

結核免疫に関する研究

第 13 報

腹腔内細胞滲出に関する研究

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

大 溝 和 夫

（受付：昭和32年7月8）

緒 言

動物の腹腔内へ異物を注入すると、腹腔内に細胞滲出が起ることは周知の所であつて、細胞滲出誘発物質としては Mudd¹⁾ (1933年) 以来流動パラフィンが汎く用いられているが¹⁾⁻¹²⁾,¹⁸⁾, その他にも各種の物質があり、大別して (1) 固型物. (例えば、金剛砂¹⁾等), (2) 高級脂肪族化合物. (例えば、流動パラフィン), (3) 蛋白質. (例えば、ブイオン) 等である。それらの物質によつて滲出細胞の組成が異なり、流動パラフィンでは一般に単核の円形細胞を主として滲出せしめ、ブイオンにては多核の細胞の滲出が著明であることは古くから知られている。諸家の実験に於ては大部分の人々が唯

単にこの現象を細胞の採集に利用したに過ぎないが、私はこの現象が動物の一つの生体反応であり、異なつた条件下に於ては、同一物質によつても異なつた細胞反応を示しはしないかと考えた。そこで正常動物と、結核死菌流動パラフィン浮游液 (以下“流パラワク”とする) で感作したツベルクリン反応陽性動物とに細胞滲出誘発物質として、流動パラフィン、流パラワク、生理食塩水、並びに結核死菌生理食塩水浮游液を夫々腹腔内へ注入し、その細胞反応を経時的に比較解析した。又死菌生理食塩水浮游液を注入した場合は滲出細胞の喰菌現象をも併せ観察したので以下その結果を報告する。

実験材料並びに実験方法

(1) 実験材料

- i) 使用動物：体重 450gm 前後の雄性正常海鼠で、ツベルクリン10倍液 0.1 ml を以てする皮内反応の陰性なることを確かめて使用した。
- ii) 感作用結核死菌流動パラフィン浮游液：型の如く Sauton 培地 5 週間培養の人型結核菌 H₂ 株を流動パラフィンと混じ、10mg/ml なる如く調製し、100°C, 30分間加熱殺菌した。
- iii) 腹腔内注入物質：
 - a) 生理的食塩水：0.9%とし、pH 7.0 に修正し、100°C, 30分3回滅菌した。
 - b) 結核菌生理食塩水浮游液：Sauton 培地 5 週

- 間培養の H₂ 株を湿菌重量で 1mg/ml なる如く生理的食塩水に混じ、瑪瑙乳鉢中で充分磨碎し、略々均等な浮游液とし、1,000r.p.m. 2分間遠心し粗塊を除き、次に 100°C, 30分間滅菌し硝子球の入つた大型試験管中に入れ良く振盪し、菌塊のないことを確かめて使用した。
- c) 流動パラフィン：100°C, 30分滅菌して使用した。
- d) 滲出誘発用結核死菌流動パラフィン浮游液：前述の感作用流パラワクの調製法に準じ、菌量は 1mg/ml とした。
- iv) 腹腔穿刺用毛細管：内径約 2 mm のガラス

管の先端を $\frac{3}{8}$ ~ $\frac{1}{2}$ 程度の注射針の太さに作り使用した。

(2) 実験方法

- i) 動物の感作法：結核流パラワク 1 ml を海猿右腹部皮下へ1週間隔で3回注射し、最終注射日より5~9週後に至り、旧ツベルクリン10倍液0.1 ml を以て皮内反応を行うと、いずれも強陽性で発赤は平均 25mm² 以上を示し、硬結も著明であり、一部には中心壊死を呈するものもあつた。Middlebrook-Dubos 赤血球凝集反応は32倍から128倍稀釈血清に於て陽性を示す如き状態に達していた。
- ii) 腹腔内滲出細胞採集方法：上記の誘発物質の10 ml を腹腔内へ注入後5日目迄24時間間隔で、上記のガラス毛细管を以て腹腔穿刺を行い、先端に毛细管現象で侵入して来る腹腔液を載物ガラス上に塗抹乾燥固定した。

