IN VITRO STUDIES ON IMMUNOLOGICAL MECHANISM OF ANTIGENIC INFORMATION TRANSFER OF THE TONSIL.

AKIO IMAI, M.D.

Département of Otolaryngology, Niigata University School of Medicine Niigata

(Director: H. Ino, M.D.)

It is important to make the immunological role of the tonsil clear, comparing the responses of tonsil with those of the spleen and lymphnodes which are known as peripheral lymphatic organs.

These experiments were conducted to learn whether the antigenic information in the tonsil induced the antibody formation of another lymphatic organs. The experimental procedures are as follows:

- 1) Adult rabbits were sensitized intravenously and peritonsillarly with SRBC in vivo, and tonsil, spleen and lymphnode cells were cultured in vitro. Simultaneously, non-sensitized spleen cells were cultured with sensitized tonsil cells, with sensitized spleen cells and with sensitized lymphnode cells.
- 2) 4 days after, the antibody forming cells (plaque forming cells) were measured by Jerne's hemolytic plaque technique.

The following conclusions were drawn from this study:

- 1) Live cells of 42% were harvested after 4-day culture.
- 2) PFC number per 10^6 wore away to $1/2-1/10$, in both single culture and mixed culture.
- 3) On the whole, mixed culture was inclined to increase its number of PFC.
- 4) In the group of one-time i. v. sensitization, only IgM-PFC of tonsil increased in number in mixed culture.
- 5) In the group of repeated i. v. sensitization, every organ had the tendency of increase in number of PFC.
- 6) In the group of peritonsillar sensitization, a small number of PFC was recognized in tonsil. Especially none of IgM-PFC was found in single culture, but mixed culture resulted in appearance of PFC.

Discussions were done on the mechanism of the increase in number of PFC in mixed culture, and the ability of transfer of antigenic information of the tonsil.

A78—0528. 52060

細胞培養による扁桃の抗原情報伝達系に関する研究

新潟大学医学部耳鼻咽喉科教室（主任：猪初男教授）

今井昭雄

緒言

近年免疫学の発展に伴ない、扁桃の免疫機能に関する研究が種々行われている。著者らも既に扁桃の免疫学的

位置、局所免疫能に関する研究成績から、脾臓、リンパ節の免疫能と比較検討して、扁桃を局所免疫能を営む末梢性リンパ組織としてとらえてきた。¹⁾²⁾³⁾⁴⁾

特に最近のリンパ球の研究は、細胞培養、細胞学的検索技術の向上に伴って急速に発達し、T-cell, B-cell 両者の起源や機能並びに両者の相互作用に関する報告は枚挙にいとまがない。しかし T-cell, B-cell の機能についてはいまだ問題が残されており、今後の研究に俟つ点が多い。

扁桃における T-cell, B-cell およびマクロファージの相互作用についてもいまだ定説はない。また、ヒトにおける液性抗体産生に関する中枢性リンパ組織（鳥類のファブリシウス嚢に相当する器官、家兎では虫垂にその働きを認めている報告がある⁵⁾）の存在が確認されていない現在、扁桃を始めとする腸管付随リンパ組織の機能解明がいそがれる。

扁桃は消化管上端口狭部に位置し、外来刺激に常にさらされ、慢性炎症を有し、遷延感作の状態にあるという特徴をもち、他の末梢性リンパ組織である脾臓やリンパ節と違った反応態度を示すものと推察される。

外部から取り込んだ抗原刺激に対する、個々のリンパ組織の反応様式については既に報告したが、個々のリンパ性臓器が抗原刺激に反応するとともに、この情報を他

のリンパ組織へ伝達し、全身的に影響を与える能力、様式に違いがあるのではないだろうかという点から扁桃の特徴をとらえてみようと考え、実験動物として家兎を用いて次のような実験を行った。すなわち、抗体産生細胞の産生母地として脾臓を選び、正常脾臓細胞を培養し、これに感作された扁桃細胞を混合して Jerne の抗体ブラク法で、抗体産生細胞数の変化をみた。同時に、感作された脾細胞、リンパ節細胞についても同様の方法で培養し、扁桃細胞と比較した。

実験材料および実験方法

- 1) 実験スケジュール
- 2) 実験動物
- 3) 抗原
- 4) 感作方法
- 5) 血清抗体価の測定
- 6) 培養条件
- 7) 細胞浮遊液調整法
- 8) 培養細胞の採取
- 9) 抗体産生細胞 (PFC) の測定
- 10) 混合培養群における PFC の換算、比較法

PROCEDURE

図 1

1) 実験スケジュール (図1)

感作動物の扁桃細胞, 脾細胞, リンパ節細胞と, 非感作正常脾細胞を採取, 単独培養群 (Single Culture) と混合培養群 (Mixed Culture) および Control の7種の組合せで培養を行った.

培養4日目に各々について Jerne の hemolytic plaque technique による抗体産生細胞数を算定比較した.

2) 実験動物

成熟白色家兎 (体重 2 kg程度)

3) 抗原

補体結合反応用羊血球 sheep red blood cell, SRBC (東芝化学 K.K.)

使用前に生理食塩水で3回洗浄し, 生理食塩水で25%赤血球浮遊液として使用.

4) 感作方法

(i) 静注感作群: 1回量 2ml~10ml, 1回~6回 (RABBIT No. 1~No. 20)

(ii) 扁桃周囲感作群: 1回量両側へ0.5mlずつ, 1回~3回 (RABBIT No. 21~No. 24)

ネブプタール麻酔下に口腔内より扁桃実質を通して扁桃

周囲へ局注.

感作は原則として週1回とした.

5) 血清抗体価の測定 (血球凝集反応)

10倍から倍数希釈した血清に0.5%羊血球生食浮遊液を等量加え, 室温に一夜放置後判定⁸⁾

6) 培養条件

(i) Medium: Eagle MEM, glutamine, 10%正常ウサギ血清 (NRS), SM 100 μ g/ml, PC-G 100unit/ml, PH 7.2⁹⁾

(ii) 細胞濃度: 10×10^6 /ml に細胞浮遊液を調整, 直径9cmおよび2cmのガラスシャーレに10ml, 2mlずつ入れて培養.

