索することにより，抗体産生にいたる一連の免疫現象におけるMφの動態を観察した。

材料および方法： 抗原としては，(1)Horseradish Peroxidase(HrP)（可溶性酵素蛋白），および(2) ^3H - ϕ A phages(^3H -thymidine をvirus DNAに取り込ませたもの)を用い，Wistar ラット（200～250g）の各後足蹠皮下に，(1)の場合1mg/0.1mlのHrPに当量のComplete Freund's adjuvantを加えたものとして，また(2)の場合は，phage数が $2\sim 5 \times 10^{11}$ /0.2ml（放射能は2～5 μC ）となるようにして接種した。十分な血清抗体価をえるためには，1次抗原刺激後21日目に1次刺激とほぼ同量の抗原を，それぞれ前足皮下に接種した。

(1)の場合（HrP 抗原），抗原接種後6，24，48時間，4，7，10，14，21日，さらに2次抗原刺激後，7，14，21日目に局所リンパ節の膝窩リンパ節（二次刺激後は腋窩リンパ節）の他，鼠蹊，腸間膜，頸部リンパ節，脾，胸腺を採取し，冷却した4%パラホルムアルデヒド/0.1M，磷酸緩衝液（pH 7.4）中で固定，0.88M gum-sucrose 溶液で水洗した後，8 μ の凍結切片とした。HrP 抗原の組織内局在証明には，Karnovskyらによるperoxidaseの組織化学的証明法を用いた。抗体の局在は，"酵素抗原とその抗体のcomplexは，酵

素作用を保持している”という Uriel らによって明らかにされた原理を応用し、切片を抗原液 (HrP 50 r/mℓ in 0.02 M tris/HCl buffer) 中にインキュベートし、充分余剰の抗原、抗体を洗い落した後、抗原抗体 Complex の peroxidase 活性を、Karnovsky 法で証明することにより観察した。その他、アルカリ・フォスファターゼ (ALP)、酸フォスファターゼ (ACP)、 β -グルクロニダーゼ (β -G) などの lysosomal enzymes の組織化学的証明も同時に行なった。

(2)の場合 (ϕ A phage 抗原)、抗原接種後、(1)の場合と同様に、経時的に局所リンパ節を採取し、固定、水洗後、6 μ の切片について、dipping 法によるオートラジオグラフィーで、抗原の局在を追求した。これらの切片に、それぞれ ALP、 β -G、およびヘマトキシリン・エオシン染色をほどこした。

結果の要略： HrP を抗原としたときも、また ϕ A phage を抗原とした時も、足趾に接種された抗原の大部分は、膝窩リンパ節内髄索、髄洞の M ϕ に貪食されている。経時的に抗原局在を追求しても、ここに用いられたような抗原量では、鼠蹊リンパ節をはじめ、遠隔リンパ節の M ϕ に貪食されている抗原は見当らなかった。

HrP を抗原とした場合、M ϕ に貪食された抗原は、6時間をピークとして、その後は徐々に減っていき、4~7日目には、M ϕ 内に見当らなくなる。(HrP の酵素活性が証明できなくなる)。M ϕ はもともと ACP など lysosomal enzymes の強い活性を示すが、 β -G だけは、抗原刺激前には、ごく弱い活性しか現わず、M ϕ 中の抗原減弱とはちょうど反対に、4~7日と時を経るに従って活性を増していく。また、この時期に現われる抗体産生細胞にも強い β -G 活性が証明され、興味をひく。

HrP に対する抗体を産生する細胞は、早いものでは、48時間後、多くは4日目位から局所リンパ節の髄索に現われるようになり、14日目にその数はピークに達する。この数の変化は、補体結合反応または血球凝集反応で調べた血清抗体価の変動とよく一致する。この抗体産生細胞は、例外なく形質細胞系の細胞であり、M ϕ 中の抗体局在は認められない。しかし、抗原接種から7日目までは、抗原の HrP 自身、M ϕ 中に残っており、この間は本実験で用いられた方法では、M ϕ 中の抗体局在の判定は正確にできない。そこで、ラットをヒト血清アルブミン (HSA) で免疫し、2~6日後の局所リンパ節内の抗体局在を、HSA に peroxidase を conjugate したものを抗原液として用いて検索したが、やはり、M ϕ 中には抗体局在は認められなかった。ただし、HrP の場合も、また HSA の場合も、4日目をピークとして、抗原を取り込んだ M ϕ 周囲に赤血