- iii) 標本染色法並びに細胞組成算定法：普通血球標本の如く稀釈ギームザ液にて染色し、均等な塗抹部を選び細胞200個を算して、その細胞組成を解析した。
- iv) 細胞内結核菌染色法：死菌生理食塩水浮游液による腹腔内細胞滲出液の塗抹標本を乾燥固定後40°Cの加温石炭酸フクシン液で3~5分間染色し、水洗後10%の無水亜硫酸曹達液を以て標本を充分脱色した後、前述の如く、ギームザ液を以て後染色を行つた。
- v) 喰菌能観察法：標本を検鏡し、単核細胞、並びに多核細胞をそれぞれ100個計えて、喰菌細胞(細胞100個中の菌を喰菌している細胞数)、被喰菌数(喰菌細胞内の菌数の総計)及び平均喰菌数(喰菌細胞個数を以て被喰菌数を除いた数)を指標として喰菌状態を観察した。

実験成績

第1表は4種の物質を注入した場合の正常群、並びに感作群に於ける腹腔内滲出細胞の変動を各3匹の海猿の実験値を平均して経時的に一括表示したものである。これを更に解析して第1図より第12図に示した。

即ち、各種物質を注入後12時間目頃迄は滲出細胞は殆んど全部が多核細胞であり、各群にその差は見出し得ないが、以後時間の経過と共に単核細胞がこれに代つて増加し、遂に多核細胞と交代して逆にその主成分となるのが一般の経過である。この詳細な細胞変動は次の如くである。第一に多核細胞の変動から示すと、生理食塩水注入の組(第1図)、流動パラフィン注入の組(第3図)に就いては、正常群感作群共に多核細胞は時間の経過と共に著明に減少し、特にその減少度は感作群に著しい。生理食塩水注入の場合は、多核細胞は1日後で、正常群では全細胞の58.5%であるのに反し、感作群では23.5%であり、同様に流動パラフィン注入の組に於ても正常群55.0%で、感作群19.5%となっている。以後5日目では両群共に多核細胞は10%以下となるけれども感作群では正常群よりな

おその比率は低い。然るに死菌生理食塩水浮游液注入の組(第2図)並びに、流パラワク注入の組(第4図)では一般の推移は大體同じであるが、24時間目では多核細胞は何れも74~80%を占め、両群間、並びに各群の各組間で、生理食塩水、又は流動パラフィン注入の場合のような差、並びに急速な減少は認められなかつた。而して死菌生理食塩水を注入された感作群では、その後の減少は割合に早く、5日目では6%となつたが、他の組ではなお30%前後であり、著しい対比を示した。(第2図、第6図)

次に単核細胞の変動は第7図~第12図に示す如く、多核細胞のそれとは全く対蹠的で24時間目頃迄はその比率は全く低いが、以後漸次増加し、且つその増加は両群共生理食塩水、及び流動パラフィン注入の組に強く、死菌を混じた場合は低かつた。

又両群の各組に於て多核細胞が単核細胞中に貪喰されたものが認められた。即ち、2日以後の染色標本に於てはその貪喰された多核細胞の染色態度は悪く、淡い青色に染色されるに止まつた。これは以下に述べる所謂二重喰菌現象の

ことから考えて、恐らくは老朽の多核細胞であろうと思われた。第2表、第3表は腹腔内へ注入された結核菌に対する喰菌能を表示したものである。両群に於ける単核細胞の喰菌状態を比較して見ると感作群では1日目で喰菌細胞が20%、2日目では12%、3日目では9%と、逐時喰菌細胞は減少しているに反し、正常群では1日目9%、2日目31%、3日目では26%、4日目24%、5日目11%となり、2日目に於て喰菌細胞が最も多かつた。これを平均喰菌数に見ても大体同じ経過を示した。又多核細胞の両群

に於ける喰菌現象の経過も略々同様で、感作群では1日目5%、2日目4%、3日目1%となり、正常群では1日目8%、2日目9%、3日目7%となり、4日目以後は何れも喰菌多核細胞を認めることは出来なかつた。更に興味ある現象として喰菌多核細胞が更に単核細胞に喰菌処理されている所謂二重の喰菌状態を示したものが両群に見出されたことである。この単核細胞内の多核細胞は3日以後になると核は淡染し、その胞体は融解されたような状態となるのが観察された。

