痘苗點眼による結膜下組織の變化.

On the changes in the subconjunctival tissue caused by corneal administration of small pox vaccine.

金 田 靖 Yasushi KANADA.

(昭和25年11月15日原稿受附)

網内系が痘毒免疫に関係することの實驗は少からず、例へば藤沢（昭6）は家兎に2週間以上の間隔をおいて痘苗を再接種して完全免疫を証明したのち、放血致死せしめ、肺、腎、睪丸の組織片を培養し、痘毒が正常組織片内では増強するにかなはず、かく免疫せられた組織片内では増強しないか、または稀に増強しても軽度であることを見た。即ち免疫家兎の組織はその体液から分離しても、明かに免疫性を有する。但し氏は痘毒滅殺素の生産母地は網内系であると述べた。木村等（1931）は家兎の背部皮膚に痘苗を接種したのち、経時的に脾の薄片を培養し、培養組織の痘毒滅殺素が培養2日後既に証明せられ、4—6日後の間に最も多いことを見た。鳥瀉（昭19）は血中の抗感染物質の増加に先じて、網内系細胞の抗感染作用増強があるのを見た。その他、Hoen等（1926）、Goldmann（1928）、Zurkzoglin と Joffe（1929）等は家兎と天竺鼠で網内系を墨汁で封鎖しておけば、接種した病毒が容易に血液中に現れることを認め、痘毒が特に網内系細胞に親和性を持つと云つた。Jungeblut（1930）は網内系細胞は抗原を取り入れ、これを無毒とし、抗体を産生し、網内系細胞が刺戟されれば抗体の産生は増すと述べた。しかるに線組系細胞の痘毒に対する反応の實驗は少い。注意すべきは鳥瀉（昭19）の實驗で、氏は家兎の皮膚に種痘し、2週間後に牛痘苗を以つて作つた煮沸免疫元を左眼に45日間毎日連続点眼し、最後の点眼から5日目に左右の角膜を亂切し、その上に痘苗を塗りつけたところ、右眼は強い感染を起したが、煮沸免疫元を点眼した左眼には感染が起らないことを見た。即ち免疫元を点眼した角膜部分が特に強く免疫性を得たのである。種痘組織を鏡檢したものには森島（昭23）があり、氏は家兎の側腹部皮内に種痘し、局所反応は特殊白血球の局所血管への集中と組織内への遊出とに始まり、遊出した白血球の一部は崩壊し、大部分は類リンパ球や線維細胞になると云つた。但しその細胞轉化の説には異論がある。大原（昭25）は痘苗を天竺鼠に靜注したり、二十日鼠をビールス

性脳炎に罹患せしめたりなどして、身体所々の線組系細胞を観察し、それが賦活せられたり、萎縮に陥つたりすることを見た。そこで私は天竺鼠に痘苗を点眼し、アレルギー反応時の結膜下組織の変化を詳しく調べた。

I. 材料と方法.

先づ天竺鼠の右眼に予め2%塩酸コカインを点眼して角膜の知覚を鈍麻せしめ、術者の左示指を動物の下眼瞼に、助手の右示指を上眼瞼にあて、眼瞼を開く様にして眼球を上下眼窩縁にて強く圧迫して固定し、 $\frac{1}{2}$ 注射針をもつて角膜中央部に2條づつ互に直角に交叉する格子状の搔傷を作り、池田(昭9)が痘苗の効力検定を行ふため天竺鼠角膜に接種した痘苗稀釈の例に倣ひ、大阪大学微生物研究会製痘苗の500倍生理的食塩水稀釈液を15分間に4回点眼し、その間内眼角を軽く脱脂綿をもつて圧迫した。点眼後12, 24, 48時間, 5, 8, 12日に両眼の結膜円蓋部の結膜下組織を採り、生理的食塩溶液で作つた1万倍中性赤溶液に37°Cにて15—20分入れ、速かに諸細胞の空胞と粒子を検鏡した。他方同様の組織を載せガラスの上に拵げ、ホルマリンで固定し、鐵ヘマテインラックで染めたほか、眼球を摘出して、10%ホルマリンにて固定し、チェロイデンに包埋して厚さ20 μ の水平断切片を作り、同じ方法で染めた。