0.7×10^6 /ml~ 34×10^6 /ml の濃度で各細胞を培養し4日後の細胞数を測定して, その絶対数および生存率を総合すると, 細胞濃度の低い培養はバラツキが大きく, 細胞濃度が高くなると効率が悪くなる. したがって 10×10^6 /ml 前後の細胞濃度による培養を至適濃度とした.⁸⁾ しかし, 扁桃組織から細胞を採取する場合は, 十分な細胞数が得られず, 扁桃単独培養群では, 0.7×10^6 /ml~ 4.5×10^6 /ml 平均 2.3×10^6 /ml 程度の細胞数が得られた.

HEMOLYTIC PLAQUE ASSAY, JERNE

図 2

(四) CO₂ 5%, 37°C, 水蒸気飽和, 細胞培養恒温器で静置培養. 培養液の交換を行わずに4日間培養した後, 抗体産生細胞の検定を行った. 培養を4日間としたのは *in vitro* における反応が一般に4日目にピークを描くからである.⁷⁾⁸⁾

7) 細胞浮遊液調整法

脱血死せしめた感作家兎の扁桃, 頸部リンパ節(顎下部, 頸動静脈周辺部), 脾臓および非感作家兎脾臓をなるべく無菌的に摘出し, 培養液中で良く洗い周囲の結合組織, 脂肪組織を除去した後, 注射針を使つて細胞を培養液中に遊出させる. 小さな細胞塊は顕微鏡用カバーガラスにはさんで軽く圧して細胞を遊出させる. 白金メッシュ (No. 150) で濾過し, 可及的均一な細胞分画を得, 800r.p.m., 10min. の遠沈で細胞を洗い再び同 Eagle, MEM に浮遊させる. 0.1% crystal violet 加 0.1M クエン酸水溶液で有核細胞数を計測し $10 \times 10^6/\text{ml}$ となるように調整した.

混合培養群では前述の組合せに感作細胞, 非感作細胞を種々の割合に混合, 全量を 10ml または 2ml とした.

8) 培養細胞の採取

各シャーレより細胞浮遊液を採取(この際ガラス面に附着した細胞は, ゴムハケを使つて剝がした) 800r.p.m., 10min. の遠沈で細胞を集め, Hanks 液で 1ml に再浮遊し, これを原液として以下10倍, 100倍, 1000倍の希釈浮遊液を作り, 各々の 0.2ml を Jerne の hemolytic plaque technique に用いた. 同時に採取時の細胞数を算定, 培養開始時の細胞数と比較し, PFC の換算に用いた. なお, 生細胞の確認には 0.5% trypan blue を使用した.

9) 抗体産生細胞 (PFC) の測定

図2の如く Jerne の hemolytic plaque technique を多少 modify し plaque forming cell, PFC を測定した.⁸⁾⁶⁾⁹⁾

上記細胞浮遊液 0.2ml と, 25% SRBC 0.1ml を加えた 0.7% 199寒天培地 2.2ml を, あらかじめ 4ml の 1.4% 199寒天培地の base layer をしいてある直径 9cm のプラスチック Petri dish に流して重層する. これを 37°C で 60分間孵卵器に入れた後, 補体(東芝化学K.K. 製乾燥補体) 10倍希釈 Hanks 液を充分(1シャーレに約 2ml) 加え, さらに 37°C 30分孵卵器に入れ, 現われた溶血斑を数えて, IgM-PFC 数とした.

次に抗ウサギ IgG ヤギ血清(教室の鈴木作製による)の 200 倍希釈液を 2ml ずつ各シャーレに加えて, 37°C

写真1 溶血斑の拡大, 中央に形質細胞様細胞を認める.

60分間孵卵器に入れ, 前回と同様に補体を加えて30分後現われた溶血斑を数え, これと IgM-PFC との差をもつて IgG-PFC とした.(写真1) plaque の中央には形質細胞様の細胞が同定される. Hannoun et al.¹⁰⁾ は同時に細網細胞様細胞やマクロファージ様細胞もみられるが, これらは本質的に形質細胞と同じものであろうと述べている.

10) 混合培養群における PFC の換算比較法

混合培養群においては感作細胞と非感作細胞が種々の割合に混じているので, 次のような換算式を用い比較することにした.

	培養開始時 細胞数	採取時 細胞数	PFC の数
単独培養群	Ns	N's	PFCs
混合培養群	Nm	N'm	PFCm
	(感作細胞 a + 非感作細胞 b)	(a' + b')	

とすると,

単独培養群の単位細胞数当たりの PFC は

$$\frac{\text{PFCs}}{N's} \dots \dots \dots (1)$$

混合培養群の単位細胞数当たりの PFC は

$$\frac{\text{PFCm}}{N'm} \dots \dots \dots (2)$$

(2)を混合したもとの感作細胞当たりの PFC に換算すると

$$\frac{\text{PFCm}}{N'm \left(\frac{a'}{a' + b'} \right)} \dots \dots \dots (3)$$

混合培養における感作細胞数 a と非感作細胞数 b との混合比が採取時にも変わらないものと仮定して, すなわち $a : b = a' : b'$ として

$$(3) = \frac{\text{PFCm}}{N'm \left(\frac{a}{a+b} \right)} \dots\dots\dots (4)$$

$\frac{(4)}{(1)} \times 100$ をもって増加率とした。

なお、いずれの場合もまず background PFC として Control の PFC を減じてある。

Single Culture においては PFC/10⁶ は当該細胞群の抗体産生細胞数をそのまま表わしているわけであるが、Mixed Culture においては換算値であるので、実際観察される PFC ではなく、当該細胞群のみから PFC が出現したと仮定した場合の単位細胞数当たりの抗体産生細胞数ということになる。また逆に、上述の如く換算した PFC の増加分が非感作脾細胞単位細胞当たり何個かということをも $\{(4)-(1)\} \times \frac{\text{感作細胞数}}{\text{非感作脾細胞数}}$ の式により換算して検討しても、同一の傾向が得られたので、以後は前述の換算法を用いた結果を使用した。したがってこの数値からは増加の絶対数は求められず、各々の場合の増加または減少傾向を知ることになる。