考 按

腹腔内滲出細胞の組成を検討するに当り、細胞の鑑別は毎常必ずしも容易ではないから、私は比較的鑑別し易い多核細胞と、所謂単核細胞とに分けてその変動を観察した。

全般を通じて共通の傾向は、(1)腹腔内へ生理食塩水、流動パラフィン、死菌生理食塩水浮游液及び流パラワク等の何れの物質を注入しても初期には多核細胞が滲出細胞の主成分をなし、以後それが、所謂単核細胞と置換されるが、(2)その速度は正常海狸に比し感作海狸では速かで、特に感作海狸に生理食塩水、流動パラフィンを注入したものでは甚だ速かであり、正常海狸でも、死菌浮游液を注入せしめた場合は、多核細胞と単核細胞との置換が遅れることである。

この事から正常海狸では腹腔内へ注入した物質の処理に長期間多くの多核細胞の活動を必要とし、単核細胞との交代が遅れ、感作海狸に於ては多核細胞による異物処理が速かで単核細胞との交代が速かに行われることが推察される。又生理食塩水や流動パラフィンのみ注入の場合と、これに死菌を浮游せしめた場合とを比較しても、死菌の処理にはより多くの多核細胞の活動が必要であり、且つ二重喰菌現象からも容易に推察される如く、一次的に死菌を処理した多核細胞は更に後期の滲出細胞の主成分である単

核細胞により終局的に清拭されるようである。換言すれば一次的に生体防禦の役目を果たした多核細胞はその使命を更に単核細胞に引渡すもので、感作海狸ではこの交代が速かであることは明らかである。

即ち、感作により生体の間葉系に前以て或る準備状態が出来て、次に来た様々の刺激や、侵襲に対し正常海狸に比し、より少ない多核細胞で処理され、そして単核細胞に後を引継ぐのであろうと思われる。しかし乍ら一方 Schmidt⁹⁾ 原次¹⁰⁾等の指摘する如く感作海狸では単核細胞の動員が早く行われるという考え方も捨て難い所である。又腹腔内に於て多核細胞、並びに単核細胞の喰菌現象に就いて検討するに、喰菌多核細胞は正常海狸及び感作海狸に於て、共に3日目迄は認められるが、喰菌単核細胞は、もつと長期間認められその数も多い。即ち、喰菌単核細胞は正常海狸で1日目は割合に少ないが、2日目が多く以後漸次減少するが、5日目でもまだ1日目より多く、感作海狸では一般に少ないが、1日目に最も多く、以後漸減するが、5日目でもまだ僅かに認められる。この事は感作海狸の方が菌の処理が速かであることを示すものと思考される。

近年に至り Mackaness⁶⁾ が生菌を用いて正常動物と感作動物の腹腔内滲出細胞の喰菌現象、

並びに細胞内の菌の増殖を詳細に検討し、両群の動物の間には差は認めなかつたとしているが、Suter¹⁸⁾の更に詳細な喰菌現象に関する実験はこれに反し感作動物では細胞自体が喰菌能を向上していることを報告している。而してツ

結 語

正常並びに結核流パラワク感作海猿の腹腔内へ生理食塩水、流動パラフィン及び夫々に結核死菌を混じた4種の物質を腹腔内へ注入し、腹腔内細胞滲出を起さしめ、細胞滲出の状況を比較検討し、次の結果を得た。

- 1) 腹腔内滲出細胞は初期には主として多核細胞であるが、以後漸次単核細胞と交代する。
- 2) 死菌を混じた細胞誘出物質注入の場合は多核細胞が長期にわたり滲出し、単核細胞は滲

出が遅れる。
3) 感作動物では、正常動物に比し多核細胞と単核細胞との交代が速かであつた。
4) 腹腔内へ注入された結核死菌に対する滲出細胞の喰菌現象は感作海猿では正常海猿より速かに認められ、二重喰菌現象から見て単核細胞が終局的に死菌を処理するものと考えられる。