次に初回と同じ要領により、14日後再び同眼に搔傷点眼し、同時に対照として左眼にも搔傷点眼し、12, 24, 48時間, 5, 8, 14, 30, 60, 90日後に初回点眼の場合と同様にして結膜下組織を検べ、初回点眼の場合と比較研究した。

そのほか、初回搔傷痘苗点眼後30, 60, 90日に再び両眼に搔傷点眼し、同時に痘苗を右側腹部に0.5cc皮下注射し、24時間後に結膜下組織のほか、注射部と対照として他側腹部の皮下組織を採つて、前述の方法で調べた。

搔傷点眼後の肉眼的の変化としては、初回では点眼後間もなく眼瞼と球結膜に浮腫と充血が現れるが、約3時間でこれらは消退した。しかし多くは点眼後24時間で角膜の搔傷部が線状に潤濁し始め、2日後に全角膜が表面粗となつて軽く潤濁し、4—8日後は潤濁が最も強く、パンヌスを生じ、9日後頃から再び恢復し始め、2週後は潤濁は極めて軽く、パンヌスも漸次輕快し、18—19日後に瞳孔縁のみ僅かに濁り、3週後には角膜は殆んど旧態に復した。角膜の変化の最も強い4—8日後に4匹斃死したことを附言する。

然るに14日後再び搔傷点眼した場合は角膜の潤濁は、両眼共に2日後に始まり、右眼は初回点眼の場合に比し、角膜の変化が著しく軽く、ただ5

一7日後にやや強い。これに反し対照眼は5—6日後に初回点眼の場合と同様に強い変化を現した。但し両眼共に角膜変化の持続期間が初回点眼に比して著しく短く、点眼後12—14日で両眼共に正常に復したのである。

次に私は痘苗を稀釈せず、また角膜を搔傷することなく点眼し、搔傷点眼の場合と同様にして調べたが、この方法では肉眼的に初回と14日後の再回点眼後に著しい変化が認められなかつた。

II. 検査成績.

A. 搔傷点眼後の變化.

1. 初回点眼

先づ超生染の所見を云へば、12時間後に採取した点眼側の結膜下組織にては、組織球と線組球の胞体内に多数の橙褐色の小空胞と、少数の橙色の僅かに大きい中性赤空胞が見られ、その間に小さい不染性空胞が僅かに散在するものと、全然不染性空胞がないものがある。中性赤粒子は赤褐色の点状沈澱物として、これら空胞の間に多数にある。線維細胞にも少数の同様の中性赤空胞があり、不染性空胞は殆んど見られない。24—48時間後に採取した組織にも諸細胞に中性赤空胞は依然比較的小さく、不染性空胞も小さくて僅少である(第5図)。この状態が肉眼的変化の最も著しい5—8日後に続き、更に12日後にも及ぶ。

薄膜標本では、12時間後に線維細胞が約85%を、組織球と線組球が少しく増して何れも約6%を占め、單核球と白血球は少い。しかし組織球の群在するところもある。24—48時間後には大体同様で、5日後には組織球と線組球が減じ、單核球が僅かに殖えて約5%を、線維細胞は依然約85%を占める。8日後には單核球が再び減じ、線維細胞が約90%を占め(図1)、12日後にも同じ状態に止まる。

次に切片標本では組織球と線組球の区別し難いことが多く、12時間後には線維細胞50個に対し組織球と線組球を合したものが5個を数へる。この状態が24時間後にも続き、48時間後には組織球と線組球は線維細胞50個に対し3—5個の割に見られ、更に5日以後には前2者は数をやや減じ、12日後には線維細胞50個に対し3個を数へる。

2. 14日後再回点眼.

