レンサ球菌菌体成分感作モルモットにおける 細胞性免疫の成立に関する研究

小野田 卓男

日本医科大学整形外科教室 (主任: 伊藤忠厚教授)

日本医科大学微生物学免疫学教室 (指導: 木村義民教授)

Induction of cellular immunity in guinea pig sensitized with group A streptococcal cell wall antigen

Takuo Onoda

Department of Orthopedics (Chief: Prof. T. Ito)

Department of Microbiology and Immunology (Director: Y. Kimura), Nippon Medical School

There are many reports related to the delayed-type hypersensitivity (DTH) following to group A streptococcal infection. The roles of cell-mediated immunity to streptococci, however, isn't fully understood. Lymphocytes from normal guinea pigs and from guinea pigs displaying DTH to group A streptococcal cell wall antigen were cultured in the presence of the antigen. The supernatant fluid from the lymphocyte culture was assessed for their roles in the cell-mediated immunity to streptococcal cell wall antigen.

Guinea pigs were sensitized with a single, 4 or 12 times injections of a emulsion containing 500 µg of antigen with Freund's complete adjuvant into the four foot-pads and subcutaneously. Lymphocytes from regional lymph nodes of normal or antigen sensitized guinea pigs were incubated with various concentrations of antigen. The culture supernatant fluid was then collected.

Using the culture supernatant fluid, macrophage migration inhibition test (MIF), ³H-TdR incorporation of normal guinea pig lymphocytes, ¹⁴C-glucosamine up take by normal guinea pig macrophages, the activity to accelerate phagocytosis against viable streptococci, and cytotoxic activity on ³H-labeled L-cells were investigated.

DTH to streptococcal cell wall antigen was observed in immunized guinea pigs before the production of serum antibody. The peritoneal macrophages of normal guinea pigs were activated and phagocytosis of the macrophages against viable streptococci were accelerated by lymphokines which obtained from culture supernatant fluid of lymphocytes of immune animals in the presence of antigen. This fact may play the very important role in the streptococcal immunity at the early stages of streptococcal infection before the production of serum antibody. The production of cytotoxic factor from immunized lymphocytes decreased following to the increase of sensitization times, but the production of macrophage migration inhibitory factor didn't change following to the increase of sensitization times. The activity was observed distinctly in the culture supernatant fluid from lymphocytes 12 times' sensitized animals, but couldn't observe in that from normal, a single and 4 times' sensitized animals.

Thus the production of macrophage migration inhibitory factor was not necessarily correlated with that of the mitogenic factor and that of the cytotoxic factor. These facts suggest that there may exist T-cells displaying different function in the process of immunization.

Key words: Streptococcal antigen, Cellular immunity, Lymphokines.

結言

レンサ球菌感染を基盤として、該菌体成分に対して成立する遅延型アレルギー反応ないしは細胞性免疫が、その感染症ないしは続発症において、いかなる意義を有するかは今日なお明確でない。しかしながら遅延型アレルギー反応の成立に関しては、すでに Lawrence によりヒト末梢白血球を用いての passive transfer の実験から明らかにされている¹⁾。

一方、実験動物における本菌に対する遅延型アレルギー反応の研究は、古くは Swift ら²⁾のウサギを用いての実験があるが、近年 Beachey ら³⁾, Pachman ら⁴⁾は、部分精製ないしは精製された菌体 M-蛋白に対する遅延型アレルギー反応の成立を、モルモットを用いて明らかにし、Dekaris ら⁵⁾も菌体加熱塩酸抽出物を carboxymethyl cellulose column による 0.1 M potassium phosphate buffer (pH 6.0~7.0) 溶出画分に對し、同じくモルモットを用いて、遅延型アレルギー反応の成立することを認めた。

さらに最近 Yang ら⁶⁾は、A 群レンサ球菌菌体抗原を用いて、感作モルモットの T 細胞が、モルモット培養心筋細胞に對し、cytotoxic に働くことを示した。

著者は、レンサ球菌感染に基づき成立する遅延型アレルギー反応ないしは細胞性免疫の意義を明らかにしていく目的をもって、A 群レンサ球菌菌体成分を用い、これをモルモットに免疫することにより、遅延型アレルギー反応を成立せしめ、感作回数を種々変換することにより、本反応を経時的に追求し、併せてその間に生起する細胞性免疫の質的な変動を lymphokine を中心に検討し、以下の結果をえたので報告する。

実験材料と方法

1) 実験動物：Hartley 系モルモット（日本生物材料センター）、体重 250~300 g の雌を使用した。

2) 抗原の抽出：A 群レンサ球菌 3 型 (B 930/24/3) ないしは 12 型 (SS 95/12) を Todd-Hewitt broth で培養後、Bleiweis ら⁷⁾の方法に準拠し、Braun の cell homogenizer (Model, MSR) で細胞壁画分を取り、RNAse (100 µg/ml) で処理後、Lancefield の方法¹⁰⁾に従い、加熱塩酸抽出によりえられた粗抗原を、さらに飽和硫酸にし 33~60% で沈降する画分を partial purified extract (PPE) とし、これを抗原として用いた。

