

ツベルクリンによる白血球溶解現象に関する研究

第 1 篇

ツベルクリンによる白血球溶解現象に関する基礎的研究

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
橋 本 宏
高 橋 芳 雄

(受付：昭和32年11月8日)

緒 言

結核感染個体の組織培養に際し一定量の旧ツベルクリン (OT) を添加すると、組織細胞の特異的な発育障害が惹起されるという Rich-Lewis¹⁾, Aronson²⁾等を始めとする多くの人々の主張に端を発して、Favour 等^{3)~6)}は結核感染個体の白血球が *in vitro* で OT により溶解される現象を観察した。その後多数の追試者^{7)~22)}が此の現象を確認したが、一方否定する人^{23)~25)}もない訳ではない。

そこで私達は健常モルモットと人型結核菌

H₃₇Rv 株死菌流動パラフィン浮游液で感作したモルモットの全血に OT を添加した場合の白血球の減少率を各種条件下で比較検討した処、全血にその 1/4容量の OT (1:1~1:500) を加え、37°C, 1 時間放置した後の白血球の減少率は、両者間で顕著な差があつて健常モルモットでは10%以下、感作モルモットでは10%を遙かに越えるという結果が得られた。以下その成績の概略を述べる。

実 験 方 法

- 1 実験動物：健常モルモット及び型の如く作製した H₃₇Rv 株死菌流動パラフィン浮游液 (10mg/ml) (以下死菌流パラと略記) で前処置 (1 ml, 1 回皮下注射) したモルモットで、何れも体重は 500gm 前後のものを使用した。
- 2 旧ツベルクリン (OT)：H₃₇Rv 株のソートン培地 8 週培養濾液より型の如く調製した。
- 3 白血球数算定法：心臓穿刺により1,000倍ヘパリン液 1 容に対しその10倍量の血液を採り直ちに混和する。小試験管 6 本に前記ヘパリン加血液 0.4ml 宛分注し、更に各々の試験管に夫々原液、10倍、100倍、200倍、500倍の OT、(稀釈はすべて pH7.0

の生理的食塩水で行う) 及び pH7.0 の生理的食塩水 0.1ml 宛を入れて軽く反転混和する。直ちに生理的食塩水加試験管内の白血球をトーマ氏計算盤を用いて算定し、これを対照白血球数とした。次いで各試験管を解卵器中に保ち、各々 1, 2, 3 時間毎に白血球数を算定した。なお算定は 2 回行つて平均値を求め、溶解による減少率 (A) は次式によつて計算した。

$$A = \left(1 - \frac{\text{各時間における白血球数}}{\text{対照白血球数}} \right) \times 100\%$$

算定の際屢々見られる所謂 Clumping は、私達は安部井等¹⁵⁾に従つて白血球 4 個以上の集合を 1 Clumping

と見做し、有形のものを白血球1個として取扱った。

4 血液塗抹標本：白血球数算定と同時に血液塗抹標本を作り、型の如くギムザ染色を行つてヘモグラム

に供した。

5 OT感作血球凝集反応：小林²⁶⁾の報告に準じ、各々のモルモットの心臓穿刺による採取血から血球及び血清を分離し、OT感作血球凝集反応を行つた。

実験結果

1. H₃₇Rv 株死菌流パラ感作モルモット全血に於ける白血球溶解現象 (第1表)

原液より500倍稀釈に至る迄のOTの添加で10%以上白血球の減少が認められた。この際10~200倍稀釈OT添加時の減少率が比較的大きいが、原液及び500倍稀釈の場合と著差はない。又白血球の減少率を経時的に観察すると、1時間値<2時間値<3時間値の傾向が認められた。対照としてOTの代りに生理的食塩水を添加して行つた試験に於ける白血球の減少率は、1時間値に於て10%を越えなかつたが、2時間、及び3時間値に於ては10%以上を示すものが屢々認められた。(第1表No.1, No.5, No.8等)尚OT添加により減少するのは主として中性多核白血球であつた。