球が寄り集まっているのが認められた。

このような抗体産生細胞は、Mφによる抗原貪食の認められた局所リンパ節のみに現われ、他の遠隔リンパ節には、皮質、髄索の細網細胞突起にそって強い抗体の吸着が見られたが、抗体産生細胞は見当らなかった。

δA phage を抗原とした場合、前述のように、接種された δA phage のほとんどは、Mφに取り込まれるが、4日目には、髄索壁あるいは、髄索内の細網細胞、および形質細胞系の細胞の核に一致する部分に $^3H-\delta A$ phage にもとづく銀粒子が autoradiography で観察され、Mφ内のそれは著しく減弱している。これは、Mφに取り込まれた phage DNA が、Mφ内で 3H -thymidine レベルまで分解され、それが増殖細胞の DNA 合成に再利用されたとも考えられるが、抗原接種後、大量の cold thymidine を繰り返し注射した場合でも $^3H-\delta A$ phage の局在に変化は認められなかったし、また coating proteins に 3H -leucine を取り込ませた δA phage を抗原として用いた場合も、同じような局在を示した所から、 δA phage 自身（ある程度の変形は受けていると考えられる）が上記の細胞の核内あるいは、核周辺に集まっているものと思われる。このように抗原接種後4日目に髄索内に増殖し、抗原を保持している細胞は、強い A1P 活性を示すのに反し、抗原刺激前または直後の Mφ は全然 A1P 活性を示さない。しかし、4日目には、これらのあるものは、核周囲に弱いながら A1P 活性をもつようになる。また、このような Mφ のあるものには、核分裂を呈するものが認められている。

以上、HrP あるいは、 δA phage を抗原として免疫したラット・リンパ節内の抗原および抗体の局在を追求した結果、同一リンパ節内 Mφ による抗原の貪食が、そこでの抗体産生に必須であること、また Mφ そのものによる抗体産生を示す証拠はえられなかったが、Mφ から抗体産生細胞への transformation は否定しきれないことが示唆された。

8. 遅延型アレルギー感作動物細胞の マクロファージ遊走阻止

橋 本 達一郎 , 綿 貫 まつ子 (予研・結核)

遅延型アレルギーに最も関連をもつ *in vitro* の現象としてとりあげられたいくつかの観察のうち、マクロファージの遊走阻止を指標とする反応はかなりの期待をもって追求された。遅延型アレルギー感作動物からえられた単核細胞と対応抗原の特異的作用の結果、マクロファージに作用する物質が放出されるという観察は、マクロファージが単に反応の *indicator cell* としての利便を提供するという意義にとどまらず、遅延型アレルギーにおけるいくつかの問題点の解明、アレルギー反応におけるマクロファージの役割の理解などにつながるかもしれない。

in vitro の分析手段を欠いていたために、遅延型アレルギーの研究にもっぱら細胞によるアレルギーの *passive transfer* を利用してきたわれわれは、このマクロファージ遊走阻止を指標とする反応をとりあげて、従来の *passive transfer* 実験でえた結果と関連を保ちつつ、この反応の評価を行ない、またこれを用いて遅延型アレルギーに関する若干の問題点の追究を試みた。その結果を以下に総括する。

- (1) 遅延型アレルギー感作動物の組織切片からのマクロファージの遊走は対応抗原で特異的に抑制される。感作動物からの遊走細胞を毛細管につめて管口からのマクロファージの遊走を観察しても同じ結果がみとめられた。
- (2) 遅延型アレルギー受身感作能の強い脾、リンパ節、腹腔由来の細胞群は、いずれも抗原と作用して正常腹腔マクロファージの遊走を阻止する作用をもつ感作細胞を含むことが見出された。この作用はリンパ球に対しては認められず、感作細胞をリンパ球とする可能性について遊走阻止テストと *passive transfer* 法と組み合わせで検討を行った。
- (3) 遅延型アレルギー感作動物由来の細胞は、*in vitro* で抗原との接触によって培養液中にマクロファージ遊走阻止作用をもつ物質を放出することが確認され、かかる作用物質の分離には肉芽腫脾細胞が適切な材料であることが見出された。
- (4) ECG によるモルモット肉芽腫脾細胞とツベルクリン抗原 (T₂P₂D) の組み合わせで、マクロファージ遊走阻止物質の分離、分析を試み、また、この組み合わせで同時に培養液中にえられる皮膚反応惹起物質との関連を追究した。セファデックス・ゲル濾過法による分析の結果ではマク