3) 感作方法：PPE (500 µg) を Freund's complete adjuvant (Difco 社製) とともに、モルモット足

趾ならびに皮下に週 1 回の間隔で投与し、1 回、4 回および 12 回の各感作群と、対照として adjuvant 単独投与群とに分け、最終注射後 1 週目に実験に供した。

4) 血清抗体価の測定：Boyden¹¹⁾の方法に従い、タンニン酸処理感作血球凝集反応により測定した。

5) 皮内反応：最終感作後 1 週目に、3 型ないしは 12 型よりえられた PPE (50 µg) を皮内注射し、24 時間後の発赤・腫脹・硬結の程度を測定し、一部はヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色により病理組織学的にも検討した。

6) リンパ球浮遊液の調製：腋窩ならびにそ径リンパ節を摘出し、Hank's balanced salt solution (日本製薬社製、HBSS) 中で付着した結合組織、脂肪組織を除去後、5% に仔ウシ血清を含む Eagles' minimum essential medium (日本製薬社製、MEM) 中で、細胞を遊出させ、その後ステンレススチールメッシュを通し 3 回洗滌後、さらに glass wool column を通過させ、 1×10^7 cells/ml に調製した。細胞の viability は、trypan blue dye exclusion test で 90% 以上であることを確認した。また、一部の実験においては、脾細胞が同じように調製され実験に供された。

7) リンパ球培養上清液の採取：感作モルモットのリンパ球浮遊液 3 ml (1×10^7 cells/ml) に抗原をそれぞれ最終濃度、25, 50, 75 µg/ml になるように添加し、37°C, 48 時間、5% CO₂ フラン器で培養後遠心、細胞を除去しえられた上清をさらに pore size 0.3 µm の filter (日本ミリポア社製) で濾過し、このリンパ球培養上清液を lymphokine として用い、実験供与まで -40°C で保存した。対照としては正常モルモットリンパ球に抗原を添加したもの、感作モルモットリンパ球に異種の抗原を添加したもの、あるいはこれらリンパ球に抗原非添加によりえられたリンパ球培養上清が用いられた。

8) T-cell, B-cell の算定：ロゼット形成法により T-cell, B-cell の同定が行われた。Wilson ら¹²⁾、留目ら¹³⁾の方法に準じ、ウサギ赤血球 (RRBC) が 3 個以上付着したものを RRBC-ロゼット形成細胞 (RRBC-RFC)、すなわち T-cell とした。また、Yoshida ら¹⁴⁾の方法に準拠し、赤血球 (E) とこれに対する抗体 (A)、さらに補体 (C) の複合体 (EAC) を調製し、Bianco ら¹⁵⁾の方法に従い、EAC-ロゼット形成 (EAC-RFC) をもって B-cell を算定した。RFC の割合は細胞総数に対する百分率で表した。

9) マクロファージ遊走阻止試験：George & Vau-

ghan の方法¹⁰⁾に準じ、毛細管法により行った。マクロファージは正常モルモットの腹腔に、10% ペプトン水 (Difco 社製) 15 ml を注射し、96 時間後にヘパリン加 HBSS で腹腔を洗滌し、腹腔浸出細胞を採取した。えられた細胞を3回洗滌後、毛細管に封入し、これを小型シャーレに置き、Eagles' MEM (10% 正常モルモット血清加) 1 ml を入れ、さらに上記7) でえられたリンパ球培養上清液 1 ml を加え、間接法によりマクロファージ遊走阻止を検討した。遊走阻止能 (%) はリンパ球培養上清を添加した時と添加しなかった時の遊走面積の比率から計算した。

10) モルモットリンパ球の ³H-thymidine の取り込み：正常モルモットの局所リンパ節 (そ径・腋窩) よりえたリンパ球を MEM で 5×10^6 cells/0.5 ml に調製し、小試験管に入れ上記7) でえられたリンパ球培養上清 1 ml をこれに添加し、37°C、24 時間、5% CO₂ 存在下で培養後、³H-thymidine (第一化学薬品製、³H-TdR) 0.5 μ Ci を加え、さらに 24 時間培養後 HBSS で3回洗滌後、10% トリクロロ酢酸 (TCA) 溶液を加えて1時間氷冷し、さらに HBSS で数回洗滌して沈渣に Hyamine-OH (New England Nuclear 製) を加えて、Packard 社製 tri carb liquid scintillation counter で放射活性を測定し、リンパ球培養上清を添加しなかった時との比率で測定した。