2. 健常モルモット全血に於ける白血球溶解現象 (第2表)

OT添加或は生理的食塩水添加で、何れも10%以内の白血球の減少率に止り、この間に差が認められなかつた。只No.11では例外的に3時間値が10%以上(11.2%)を示した。ヘモグラムの変動は何れも著明でなかつた。

3. OT感作血球凝集価と白血球減少率の関係

第1表に示す如く、赤血球凝集価と白血球減少率との間に平行関係は認められなかつた。

4. 実験に使用したOTに含まれる石炭酸の影響 (第3表)

私達の用いたOTには0.5%の割に石炭酸を加えてあるので、石炭酸そのものによる影響を検討した。結果は第3表に見られる如く、正常動物及び感作動物の何れの全血に0.5%石炭酸加生理的食塩水を添加しても、白血球の減少率は10%以下であつた。

総括並びに考按

OT添加による白血球溶解現象を検討するには、先ずOT添加直後の白血球数を基準とし、一定温度で一定時間放置後、幾何以上の減少率に達したならばこれをOTによる特異的溶解によるものと見做すかが問題となる。

OTを添加し37°Cに1時間放置後の観察で、Favour等³⁾、安部井¹⁵⁾、貝田¹⁶⁾は10%、川上¹²⁾は5%を限界と定めている。私達の実験では健常動物でも10%近くの減少が見られた点から、10%以上の場合、特異的な溶解現象の存在を推定してよいのではないかと考える。

又Favour等³⁾は溶解現象は1時間以内に完了し、その後の変化は少いと述べている。私達はOT添加後1時間、2時間及び3時間に検討した結果、時間の経過と共に白血球の減少率は

増すが、対照のOT無添加のものでも2時間或は3時間値に於て屢々10%以上の減少が認められた。(第1表No.1, No.8)従つて時間の経過につれて促進する場合の溶解には非特異的因子も関与していることが考えられる。

OTを加える場合、その濃度並びに量に関しては一定の標準がなく、Favour等³⁾、川上¹²⁾、東¹⁷⁾は30倍液、貝田¹⁶⁾は10倍液、Waksman⁸⁾は5~20倍液、安部井等¹⁵⁾は240倍液、川原¹⁹⁾は480倍液として居り、添加量は大体被検液の1/10~1/4容量として居る。全血に原液から500倍稀釈OTを、全血の1/4容量加えて行つた私達の実験ではその間の減少率に著明な差が見られなかつた。

血液塗抹標本によつて溶解現象を検索するに

当つて、完全に溶解した白血球は標本中に見られない筈であり、又原形質、核が変形しているが猶白血球であることが推察し得る程度のもは溶解過程にあるものと考え、算定の対称は一応正常の形態を止めている白血球のみとした。その結果は前述の如く、OT 添加によつて溶解するのは主として多核白血球であることが観察された。此の所見は Favour 以来の諸家の報告^{7), 12), 16), 19)}に一致するものである。

OT 感作血球凝集反応の凝集価と減少率の間には一定の関係を見出し得ず、凝集価の高いもの必ずしも減少率が大きいとは言えない。Waksman⁸⁾は白血球溶解性因子は Römer 反応、沈降反応、補体結合反応などは無関係で、

結 論

正常モルモット及び H₃₇Rv 株死菌流パラ感作モルモットの全血に、その 1/4 容量の各種濃度の OT を添加し直後の白血球数を基準として、37°C に 1, 2, 及び 3 時間放置後の白血球の減少率を検討して次の結果を得た。

- 1) OT 添加後 1 時間の白血球の減少率は感作モルモットでは 10% を越え、正常モルモットでは 10% 以内であつた。
- 2) 添加する OT の濃度が原液より 500 倍稀釈に至るまでの間では、白血球の減少率に著差が認められなかつた。
- 3) OT 添加後 1 時間、2 時間及び 3 時間と経時的に観察すると漸次減少率が大となつた。

