

ツベルクリンによる白血球溶解 現象に関する研究

第 2 篇

溶解機構の検討

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

前報に於て私達は Favour 等^{1)~4)}の記載した結核動物の白血球の OT による特異的溶解現象（以下 L. L. と略）につき追試実験を行つ

て之を確認した。今回はこの現象の機構追究の目的で二三の実験を試みたので此処に報告する。

第 1 実験

Favour 等^{1)~4)}は L. L. が白血球に結核患者（動物）血漿（血清）とツベルクリンを添加することによつて起ると報告し、私達は前報に於て死菌流バラ感作モルモットの全血に OT を添加して L. L. の惹起されることを実証した。此処では健常モルモットの白血球を用いて之に抗血清と OT を加えた場合 L. L. の起ることを確認した後、加える抗血清を前以つて i) 稀釈、ii) 加温、又は iii) OT 感作血球によつて吸収し之等の処置後の血清と OT によつて L. L. が惹起されるか否かについて検討を加えた。

実験方法ならびに実験結果

使用動物、使用ツベルクリン、白血球数算定法および減少率の求め方、ならびに OT 感作血球凝集反応の術式は総て前報におけると同様である。

1) 抗血清稀釈の L. L. に及ぼす影響

各々健常モルモット全血 0.2ml を入れた 3 本の試験管に 2, 4, 及び 8 倍稀釈抗血清 0.2ml を夫々加えた後更に 10 倍 OT 0.1ml 宛を加えて白血球の減少率を比較すると第 1 表に示す如く、4 倍稀釈血清で最も高く、2 倍及び 8 倍稀釈血清では共に之より僅かに低かつた。

2) 抗血清加温の L. L. に及ぼす影響

結果は第 2 表～第 4 表に示す如く、56°C、30 分、及び 56°C、3 時間加温血清を用いても殆んど大差ない L. L. が認められ、又両加温血清の間には OT 感作血球凝集価の差が認められなかつた。70°C 10 分加温血清では L. L. も OT 感作血球凝集反応も起らなかつた。

3) 抗血清吸収の L. L. に及ぼす影響

終末 2 倍稀釈抗血清により OT 感作血球凝集反応を型の如く行つた後、試験管を遠心し

(1,500 r. p. m., 2分) その上清によつて OT 感作血球凝集反応を繰返すことにより凝集素の吸収を計り、一方各 OT 感作血球凝集反応毎の上清 0.2ml に健常海猿全血 0.2ml と 10倍 OT 0.1ml を添加して白血球の減少率を観察した。

第 2 実験

本実験では健常動物及び感作動物の洗滌腹腔内滲出細胞(体液を除外)を用いて、之に血清—健常動物血清或は感作動物血清—及び OT を添加した場合、細胞の減少率がどうなるかについて検討を加えた。

実験方法ならびに実験結果

腹腔内滲出細胞採集法は、滅菌ブイヨン 10ml をモルモットの腹腔内に注入し、48時間後 100~150ml の滅菌生理的食塩水 (pH 7.0) を更に注入して 10分後に ½ 注射針で以つて腹腔穿刺を行う。この際滲出細胞の凝固を防ぐ為に 100倍ヘパリン液を採集液の $\frac{1}{10}$ ~ $\frac{1}{20}$ 容量加える。次いで得られた穿刺液を 1,000~1,500 r. p. m., 2分間遠心後上清を捨て更に沈澱せる細胞を pH 7.0 滅菌生理的食塩水で 2 回洗滌した後 5,000~10,000/ mm^3 の細胞生理的食塩水浮游液を作製する。

1) 感作モルモット腹腔内滲出細胞浮游液に感作モルモット血清及び OT を添加した場合の細胞減少率

細胞浮游液 1.0ml に他の感作モルモットより得た血清 0.1ml と 10倍 OT 0.1ml を加えると第 8 表に見られる如く、対照の生理的食塩水と OT を加えたものに比し遙かに著明な減少率を示した。尚対照群 (5 匹) の中 1 例に於てのみ 1 時間後 10% 以上の減少率を示した。

2) 感作モルモット腹腔内滲出細胞に健常モルモット血清及び OT を添加した場合の細胞減少率

感作モルモット腹腔内滲出細胞浮游液 1.0ml

結果は第 5 表~第 7 表に示す様に、上記の操作で凝集素を繰返えし吸収して、OT 感作血球凝集反応が陰転した血清では L. L. も亦観察されなくなつた。

に健常モルモット血清 0.1ml 及び 10倍 OT 0.1ml を加えても第 9 表に示した如く、対照の生理的食塩水に OT を加えたものと著しい差はなく、何れも 1 時間後の減少率は 10% 以下であつた。