11) モルモット腹腔浸出細胞の ¹⁴C-glucosamine の取り込み：Hammond ら¹¹⁾の方法に準じ、正常モルモットより採取した腹腔浸出細胞を MEM で 5×10^6 cells/0.5 ml に調製し、これにさらに5% に仔ウシ血清を含む MEM 1 ml を加え小試験管を斜面にして、2 時間、37°C、5% CO₂ 存在下で保温し、非付着細胞を3回洗滌することにより除去し、再び MEM 2 ml を入れこれに上記7) でえられたリンパ球培養上清液 1 ml を加え、48 時間培養した。培養終了6時間前に 1 μ Ci の glucosamin (第一化学薬品製) を添加した。培養終了後、HBSS で数回洗滌し凍結融解後、10% TCA 溶液を加えて1時間氷冷し、ついで HBSS で数回洗滌して沈渣に Hyamine-OH を加えて細胞を溶解し、Bray 液を加えて ³H-TdR の取り込みと同様の方法で測定した。その活性はリンパ球培養上清を添加しなかった時との比率で示した。

12) 活性化マクロファージの食食能：正常モルモットからえられた腹腔浸出細胞をシャーレに入れ、37°C、2 時間、5% CO₂ 存在下で保温後、シャーレに付着しなかった細胞を洗滌により除去し、プレート

当り 5×10^6 cells の付着細胞 (マクロファージ) の monolayer を作製した。これに A 群レンサ球菌 (12 型菌) $19.8 \pm 1.3 \times 10^3$ cells を加え、シャーレを 37°C で 30 分間回転振盪し、その後生食水で細胞をよく洗滌し、洗滌液を Todd-Hewitt 血液寒天培地に加え、食食されなかった菌の菌数を算定し、はじめに添加した菌数との差から食食された菌数を求めた。

13) 培養線維芽細胞に対する細胞障害試験：Trivers ら¹²⁾の方法に準じ、マウス培養線維芽細胞 L-cell を標的細胞として、えられたリンパ球培養上清の障害作用を検討した。すなわち、L-cell の monolayer に 0.5 μ Ci の ³H-TdR をあらかじめ標識したあと、細胞数を MEM 中で 0.5×10^6 cells/ml に調製し、これに上記7) でえられたリンパ球培養上清 1 ml を添加し、5% CO₂ 存在下で 37°C、72 時間反応せしめたあと、培養上清中に放出された ³H-TdR の量を、放出された ³H-TdR と細胞中の残存 ³H-TdR の合計で除し、100 倍して放出 % とし、その細胞障害能を示した。

実験結果

1. 感作動物の血清抗体価と遅延型皮内反応

各感作群モルモットの血清抗体価は、感作血球凝集反応で、遅延型アレルギー反応は、抗原を皮内に注射後 24 時間で測定した。

Table 1 に示すように、12 型菌からえられた抗原 (PPE) による1回感作群では血清抗体価はほとんど上昇せず、非感作群のそれと変わらなかったが、遅延型皮内反応は陽性を呈し、その組織学的変化も単核球の浸潤を主体とする変化を示し、すでに遅延型アレルギー反応が成立していることが示された (Fig. 1)。

12 回感作群においては、皮内反応はさらに強くなる傾向にあったが、血清抗体価も高く、6~12 時間で認められるいわゆる即時型アレルギー反応が出現し、遅延型反応にオーバーラップしているものと思われる。また、この12型抗原感作群に、heterologous な3型抗原を皮内注射しても弱いながらも遅延型皮内反応が成立し、この反応に関与する抗原物質は型特異性でなく、他の菌型にも存在する交叉反応性のあるものであることが示唆された。

2. T-cell, B-cell の変動

感作動物の所属リンパ節ならびに脾臓における T-cell, B-cell の相対的変動につき、RRBC-, EAC-ロ

Table 1 Passive hemagglutinating titers and delayed-type skin reaction in guinea pigs immunized with group A streptococcal cell wall type 12 antigen and Freund's complete adjuvant

Times of immunization with type 12 antigen	NO. of animals	Hemagglutinating titers	Skin reaction ²⁾ (mm)	
			type 12 antigen	type 3 antigen
1	9	1:2-1:16	13.5	9.6
4	8	1:2-1:32	11.3	9.0
12	4	1:2,048-1:6,536	12.1	7.3
control ¹⁾	11	1:2-1:16	3.4	1.0

1) Control animals were injected with Freund's complete adjuvant alone.

2) Skin reactions were tested for delayed-type hypersensitivity by intradermal injection of 50 μ g of homologous (type 12) antigen and heterologous (type 3) antigen in 0.1 ml saline at 70 day after final immunization. The titers indicated mean diameter of the extent of erythema at 24 hr later.

Fig. 1 Histological finding of delayed-type skin reaction in the case of a single immunized animals.