実験結果

1) 培養細胞数の減少

図 3

写真 2 扁桃細胞，培養 4 日目

図 4

- 2) 培養細胞の形態
- 3) 血清抗体価
- 4) 培養4日による PFC の減少
- 5) 混合培養による PFC の変化
 - (i) 各々の実験個体の成績
 - (ii) 全体の傾向
 - (iii) 感作方法による差 (静注感作と扁桃周囲感作)
 - (iv) 静注感作群 (一回感作と多回感作による差)
- 6) IgM と IgG の関係
- 7) 細胞混合比

大きな細胞はシャーレのガラス面に付着しやすい性質を示し、マクロファージ系の細胞と思われる。一方大多数の小さな細胞は主としてリンパ球と思われ、ガラス面に付着する傾向はあまりなく、シャーレの底面近くを漂っているように見られる。

3) 血清抗体価 (図4)

SRBC の感作量および感作回数と実験動物の血清抗体価の関係はグラフの如くで、血清抗体価は感作回数とほぼ並行して上昇している。すなわち本実験における感作

表1 Rabbit No. 20 (207)
sensitization 25%SRBC 5ml×4times

	PFC/10 ⁶	At Sacrifice	After Culture	RATIO%
Spleen	Ig-M	469.92	60.00	13
	Ig-G	61.55	31.11	51
Lymphnode	Ig-M	13.52	1.39	10
	Ig-G	4.60	0.88	19
Control	Ig-M	3.64	0.34	9
	Ig-G	2.27	0.25	11

1) 培養細胞数の減少 (図3)

10×10⁶/ml で培養し経時的に細胞数の減少をみると、培養日4日で平均42%の生細胞が採取できた。この際混合培養群では、混合した両細胞の減少が起こっているわけであるが、最初に混合した時の比率が変わらないものと仮定した。

2) 培養細胞の形態 (写真2)

低倍率の倒立顕微鏡で観察すると、培養当初から細胞は少数の大きな細胞と多数の小さな細胞に大別される。

表 2

EXPERIMENTAL RESULT (PFC NUMBER / 10⁶)

RABBIT NO.	SENSITIZATION i.v. p.t.	TITER	TONSIL				SPLEEN				LYMPHNODE			
			Ig-M		Ig-G		Ig-M		Ig-G		Ig-M		Ig-G	
			SINGLE	MIXED	SINGLE	MIXED	SINGLE	MIXED	SINGLE	MIXED	SINGLE	MIXED	SINGLE	MIXED
1 (109)	10X1	20		0.15		1.73		3.68		0.38		4.03		1.65
2 (112)	10X1	80	7.50	2.00	10.83	1.00	0.45	0.75	2.21	0.75	1.78	0.97	0.67	1.91
3 (113)	10X1	20	4.00	9.45	3.60	6.27	7.52	4.11	7.43	6.24	27.74	5.93	5.60	4.65
4 (114)	10X1	20					4.97	5.43	1.44	0.55	1.91	2.34	1.86	0.69
5 (115)	10X1	20	0.64	11.72	0.22	5.74	30.56	12.48	25.00	9.82	1.95	0.29	7.32	3.65
6 (116)	10X1	40	4.17	7.79	0.00	1.90	3.43	0.93	3.91	0.45	0.25	1.12	0.88	0.56
7 (117)	2X3	320	0.63	3.67	0.16	9.75	122.77	70.71	165.30	6.28	7.44	2.46	3.65	
8 (118)	2X5	320	0.56	15.05	0.56	2.21	70.25	15.63	12.40	7.73	1.71	14.39	5.43	10.86
9 (119)	2X5	160	0.56	8.82	0.56	7.04	16.23	78.85	4.82	70.49	2.31	17.43	0.78	2.15
10 (120)	2X3	320	0.71	0.75	1.79	2.36	30.92	25.36	8.88	47.48	1.06	12.43	2.11	3.87
11 (121)	2X4	640	6.67		3.33		24.00	10.11	19.70	42.89	1.45	13.45	1.08	7.52
12 (123)	5X3	1280	14.29	1.49	0.00	4.46	31.67	56.50	1.88	11.58	1.43	5.68	5.31	3.89
13 (125)	5X3	1280	2.50	0.00	12.50	0.00	7.14	15.56	4.29	5.92	0.00	2.27	0.30	1.15
14 (126)	5X6	2560	0.00	1.81	1.25	1.81	10.00	14.88	20.77	25.66	0.25	0.00	1.75	1.50
15 (127)	5X6	2560	2.00	0.00	0.00	0.00	7.50	13.68	37.50	137.90	0.56	0.00	3.33	0.86
16 (128)	5X6	640	0.00	0.00	0.00	0.26	10.40	4.30	67.05	50.56	0.99	0.14	2.91	3.60
17 (128)	10X1	80	8.22	0.27	0.67	0.27	0.44	2.19	0.04	0.81	0.67	0.08	0.32	0.17
18 (205)	10X1	40	0.00	0.00	0.00	1.50	6.12	0.42	4.08	1.26	3.65	2.86	9.27	2.00
19 (206)	10X3	160					0.95	0.96	2.38	1.90	1.58	0.56	0.00	2.78
20 (207)	6X4	640	0.00	2.33	0.28	1.74	80.00	40.56	31.11	70.58	1.39	1.21	0.88	1.21
21 (122)	2X1	20	0.00	0.00	0.00	0.43	2.96	9.61	1.84	2.90	11.74	26.69	7.92	6.74
22 (124)	2X1	20	0.80	7.90	0.00	1.94	5.32	7.86	0.32	2.67	4.78	16.08	0.22	0.33
23 (201)	1K2	320	0.80	0.00	3.33	2.15	0.43	0.00	4.70	16.64	0.83	0.16	19.88	32.82
24 (202)	1K3	640	0.00	0.00	0.00	0.00	0.22	0.00	1.40	8.19	0.09	0.29	3.36	1.24

SENSITIZATION : 25%SRBC m: 3 times
i.v. : intravenous injection
p.t. : peritoneal injection
TITER : serum antibody titer (hemagglutination)

CHANGES OF PFC NUMBER IN MIXED CULTURE

図 5

図 6

条件では、血清抗体価は SRBC の感作総量の増加によるよりは、感作回数を増やすことにより上昇することがわかる。

4) 培養4日による PFC の減少 (表1)

感作動物の培養細胞の PFC 出現は培養4日間で $1/2 \sim 1/10$ に減少した。また表に明らかなように IgM-PFC の減少にくらべて IgG-PFC の減少が少ないのは、免疫学的記憶と関係があるものと思われる。