ロファージ遊走阻止分画は分散し、皮膚反応惹起分画とかならずしも一致していないが、皮膚反応惹起分画はマクロファージ遊走阻止活性を伴っているので、マクロファージ遊走阻止物質はその作用を介して、遅延型反応の惹起におけるマクロファージの役割に連関をもつのではないかと推定される。

9. cell migration 阻止現象の成立と細胞性免疫

秋 山 武 久 (慶応大・医・微生物)

内 山 竹 彦 (")

三 間 孝 (")

目的： 近年開発された cell migration 阻止の現象は、in vitro で遅延型アレルギー反応を観察しうる面白い方法のように思われる。われわれは、遅延型アレルギー反応の成立機序が細胞性免疫のそれと質的に類似しているであろうという予想のもとに、この現象がいくつかの感染症や移植でも観察しうるかどうかを調べてみた。

方法： cell migration 阻止の方法は、前掲の讀者によって詳細に説明されるものと思われるので省略したい。動物にはモルモットの他に、マウス・ラットを使用した。細胞の培養時に添加する抗原としては、ツベルクリン反応検出として O.T. を、細菌感染症の場合にはブイヨン培養液の 100°, 90 min 加熱液の遠沈上清を、トキソプラズマ症の場合には強毒 Rh 株をマウスの腹腔に接種して 4 日目の腹水遠沈上清を音波破碎したものを、移植（異種移植癌）の場合には純培養状に増殖した時期の腹腔内細胞の音波破碎液を使用した。

結果： 1. ツベルクリン反応……モルモットでもマウスでも結核死菌 — Freund アジュバントで感作すると、cell migration (C.M) 阻止が陽性に出るが、その程度はモルモットの方がはるかに強かった。感作動物の少量 (10%) の腹腔細胞に未処置—感作動物に対して、同系、同種、異種の何れでも可 — 動物の腹腔細胞 (90%) を混合して毛細管につめた場合にも C.M. 阻止は陽性となった。感作モルモットの腹腔細胞を培養法によってマクロファージとリンパ球に分離し、それぞれに未処置モルモットの腹腔細胞を混合して培養すると、リンパ球と混合した場合に限って C.M. 阻止が認められた。感作モルモットのリンパ節、脾臓細胞を O.T. 液中で培養した後で得られた遠沈上清の少量を未処置モルモットの腹腔細胞を培養している環境に添加

してもC.M. 阻止がみられた。

2. 感染症……マウスにおける腸炎菌、鼠チフス菌、トキソプラズマなどの感染症のように免疫の主役が細胞性と思われるもの、そうでないもの、たとえば、マウスにおけるチフス菌、大腸菌感染症としてはC.M. の態度が相違する。すなわち、C.M. 阻止は前者群にのみ観察された。不活化ワクチン接種の場合はcomplete Freund アジュバントを添加したかどうかで異なり、食塩水に浮遊して接種した場合には、菌種を問わずに、C.M. 阻止は認められなかったが、アジュバント添加の場合には（トキソプラズマと腸炎菌でのみ調べたが）、C.M. 阻止が観察された。ただし、強毒菌（原虫）攻撃に耐過するような効果と、前処置後のC.M. 阻止の有無とは平行せず、トキソプラズマの死虫にアジュバントを添加して免疫したマウスの腹腔細胞ではC.M. 阻止は陽性であったが、強毒虫攻撃に対する防御能は全く成立していなかった。

マウスと腸炎菌の組合せでは、モルモットのツ反応において観察されたcell freeエキスの添加による未処置細胞のC.M. 阻止と同様の成績がえられた。

3. 移植……C.M. 阻止は生きている細胞を移植した時にのみ認められた。

考察： 以上の現象の観察を通して、細胞性免疫成立のステップを考察してみたい。

10. 移植免疫および遅延型過敏症反応における マクロファージの役割

野 本 亀久雄 （九大・医・細菌）

移植免疫、ツベルクリン型遅延型過敏症を含むいわゆる細胞性免疫において、リンパ球とマクロファージの役割が永く論争的であった。最近、ツベルクリンなどの可溶性抗原に対する遅延型過敏症において、感作リンパ球が抗原と接触した後、migration inhibitory factor (MIF) を産出し、その結果マクロファージが活化され、抗原接種部位に浸潤し、発赤、硬結などの反応をひき起こすことが明らかにされた。一方、移植免疫においては、Gorerが同種移植腫瘍に対する反応を組織学的に分類（1.リンパ球の浸潤を主体とするもの、2.マクロファージ系の細胞の浸潤を主体とするもの、3.移植片周囲の浸出液の貯留を主所見とするもの）して以来、target cell destruction の主体が感作小リンパ球にあるのか、マクロファージにあるのかはなお異論の多いところである。演者らの研究目的はtarget cell destruction