Infiltration of lymphocytes or monocytes around capillaries is observed. ($\times 250$, hematoxylin eosin staining)

ゼット形成法により検討した。

その結果は Fig. 2 に示すようにリンパ節においては T-, B-cell とともに 1 回感作群では増加するが、4 回、12 回感作群では、T-cell は相対的に減少し、逆に B-cell は増加の傾向にあった。一方脾臓においては T-, B-cell とともに著明な変動は認められなかった。

3. リンパ球培養上清によるマクロファージ遊走阻止試験

A 群レンサ球菌 12 型抗原で、1, 4, 12 回感作されたモルモットのリンパ球に homologous あるいは heterologous な抗原を添加し、えられたリンパ球培養上清を lymphokine とし、間接法でマクロファージの

Fig. 2 Distribution of T- and B-cell population in the regional lymph node and spleen of guinea pigs immunized with group A streptococcal cell wall (type 12) antigen. Control animals were injected with Freund's complete adjuvant alone.

遊走能に及ぼす影響を検討した。

Fig. 3 に示すように、感作モルモットのリンパ球に homologous な抗原を添加することによりえられた lymphokine は、60~80%の遊走阻止能を示した。すなわち、1 回感作群のモルモットにおいては、遅延型皮内反応の成立とともにマクロファージ遊走阻止因子を産生させる effector T-cell が存在し、しかもかような因子の産生は、4 回、12 回感作群でも認められた。しかし、本因子の産生は heterologous な 3 型菌の抗原の添加によっても産生され、皮内反応の場合と同様に反応に関与する抗原に型特異性は認められなかった。

Fig. 3 Migration inhibition of normal guinea pig peritoneal macrophages by lymphocyte culture supernatant fluids obtained from lymphocytes of normal or type 12 antigen sensitized guinea pigs, which were stimulated with type 12 or type 3 antigen

- 1) Control animals were injected with Freund's complete adjuvant alone.
- 2) Lymphocyte suspension (3×10^7 cells/plate) in Eagles' MEM adding of 10% heat inactivated normal guinea pigs sera were cultured with antigen (50 μ g/plate) or antigen free in a CO_2 incubator for 48 hr and then culture supernatant fluids were collected.

Vertical bars indicate standard deviation.

4. リンパ球培養上清による正常リンパ球の³H-TdRの取り込み

感作動物からえられたリンパ球に12型抗原ないしは3型抗原を添加し、その培養上清中に正常モルモットリンパ球に対する blastogenic effect をもつ因子が存在するか否かを検討した。1回感作群からえられたそれは、もっともその効果が強く、stimulatory ratio は、3.76 を示し、感作回数が増加とともに blastogenic factor の活性は低下し、12回感作群のリンパ球にはこの因子を産生する能力は、ほとんど消失しているように思われた。

Heterologous な抗原添加によっても、その活性はいく分弱い、ほぼ同様な傾向が示された (Fig. 4)。

5. リンパ球培養上清中のマクロファージ活性化因子について

リンパ球培養上清中にマクロファージ活性化因子が存在するか否かを、¹⁴C-glucosamine のマクロファージ細胞膜への取り込みを指標にして検討した。

Fig. 5 に示すように、本活性化因子は、1回、4回感作群のリンパ球培養上清中に存在し、その stimulatory ratio はそれぞれ 2.84, 3.22 を示したが、12回感作群ではその活性はきわめて弱く、したがって感作回数ないしは感作日数の増加に伴い、かえって本因子の活性は低下をきたした。一方、heterologous な抗原添加によっても、その活性は若干落ちるがほぼ同

様な産生パターンが示された。

6. 活性化マクロファージのレンサ球菌生菌に対する貪食能の検討

4回感作群のモルモットよりえられたリンパ球を、homologous 抗原と培養することによりえられた培養上清が、正常マクロファージの ¹⁴C-glucosamine の取り込みを亢進せしめ、マクロファージを活性化することが明らかにされたので、実際にこの活性化マクロファージが、homologous の生菌に対しその貪食能を高めているか否かを検討した。

Table 2 に示すように、対照群に比し約 10% 以上の亢進を示し、明らかに effector cell に抗原を添加することにより、その培養上清中にマクロファージの貪食能を亢進せしめる、いわゆる macrophage activating factor の存在することが示された。

一方、Table 1 には示されていないが、12回感作群のリンパ球培養上清中には本因子は検出されず、その反応は Table 2 の対照群とほぼ同様であった。

7. リンパ球培養上清の細胞障害作用

感作動物由来のリンパ球に抗原を添加することにより放出される mediators が ³H-TdR で予め標識された培養線維芽細胞 (L-cell) に対し、cytotoxic に働くか否かを ³H-TdR の遊離を指標として検討した。

Table 3 に示すように、1回、4回感作群のリン

Fig. 4 Incorporation of ³H-thymidine by normal lymphocytes which were stimulated with lymphocyte culture supernatant fluids obtained from lymphocytes of normal or type 12 antigen sensitized guinea pigs, which were stimulated with type 12 or type 3 antigen.