3) 健常モルモット腹腔内滲出細胞に感作モルモット血清及び OT を添加した場合の細胞減少率

健常モルモット腹腔内滲出細胞浮游液 1.0ml に感作モルモット血清 0.1ml 及び 10倍 OT 0.1ml を加えると第 10 表に示した如く、対照に比して著しい減少率を示した。

4) 健常モルモット腹腔内滲出細胞に感作ウサギ血清及び OT を添加した場合の細胞減少率

健常モルモット腹腔内滲出細胞浮游液 0.2ml に人型結核菌 H₃₇Rv 株死菌流パラで前処置し (15mg/ml, 1ml, 皮下注射), Römer 反応陽性で血中抗体価も充分に上昇したウサギ血清 (Römer 反応, 血中抗体価は第 11 表 a, b, c に示す) 0.2ml 及び 10倍 OT 0.1ml を加えて細胞減少率を検した。尚此の際はウサギ血清を非働化 (56° C, 30分加温) した場合としない場合に分けて、各々 1 時間, 2 時間後の細胞数を混合直後値と比較した。結果は第 12 表 a, b に示す如く、モルモット白血球に異種動物であるウサギの抗血清と OT を添加しても補体存在下で L. L. の惹起されることが認められた。

総括ならびに考按

Favour 等^{1)~4)}によれば L. L. には “plasma factor” と補体作用が必要であるという。私達

は全血を用うれば抗血清を 56° C, 30分, 56° C, 3 時間加温しても溶解力に影響なく、70° C,

10分で完全に溶解力の消失を見た事、感作動物腹腔内滲出細胞浮游液について行つた実験でL. L.が感作動物血清とOTの添加では惹起されたが健常動物血清とOTの添加では惹起されなかつた事、および健常動物腹腔内滲出細胞浮游液について行つた実験でL. L.が非加温抗血清とOTの添加で惹起されたが、56°C 30分加温抗血清とOTの添加では惹起されなかつた事等からL. L.には血清内有効因子(血清因子)と補体が必要なことを確認した。而してこの両者が存在すれば白血球は感作動物に由来するものでも健常動物に由来するものでもよいことが実証された。しかも抗血清は一定の稀釈で最もよく作用するという結果が得られ、一層L. L.が抗原抗体反応の結果招来されるものであるとの

結 論

1) L. L.には血清因子と補体の存在が必要である。

2) 抗原(OT)、補体、及び血清因子が存在すれば白血球は健常動物、感作動物何れに由来するものでも溶解作用を受ける。而して補体及び血清因子が白血球と異種動物のものでもL. L.は惹起される。

3) OTの濃度が一定の際に、最大のL. L.

確信を得た。然し乍ら血清因子に関しては56°C 15分で破壊されるというFavour等の報告とは一致せずWaksman⁵⁾の55°C~58°C 4時間の加温によつても不活性化されないという報告と一致した。尚抗血清でOT感作血球凝集反応を繰返えし行い、凝集素を吸収すると凝集素の消失と共にこの血清ではL. L.も起らなくなる事実と免疫血清加温がL. L.とOT感作血球凝集反応とに共通した影響を及ぼす事実とを合わせ考えると、或いはOT感作血球凝集反応の抗体とL. L.の血清因子とに共通する処があるとも推定されるが、私達が前報で実証した如く両反応の強さは平行しないので、之等両抗体が同一物であるとも考え難く、この点に関しては尚検討の余地がある様に思われる。

を起す抗血清の最適稀釈度が存在する。

4) L. L.にあづかる血清因子は56°C, 30分乃至3時間の加温に安定であるが、70°C, 10分で不活性化される。

5) 抗血清よりOT感作血球に対する凝集素を吸収することによりL. L.に関与する有効因子も失われる。

文 献

1) Favour, C. B. et al.: Amer. Rev. Tbc., 60, 212, 1949. 2) Miller, J. M. & Favour, C. B.: J. Exp. Med., 93, 1, 1951. 3) Favour, C. B.: Advance in Tbc. Research, IV, 219,

1951. 4) O' Neill, E. F. & Favour, C. B.: Amer. Rev. Tbc., 72, 577, 1955. 5) Waksman, B. H.: J. Imm., 70, 331, 1953.