超生染の所見は、12時間後採取の結膜下組織の組織球と線組球に大なる中性赤空胞が増し、不染性空胞は初回点眼後と同じく数は少いが大さを増し、大なるものは中性赤空胞を遙かに凌ぐ。中性赤粒子は褐赤色の点状沈澱物として大なる空胞の辺縁に附着し、また空胞間に多数散在する。線維

細胞の胞体内にも少数の中性赤空胞と1—2個の不染色空胞があり、共に大さを増している。24—48時間後には組織球と線組球の赤染空胞は更に大さを増し、胞体に充満する。核に圧せられて帽状を呈するものもある(図6)。5日後には赤染空胞は少しく小さくなり、不染色空胞は依然として大きく、胞体の辺縁に偏在することが目立つ。10日後には中性赤空胞は更に小さくなるけれども、不染色空胞は平均して大さ不変で、胞体外へ膨出したものが多い。15日後には中性赤空胞は殆んど正常大の大きさに縮小する。不染色空胞は30日後にも依然として胞体の辺縁に膨出したもの多く(図7)。かゝる変化が60, 90日後にも続く。

薄膜標本を見れば、12時間後に線組球が目立つて増殖し10%を越え、組織球は少しく増して6%を、線維細胞は80%を示し、単核球と白血球は少い。かゝる変化が24—48時間後にも見られ、5日後には組織球と線組球が著しく減じ、線維細胞が90%を越える。30, 60, 90日後も同様である。

切片標本では12, 24, 48時間後には組織球と線組球は線維細胞50個に対し8—10個あり、5日後には減じ、10日後に至れば線維細胞50個に対し約3個を数へ、15—90日後も同様である。

3. 30, 60, 90日後再回点眼と皮下注射.

30, 60, 90日後に再回点眼を行へば、14日後再回点眼の場合の如き結膜下組織の細胞の著しい変化を見ない。即ち超生染では、諸細胞の中性赤空胞の数は多いが、形が小さく、その著しく小なるものは中性赤粒子と区別し難く、また不染色空胞を見ない(図8)。薄膜と切片標本では正常組織に比し僅かに線組球が増していることが認められた。

皮下組織には結膜下組織よりも少しく変化が強く、起生染で多数の小空胞に伍して、やや大なる空胞を見る(図2)。皮下組織の薄膜と切片標本にて線組球の僅かの増加が確められた。

B. 單純点眼後の變化.

痘苗を稀釈せず、また角膜を搔傷せずして点眼すれば、変化は大体に於て、初回、再回共に角膜を搔傷して点眼を行つた場合と同じであるが(図3—4参照)、少しく違つたところを云ふと、この場合には14日後再回点眼して48時間後に著しく増大した中性赤空胞が5日後に多分互いに癒合して不規則な形となるものが多い。8日後には中性赤空胞は小さくなる。不染色空胞は数日大きく止り、胞体の辺縁に偏在し、殊に組織球では著しく胞体から膨出したものも多く、標本観察中30分後に、その輪廓が次第に不鮮明となつたものを見た。以上の諸検査で、対照眼にはいつれの時期に

も軽い変化が認められた。

III. 考 察.

初回角膜搔傷点眼後には、結膜下組織の諸細胞の変化は弱く、中性赤で超生染すれば正常時と比べて赤染空胞のやや大きくなったものが少しく増している程度である。しかし詳しく云へば、組織球と線組球の空胞は明かに増し、線維細胞にも少数の橙褐色の小なる空胞があり、この状態が12日後まで続く。組織球と線組球の数は初回点眼12—48時間後に少しく増し、5日後には既に大体正常にもどる。

然るに再回点眼のときは、12時間後に早くも中性赤に橙黄色に染るべき大なる空胞が組織球と線組球に多数現れ、線維細胞の空胞も少数ながら大きい。而してこの変化が24—48時間後最も著しい。角膜を搔傷せず單純再回点眼の5日後には空胞が癒合してできたと思はれる不正形の空胞が見られる。何れの方法によるも8日以後は漸次空胞が縮小し、14日以後は殆んど正常大に復帰し、橙褐色を呈する。