A : Culture supernatants were obtained from immune lymphocyte stimulated with type 12 homologous antigen. B : Culture supernatants were obtained from immune lymphocyte stimulated with type 3 heterologous antigen. C : Culture supernatants were obtained from immune lymphocyte stimulated with medium alone. Lymphocyte suspension (3×10^6 cells/plate) in Eagles' MEM containing 10% heat inactivated fetal calf serum were cultured with antigen (50 μ g/plate) or antigen free in a CO₂ incubator for 48 hr and culture supernatant fluids were collected. The supernatant fluids (1 ml) were added to normal guinea pig lymphocyte suspensions (5×10^6 cells/ml) in Eagles' MEM. Mixtures were incubated for 24 hr at 37°C in a humid atmosphere 5% CO₂ in air, and then added 0.5 μ Ci of ³H-TdR and cultured for further 24 hr. Control animals were injected with Freund's complete adjuvant alone.

パ球からは、cytotoxic factor は認められず、12 回感作群の mediators 中にその活性が確認され、むしろ感作回数を増加させることにより、cytotoxic factor が産生されやすいように思われ、前記の macrophage activating factor と、この cytotoxic factor の産生において解離が認められたことが注目される。

考察

レンサ球菌感染に基づいて成立する遅延型アレルギー反応ないしは細胞性免疫が、その感染症ないしは続発症において、どのような役割を演じているかは明らかにされていない。著者はこの問題を解明する目的をもって、今回A群レンサ球菌細胞壁より抽出した菌体成分を抗原とし、Freund's complete adjuvant ととも

Fig. 5 Incorporation of ¹⁴C-glucosamin by normal peritoneal exudate cells which were stimulated with lymphocyte culture supernatant fluid obtained from lymphocytes of normal or type 12 antigen immunized guinea pigs, which were stimulated with type 12 or type 3 antigen A, B and C are same as in Fig. 4

Lymphocyte suspension (3×10^6 cells/plate) in Eagles' MEM containing heat inactivated fetal calf serum at 5% were cultured with antigen (75 μ g/plate) or antigen free in a CO₂ incubator for 48 hr and culture supernatant fluid was collected. The supernatant fluid (1 ml) was added to normal guinea pig peritoneal exudate cells (5×10^6 cells/ml) in Eagles' MEM containing inactivated fetal calf serum at 5%. Mixtures were incubated for 42 hr added 1 μ Ci of ¹⁴C-glucosamin and cultured for a further 6 hr. Control animals were injected with Freund's complete adjuvant alone.

にモルモットを免疫するに際して、感作回数を種々変換した場合の該抗原に対し遅延型アレルギー反応の成立と、その間に産生される lymphokine との関連につき種々検討を試みた。

細胞性免疫の成立に関する in vitro のパラメーターとして今日多くの方法が開発され、その多くは直接的、間接的を問わず effector T-cell と特異抗原との反応により生成、遊離する lymphokine の活性を介しての測定に基づいている。

本論文においては、感作モルモットよりえられたリンパ球を in vitro で対応する抗原で刺激することにより生成する lymphokine の活性を介して、レンサ球菌菌体成分に対し細胞性免疫が成立しているかどうかを検討したものである。すなわち、抗原で1回感作されたモルモット群において、血清抗体がまだ産生されていない時点ですでに遅延型皮内反応が成立し、その際えられた lymphokine には、マクロファージ遊走阻止因子 (macrophage migration inhibition

Table 2 Effect of supernatants from cultures of non-immune and immunelymphocytes on the phagocytic activity of normal guinea pig peritoneal exudate cells¹⁾

lymphocyte of	Culture supernatants	Bacteria added initially (NO)	NO. of phagocytosed after 30 min.	% of phagocytosed
	stimulated with			
non-immune animals ²⁾	antigen free	19.875×10 ³	4,875	24.52
	antigen free	20.156×10 ³	5,042	25.02
	type 12 antigen (75ug)	21.220×10 ³	6,164	29.05
immune animals ³⁾	antigen free	18.530×10 ³	5,709	30.81
	type 12 antigen (75ug)	19.875×10 ³	8,560	42.76

- 1) Normal guinea pig peritoneal exudate cells (5×10^6 cells) were exposed to antigen elicited immune or non-immune lymphocyte culture supernatant fluid (1 ml). Details were same as in Fig. 5. The peritoneal exudate cells were infected with group A streptococcus, type 12 viable cells ($19.8 + 1.3 \times 10^6$ cells). Phagocytosis was allowed to proceed for 30 min at 37°C. Bacterial cells in the external fluid was cultured in Todd-Hewitt agar containing blood at 5%. Number of phagocytosed bacterial cells were determined by the formula: NO. of initially added bacteria-no. of externally added bacteria.
- 2) Control animals were injected with Freund's complete adjuvant.
- 3) Animals were immunized four times with type 12 antigen.