文 献

- 1) Mudd, E. B. H. : J. Ger. Physiol., 16, 625, 1933.
- 2) Chase, M.W. : Proc. Soc. Biol. & Med., 59, 134, 1945.
- 3) Stavitsky, A. B. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 67, 2, 1948.
- 4) Mataxas, M. N. & Metaxas Bühler, M. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 69, 162, 1948.
- 5) Walsh, T. E. & Smith, C. A. : J. Imm., 66, 3, 1951.
- 6) Kirchheimer, W. et al. : Amer. Rev. Tub., 64, 516, 1951.
- 7) 相島, 他 : 化学療法研究所録報, 6, 1-4, 1952.
- 8) Mackaness, G. B. : J. Path. & Bact., 64, 429, 1952.
- 9) Schmidt, F. et al. : Beit. Klin. Tub., 109 (2), 131, 1953.
- 10) Zuckerman, A. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 82, 469, 1953.
- 11) Mary, M. Tremaine & Jeter, W. S. : J. Imm., 74 (2), 1955.
- 12) 金井興美 : 日本細菌学雑誌, 10 (8), 657, 1955.
- 13) 宇佐美正鴨 : アレルギー, 4 (5), 376, 1956.
- 14) 原沢道美 : 医学と生物学, 39 (6), 203, 1955.
- 15) 辻 周介 : 結核研究の進歩, 8, 215, 1954.
- 16) Mackaness, G. B. : Amer. Rev. Tub., 69, 480, 1954.
- 17) 萩田友雄 : アレルギー, 5 (1), 30, 1956.
- 18) Suter, E. : J. Exp. Med., 96, 137, 1952.
- 19) 大溝和夫 : 金大結研年報, 15 (下), 220, 1957.

第1表 腹腔内滲出細胞組成の変動

(a)				(b)			
注物 入質	経日 過数	ツ反陰性正常動物		注物 入質	経日 過数	ツ反陽性感作動物	
		多核細胞 (%)	単核細胞 (%)			多核細胞 (%)	単核細胞 (%)
生理食 塩水	1	58.5	41.5	生理食 塩水	1	23.5	76.5
	2	25.0	75.0		2	14.0	86.0
	3	10.0	90.0		3	6.5	93.5
	4	9.0	91.0		4	4.0	96.0
	5	8.0	92.0		5	3.5	96.5
死塩水 浮遊液	1	78.0	22.0	死塩水 浮遊液	1	74.0	26.0
	2	70.0	30.0		2	48.0	52.0
	3	60.0	40.0		3	30.0	70.0
	4	40.0	60.0		4	12.0	88.0
	5	31.5	68.5		5	6.0	94.0
流パ ラフ イン 動	1	55.0	45.0	流パ ラフ イン 動	1	19.5	80.5
	2	25.0	75.0		2	13.0	87.0
	3	11.5	88.5		3	6.0	94.0
	4	6.5	93.5		4	3.5	96.5
	5	5.0	95.0		5	2.0	98.0
死フ イン 流動 浮遊 液	1	80.0	20.0	死フ イン 流動 浮遊 液	1	74.0	26.0
	2	70.0	30.0		2	50.0	50.0
	3	64.0	36.0		3	37.0	63.0
	4	42.5	57.5		4	31.0	69.0
	5	36.0	64.0		5	27.0	73.0

第2表 腹腔内多核細胞喰菌経過

	経過 日数	喰菌 細胞数	被喰 菌数	平均 喰菌数
正常 動物	1	8	36	4.5
	2	9	34	3.7
	3	7	13	1.8
	4	0	0	0
	5	0	0	0
感作 動物	1	5	26	5.1
	2	4	15	3.7
	3	1	2	2
	4	0	0	0
	5	0	0	0

第3表 腹腔内単核細胞喰菌経過

	経過 日数	喰菌 細胞数	被喰 菌数	平均 喰菌数
正常 動物	1	9	23	2.5
	2	31	164	5.3
	3	26	145	5.6
	4	24	93	3.8
	5	11	35	3.1
感作 動物	1	20	123	6.1
	2	12	56	4.6
	3	10	32	3.2
	4	4	10	2.5
	5	2	5	2.5