第 1 表 抗血清稀釈の L. L. に及ぼす影響

(健常モルモット全血 0.2ml + 稀釈抗血清 0.2ml + 10倍 OT 0.1ml..... → 1時間判定)

血清稀釈 倍数 直後 白血球数	2				4				8			
	2600				2600				2600			
	10倍 OT		生理的食塩水		10倍 OT		生理的食塩水		10倍 OT		生理的食塩水	
検査事項 動物	白血球数	減少率	白血球数	減少率	白血球数	減少率	白血球数	減少率	白血球数	減少率	白血球数	減少率
No. 1	1850	-28.8%	2800	+ 7.7%	1850	-28.8%	2400	- 7.7%	1700	-34.6%	2550	- 1.9%
No. 2	2150	-21.3%	2500	- 3.5%	1700	-34.6%	2600	0%	2150	-21.3%	2450	- 5.8%
No. 4	2550	- 1.9%	2700	+ 3.5%	1700	-34.6%	2500	- 3.5%	2100	-19.2%	2600	0%
No. 5	2050	-21.2%	2600	0%	1900	-26.9%	2700	+ 3.5%	2100	-19.2%	2650	+ 1.9%
No. 6	1600	-38.5%	2500	- 3.5%	1700	-34.6%	2650	+ 1.9%	1700	-34.6%	2600	0%

第 2 表 抗血清加温の L. L. に及ぼす影響

(56°C, 30分加温抗血清の L. L. に及ぼす影響)

a) 56°C, 30分加温抗血清で行った OT 感
作血球凝集反応

b) 同血清を用いて行った L. L. の成績

(血清は 4 倍稀釈にして行った)

動物 番号	血清 稀釈 倍数	2	4	8	16	32	64	128	256
		No. 2	2	2	2	1	1	1'	0
No. 4	2	2	1'	0	0	0	0	0	
No. 6	2	2	2	1	1	1'	0	0	
No. 7	2	1	1	1	1'	0	0	0	
No. 9	2	1	1	1	1'	0	0	0	

動物 番号	健常モルモット全 血 + 感作モルモッ ト血清 + OT		健常モルモット全 血 + 生理的食塩水 + OT	
	混合直後白血球数 2750			
	白血球数	減少率	白血球数	減少率
No. 2	1950	-29.1%	2650	- 3.6%
No. 4	2000	-27.3%	2600	- 5.5%
No. 6	1950	-29.1%	2650	- 3.6%
No. 7	1700	-39.0%	2600	- 5.5%
No. 9	1900	-30.9%	2850	+ 3.6%

第 3 表 抗血清加温の L. L. に及ぼす影響

(56°C, 3時間加温抗血清の L. L. に及ぼす影響)

a) 56°C, 3時間加温抗血清で行った OT 感作血球凝集反応

動物番号	血清稀釈倍数	2	4	8	16	32	64	128	256
	No. 2	2	2	2	1	1	1'	0	0
No. 4	2	2	1'	0	0	0	0	0	
No. 6	2	2	2	1	1	1'	0	0	
No. 7	2	1	1	1	1'	0	0	0	
No. 9	2	1	1	1	1'	0	0	0	

b) 同血清を用いて行つた L. L. の成績

(血清は 4 倍稀釈にして行つた)

動物番号	健常モルモット全血+感作モルモット血清+OT		健常モルモット全血+生理的食塩水+OT	
	混合直後白血球数 4100			
	白血球数	減少率	白血球数	減少率
No. 2	3550	-13.4%	4000	-2.4%
No. 4	2500	-39.0%	3800	-7.3%
No. 6	3250	-18.3%	3750	-8.5%
No. 7	2850	-30.5%	3600	-12.2%
No. 9	2900	-29.3%	3900	-4.9%

第 4 表 抗血清加温の L. L. に及ぼす影響

(70°C, 10分加温抗血清の L. L. に及ぼす影響)

a) 70°C, 10分加温抗血清で行つた OT 感作血球凝集反応

動物番号	血清稀釈倍数	2	4	8	16	32	64	128	256
	No. 2	0	0	0	0	0	0	0	0
No. 4	0	0	0	0	0	0	0	0	
No. 6	0	0	0	0	0	0	0	0	
No. 7	0	0	0	0	0	0	0	0	
No. 9	0	0	0	0	0	0	0	0	

b) 同血清を用いて行つた L. L. の成績

(血清は 4 倍稀釈にして行つた)