文

- 1) Rich, A. R. & Lewis, M. R.: Bull. Johns. Hopkins., 50, 115, 1932. 2) Aronson, J. D.: J. Imm., 25, 1, 1933. 3) Favour, C. B. et al.: Amer. Rev. Tbc., 60, 212, 1949. 4) Miller, J. M. & Favour, C. B.: J. Exp. Med., 93, 1, 1951. 5) Favour, C. B.: Advance in Tbc. Research, IV, 219, 1951. 6) O' Neill, E. F. & Favour, C. B.: Amer. Rev. Tbc., 72, 577, 1955. 7) Waksman, B. H.: J. Imm., 70, 331, 1953. 8) Waksman, B. H. &

強いて関係があるものを求めれば、それは血球凝集反応の抗体であらうと述べている。一方川上⁹⁾安部井¹⁵⁾は血球凝集反応と減少率とは無関係であると言う。この問題に関しては私達の成績は後者に一致した。

又私達の使用した OT は 0.5% の割に石炭酸が加えてあるので、石炭酸そのものによる影響を観察したが、第 3 表に示した如く、石炭酸の影響はないことが認められた。

尚採血に際し、抗凝固剤として使用するヘパリンには抗補体作用があると言う報告^{12), 27)}があるが、この研究では上記作用による障害は認められなかつた。

論

が、2 時間以上では非特異的溶解が増強することが実証された。

- 4) 以上の事実から、動物の全血にその 1/4 容量の OT (1:1 ~ 1:500) を加えて 37°C に 1 時間放置後、白血球の減少率が 10% を越えた場合 OT による特異的溶解現象の存在が考えられる。
- 5) OT による白血球の特異的溶解に関与するものは主として中性多核白血球であつた。
- 6) OT による白血球の特異的溶解現象と OT 感作血球凝集反応の間には平行関係が認められなかつた。

献

- Broeking, D.: Amer. Rev. Tbc., 69, 1002, 1954. 9) 川上保雄, 他: 日新医学, 39, 439, 1952. 10) 川上保雄, 他: 日新医学, 40, 615, 1953. 11) 川上保雄, 他: 結核, 28, 281, 1953. 12) 川上保雄, 他: 結核の臨床, 2, 45, 1954. 13) 中川 進, 他: アレルギー-2, 94, 1953. 14) 中川 進, 他: アレルギー, 3, 311, 1955. 15) 安部井英一, 他: 日本臨床結核, 15, 794, 1956. 16) 貝田勝美: アレルギー, 4, 87, 1955. 17) 東 堅治: アレルギー, 5,

145, 1956. 18) 楠野彌与子：関西医科大学雑誌, 8, 66, 1956. 19) 川原福江：関西医科大学雑誌, 8, 36, 1956. 20) 石田政男：日血会誌, 18, 232, 1955. 21) 石田政男：日血会誌, 19, 238, 1956. 22) 大村 康：九大結研紀要, 3, 173, 1957. 23) Bardrige, G. D. & Kligman, A. M. : Amer. Rev. Tbc.,

63, 674, 1951. 24) Juhasz-Schäffer, A. : Zt. schr. f. Imm. u. exp. Therap., 56, 377, 1928. 25) 小谷尚三, 他：大阪大学医学雑誌, 6, 433, 1954. 26) 小林 博：金大結研年報, 14 (中), 177, 1956. 27) 鈴木忠彦, 他：アレルギー, 4, 139, 1955.