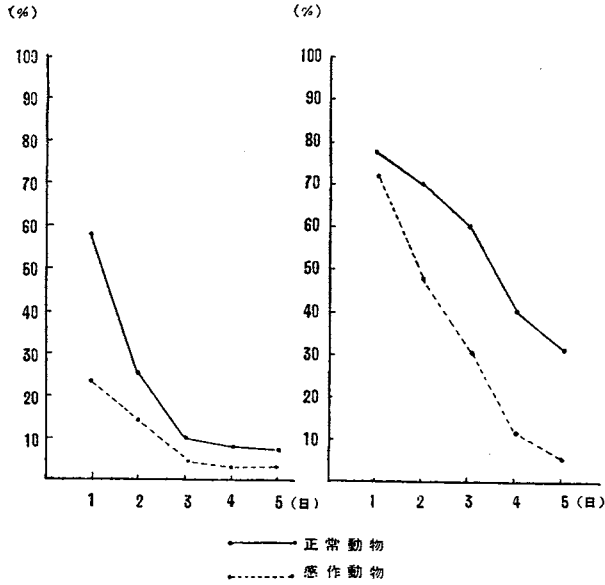
腹腔内多核細胞滲出経過図

第 1 図

第 2 図

生理食塩水注入

死菌生理食塩水浮游液注入



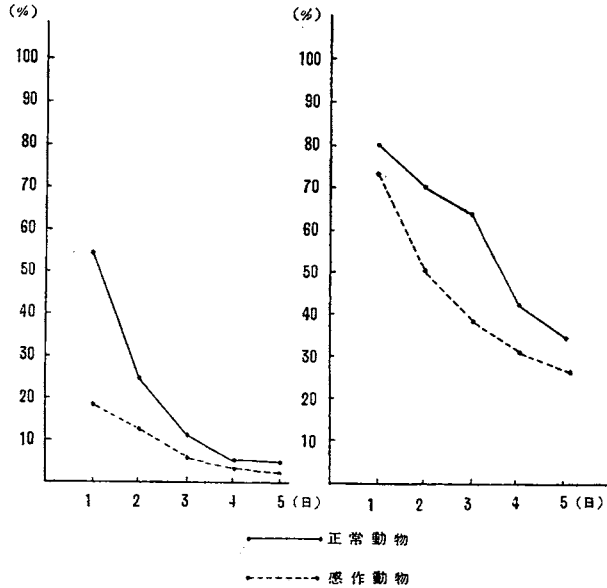
腹腔内多核細胞滲出経過図

第 3 図

第 4 図

流動パラフィン注入

死菌流動パラフィン浮游液注入

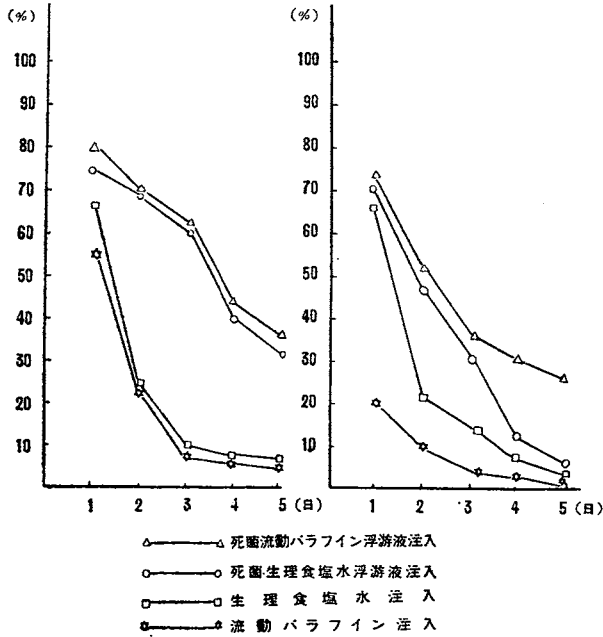


腹腔内多核細胞滲出経過図

第 5 図

第 6 図

正常動物に於ける多核細胞滲出経過 感作動物に於ける多核細胞滲出経過



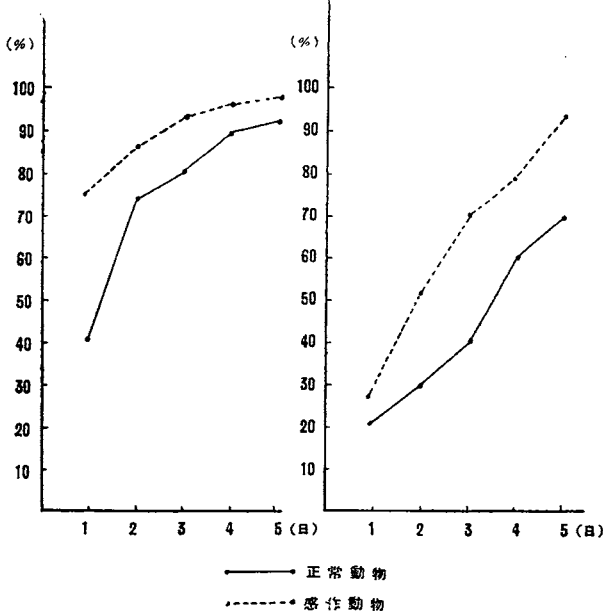
腹腔内所謂単核細胞滲出経過図