組織球と線組球の中性赤不染性空胞は再回点眼12時間後、数は少いが大きさを増し、5日後には胞体の辺縁に偏在し、漸次胞体外へ膨出し、殊に單純再回点眼8日後に標本観察中、30分後に空胞の輪廓が著しく不鮮明となつたものを見た。

組織球と線組球は再回点眼の12—24時間後に夥しく増殖し、5日以後数を減ずる。

矢追(昭22)は皮内に痘苗再接種後に肉眼的のアレルギー反応が24時間以内に現れ、48時間で最大に達し、それから減退し、普通4—5日間持続することを見たが、私の実験でも線組系細胞の変化は、これと時間的に一致した。平田(昭22)は家兎の皮下に健康馬血清を注射し、10数時間後に組織球の群在が目立ち、その中性赤空胞は大きくなって、胞体内に充満するが、50時間後には再び小さくなり、また胞体が私共の云ふ線組球の形を取つて長い突起を出すことを見たが、線維細胞には変化を認め得なかつた。又氏(昭23)は馬血清を再注射し、組織球の中性赤空胞が少しく橙色を帯びることを認めた。最近山本(昭25)は健康馬血清による感作家兎の皮下の細胞を中性赤とヤーマス緑で生染し、生染粒子の排列様式から多くの單核球を見分け得たと述べた。しかし私共の経験ではこれ等の生染粒子の排列様式は細胞の生活中に変わり易いものであつて、これを以て常に單核球を特徴づけることはむづかしく、天野、平田、山本等の單核球の中には少なからざる組織球が加つていると思へる。

一方線維細胞から組織球や單核球の生ずることは最も普通の現象であつて、組織培養にては例へば Geiersbach (1939) が鶏胎の心臓の線維細胞の加つた培地で観察し、線維細胞が球化して組織球に変態することを見てゐる。

私の実験では再回点眼後12—48時間に組織球と線維球に著しい空胞が現れ、なほこれらの細胞に轉化しない線維細胞にも屢ば大なる空胞を見た。嘗て空胞を詳しく調べたものに Carrel と Ebeling (1926), Möllendorff (1936), Sabin (1939) 等があり、Carrel と Ebeling は鶏の線維細胞と組織球を胎兒抽出液加血漿で培養すれば空胞が大きくなり、Tyrode 氏液と Ringer 氏液では小さくなることを見、これらの空胞は細胞外液の構成如何によつて変化することを述べ、Möllendorff は家兎の線維細胞を脾エキスを加血漿で培養し、培地に KCl, 蔗糖等を添加すれば胞体内に空胞が生ずることを知り、また Sabin は抗原として赤い色蛋白質を家兎の腹腔内に注射し、身体所々の組織球の胞体内に色蛋白質から分離した染料に染る空胞が生ずることを見、色蛋白質が胞体内に見えなくなる時期と血液中に抗体が生ずる時期は一致すると述べた。

私の実験にては空胞には中性赤に染まるものと、しからざるものが見られ、殊に不染性空胞は再回点眼後に著しき変化を示し、胞体辺縁へ進み、胞体外へ膨出し、遊離する像から考へて、中性赤空胞は沢近(昭25)の見た如く、細胞が抗原を取り、これを同化しつつ抗体を作る相と解したい。細谷(昭18)は天竺鼠の皮下に葡萄状球菌精製トキソイドを注射して、1—5 cc の1回注射では血清中の抗毒素は少しも増さないにも拘らず、皮膚の免疫は注射の2週後に成立し、3週後に減退し、4週後に消失したことを見たが、私の成績はこれと大体一致し、30, 60, 90日後に再回点眼または皮下注射した場合は結膜下組織には殆んど変化がなく、注射部皮下組織にも変化は僅かである。