5) 混合培養による PFC の変化

(i) 各々の実験個の成績 (表2, 図5)

各感作組織単独培養による単位細胞数当たりの PFC と、実験方法10) で示した計算式にしたがって換算した混合培養による単位細胞数当たりの PFC を対比してまとめた。

混合培養による増加分は、感作臓器に存在していた SRBC に対する抗原認識細胞 antigen reactive cell, ARC が非感作脾臓の抗体産生前駆細胞 antibody forming cell-precursor, AFC-P と反応して抗体産生細胞 antibody forming cell, AFC の増加をもたらす、plaque として出現したものと考えられる。しかし混合培養群の値が単独培養群のそれより減少している例もかなりあった。この PFC の増加と減少が何を意味するかについては後述する。

また少数例ではあるが特に扁桃において、単独培養群で PFC の出現をみないのに、混合培養群で PFC を観察したものや、両群ともに PFC の出現を見なかつた例 (扁桃周囲感作群に多い) があつた。

後の考按で述べるように、混合培養による PFC の増加、減少の意義づけは難しく、一概に論ずることはできない。したがって個々の症例についての解釈は困難となり、数を重ねてその傾向を知る他はない。そこで平均をとっていくつかの項目について検討してみた。

(ii) 全体の傾向 (表3, 図6) (RABBIT No. 1~No.

表3 Mean

	PFC/ 10^6	Single	Mixed	RATIO%
Tonsil	Ig-M	2.12	3.88	183
	Ig-G	1.86	2.50	133
Spleen	Ig-M	15.43	18.90	122
	Ig-G	14.85	26.32	177
Lymphnode	Ig-M	3.06	5.68	186
	Ig-G	3.56	4.14	116

表4 Intravenous (i.v.) and Peritonsillar (p.t.) Sensitization

Sensitization		PFC/ 10^6	Single	Mixed	RATIO%
i.v.	Tonsil	Ig-M	2.61	4.32	166
		Ig-G	2.10	2.83	135
	Spleen	Ig-M	18.36	21.87	119
		Ig-G	17.54	30.46	174
	Lymphnode	Ig-M	3.00	4.65	155
		Ig-G	2.65	2.91	110
p.t.	Tonsil	Ig-M	0.00	1.98	∞
		Ig-G	0.83	1.13	136
	Spleen	Ig-M	2.23	4.37	196
		Ig-G	2.07	5.60	271
	Lymphnode	Ig-M	3.36	10.80	321
		Ig-G	7.85	10.28	131

図 7

24)

扁桃, 脾臓, リンパ節ともに単独群にくらべて混合培養群の方が IgM, IgG のいずれも増加している。増加率 Ratio は単独群を 100 とした時の割合を表わしたものである。PFC の絶対数は脾臓で一番多く, リンパ節では脾臓の約 $\frac{1}{2}$ と低値を示し, 扁桃はさらに低値を示す。増加率は扁桃の IgM, リンパ節の IgM とともに高く, 扁桃・リンパ節は良く似たパターンを示している。

(四) 感作方法による差(静注感作と扁桃周囲感作)(表 4, 図 7)

静注感作 i.v. (RABBIT No. 1-No. 20) では, PFC の絶対数はやはり脾臓に多く, 扁桃とリンパ節では絶対数, 率ともに似たような態度をとっている。これに対して扁桃周囲感作 p.t. (RABBIT No. 21-No. 24) では, 絶対数においては扁桃, 脾臓, リンパ節の順に多くなり, 特に扁桃の IgM-PFC は単独培養群では検出できず, 混合培養群で出現している。したがって増加率では扁桃の IgM-PFC は無限大の増加を示し, 次いでリンパ節の IgM-PFC となった。頸部リンパ節を実験に供しているのでリンパ節への影響が大きくなるのはうなずける。しかし, 扁桃実質を通して扁桃周囲へ, 場合によっては扁桃実質内へ抗原 SRBC を注射したにも拘らず, 扁桃における PFC の少ないことが注目される。これは SRBC の抗原性や, 抗原情報の流れに関係があるように思われる。また一回の感作量が限られていること, 感作

回数が少ないこと等も原因しているものと考えられる。

(四) 静注感作群 (RABBIT No. 1-No. 20) 一回感作 one-time Sensitization と多回感作 repeated Sensitization による差(表 5, 図 8)

一回感作では, 扁桃 IgM-PFC 以外の全ての PFC はむしろ減少の傾向を示した。(単独培養群100に対して混合培養群38~68%)しかし, 扁桃 IgM-PFC のみは増加傾向(213%)を示したことは興味深い

多回感作では, いずれも混合培養により増加傾向を示した。増加率ではリンパ節に IgM-PFC おいて 397% の高値を示し, 前述扁桃周囲感作における IgM-PFC 増加率 321% とともにリンパ節の特徴を示すものと考えられる。

6) IgM と IgG の関係

血清抗体価と IgM, IgG の関係を検討した。各々の症例で IgM と IgG を比較しても感作条件がそれぞれ異なるので, これを $\text{IgM} > \text{IgG}$, $\text{IgM} = \text{IgG}$, $\text{IgM} < \text{IgG}$ の

表 5 Intravenous Sensitization
one-time and repeated Injection

Sensitization		PFC/10 ⁶	Single	Mixed	RATIO%
one-time	Tonsil	Ig-M	2.47	5.27	213
		Ig-G	3.06	2.75	68
	Spleen	Ig-M	9.68	5.28	55
		Ig-G	6.45	2.83	44
	Lymphnode	Ig-M	6.28	2.36	38
		Ig-G	3.87	2.05	53
repeated	Tonsil	Ig-M	2.68	3.80	142
		Ig-G	1.71	2.86	167
	Spleen	Ig-M	22.71	30.81	136
		Ig-G	22.54	45.34	201
	Lymphnode	Ig-M	1.48	5.88	397
		Ig-G	2.09	3.37	161

図 8

3群に大別した(図9)。血清抗体価×20では圧倒的にIgMがIgGより高値を示す例が多く、血清抗体価が高くなるとIgGの多い例が増え、×2560ではIgGの多い例がほとんど全例を占める。単独培養群でも、混合培養群でもほぼ同じ傾向を示しているが、混合培養群では低抗体価の場合も高抗体価の場合もIgM>IgG, IgM=IgG