動物番号	健常モルモット全血+感作モルモット血清+OT		健常モルモット全血+生理的食塩水+OT	
	混合直後白血球数 2800			
	白血球数	減少率	白血球数	減少率
No. 2	2600	-7.1%	2750	-1.8%
No. 4	2700	-3.6%	3050	+8.9%
No. 6	2550	-8.9%	2950	-5.3%
No. 7	2700	-3.6%	2750	-1.8%
No. 9	2650	-5.4%	2600	-7.1%

第 5 表 抗血清吸収の L. L. に及ぼす影響

a) 使用抗血清の OT 感作血球凝集反応

動物番号	血清稀釈						
	2	4	8	16	32	64	128
No. 1	2	2	1	1	1	1	0
No. 2	2	2	1	1	1	0	0
No. 4	2	2	1	0	0	0	0
No. 5	2	2	1	1	1	0	0
No. 6	2	1	1	1	1	0	0

b) 1回吸収血清で行った L. L.

動物番号	血清稀釈 2 倍			
	混合直後白血球数 4200			
	10倍 OT		生理的食塩水	
	白血球数	減少率	白血球数	減少率
No. 1	3000	-28.6%	4150	- 1.2%
No. 2	3650	-13.1%	3950	- 6.0%
No. 4	3500	-16.7%	3950	- 6.0%
No. 5	3400	-23.5%	4100	- 2.4%
No. 6	3400	-23.5%	3800	- 9.5%

第 6 表 抗血清吸収の L. L. に及ぼす影響

a) 1回吸収後の OT 感作血球凝集反応

動物番号	血清稀釈 4 倍	
No. 1	1	
No. 2	1	
No. 4	0	
No. 5	1	
No. 6	1	

b) 2回吸収血清で行った L. L.

動物番号	血清稀釈 4 倍			
	混合直後白血球数 4200			
	10倍 OT		生理的食塩水	
	白血球数	減少率	白血球数	減少率
No. 1	2650	-36.9%	4100	- 2.4%
No. 2	3700	-11.9%	3900	- 7.1%
No. 4	3850	- 8.3%	4100	- 2.4%
No. 5	2800	-33.3%	4250	+ 1.2%
No. 6	2800	-33.3%	4250	+ 1.2%

第 7 表 抗血清吸収の L. L. に及ぼす影響

a) 2 回吸収後の OT 感作血球凝集反応

b) 3 回吸収血清で行つた L. L.

血清稀釈 動物番号	8 倍
No. 1	1'
No. 2	1'
No. 4	0
No. 5	1'
No. 6	1'

血清稀釈 動物番号	8 倍			
	混合直後白血球数 2300			
	10倍 OT		生理的食塩水	
	白血球数	減少率	白血球数	減少率
No. 1	2200	- 4.3%	2350	+ 2.2%
No. 2	2500	- 8.7%	2250	- 2.2%
No. 4	2400	+ 4.3%	2300	0%
No. 5	2500	- 8.7%	2450	- 6.5%
No. 6	2400	+ 4.3%	2400	+ 4.3%

第 8 表 感作モルモット腹腔内滲出細胞と感作モルモット血清及び OT による L. L.

血清添加の有無 滲出細胞採集動物番号	腹腔内滲出細胞+血清+OT					腹腔内滲出細胞+生理的食塩水+OT				
	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5	No. 1	No. 2	No. 3	No. 4	No. 5
混合直後細胞数	4800	6800	1900	3850	5000	4800	6800	1900	3850	5000
1 時間値 {細胞数	1600	3700	1350	2800	3550	4350	5500	1750	3600	4500
減少率	-66.7%	-45.6%	-28.9%	-20.7%	-29.0%	- 9.4%	-19.1%	- 7.9%	- 6.5%	-10.0%
2 時間値 {細胞数	1400	3700	700	2250	3000	3800	5450	1550	2800	3750
減少率	-70.8%	-45.6%	-63.2%	-41.6%	-40.0%	-20.8%	-19.9%	-14.7%	-27.3%	-25.0%

第 9 表 感作モルモット腹腔内滲出細胞と健常モルモット血清及び OT による L. L.

血清添加の有無 滲出細胞採集動物番号	腹腔内滲出細胞+血清+OT				腹腔内滲出細胞+生理食塩水+OT			
	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9	No. 6	No. 7	No. 8	No. 9
混合直後細胞数	3900	4250	6200	4250	3900	4250	6200	4250
1 時間値 {細胞数	3900	4100	5950	3950	3750	4000	5800	4400
減少率	0%	- 2.3%	- 4.3%	- 7.1%	- 3.8%	- 5.9%	- 6.5%	+ 3.5%
2 時間値 {細胞数	3000	2850	5800	3700	3150	3300	5600	3650
減少率	-23.1%	-30.5%	- 6.5%	-12.9%	-19.2%	-22.4%	- 9.7%	-14.1%

第 10 表 健常モルモット腹腔内滲出細胞と感作モルモット血清及び OT による L. L.