第 7 図

第 8 図

生理食塩水注入

死菌生理食塩水浮游液注入



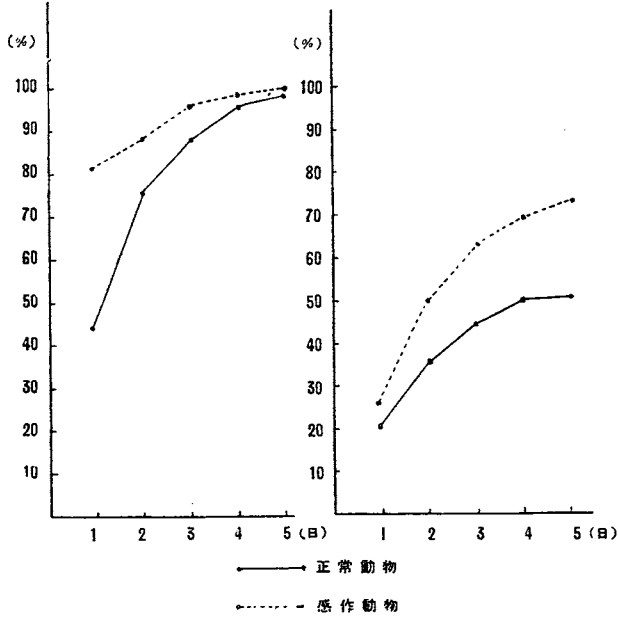
腹腔内所謂単核細胞滲出経過図

第 9 図

第 10 図

流動パラフィン注入

死菌流動パラフィン浮游液注入



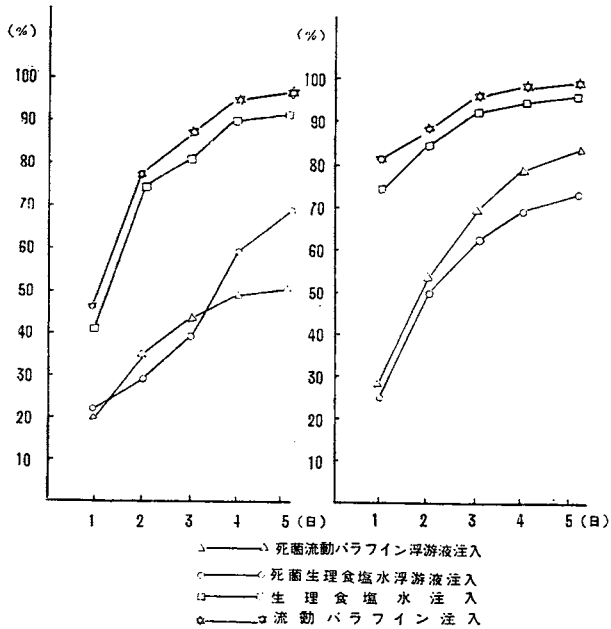
腹腔内所謂単核細胞滲出経過図

第 11 図

第 12 図

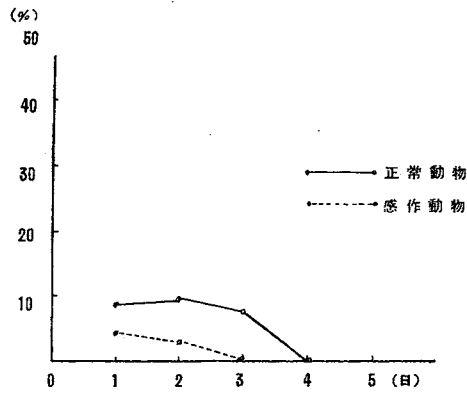
正常動物に於ける単核細胞滲出経過

感作動物に於ける単核細胞滲出経過



第 13 図

正常動物腹腔内多核細胞喰菌経過



第 14 図

感作動物腹腔内単核細胞喰菌経過