表6 Relation Between Ig-M and Ig-G

i.v.		Tonsil Spleen Lymphnode			total
one-time	Ig-M>Ig-G	7	15	12	34
	Ig-M=Ig-G	3	0	0	3
	Ig-M<Ig-G	4	2	5	11
repeat-ed	Ig-M>Ig-G	10	13	13	36
	Ig-M=Ig-G	8	0	1	9
	Ig-M<Ig-G	10	16	16	42

図 9

図 10

$IgM < IgG$ のいずれの群にもばらつく傾向がみられる。

静注感作群を一回感作と多回感作に分け、各臓器別に $IgM > IgG$, $IgM \sim IgG$, $IgM < IgG$ の例数をまとめて表 6 に示す。一回感作では $IgM > IgG$ の症例が多く、多回感作では $IgM < IgG$ の症例がやや多くみられた。

7) 細胞混合比 (図10)

混合培養群において感作細胞数を a 、非感作脾細胞数を b とした場合、その混合比 a/b と PFC 増加との関係をグラフに示す。混合比は 1.0 以下、いいかえると感作細胞より非感作脾細胞を多くした方が増加傾向が強い。 a が b の $1/2$ もしくはそれ以下の場合 PFC の増加傾向が強いように思われる。

考 察

著者らはこれまでに扁桃の免疫生物学的な位置づけ並びに局所免疫能の有無に関していくつかの実験を行ない報告してきた。扁桃自体に果して免疫能が存在するのか、存在するとすれば何才頃までその能力を持ちつづけるのか、免疫能は全身免疫の一環をなすものなのか、あるいは局所免疫能に止まるものなのか、免疫能が存在するならば、その扁桃を摘出しても良いのか、あるいは扁桃は単なる抗原の認識をその主たる役割とし、扁桃自体には抗体の産生がみられないものなのかなどの幾多の疑問があった。

中枢性リンパ組織は抗原の認識を行ない、抗体の産生に関する指令を与えるが、抗体そのものは産生しないという点を判定の基準として扁桃、脾臓、リンパ節の SRBC に対する抗体産生能を比較した。²¹⁾ そして、扁桃には IgM , IgG 抗体産生細胞が存在すること、抗原に対する反応の仕方が末梢性リンパ組織である脾臓やリンパ節に類似していることなどが分った。また扁桃と脾臓、リンパ節間にみられる多少の差は、解剖学的な位置の差、すなわち外界と直接接しているか否かによるものと推定し、扁桃は局所免疫能を有する末梢性リンパ組織と位置づけした。

外界に接し、抗原情報を取り込み、常に炎症状態にあることが扁桃の特徴とするならば、取りこんだ抗原情報をいかに処理し、いかに保持し、効果発現臓器に反映させているのか、また同じ末梢性リンパ組織である脾臓やリンパ節とどのような点でどのような違いがあるのかを検討するため、感作ウサギの扁桃、脾臓、リンパ節細胞を体外培養し、同時に非感作同種ウサギ脾細胞を抗原情報の受け取り細胞、または効果反映細胞の母地とみなして混合培養し、抗体産生細胞の発現の様態を Jerne の

hemolytic plaque technique で測定した。

体内に取り込まれた抗原はマクロファージで処理され ARC, T-cell に認識され AFC-P, B-cell に抗原情報が伝えられ、AFC-P→AFC となり PFC として観察される。細胞培養技術の向上に伴ない最近では *in vitro* で secondary response のみならず primary response も観察できるようになった。¹²⁾ このことは脾臓、リンパ節とともに扁桃にもマクロファージ、ARC, AFC-P の三系が存在していることを意味する。¹³⁾

in vitro で感作を受けたウサギの扁桃、脾臓、リンパ節には感作抗原に対する情報が存在しているわけで、この抗原情報保持細胞の増加する時期に、感作されていないウサギの AFC-P を加えてやれば AFC-P→AFC (PFC) の過程を起こさせることができると思われる。生体内では、局所で産生された抗原認識細胞が血流やリンパ流を流れて脾臓あるいは他の AFC-P を有するリンパ組織へ到達し、そこの AFC-P と反応して AFC の増加をもたらすものと考えられるからそのモデルといえる。しかし Mishell et al.¹⁰⁾ のように *in vitro* の実験は *in vivo* では起こり得ない条件を作ること、また *in vivo* におけるような regulating system がないことなどから、*in vitro* の成績を直接 *in vivo* の成績に当てはめることはできない。

実験スケジュールの如き組合せで Single Culture と Mixed Culture を比較するとともに、扁桃、脾臓、リンパ節の反応態度を比較した。特に扁桃の特異性については、口腔部で常に炎症が存在する臓器であることの意義、輸入リンパ管がなく輸出リンパ管のみであることが抗原情報の流れにどのような意味を持つかなどについて検討した。

in vivo 感作動物において、培養開始時の PFC 数と、培養 4 日目における PFC 数を比較すると表 2 の如くで、PFC の減少は細胞数の減少 (平均 42%, 図 3) を考慮すると著しい。B-cell の lifespan が T-cell のそれより短い¹²⁾ ことによるかもしれないが、培養細胞の減少に比して PFC の減少が著しいのは、SRBC に対する AFC のみが減少しているとは考えられず培養による細胞の activity の低下が考えられる。また培養細胞の減少の著しいものほど、抗体産生能の低い傾向がみられること、¹⁴⁾ 19S 抗体の immunological memory が非常に短時間であることにも関係しているものと思われる。¹⁵⁾⁽¹⁶⁾

混合培養においては、培養により最初の細胞混合比を失わずに、両臓器細胞全体の減少が同じ割合で起きてい

るものと仮定した。実際には cell proliferation や細胞淘汰現象が起こっているのであろうが、本実験ではその点は確めることが不可能であるので、比較換算には培養当初の混合比をもつて計算した。Chapman et al.¹⁷⁾ は混合培養による個々の細胞の生存能力は、分離したものと違わないと述べている。