感作海狸番号		No. 2	No. 3	No. 5			
混合直後細胞数		4 2 0 0					
添 加 物	10倍 T O	生 理 的 食 塩 水	10倍 O T	生 理 的 食 塩 水	10倍 O T	生 理 的 食 塩 水	
1 時間値	細胞数	3500	3950	2900	3800	3250	4000
	減少率	-16.7%	- 5.1%	-31.0%	- 9.5%	-22.6%	- 4.8%
2 時間値	細胞数	3100	3850	2550	3500	2750	3850
	減少率	-26.2%	- 8.0%	-39.3%	-16.7%	-34.5%	- 8.3%

第 11 表 感作ウサギ血清の抗体価及び Römer 反応

a) OT 感作血球凝集反応

動物 \ 血清稀釈	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096
No. 3	3	3	3	3	3	2	1	1	0	0	0
No. 4	3	3	3	3	3	2	2	1	0	0	0
No. 6	3	3	3	3	2	2	1	1	0	0	0
No. 7	3	3	3	3	3	3	2	2	1	1	0
No. 8	3	3	3	3	3	3	2	1	1	0	0

b) 井上菌凝集反応

動物 \ 血清稀釈	8	16	32	64	128	256	512	1,024	2,048	4,096	8,192
No. 3	3	3	3	3	3	3	3	2	1	0	0
No. 4	3	3	3	3	3	2	1	0	0	0	0
No. 6	3	3	3	3	2	1	1	0	0	0	0
No. 7	3	2	2	1	1	1	1	0	0	0	0
No. 8	3	3	3	3	3	3	2	1	1	0	0

c) Römer 反応

動物 \ 時間 O T	24 時間		48 時間	
	10 倍	100 倍	10 倍	100 倍
No. 3	25×30 i(++)	25×28 i(++)	30×30 i(++)	24×22 i(++)
No. 4	25×32 i(++)	20×18 i(++)	30×33 i(++)	30×28 i(++)
No. 6	20×27 i(++)	15×17 i(+)	22×31 i(++)	14×15 i(+)
No. 7	16×22 i(++)	10×13 i(+)	18×22 i(++)	10×16 i(+)
No. 8	19×23 i(++)	15×18 i(++)	21×25 i(++)	17×20 i(++)

註： 1) 表中の発赤の大きさはmm
で表す

2) i は硬結の程度を示す

第 12 表 (a) 健常モルモット腹腔内滲出細胞と感作ウサギ血清
及び OT による L. L.

ウサギ番号	No. 3		No. 4		No. 6		No. 7		No. 8		
混合直後 細胞数	3300										
添加物	OT	生食水	OT	生食水	OT	生食水	OT	生食水	OT	生食水	
1 時間値	細胞数	1700	3550	1650	3650	2250	3650	2350	3700	1500	3600
	減少率	-48.5%	+7.6%	-50.0%	+10.6%	-30.0%	+10.6%	-28.8%	+12.1%	-54.6%	+9.1%
2 時間値	細胞数	1750	3100	1350	3250	2400	3300	2050	3450	1750	3400
	減少率	-47.0%	-6.1%	-59.1%	-1.5%	-27.3%	0%	-37.9%	+4.5%	-47.0%	+3.3%

第 12 表 (b) 健常モルモット腹腔内滲出細胞と感作ウサギ非働
化血清および OT による L. L.

ウサギ番号	No. 3		No. 4		No. 6		No. 7		No. 8		
混合直後 細胞数	3300										
添加物	OT	生食水	OT	生食水	OT	生食水	OT	生食水	OT	生食水	
1 時間値	細胞数	3100	3250	3400	2950	3600	3500	3750	3300	3500	3250
	減少率	-6.1%	-1.5%	+3.3%	-10.6%	+9.1%	+6.1%	+13.6%	0%	+7.6%	-1.5%
2 時間値	細胞数	2900	3100	3300	3200	3650	3250	3500	3500	3300	3400
	減少率	-12.1%	-6.1%	0%	-3.0%	+10.6%	-1.5%	+6.1%	+6.1%	0%	+3.3%