第 1 表 H₃₇Rv 株死菌流パラ感作モルモット全血における白血球溶解現象

註：1) Δ…細胞減少率(%) = $(1 - \frac{OTをを加えたものの白血球数}{生理的食塩水を加えたものの白血球数}) \times 100$
 2) P…多核白血球
 3) L…リンパ球

動物	赤血球凝集価	対照白血球数	検査事項 ツ稀 釈 倍数	時 間											
				1 時 間			2 時 間			3 時 間					
				白血球数	Δ	P. L.	白血球数	Δ	P. L.	白血球数	Δ	P. L.			
No. 1	1:128	L. 73% P. 15%	1: 1	6800	-18.1%	15%	75%	6200	-25.3%	11%	81%	5200	-37.3%	13%	75%
			1: 10	7500	- 9.6%	5%	81%	6900	-16.7%	5%	84%	5700	-31.3%	5%	81%
			1:100	6550	-21.1%	7%	79%	6650	-19.9%	10%	76%	5300	-36.1%	10%	76%
			1:200	6700	-19.3%	11%	79%	7300	-12.0%	9%	76%	6100	-24.1%	12%	78%
			1:500	7700	- 6.6%	6%	78%	7350	-12.7%	7%	79%	5460	-34.3%	9%	76%
			生食水	8550	+ 2.8%	12%	72%	7100	-14.5%	13%	68%	6900	-16.9%	13%	66%
No. 2	1:32	L. 71% P. 21%	1: 1	4600	-22.0%	19%	75%	4300	-27.1%	17%	80%	4300	-27.1%	19%	79%
			1: 10	4250	-28.0%	16%	79%	4000	-32.2%	7%	86%	3850	-34.7%	12%	83%
			1:100	3400	-42.4%	16%	83%	3650	-38.0%	7%	88%	3650	-38.0%	8%	80%
			1:200	3600	-39.0%	6%	92%	3550	-39.8%	8%	91%	3400	-42.4%	8%	90%
			1:500	4150	-29.7%	8%	85%	4350	-26.3%	10%	72%	3700	-37.3%	4%	90%
			生食水	5500	- 6.8%	18%	70%	5400	- 8.5%	20%	73%	4950	-11.0%	17%	80%
No. 3	1:128	L. 82% P. 11%	1: 1	5000	-37.5%	6%	90%	5040	-37.0%	9%	90%	5150	-51.5%	7%	88%
			1: 10	5150	-35.6%	4%	87%	5300	-33.7%	6%	82%	5250	-34.4%	6%	78%
			1:100	5650	-29.4%	8%	72%	5700	-28.7%	3%	89%	5700	-28.7%	2%	82%
			1:200	5750	-29.8%	10%	78%	5500	-31.2%	6%	77%	5550	-30.9%	6%	76%
			1:500	5550	-30.9%	11%	82%	5040	-37.0%	8%	85%	5300	-33.7%	6%	80%
			生食水	7500	- 6.3%	12%	80%	7200	-10.0%	10%	81%	7350	- 8.0%	9%	82%
No. 4	1:16	L. 68% P. 25%	1: 1	2850	-12.3%	17%	77%	2600	-20.0%	15%	77%	2600	-20.0%	18%	77%
			1: 10	2700	-16.9%	13%	78%	2750	-15.4%	10%	85%	2500	-23.1%	12%	83%
			1:100	2700	-16.9%	11%	84%	2750	-15.4%	16%	74%	2700	-16.9%	12%	86%
			1:200	2800	-13.8%	12%	80%	2750	-15.4%	17%	79%	2650	-18.5%	15%	85%
			1:500	3150	- 0.3%	12%	80%	2800	-13.8%	17%	79%	2500	-23.1%	15%	77%
			生食水	3150	- 3.1%	27%	68%	3150	- 3.1%	26%	70%	2950	- 9.2%	31%	64%