の effector cell を明らかにし、ツベルクリン型反応と移植免疫の相関性を知ることである。

ゴールデンハムスターに発生し、長期にわたって移植継代され、同種移植可能となった lymphoma を抗原として用いた。この腫瘍は、補体存在下で液性抗体に感受性を示さず、悪作リンパ系細胞によっては容易に破壊される性質を有している。この lymphoma で免疫された MHA 系のハムスターのリンパ系細胞には、lymphoma 細胞とともに recipients に接種された際、腹腔浸出細胞＞局所リンパ系細胞＞脾細胞の順で、腫瘍増殖抑制作用がみられた。この場合、effector cell として悪作リンパ球のみで充分なのか、マクロファージの関与を必要とするのかを明らかにするため、胸腺摘出後 X 線を照射し、マクロファージを含めたリンパ系の機能が低下した動物に骨髓移植を行ない、マクロファージの機能のみを正常レベルに回復させた動物を用いて実験を進めた。局所リンパ節細胞を腫瘍細胞と混ぜ、皮下または皮内に移植した場合にも、腫瘍を皮下に移植し、リンパ節細胞を静注した場合にも、recipients 体内のマクロファージの有無に関係なく、リンパ節細胞は腫瘍増殖を抑制した。また正常マクロファージを直接リンパ節細胞＋腫瘍細胞浮遊液に混和し、移植した場合にも、マクロファージの存在は、悪作リンパ節細胞による腫瘍増殖抑制効果を促進しなかった。しかし、腫瘍周辺の発赤、硬結は、recipients の体内にマクロファージが存在する場合にのみ認められた。以上のことから移植免疫の機序を次のように考えている。悪作リンパ球が細胞表面の antibody like receptor で腫瘍細胞と接触し、細胞障害因子を高濃度で与え、target cell destruction を引き起す。一方、同様の因子 (MIF) は浸出液中にも低濃度で放出され、マクロファージの活性を変化させ、遅延型過敏症としての反応を引き起す。この考えにしたがえば、免疫反応の特異性を決定するのは antibody like receptor であり、細胞障害因子は非特異的に働くものであろう。

結核菌で免疫された動物のリンパ系細胞と FPD (結核菌菌体成分) で coat した lymphoma 細胞を正常 recipients に移植し、腫瘍増殖を観察した。Killed H₃₇RV in paraffin で免疫し、living BCG で 2 回 booster した動物のリンパ系細胞のうち、腹腔内浸出細胞には十分な抑制作用が見られなかったが、局所リンパ節細胞には明らかに腫瘍増殖抑制作用が認められた。これらの実験結果は、われわれの提出した target cell destruction の考えを支持するものであろう。

11. マウスの日本脳炎ウイルス感染に及ぼす BCG の作用

大 滝 研 也 (予研・村山分室)

細網内皮系(網内系)あるいはマクロファージ(Mφ)は、その特徴的な機能と生体内における配置と分布から、多くのウイルス感染に積極的なかわりを持つことが想像されるが、とくに発病機転に viremia が主要な位置を占めるとみなされる日本脳炎、小児麻疹などでは、とくに網内系の果たす役割は大きいと考えられる。このことを裏付ける観察結果は、それぞれのウイルスについていくつか報告されている。ここでは網内系、Mφの活動度(activity)の如何によってウイルス感染が大きく影響を受けるのではないかと考え、マウスにBCG、zymosan(Zy)などのいわゆる網内系刺激剤を投与し、網内系細胞の活動度を高めた場合、日本脳炎(日脳)ウイルス感染がどう変るか、変るものであればこれは網内系細胞の性質、性状のいかなる変化にもとづくかを明らかにすることを研究の課題とした。

マウスはd1系を用い、ウイルスは末梢感染性の高い日脳ウイルスJath-160株を選んだ。

生後14日マウスにBCG 1mg(湿重量、生菌数約 3×10^7)をi.v. に接種、Zyは17日と19日目に0.5mgずつ計1mgをi.v. に投与、いずれも生後28日目に雄は $10^{2.3}$ B.L.U.(Baby mouse Lethal Unit)、雌は $10^{1.6}$ B.L.U.の少量をivに接種、その後3週間観察した。死亡率を表示すると次の通りである。