違った同種個体のリンパ球を混合すると、blastoid formation が起こることは以前より知られている。¹⁸⁾¹⁹⁾ またリンパ球の培養により細胞分裂や増殖が観察されることも明らかである。一方、リンパ球混合試験 (MLC) による細胞障害性、組織親和性の検定が主として移植免疫の分野で研究されている。¹⁴⁾²⁰⁾ また T-cell, B-cell の interaction についても研究がなされてきている。²¹⁾ autologous または twin からの細胞の培養には細胞間の排拒現象は起こらないが、homologous mixed culture でも、ある組合せでは PFC の抑制が認められるとの報告もある。これは同種脾細胞間の組織不適合性の現われであり、細胞表面にある組織適合抗原中主要抗原たる H-2 抗原の不適合が強く関係しているといわれている。²²⁾

しかし Mixed Culture による blastoid formation と同時に DNA 合成の刺激作用も報告されている。²⁰⁾²³⁾ Chapman & Dutton¹⁷⁾²⁴⁾ はウサギ脾細胞またはリンパ節細胞で、Bain et al. や Hirschhorn et al.²⁵⁾ はヒト末梢白血球で、混合培養による増殖反応を報告している。

実験結果で述べたように、個々の症例をとってみると混合培養により PFC の増加したものと減少したものがあつた。本実験で使ったウサギは遺伝的に無関係なものを使っており、histocompatibility の多少は不明であり、培養による cell activity の変化も個々の例について検討することはできない。

PFC の増加といつても相対的なものであり培養当初に較べれば絶対数としては減少している。このことより混合培養による PFC の変化には次の 2 つの原因が考えられる。

①単独、混合いずれも PFC は減少するが、混合することにより本来の PFC の減少がおさえられる場合。すなわち非感作脾細胞は混合による Stimulator の役割を受け持ち、感作臓器 ARC→非感作 AFC-P interaction は考えない

②感作臓器の ARC が非感作脾細胞の AFC-P と interaction を起こし、PFC の増加傾向を示す場合。

単独培養、混合培養による細胞数の変化がほぼ同じで

あつたこと、感作細胞と非感作細胞との混合比が 1:1 以下の場合 PFC の増加が大きくなること、すなわち非感作脾細胞の混合量により PFC の増加傾向が変わってくること等より①より②の route が考えられる。また①の場合 SRBC に対する PFC のみ減ることはおかしう、細胞数の減少を考慮すれば②の route が妥当といえる。

しかしそれだけでは混合培養による PFC の減少を説明することはできない。したがって個々の症例の検討よりも実験条件による群毎の傾向に重きを置かざるを得ない。

○ 静注感作群 (表 4, 図 7)

絶対量は脾臓に多く、次いでリンパ節、黒桃の順となつている。平野²⁶⁾ はマウスで SRBC 静注感作を行うと、その臓器内分布は脾臓>リンパ節>末梢血であると述べている。

本群では Single Culture, Mixed Culture とともに同じような傾向を示している。また IgM, IgG は良く似た傾向を示している。増加率は黒桃はリンパ節と良く似ており、静注感作による増度は末梢性リンパ組織の特徴を表わしている。これは前回の実験結果¹⁾ と良く一致する。

一回感作、多回感作に分けて検討すると、(表 5, 図 8) 一回感作では脾臓においても PFC は IgM 10.0/10⁶, IgG 6.5/10⁶ 程度の低値を示し、感作を重ねると脾臓で IgM, IgG とともに 23/10⁶ 程度に増加し、Mixed Culture を行うと一回感作では黒桃の IgM のみ増加傾向を示すのに対し他は全てむしろ減少を示した。このことは一回の静注感作では黒桃以外の臓器では免疫学的記憶、抗原情報の伝達はほとんど起こらないことを示している。これに対して黒桃では一回感作でも充分に抗原情報の伝達能力があることを示している。これは黒桃が口腔部に位置し、少量の抗原量でも取り込んだ情報を AFC-P に伝達しうること、いいかえれば、黒桃が特に初感染時に全身に免疫学的反応を起こさせ得る可能性が高いことを意味しているといえる。

一方感作を繰返すと、脾臓、黒桃、リンパ節ともに混合培養により PFC の増加傾向を示すが、黒桃が特に高い増加率を示すわけではなく、むしろリンパ節細胞に増加率が高く現われている。

○ 黒桃および黒桃周囲感作群 (表 4, 図 7)

黒桃の IgM-PFC が 0 を示しているが、これは培養による activity の低下によるものと思われる。Mixed Culture によつて PFC が出現するが、これも黒桃の抗原情報の伝達能力の高さを示している。増加率の∞は

Single が 0 であるための数値で、絶対値が高いわけではなく、単なる比較値としての意味にとどまる。

静注感作群と違って PFC の絶対量が扁桃>脾臓>リンパ節となっている。これはもともと頸部所属リンパ節を使用しているための結果である。脾臓に PFC が少ないのは、感作量(1回感作量および感作回数)が少ないためであるが、血清抗体価は充分に上昇しており、リンパ節の働きは非常に活発であるといえる。扁桃および扁桃周囲に SRBC を注射したにも拘らず、扁桃における PFC の出現が非常に少ない。これは抗原を SRBC にしたこと、またリンパの流れを考えればうなずける。すなわち、SRBC は肉眼的にみて扁桃炎を起こさせることはなく、臓器摘出時の観察では、周囲の軽度の充血と、SRBC による粘膜下の変色を時に認めるのみで強い変化は起こしていない。特徴的なことは頸部リンパ節の腫大であった。もし細菌性抗原等を用いれば違った結果が出たものと思われ、このことをそのまま他の抗原を用いた場合、または臨床上の知見として応用することはできない。また扁桃には輸入リンパ管がなく、扁桃自体が取り込む抗原は主として外界に接している例すなわち crypt からのものと考えられるからである。その点頸部リンパ節は、扁桃および扁桃周囲から多くのリンパ流を受けて反応しているものと考えられる。

抗原情報を伝達する能力のすぐれた扁桃は、周囲の生体内から抗原を受けるよりも crypt を通して受け取った抗原によく反応して、所属リンパ節に充分な抗原情報を伝達しているものと考えられる。²⁶⁾ また前述したように、特に一回感作といった条件でも抗原情報の伝達能力を大きく表わすことも考え合わせ、このことが扁桃が他の末梢性リンパ組織と異なる大きな特徴と考えられる。