No. 5	1:32	L.72% P.18%	1: 1	4550	-23.0%	18%	75%	4450	-24.6%	15%	80%	4400	-25.4%	13%	76%
			1: 10	4200	-28.8%	12%	78%	4200	-28.8%	13%	80%	4250	-28.0%	10%	75%
			1:100	4150	-29.7%	15%	77%	4250	-28.0%	15%	80%	4000	-32.2%	10%	81%
			1:200	4450	-24.6%	15%	77%	4300	-27.1%	11%	85%	4500	-23.7%	13%	82%
			1:500	4250	-28.0%	11%	88%	4300	-27.1%	11%	86%	4000	-32.2%	13%	76%
			生食水	5350	-9.3%	16%	83%	5200	-11.9%	16%	82%	5050	-16.1%	15%	86%
No. 6	1:64	7000	1: 1	5250	-25.0%			4500	-35.7%			4700	-32.8%		
			1: 10	4400	-37.1%			4550	-35.0%			4300	-38.5%		
			1:100	4800	-31.4%			3450	-50.7%			4000	-42.8%		
			1:200	5400	-22.8%			4000	-42.8%			4100	-41.8%		
			1:500	4500	-35.7%			4350	-37.8%			4200	-40.0%		
			生食水	7500	-7.1%			6700	-4.2%			6800	-2.8%		
No. 7	1: 8	L.77% P.18%	1: 1	5300	-3.6%	18%	80%	4200	-23.6%	23%	69%	3950	-26.3%	23%	63%
			1: 10	3550	-35.4%	6%	87%	3600	-34.5%	9%	84%	3200	-21.8%	9%	81%
			1:100	3400	-38.1%	13%	87%	2850	-47.8%	11%	86%	2300	-58.1%	11%	85%
			1:200	2900	-47.4%	11%	86%	3150	-42.7%	14%	81%	3700	-32.7%	9%	88%
			1:500	3500	-36.3%	10%	86%	3600	-34.5%	9%	86%	3450	-31.4%	10%	85%
			生食水	5750	+4.5%	21%	70%	5300	-3.6%	26%	61%	5200	-5.2%	25%	65%
No. 8	1:128	L.76% P.22%	1: 1	4600	-11.5%	18%	70%	3400	-34.6%	16%	72%	3250	-37.5%	12%	80%
			1: 10	2650	-49.0%	7%	86%	2750	-47.1%	6%	88%	2700	-48.1%	6%	90%
			1:100	2800	-46.2%	6%	92%	2600	-50.0%	2%	89%	2700	-48.1%	3%	90%
			1:200	2850	-45.2%	10%	87%	2750	-47.1%	8%	90%	2550	-51.0%	6%	90%
			1:500	2850	-45.2%	11%	76%	2800	-46.2%	5%	87%	2550	-51.0%	4%	85%
			生食水	4700	-9.6%	17%	84%	4550	-12.5%	18%	85%	4400	-15.4%	18%	86%
No. 9	1:16	L.66% P.28%	1: 1	3300	-10.8%	15%	80%	3000	-18.6%	14%	83%	2550	-31.1%	12%	85%
			1: 10	3600	-7.7%	14%	76%	3250	-12.2%	12%	80%	2300	-37.4%	10%	80%
			1:100	3250	-12.2%	12%	70%	3000	-18.6%	13%	84%	2550	-31.1%	10%	84%
			1:200	3500	-5.4%	20%	69%	3350	-9.4%	23%	73%	2300	-32.4%	16%	75%
			1:500	3000	-18.6%	20%	68%	3050	-17.3%	20%	70%	2600	-29.7%	15%	76%
			生食水	3500	-5.4%	25%	70%	3400	-8.1%	23%	71%	3550	-4.0%	20%	70%
No.10	1:32	L.60% P.32%	1: 1	10000	-1.9%	32%	60%	6600	-35.2%	29%	65%	6700	-34.3%	20%	70%
			1: 10	9200	-9.8%	23%	70%	6800	-33.3%	20%	71%	6500	-36.8%	18%	80%
			1:100	9100	-9.9%	25%	62%	8320	-16.1%	22%	72%	8200	-18.3%	20%	75%
			1:200	9800	-3.9%	26%	62%	9600	-5.8%	22%	70%	8050	-21.9%	24%	76%
			1:500	10200	0	26%	72%	9400	-7.8%	20%	73%	8000	-21.5%	20%	75%
			生食水	10200	0	31%	62%	10000	-1.9%	29%	66%	9800	-3.9%	30%	63%