	雄	雌
対 照	13/16	13/15
BCG接種群	6/16	3/15
Zy投与群	8/15	9/16

BCG接種は明らかに日脳ウイルスによる発病死をおさえたが、Zyは作用があってもごくわずかであった。同上処理したマウスの肝の組織所見ではlarge mononuclear cellの繁殖はBCG接種マウスよりZy投与マウスの方が著るしかった。このことからMφの数の多少で発病の抑制の強弱が決るものではないと思われる。以下の実験では刺激剤としてもっぱらBCGを用いた。

つゞく実験で、BCGの効果が発現するためには接種後数日の日数が必要なこと、またこの効果はウイルス接種をi.c. に行なった場合には認められないことが明らかになった。

BCGによって発病がおさえられることから、対照マウスで日脳ウイルス感染後3ないし4日間に認められるviremiaがBCG接種群ではどうかと考え、日を追って血中ウイルスを定量した。対照では12匹中7匹にウイルスがつかまったが、BCG群では10匹中1匹にごく少量のウイルスを認めたにすぎなかった。以上からBCG接種による発病死の減少がviremiaの抑制によるものと考えられる。

viremiaの抑制がBCGのいかなる作用にもとづくか、可能性として抗体、インターフェロンの産生がBCG接種マウスで促進、増強されることがあげられるが、これを確かめるため血中抗体、流血ならびに脾のインターフェロンを測定したが、どちらもBCG接種で高めたり早められたりすることはなかった。

C₃で網内系細胞とウイルスの直接のかかわりあいではBCG接種群でviremiaがおさえられるのではないかという可能性を調べるため、対照とも二群のマウスから腹腔細胞を築め、in vitroにマクロファージを培養し、これに日脳ウイルスを接種してその増殖を追った。結果は次の通りである。

	3	24	48	72 (時間)
対 照-Mφ	$10^{3.7}$ PFU [*] /mℓ	$10^{3.0}$	$10^{2.7}$	$10^{1.8}$
BCG-Mφ	$10^{3.7}$	$10^{1.3}$	$10^{1.8}$	$10^{1.1}$

* Plaque Forming Unit

この結果は、日脳ウイルスの熱不活化が著るしいことを考えると、対照マウスからのMφではかなりの増殖があるが、BCG接種からのものではそれがおさえられることを示すものと考えられる。

考 察

以上の実験結果は日脳ウイルス感染においてその展開に網内系が積極的に関与することを示唆する。これは蛍光抗体を用いて感染初期の増殖部位を追った京極らの観察やその他の実験結果とも符合する。

MacKanness, Youmans その他は、BCG, L.monocytogenes, Salm. typhimurium等の感染によって生体が獲得する種々な細菌に対する抵抗性(acquired cellular resistance)の性質、成立機転を研究しているが(MacKanness ; J.Exp. Med vol 129 No.5 '69, Youmans ; J.Bact. vol 97. No.1 '69), われわれの実験結果はこの抵抗性が少なくともある種のvirusに対しても及ぶことを示している。

ECJによってMφにいかなる変化が生じてウイルスの増殖をおさえるのか今後の課題としたい。この点についてつけ加えると、ECG接種マウスからのMφは位相差やその他の方法による形態学的な観察ではMackness等の記載と同じく、ガラス面に広がりやすく、細胞のorganella, vacuole が少くなり、いわゆるactivateされた状態になっている。おそらくlysosomeもふえているものと思われる。activateされたMφでのウイルス増殖の抑制の機作として、先にしらべた血中抗体、インターフェロンとは別に、Mφに固着した抗体あるいはMφ自身に含まれるインターフェロンが対照マウスのMφより少く生ずるという可能性も否定出来ないが、第3の可能性としてactivateされたMφの異物分解能の増大によって、とりこんだvirus粒子の多くが分解され増殖系にのらないことがあげられるのではないだろうか。これらの可能性をこれから検討して行く考えている。

12. 家畜の自己免疫性貧血症における マクロファージの役割

木 下 与志雄 (家畜衛生試験場)