溶血を形成する抗体産生細胞は B-cell より発生するといわれており、その増殖を調節しているといわれる T-cell の存在下に抗体を産生する。感作動物の細胞群にとっては SRBC 抗原は、一回感作群では初めての、多回感作群では既知の抗原かも知れないが、混合培養した非感作細胞群にとっては SRBC による抗原情報は初めてのものである。IgM, IgG と抗体価の関係をみた図 9 よりわかるように、抗体価の一番低い群では圧倒的に IgM が多く、また単独培養群でも混合培養群でもほぼ同じ傾向にある。感作を重ねて抗体価が上昇すると、IgM<IgG の傾向になり (in vivo ではこの傾向は著明である)、単独培養群でも混合培養群でも、やはり同じ傾向が認められる。単独群でも混合群でも同じ傾向であ

ることは、既に IgM 抗体産生または IgG 抗体産生の指令が存在するということである。すなわち、混合によって増加する PFC は感作細胞群に存在する抗原情報により決定されることを意味する。中村²⁷⁾は抗体産生母細胞の機能的方向づけが胸腺 RNA によってなされると報告している。増加分の指令は感作細胞群の ARC の働きによるということになると、ARC の多少や、活性いかによって PFC の増加をきたすということになり、混合による PFC の増加は ARC の働きを反映しているものといえる。

感作細胞群に存在している ARC または memory cell が、新しく登場する、SRBC に対する IgM または IgG 抗体を産生すべく運命づけられている AFC-P に作用して PFC の増加をきたしたのと考えられる。²⁸⁾

本実験系に当然存在しているであろうマクロファージの働きは不明である。Fishman²⁹⁾³⁰⁾はマクロファージはおそらく、抗体を産生するかどうかは別としても、抗原との共同作業によってリンパ球に特定の抗体産生をうながす指令を発するものと考えている。Cline et al.³¹⁾はヒトで、Pierce et al.³²⁾はマウスでマクロファージとリンパ球の interaction について報告している。

感作マクロファージが非感作細胞群の ARC または AFC-P との interaction を起こすこともあるうし、非感作細胞群中のマクロファージの働きが起こっていることも考えられる。³³⁾³⁴⁾しかし本実験からは個々の細胞の interaction を見ることはできず推論するのみである。

さて、近年の免疫細胞学の発展は目ざましいものがあり、T-cell, B-cell, マクロファージ等の interaction や、その起源等に関する実験的研究、臨床上の応用に至るまで、数々の研究がなされているがいまだ一定の結論は出ていない。³⁵⁾³⁶⁾³⁷⁾³⁸⁾³⁹⁾⁴⁰⁾⁴¹⁾扁桃における T-cell, B-cell の起源、分布等に関しても研究がなされ、扁桃には T-cell, B-cell の両者が存在していることが確認されている。⁴²⁾⁴³⁾

T-cell には B-cell の抗体産生を助ける helper cell または抑制する suppressor cell として働くものと、細胞性免疫にあずかるいわゆる感作リンパ球とがある。

B-cell は体液性免疫に関与し、T-cell の調節を受けて抗体を産生する細胞であるという。⁴⁴⁾⁴⁵⁾⁴⁶⁾⁴⁷⁾⁴⁸⁾マウスでは比較的この関係がはっきりしているが、ウサギでは B-cell が抗体産生細胞とはならないとの報告もあり、⁴⁹⁾リンパ球の発生に関しては種による違いが存在するといわれる。しかし、異種赤血球は thymus dependent ant-

igen とされており、T, B cell-interaction を是非必要とするといわれている。⁴⁰⁾

本実験では細胞個々の働きを決定することはできなかったが、扁桃が末梢性リンパ組織である脾臓、リンパ節と似た態度をとりながら、感作方法により他の末梢性リンパ組織と違った特徴的な抗原情報伝達能を示すことを明らかにし得たものと思う。

結 語

脾臓やリンパ節と同じ末梢性リンパ組織としてとらえてきた扁桃が、抗原情報の伝達という点でどのような違った反応態度をとるかを検討した。全体の傾向としてみると、脾臓やリンパ節と同じく混合培養により PFC の増加傾向を認めるが、許注一回感作でも高い増加率を示すこと、扁桃周囲感作では扁桃自身は強い反応を示さないが、混合培養ではやはり高い増加率を示すことなどが特徴的であった。また、扁桃周囲感作では所属リンパ節への影響が強かった。これらは扁桃が外界に接する crypt から抗原を受ける system になっていること、他の抗体産生リンパ組織たる脾臓や頸部リンパ節にその情報を伝達すること、他の組織と較べて特に初感作時にその能力が高いことなどを意味する。

扁桃は、その活動性が若年期に強いことを考えると、上気道口蓋部にあり外界からの刺激を最初に受けることによつて、その特徴的な機能を発揮するものと考えられる。

文 献

- 鈴木昌也：生下時胸腺摘出家鼠の扁桃における H-2 ミシジンのとりこみに関する研究。日耳鼻，73；11，62-74，1970。
- 鈴木昌也，今井昭雄：ヒト口蓋扁桃の核酸量と比較射活性の研究。耳鼻臨床，64；1，73-81，1971。
- 鈴木昌也，今井昭雄，小島健二，北見治：扁桃の局所免疫能と免疫学的位置づけに関する研究。日耳鼻，76；9，1-10，1973。
- M. Suzuki & H. Ino: Relation between Thymus and Tonsil. Arch. klin. exp. Ohr., Nas.-u. Kehlk. Heilk. 204；249-260，1973。
- 土屋雅春，玉置憲一：免疫学的伝達系。免疫学叢書 7。医学書院。
- 今井康九，藤合宏，滝沢元，重野直也，小林良彦：抗体ブラク法による担癌マウスの抗体産生能に及ぼす各種制癌剤の影響。新潟医学会誌，84；10，715-731，1970。
- M. Richardson, J.W. Moorhead & D.C. Reedy: The Secondary Anti-Erythrocyte Response of Rabbit Spleen Cells Stimulated in vitro. Immunology 17；630-615，1969。
- R.I. Mithell & R.W. Dutton: Immunization of Dissociated Spleen Cell Cultures from Normal Mice. J. Exp. Med. 126；423-442，1967。
- N.K. Jerne & A.A. Nordin: Plaque Formation in Agar by Single Antibody-Producing Cell. Science 140；406，1963。
- C. Hammoun & A.E. Bussard: Antibody Production by Cells in Tissue Culture. J. Exp. Med. 123；1035-1051，1966。
- R.I. Mithell & R.W. Dutton: Immunization of Normal Mouse Spleen Cell Suspension in Vitro. Science 153；1004-1006，1966。
- J.W. Dyminski & B.F. Argyris: In Vitro Sensitization to Transplantation Antigens. Transplantation 11；6，514-520，1971。
- M.F. Greaves, J.J.T. Owen & M.C. Raff: T and B Lymphocytes. Excerpta Medica。
- 平野真司：同種リンパ球混合培養法によるリンパ球の effector 作用の検討。最新医学，26；8，1524-1533，1971。
- J.W. Hhr & M.S. Finkelstein: Antibody Formation initiated in Vitro. J. Exp. Med. 117；457-477，1963。
- S.E. Svehag & B. Mandel: The Formation and Properties of Poliovirus-neutralizing Antibody J. Exp. Med. 119；21-39，1964。
- N.D. Chapman & R.W. Dutton: The Stimulation of DNA Synthesis in Cultures of Rabbit Lymphnode and Spleen Cell Suspensions by Homologous Cells. J. Exp. Med. 121；85-101，1965。
- 森陽一：ヒトリンパ球の培養と若返り現象。免疫実験操作法，309-313，1971。
- 萩原淳嘉：培養リンパ節細胞の抗体産生。免疫の生化学，蛋白質核酸酵素編集委員会，239-242。
- 野本龍久雄：移植免疫とリンパ球。移植，8；2，95-104，1973。
- P. Lenai & M. Feldman: Cooperation of Lymphoid Cells in an in vitro Graft Reaction System. Transplantation 11；5，446-456，1971。