Table 3 Effect of supernatants from cultures¹⁾ of non-immune and immune lymphocytes on L-cell

lymphocyte of	Culture supernatants	% release of ³ H-TdR from target cells
	stimulated with	
non-immune animals ²⁾	antigen free	0.70 ± 0.41 ⁴⁾
	type 12 antigen (75ug)	1.98 ± 1.73
immune animals ³⁾		
	1 time	1.70 ± 0.21
	4 times	1.18 ± 0.25
	12 times	4.38 ± 0.38

- 1) Details of the lymphocyte culture were same as in Fig. 5.
 - 2) Control animals were injected with Freund's complete adjuvant alone.
 - 3) Animals were immunized 1, 4 and 12 times with type 12 antigen.
 - 4) Mean ± SD
- Target L-cells (5×10^4 cells/ml) were labeled with ³H-TdR (0.5 μCi) in Eagles' MEM containing fetal calf serum at 5%. Immune or non-immune lymphocyte culture supernatant (1 ml) were added to radiolabeled L-cells and they were cultured for 72 hr at 37°C in 5% CO₂ incubator. The release of ³H-TdR from target L-cells was counted in a liquid scintillation counter for 5 min.

factor—MIF) が存在することが明らかにされ、しかも遅延型皮内反応と同様に、4回、12回感作群よりえられた lymphokine にも本因子が存在していることが認められ、遅延型アレルギー反応と MIF の産生

とが相関して出現することが観察された。このような相関は、George & Vaughan の BCG 感作モルモットの実験¹⁹⁾以来確認され、MIF の測定は、遅延型アレルギー反応を細胞レベルで検出しうるすぐれた手段

となり、遅延型皮内反応の場におけるマクロファージの集簇を説明しえる根拠となっている。

レンサ球菌菌体成分を用いてモルモットを感作することにより、遅延型アレルギー反応が成立し、また MIF が産生されることは、Beachey ら⁹⁾、Pachman ら¹⁰⁾ により報告され、また似たような現象として、リウマチ熱患者の末梢白血球の遊走が、レンサ球菌細胞膜を抗原として用いた時阻止されることも明らかにされた¹⁹⁾。しかし、このような遊走阻止因子が、レンサ球菌感染症ないしはその続発症の成立にいかに関与しているかは明らかでなく、なお不明のまま残されている。

一方、えられた lymphokine の正常リンパ球への ³H-TdR の取り込みに対する影響をみると、1 回感作群よりえたそれは、もっとも強く、感作回数が増加すると、逆にその blastogenic ないしは mitogenic な活性が低下し、従って本因子は感作期間中一貫して産生されず、遅延型皮内反応、MIF とは必ずしも相関しなかった。

さらに lymphokine を用い、これが正常モルモットよりえられたマクロファージを活性化しうるか否かを ¹⁴C-glucosamine の取り込みから検討した。Fig. 5 に示したように、1 回感作群からえられた lymphokine にはすでに本活性化因子が存在し、しかもその活性化されたマクロファージは、正常マクロファージよりもよく菌を貪食し、従ってかかる lymphokine 中には、マクロファージの貪食能を亢進せしめる因子 (macrophage activating factor) の存在が明らかにされた。しかし、くり返し感作を行ったモルモットよりえられたものには、MIF は存在するにもかかわらず、マクロファージを活性化し、貪食能を高める活性は認められず、MIF の産生との間に discrepancy が存在し、むしろ blastogenic factor の産生と相関した。Hammond ら¹⁷⁾ により glucosamine のマクロファージ細胞膜への取り込みを、その活性化の index として、細胞性免疫成立の 1 つの指標として用いえることが示され、さらに Nathan ら²⁰⁾ は本活性化因子と MIF とは分離し難たいことを報告した。しかし、今回のデータからすると、マクロファージ活性化と MIF とは必ずしも相関せず、従って同一物質がこの 2 つの活性をもつか、別々な物質が各々の活性を持つか、あるいは同一物質ではあっても感作の時期により、一方のみの活性をもつか否かは、感作方法の相違ばかりでなく、本物質の精製の問題ともからんで今後検討しなければ

ならない。

特異抗原と effector T-cell との反応により活性化されたマクロファージは、非特異的に菌を貪食し殺菌しうることが、Mackness ら²¹⁾ の実験により明らかにされて以来、とくに細胞内寄生性細菌のいわゆる感染免疫ないしは感染防禦に、活性化マクロファージがきわめて重要な働きをしていることが明らかにされた。