赤血球に関する自己免疫病が家畜において起こるということは長らく証明されていなかったが、1957年Millerらによって、イヌにおいて、人のそれに類似した自己免疫性溶血性貧血症が自然的に起こり、プラズマ細胞の増殖と網内系による赤血球貪食像を伴う“脾臓性貧血”が死因となることが報告され、最近Lewisら(1963)によって、Coombs test 陽性であるところの本症の存在が確認された。またL.E. 因子の証明されるイヌの全身性紅斑性狼瘡(Lewis, 1965)やPlasmacytosisと過アーグロブリン血症を伴うミンクのアリューション病(Saison, 1966)に於ても赤血球のCoombs test が陽性となることが報告されている。ウマの伝染性貧血症に於ても、古くから自家あるいは同種溶血素の存在が報告(Finzi, 1911, 葛西, 1931)されていたが、否定的な報告もあり、その実在性については確証するに至っていなかった。しかしながら、最近演者ら(1966~1968)によって、諸種の赤血球自己抗体が、本症に於て同定されると共に、Coombs test もまた陽性となることが証明され、それらの免疫グロブリンとしての性状ならびに貧血における役割などについて明らかにされた。

これらの家畜の自己免疫疾患のうち、ウマの伝染性貧血症は、広く間葉系細胞に親和性を有する

ウィルス性疾患であり、現在、このウィルスは、少なくともマクロファージ様細胞を主体とする培養白血球中で増殖することが知られている。本症は臨床的には、回帰熱、貧血、黄疸症、末梢血担鉄細胞 (Siderocytis)、フェリチネミア及び循環障害等を特徴とするが、病理学的には、とくに肝、脾臓及びリンパ節などにおける網内系細胞の腫大増殖、遊走化、及びリンパ胚球、小型リンパ球様細胞の増殖数を特徴とし、急性あるいは亜急性型では、脾、肝臓などにおけるうっ血、出血、マクロファージによる赤血球貪食像ならびに担鉄細胞などが観察され、慢性型では、脾、肝臓などに小型リンパ球の著しい増殖、浸潤像が見られ、ウィルスの増殖に伴って、明らかに間葉系の免疫適格細胞群に異常な病理組織像が認められる貧血症である。これらの所見には、自己免疫性溶血性貧血症その他の自己免疫疾患と多分に類似した点が認められる。

そこで、本症における自己免疫病的性格を明らかにし、その貧血機構に関連して、マクロファージによる自己赤血球の貪食ならびに担鉄細胞出現機序を明らかにすることを目的として、赤血球自己抗体について、種々検討を行なった結果、本症においては、ウィルスの活動化に伴う発熱と共に、殆んど全例 (14頭) について、自己の赤血球に対する病的寒冷凝集素 (IgM)、温式凝集素 (IgM) ならびに Coombs test (IgM 主体、IgG も一部関与) が陽性となり、これらは赤血球自己抗体としての性格を有する免疫グロブリンであることが証明された。次にこれらの赤血球自己抗体のオプソニ的性格を明らかにするために、in vivo でマウスの腹腔内マクロファージ、および in vitro でウマの単球 — マクロファージ — 多核巨細胞系を主体とする培養白血球を使用して、検討を行なった結果、少なくとも温式型自己抗体で吸着感作されたウマ赤血球はマクロファージによる初期貪食能が著しく促進されることが証明され、かつ48時間以降に於ては、これらの赤血球は消化され、担鉄細胞化することが明らかにされた。本症における末梢血担鉄細胞は、このような機序による以外に、発熱とともに主として脾臓細網細胞から遊離されたフェリチン鉄蛋白質を流血中の白血球が二次的に Phagocytosis 或は Pinocytosis によって取りこむことによって生成される (大木ら、1958~1959、山田ら、1959)。いっぽうウシのピロプラズマ症やアナプラズマ症では、病原体が赤血球に直接寄生して、これを破壊溶血せしめ、あるいはまた、マクロファージによって、異物として単純に貪食されて、著しい貧血と内臓血担鉄細胞の生成が起こるものと考えられ、ウマの伝染性貧血症とは、その機序に於て異なった面があるように思われる。

上述の所見から判断して、ウマの伝染性貧血症においては、ウィルスの活動化に伴って、リンパ細網細胞系の機能になんらかの変調を来し、温式凝集素 (IgM) などの自己抗体が産生され、赤血球に吸着される。その結果、赤血球は主として脾、肝臓などの内臓血流中に停滞する。同時に

内臓血中に遊走化した脾，肝臓等の貪食性の網内系細胞あるいはマクロファージによって，このような自己抗体感作赤血球が貪食されるものと考えられる。