第 2 表 健常モルモット全血に於ける白血球溶解現象

時 間	動物 凝集価 (倍)* 対照白血球数 添加 OT の稀釈度	No. 11						No. 12						No. 13					
		<2						<2						<2					
		5350(L.70%, P.19%)						5200(L.84%, P.11%)						5700(L.80%, P.16%)					
		1:1	1:10	1:100	1:200	1:500	生食水	1:1	1:10	1:100	1:200	1:500	生食水	1:1	1:10	1:100	1:200	1:500	生食水
1 時 間	白血球数	4900	4850	5150	5150	5250	5400	4900	5100	5000	4750	5000	5700	5950	5600	5700	5500	5600	5500
	Δ	-8.4%	-9.3%	-3.7%	-3.7%	-1.9%	+0.9%	-5.7%	-1.9%	-3.8%	-8.6%	-3.8%	+9.6%	+4.3%	-1.7%	0%	-3.5%	-1.7%	-3.5%
	P.	15%	16%	18%	18%	20%	14%	14%	7%	10%	10%	9%	10%	15%	15%	12%	13%	11%	20%
	L.	77%	77%	78%	73%	76%	77%	80%	86%	82%	82%	86%	86%	81%	83%	84%	81%	82%	76%
2 時 間	白血球数	4800	4700	5100	4900	4600	5200	4900	4800	4800	4700	4900	5100	5700	5850	5850	5700	5650	5300
	Δ	-9.3%	-12.1%	-4.7%	-12.1%	-14.1%	-2.8%	-5.7%	-7.9%	-7.9%	-9.6%	-5.7%	-1.9%	0%	+2.6%	+2.6%	0%	-0.8%	-7.0%
	P.	14%	16%	15%	17%	15%	13%	10%	9%	12%	11%	10%	12%	14%	16%	17%	13%	12%	20%
	L.	78%	77%	76%	77%	73%	78%	82%	89%	84%	83%	88%	85%	82%	82%	76%	83%	82%	76%
3 時 間	白血球数	4700	4600	4650	4550	4600	4750	4800	4900	4800	4800	4950	5200	5200	5600	5200	5000	5400	6000
	Δ	-12.1%	-14.0%	-13.1%	-14.9%	-14.0%	-11.2%	-7.9%	-5.7%	-7.9%	-7.9%	-4.8%	0%	-8.7%	-1.7%	-8.7%	-12.3%	-5.2%	+5.2%
	P.	18%	12%	16%	10%	15%	15%	12%	8%	9%	11%	12%	11%	13%	16%	15%	11%	12%	22%
	L.	72%	81%	76%	84%	78%	78%	80%	88%	86%	88%	86%	86%	80%	80%	77%	82%	81%	75%

* : OT感作血球凝集価

第 3 表 H₃₇Rv 株死菌流パラ感作モルモット全血に於ける白血球溶解現象

時 間	動物	No. 14		No. 15		No. 16	
	O T 感 作 赤血球凝集価	1: 64		1: 64		1: 128	
	対照白血球数	5300		6350		6350	
	添 加 物	10倍OT	0.5%フ エノール 加生食水	10倍OT	0.5%フ エノール 加生食水	10倍OT	0.5%フ エノール 加生食水
1時間	白血球数	4350	5650	4850	6100	5350	6950
	A	-17.9%	+ 6.6%	-23.6%	- 3.9%	-15.7%	+ 9.4%
2時間	白血球数	4400	5400	4550	5700	4700	5950
	A	-17.0%	+ 1.9%	-08.4%	-10.2%	-26.0%	- 6.3%
3時間	白血球数	3700	5600	4200	5450	4450	6100
	A	-30.2%	+ 5.7%	-33.9%	-14.2%	-29.9%	- 3.9%