一方、グラム陽性球菌の感染防禦は、従来血清抗体により説明され、レンサ球菌にあっては、とくに M-蛋白抗原に対する抗体の存在により感染防禦が成立しうることがマウスの実験²²⁾ により明らかにされた。しかし、今回の結果からすると血清抗体が上昇する以前にすでに細胞性免疫が成立し、しかもその際マクロファージが活性化され、貪食能を亢進せしめる lymphokine が存在することから、血清抗体が十分産生される以前において、一時的にせよ、細胞性免疫を介して感染防禦が成立しえることを示唆しており、血清抗体が産生されてくるとともに、その感染防禦の主役は、血清抗体に移行し、それに伴いマクロファージ活性化能が低下していくことが明らかにされた。そして感作初期において検出することができなかった培養線維芽細胞に対する cytotoxic factor は、感染防禦能とは逆に、くり返し感作されたモルモットのリンパ球より産生されることが明らかにされた。最近 Yang ら⁸⁾ は、A 群レンサ球菌菌体抗原で感作したモルモットの脾臓よりえた T-cell が、胎児モルモットの培養心筋細胞に対し、cytotoxic に働くことを明らかにし、その反応は、心筋細胞膜とレンサ球菌菌体成分との cross-reactivity により起こるものと想定した。今回の実験で認められた cytotoxic factor は非特異的なものと思われ、むしろ Ruddle ら²³⁾ により報告されたそれに近いものと思われる。いずれにせよ、今回の実験結果は、感作の時期の相違により、放出される lymphokine に質的な相違のあることを想定せしめる。このことは、細胞性免疫ないしは lymphokine の産生に関与する effector T-cell に、さらに subset が存在するか、あるいは同一の T-cell が、異なる活性を有する lymphokine を合成しえるかはなお明確でないが、ヒトのレンサ球菌感染症ないしは続発症の発生を考えるうえに重要な示唆を与えるように思われる。

さらに感作回数の相違により、所属リンパ節、脾臓における total T-, B-cell が、どのような変動を示すかを、ロゼット形成法により検討したが、脾臓においては、ほとんど変化なく、所属リンパ節において、

1 回感作群で T-cell が増加したが、くり返し感作しても増加せず、むしろ正常値にもどった。B-cell は感作回数とともに変動し、増加して行く傾向にあった。ロゼット形成法で total の T-, B-cell を算定することがどのような意味をもつかは、必ずしも明確でなく、B-cell の増加は、抗体産生の上昇を反映するかも知れないが、細胞性免疫の動きを、total T-cell の変動としてとらえることは難しいように思われる。

本実験において、モルモットの感作に用いた抗原は、12 型菌細胞壁より抽出した蛋白抗原であるが、反応に関与する抗原決定基は、heterologous な 3 型菌の抗原と交叉反応を示し、型特異性は、M-蛋白により規定されと考えられているが、Beachey ら⁵⁾ Pachman ら⁶⁾ の精製 M-蛋白を抗原として、モルモットを免疫しても、なおかつ heterologous な菌型と交叉反応を示すという報告があり、この交叉反応性抗原が、M-蛋白という一つの分子上に型特異的抗原決定基とともに存在しているのか、精製 M-蛋白に、他の共通抗原物質が、わずかながら混入しているのかわからない。今回の結果は、型特異的反応が存在しているにもかかわらず、共通抗原との反応によりマスクされ明確に検出できなかったのか、あるいは共通抗原に対する反応のみが成立したのかは明らかでないが、いずれにせよ、レンサ球菌菌体成分に対し、細胞性免疫が成立することは明らかであり、今後この関与する抗原物質の解析が必要となろう。

結論

レンサ球菌感染に基づき成立する遅延型アレルギー反応ないしは細胞性免疫の意義を明らかにして行く目的をもって、A 群レンサ球菌菌体成分を用い、これをモルモットに免疫することにより、遅延型アレルギー反応を成立せしめ、感作回数を種々変換することにより、本反応を経時的に追求し、併せてその間に生起する細胞性免疫の質的な変動を lymphokine を中心にして検討し以下の結果をえた。

1) 感作モルモットに、A 群レンサ球菌細胞壁抗原に対しての細胞性免疫が成立した。

2) 正常モルモット腹腔マクロファージは、lymphokine 中の macrophage activating factor の作用により活性化され、A 群レンサ球菌菌体に対して、食食能の亢進を認めた。このことは、レンサ球菌感染において、血清抗体の上昇する以前の初期の段階におけ

る感染免疫ないしは、感染防禦における役割を示唆した。

3) 免疫の過程において effector T-cell による MIF の産生は、mitogenic, cytotoxic factor の産生とは必ずしも相関しなかった。このことは、異なった機能をもった effector T cell の存在を示唆した。

稿を終るにあたり、本研究にご懇切なるご指導を賜わった微生物学免疫学教室各位ならびにご協力いただいた整形外科学教室各位、また組織学的なご教示を賜わった本学第 1 病理学教室馬杉洋三教授に深く感謝いたします。