- 22) *B. Bain, M. Vas & L. Lowenstein*: Federation Proc. 22 ; 428, 1963.
- 23) *R.W. Dutton*: Further Studies of the Stimulation of DNA Synthesis in Cultures of Spleen Cell Suspensions by Homologous Cells in Inbred Strains of Mice and Rats. J. Exp. Med. 122 ; 759-770, 1965.
- 24) *K. Hirschhorn, F. Bach & R.L. Kolodny*: Immune Response and Mitosis of Human Peripheral Blood Lymphocytes in Vitro. Science 142 ; 1185-1187, 1963.
- 25) 平野真司：溶血斑形成細胞。最新医学，24；3，1436-1449，1969.
- 26) *L. Surján, Sen, L. Surján Jr. & M. Surján*: Further Investigations into the Immunological Role of Tonsil. Acta Otolaryng. 73 ; 222-226, 1972.
- 27) 中村国衛：IgG産生形質細胞の増殖を伴う in vitro 免疫系の樹立と抗原認識における胸腺 RNA の役割。アレルギー，23；3，263-264，1974.
- 28) 浜岡利之：免疫記憶細胞。最新医学，24；7，1460-1468，1969.
- 29) *M. Fishman*: Antibody Formation in Vitro. J. Exp. Med. 114 ; 837-856, 1961.
- 30) *F.L. Adler, M. Fishman & S. Dray*: Antibody Formation Initiated in Vitro. J. Immunol. 97 ; 4, 554-558, 1966.
- 31) *M.J. Cline & V.C. Swett*: The Interaction of Human Monocytes and Lymphocytes. J. Exp. Med. ; 1309-1325, 1968.
- 32) *C.W. Pierce & B. Benacerraf*: Immune Response in Vitro. Science 106 ; 1002-1004, 1969.
- 33) 三橋進，大町和千代：マクロファージと抗体産生。免疫の生化学，蛋白質核酸酵素編集部編。
- 34) *D.E. Mosier*: A Requirement for Two Cell Types for Antibody Formation in Vitro. Science 158 ; 22, 1573-1575, 1967.
- 35) 畠山茂：抗体産生細胞。免疫，医科研セミナー
- 36) 佐渡敏彦：抗体産生細胞の増殖と分化。免疫，医科研セミナー
- 37) 入交清博：リンパ節ならびに胸管内細胞の抗体産生。最新医学，24；7，1450-1459，1969.
- 38) *J.F.A.P. Miller & G.F. Mitchell*: Cell to Cell Interaction in the Immune Response. J. Exp. Med. 128 ; 801-820, 1968.
- 39) *G.F. Mitchell & J.F.A.P. Miller*: Cell to Cell Interaction in the Immune Response. J. Exp. Med. 128 ; 821-837, 1968.
- 40) *N.I. Abdou & M. Richter*: Cells involved in the Immune Response. J. Exp. Med. 129 ; 757-774, 1969.
- 41) *N.I. Abdou & M. Richter*: Cells involved in the Immune Response. J. Exp. Med. 130 ; 141-163, 1969.
- 42) 田端敏秀，榎本雅夫，岡本進：家兎扁桃の免疫能に関する研究。耳鼻臨床，66；8，889-893，1973.
- 43) 田端敏秀，榎本雅夫，藤村直樹，平松恵三：ヒト扁桃の免疫機能。耳鼻臨床，66；8，895-900，1973.
- 44) *D.J. Raidt, R.I. Mishell & R.W. Dutton*: Cellular Events in the Immune Response. J. Exp. Med. ; 681-698, 1968.
- 45) 奥村康：免疫グロブリン産生の統御者としての胸腺。最新医学，28；7，1262-1269，1973.
- 46) 尾曾越文亮：リンパ球の増殖様式とくにDNAの合成経路について。最新医学，26；8，1456-1463，1971.
- 47) 武谷健二：T細胞とB細胞。日本医会誌，70；3，253-258，1973.
- 48) *G.F. Mitchell & J.F.A.P. Miller*: Immunological Activity of Thymus and Thoracic-duct Lymphocytes. Proc. Nati. Acad. Sci. U.S. 59 ; 296-303, 1968.
- 49) 矢田純一：T細胞とB細胞。最新医学，28；7，1256-1261，1971.

稿を終るにあたり，終始御指導を頂き，御高閣を賜わった恩師猪初男教授に深謝いたします。また実験に協力いただきました教室扁桃研究班の諸先生に感謝いたします。

本論文の要旨は，第13回，第14回日本扁桃研究会に発表した。

なお本研究は文部省科学研究費の補助を受けた（昭和49年度一般研究948080号）

（原稿受付 昭和49. 9. 21日）