次に対照眼の結膜下組織に現れる変化は処理眼に比して軽い。これは鳥瀉の実験と少しく異なり、角膜を搔傷し再回点眼後の肉眼的変化は、初回点眼後の同眼の変化に比して甚だ弱いが、同時に対照眼の変化も軽く、長く続かないから、対照眼も同時に若干の免疫を獲得するものと考へられる。

IV. 結 語.

天竺鼠に痘苗を点眼し、特に結膜下線維系細胞のアレルギー反応を検べた。

1. 角膜を搔傷して痘苗を点眼するに、初回点眼後は結膜下組織に組織球

と線組球の増殖は軽いが、14日後に再回搔傷点眼すれば、それが強く現れ、5日後まで続き、8日以後は組織球と線組球の数が減じ、次第に組織像が平常に復する。

2. 結膜下組織を取つて中性赤で超生染すれば、組織球と線組球の胞体内に、初回搔傷点眼後のものでは、小なる赤染空胞が多く現れ、14日後に再回搔傷点眼したものでは再点眼の12時間後に大なる赤染空胞が多く現れる。再回点眼後の赤染空胞は24—48時間後最も多く増加し、5日後漸次縮小し、8日以後は小さくなる。線維細胞の赤染空胞も再回点眼後は大きくなる。なほ角膜を搔傷することなく14日後に再回点眼し、5日後に赤染空胞が互に癒合して不正形を呈する像を見た。

3. 14日後再回搔傷点眼して、12時間後には諸細胞に不染性の大きな空胞が少数現れ、これが再回点眼5日以後は多く胞体の辺縁にあり、胞体外へ膨出する。8日後にその空胞が胞体から將に遊離せんとする像が屢ば見られた。

4. 痘苗を初回搔傷点眼の30, 60, 90日後に再回搔傷点眼し、且つ皮下に注射し、24時間後に檢べると、結膜下組織と注射部皮下組織には著しい細胞像の変化がなく、夫々の細胞の中性赤に赤染する空胞が特に大きくない。

Author's Abstract.

Small pox vaccine was dropped on the scratched surface of the cornea of guinea pigs, and cellular studies were made on subconjunctival tissue. Observation after singular administration revealed only a slight proliferation in the histiocytes and fibrohistiocytes, while on supravital staining with neutral red, neutral red vacuoles were small in size. On the other hand when administration was repeated 14 days after the initial administration, proliferation of the histiocytes and fibrohistiocytes was remarkable, the neutral red vacuoles large in size and, although small in number, similar large vacuoles were seen in fibrocytes. Five days after the repeated administration, the neutral red vacuoles gradually declined in size, and among these vacuoles a small number of unstainable vacuoles were observed, which five days later were seen on the margin of the cell contour and gradually were seen to be excluded from the cell bodies. Repeated administration by dropping vaccine on the cornea, or by subcutaneous injection 30, 60, and 90 days after the initial administration revealed no remarkable changes in the cellular pictures of the subconjunctival or subcutaneous tissues, respectively.