なお、本論文の要旨は第 21 回日本リウマチ学会総会(1977. 大阪)、および第 14 回国際リウマチ学会(1977. サンフランシスコ)において発表した。

文献

- 1) Lawrence, H.S. : Transfer of skin reactivity to streptococcal products. "Streptococcal Infection" (M. McCarty, ed.), p. 143~156, Columbia University Press, New York, 1954.
- 2) Derick, C.L., and Swift, H.F. : Reactions of rabbits to nonhemolytic streptococci. I. General tuberculin-like hypersensitiveness, allergy or hyperergy following the secondary reaction. J. Exp. Med., **49**, 615~635, 1929.
- 3) Swift, H.F. and Derick, C.L. : Reactions of rabbits to nonhemolytic streptococci. II. Skin reactions in intravenously immunized animals. J. Exp. Med., **49**, 883~897, 1929.
- 4) Derick, C.L., Hitchcock, C.H., and Swift, H.F. : Reactions to nonhemolytic streptococci. III. A study of modes of sensitization. J. Exp. Med., **52**, 1~22, 1930.
- 5) Beachey, E.H., Alberti, H., and Stollerman, G.H. : Delayed hypersensitivity to purified streptococcal M protein in guinea pigs and in man. J. Immunol., **102**, 42~52, 1969.
- 6) Pachman, L.M., and Fox, E.N. : Cellular and antibody reactions to streptococcal M protein types 1, 3, 6 and 12. J. Immunol., **105**, 898~907, 1970.
- 7) Dekaris, D., Alouf, J.E., and Raynaud, M. : Hypersensitivity reactions in guinea pigs to group A hemolytic streptococci. Int. Arch. Allergy App. Immunol., **37**, 14~25, 1970.
- 8) Yang, L.C., Soprey, P.R., Wittner, M.K., and Fox, E.N. : Streptococcal induced cell-mediated-immune destruction of cardiac myofibers in vitro. J. Exp. Med., **146**, 344~360, 1977.
- 9) Bleiweis, A.S., Karakawa, W.W., and Krause, R. M. : Improved technique for the preparation of streptococcal cell walls. J. Bacteriol., **88**, 1198~1200, 1964.
- 10) Lancefield, R.C., and Perlmann, G. : Preparation and properties of typespecific M antigen from a group A type 1 hemolytic streptococcus. J. Exp. Med., **98**, 71~82, 1952.

- 11) Boyden, S.V. : The adsorption of protein on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein serum. *J. Exp. Med.*, **93**, 107~120, 1951.
- 12) Wilson, A.B., and Coombs, R.R.A. : Rosette formation between guinea pig lymphoid cells and rabbit erythrocytes—a possible T-cell marker. *Int. Arch. Allergy App. Immunol.*, **44**, 544~552, 1973.
- 13) 留目優子, 横室公三, 木村義民 : 免疫後のモルモット末梢リンパ組織における T-cell, B-cell の変動について. *日本細菌学雑誌*, **31**, 387~395, 1976.
- 14) Yoshida, T., Sonozaki, H., and Cohen, S. : The production of migration inhibition factor by B and T-cells of the guinea pig. *J. Exp. Med.*, **138**, 784~796, 1973.
- 15) Bianco, C., Patrick, R., and Nussenzweig, V. : A population of lymphocytes bearing a membrane receptor for antigen-antibody-complement complexes. I. Separation and characterization. *J. Exp. Med.*, **132**, 702~720, 1970.
- 16) George, M., and Vaughan, J.H. : In vitro cell migration as a model for delayed sensitivity. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **111**, 514~521, 1962.
- 17) Hammond, M.E., and Dvorak, H.F. : Antigen-induced stimulation of glucosamine incorporation by guinea pig peritoneal macrophages in delayed hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, **136**, 1518~1532, 1972.
- 18) Trivers, G., Braungart, D., and Leonard, E.J. : Mouse lymphotoxin. *J. Immunol.*, **117**, 130~135, 1976.
- 19) Read, S.E., Fischetti, V.A., Utermohlen, V., Falk, R.E., and Zabriskie, J.B. : Cellular reactivity studies to streptococcal antigens. Migration inhibition studies in patients with streptococcal infections and rheumatic fever. *J. Clin. Invest.*, **54**, 439~450, 1974.
- 20) Nathan, C.F., Remold, H.G., and David, J.R. : Characterization of a lymphocyte factor which alters macrophage function. *J. Exp. Med.*, **137**, 275~290, 1973.
- 21) Mackaness, G.B. : The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity in vivo. *J. Exp. Med.*, **129**, 973~992, 1969.
- 22) Lancefield, R.C. : Cellular constituents of group A streptococci concerned in antigenicity and virulence. "Streptococcal Infection" (M. McCarty, ed.), p. 3~18, Columbia University Press, New York, 1954.
- 23) Ruddle, N.H., and Waksman, B.H. : Cytotoxicity mediated by soluble antigen and lymphocytes in delayed hypersensitivity. *J. Exp. Med.*, **128**, 1267~1279, 1968.

(受付: 1978 年 12 月 15 日)