文 献

Carrel, A. a. A. H. Ebeling : The fundamental properties of the fibroblast and macrophage. I. u. II. J. exp. Med. 44 (1926). — 藤澤義雄 : 痘苗の研究. 日微病誌. 25 (昭6). — **Geiersbach, U** : Über den Einfluß der Narkose (Urethan) auf Gewebekulturen. Arch. exp. Zellforsch. 23 (1939). — **Goldman, A.** Über die Bedeutung des Reticuloendothels für die Generalisierung des Vakzine virus. Zbl. Bakt. Orig. 105 (1928). — 平田もとゑ : 組織過敏反応の細胞学的研究. I. 馬血清1回注射に際する皮下組織細胞の反応. 就中組織球の感作相並に形質細胞の発生様式に関する新知見. 日血会誌. 10 (昭22). — 組織過敏反応の細胞学的研究. III. Arthus 現象惹起局所の細胞学的研究. 日血会誌. 11 (昭23). — **Hoen, E., L. Tschertkow u. W. Zippe** : Der Nachweis der Vakzine Virus im Blut durch Blockade des Retikuloendothels. Z. Hyg. 106 (1926). — 鮎谷省吾と林宏 : 各科領域に於ける化膿性疾患の細菌叢と免疫療法. 昭18. — 池田武夫 : 海狸角膜接種に依る痘苗の効力検定法. 傳研業績報告. 55 (昭9). — **Jungeblut, G. W.** : Die Bedeutung des Retikuloendothels für die Infektion und Immunität. Erg. Hyg. usw. 11 (1930). — **Kimura, R., u. Y. Fujisawa** : Pockenstudien in der Gewebezüchtung. II. Bildung des viruliziden Stoffes in vitro. Z. Immun.-forsch. 71 (1931). — **Möllendorff, W.** : Experimentelle Vakuolenbildung in Fibrozyten der Gewebekultur und deren Färbung durch Neutralrot. Z. Zellforsch. 23 (1936). — 森島秀夫 : 所謂外膜細胞増殖の本態. 日本医学. 3418 (昭23). — 大原秀敏 : 死菌又は痘苗を注入せられ、又はビールス性脳炎に罹りたる動物の線組系の変化. 日組録. 1 (昭25). — **Sabin, F. R.** : Cellular reaktion to a dye-protein with a concept of the mechanism of antibody formation. J. exp. Med. 70 (1939). — 澤近宏 : 組織細胞の細菌胞食の比較観察. 日組録. 1 (昭25). — 鳥瀧隆三 : 免疫元及び免疫方法. 昭19. — 山本寛 : 単離細胞 (哺乳類) に於ける過敏反応. 日血会誌. 13 (昭25). — 矢追秀武 : 種痘. 昭22. — **Zurunkzoglin, S., u. N. Joffe** : Über den Einfluß des Retikuloendothels auf die Infektion und Antikörperbildung bei Vakzine virus. Zbl. Bakt. Orig. 110. Beih. 220 (1929).

附 圖 の 説 明

- 図1〜4は薄膜標本, 鉄ヘマテインラック染色. 拡大160倍.
 図1. 結膜下組織. 初回搔傷点眼. 8日後.
 図2. 皮下組織. 30日後再回搔傷点眼. 24時間後.
 図3. 結膜下組織. 14日後再回單純点眼. 24時間後.
 図4. 結膜下組織. 90日後再回單純点眼. 24時間後.
 図5〜8は中性赤にて生染. 図は上から下へ線維細胞, 線組球, 組織球を示す.
 図5. 結膜下組織. 初回搔傷点眼. 24時間後.
 図6と7. 結膜下組織. 14日後再回搔傷点眼. 24時間と30日後.
 図8. 結膜下組織. 30日後再回搔傷点眼. 24時間後.

Explanation of the Plate.

Fig. 1—4: Staining of the spreads with iron-hematein-lake. 160×.

Fig. 1. Subconjunctival tissue. 8 days after an administration of vaccine on scratched surface of cornea.

Fig. 2. Subcutaneous tissue. 24 hours after the second administration which was

repeated 30 days after the initial administration on scratched surface of cornea.

Fig. 3. Subconjunctival tissue. 24 hours after the second simple administration which was repeated 14 days after the initial administration by dropping vaccine on cornea.

Fig. 4. Subconjunctival tissue. 24 hours after the second simple administration which was repeated 90 days after the initial administration by the same method as above.

Fig. 5—8: Supravital staining with neutral red. From up to down: fibrocyte, fibrohistiocyte and histiocyte.

Fig. 5. Subconjunctival tissue. 24 hours after an administration of vaccine on scratched surface of cornea.

Fig. 6. a. 7. Subconjunctival tissue. 24 hours and 30 days after the second administration which was repeated 14 days after the initial administration.

Fig. 8. Subconjunctival tissue. 24 hours after the second administration which was repeated 30 days after the initial administration.

金 田 靖

1

2

3

4

5

6

7

8