感作リンパ球の動態に関する研究

第 2 編

感作リンパ球の寿命

岡山大学医学部第1解剖学教室(指導:尾曾越文亮教授)

岡山大学医学部整形外科学教室(指導:児玉 俊夫教授)

大学院学生 山 本 明 信

[昭和40年12月25日受稿]

I. 緒 言

第1編において、マウスをウシの γ -グロブリンとアジュバントを用いて感作すると、領域リンパ節にリンパ球の著明な増殖反応がおこり、トリチウム・チミジンをとりこむリンパ球の百分比が急激に上昇することを確認した。このように抗原刺激によつて増殖したリンパ球は、すべて感作されたリンパ球とみなして差支えないわけであるが、リンパ球は抗原刺激ばかりでなく、非抗原性物質特に Freund の不完全アジュバント (incomplete Freund's adjuvant) に対してもかなり著しい増殖反応をあらわす(尾曾越 1964¹⁾, 1965²⁻⁴⁾) ので、これによつて増殖したリンパ球は抗原に反応して増殖した真の感作リンパ球とは区別されねばならぬ。さらに、真の感作リンパ球のうちには、免疫情報を保持しながら長期間静止状態にある(すなわち寿命の長い)、いわゆる“免疫学的記憶細胞”(immunological memory cells) の役割を果すものがあることが期待される。

本研究は、感作リンパ球のうちで、とくに長期間残存する(すなわち寿命の長い)ものの数が、特定の1つの抗原に対応してどれだけ出現するかを明らかにし、それと免疫学的記憶細胞との関係を考察しようとするものである。

II. 実験方法

実験動物: 実験動物はすべて岡山大学医学部マウスコロニー保存の均一系 DB マウスである。実験にさきだち、標準食(オリエンタル実験用固型飼料)をもつて1週間以上飼育し、体重が着実に増加しつつあることを確かめ、体重がほぼ20gに達したマウス(雌雄両性)51匹を選んで実験に共した。マウスを3群に分け、第1群には21匹、第2群と第3群には

それぞれ15匹ずつ使用した。

感作方法: 抗原としては、第1編に報告した実験におけると同様に、ウシの γ -グロブリン (Bovine Gamma Globulin Fraction II: Nutritional Biochemical Corporation, Cleveland, Ohio, U. S. A.) (以下 BGG と略記)を用いた。第1群(マウス21匹)に対しては、BGG 3mg を含む 0.4 ml の生理的生塩水と Freund の完全アジュバント (complete Freund's adjuvant: Difco laboratories, Detroit, Michigan, U. S. A.) の0.4mlとをよく混合、油中水滴の乳剤として体幹皮下4個所に分割注射した。第2群(マウス15匹)には、Freund の完全アジュバント 0.4 ml を単独に、.4ml の生理的生塩水と混合して、同じく油中水滴の乳剤として注射した。第3群(マウス15匹)には、0.8 ml の生理的生塩水のみを注射して対照とした。

トリチウム・チミジンによる標識付け: 上述の3群のマウスは、いずれも抗原注射後5, 6, 7日目の3日間、トリチウム・チミジン (^3H -thymidine: Radiochemical Center, Amersham, England. 5000 mc/mM) (以下 TTH と略記)を体重1gあたり0.5 μc の割合で、毎日1回ずつ、3日間連続して腹腔内に注射した。そして、3群からそれぞれ3~5匹ずつ、感作から1, 2, 5および13週(3月)後に屠殺し、領域リンパ節(浅および深腋窩リンパ節ならびに鼠径リンパ節)をとり出してスタンプ標本を作った。

オートラジオグラフィーの条件: スタンプ標本は直ちにカルノア液にて20分間固定し、80%エタノールにて洗滌後乾燥し、型の如く Kodak AR-10 フィルム (AR-10 Autoradiographic Stripping Plates, Kodak, London, England) で被覆した。露出時間は4°Cで6週間とし(その間乾燥状態にたもつ)、現像、定着、

水洗後、H-E 染色を行なつて検鏡した。

オートラジオグラフの観察方法：スタンプ標本を
600～1000倍に拡大し、Abbe の描画装置を用いて、

一定区画内のすべての細胞（ほとんどすべてリンパ
球）を描画し、銀粒子をあらわすものは、核 1 個あ
たりの銀粒子の数を核の輪廓内に記入した。

表 1 マウス皮下に BGG と共に Complete Freund's adjuvant (CFA) を注射した場合、CFA のみの注
射の場合、および生理的食塩水を注射した場合に、領域リンパ節にあらわれる、ラベルされたリ
ンパ球の比率。トリチウム・チミジンの最後の注射から 1 日後
抗原感作後 1 週間

実験の区分	マウスの番号	数えた 総細胞数	細胞 1 個あたりの銀粒子が		
			10個を超えるもの (%)	20個を超えるもの (%)	30個を超えるもの (%)
BGG + CFA	BA-1	1088	109.1	34.9	11.0
	BA-2	937	114.0	32.0	9.6
	BA-3	1123	138.8	64.1	30.3
平 均 値			120.8	43.7	16.9
CFA 単独	A-1	1024	73.3	29.2	9.8
	A-2	964	74.6	52.9	23.9
	A-3	1072	84.8	51.3	29.0
平 均 値			77.1	44.5	20.9
生理的 食塩水	C-1	994	53.3	24.1	13.1
	C-2	1021	52.9	31.4	15.7
	C-3	1140	50.0	30.7	15.8
平 均 値			52.0	28.8	14.9

表 2 マウス皮下に BGG と共に Complete Freund's adjuvant (CFA) を注射した場合、CFA のみの注
射の場合、および生理的食塩水を注射した場合に、領域リンパ節にあらわれる、ラベルされたリ
ンパ球の比率。トリチウム・チミジンの最後の注射から 1 週間後。
抗原感作後 2 週間

実験の区分	マウスの番号	数えた 総細胞数	細胞 1 個あたりの銀粒子が		
			10個を超えるもの (%)	20個を超えるもの (%)	30個を超えるもの (%)
BGG + CFA	BA-5	1123	45.5	19.6	6.2
	BA-6	1004	45.8	18.0	8.0
	BA-7	1013	45.7	22.8	7.9
平 均 値			46.2	20.1	7.4
CFA 単独	A-4	1095	37.4	15.6	6.4
	A-5	1064	37.6	14.1	4.7
	A-6	1085	38.8	18.5	5.5
平 均 値			37.9	16.1	5.5
生理的 食塩水	C-4	1162	31.8	7.8	3.4
	C-5	1082	25.0	12.0	5.5
	C-6	956	25.1	13.6	8.4
平 均 値			27.3	11.1	5.8

表3 マウス皮下に BGG と共に Complete Freund's adjuvant (CFA) を注射した場合, CFA のみの注射の場合, および生理的食塩水を注射した場合に, 領域リンパ節にあらわれる, ラベルされたリンパ球の比率. トリチウム・チミジンの最後の注射から4週間後.
抗原感作後5週間.

実験の区分	マウスの番号	数えた 総細胞数	細胞 1 個あたりの銀粒子が		
			10個を超えるもの (%)	20個を超えるもの (%)	30個を超えるもの (%)
BGG + CFA	BA-13	1143	35.9	13.1	6.1
	BA-14	1172	34.0	10.4	5.1
	BA-15	1023	31.4	9.8	3.9
	BA-16	986	51.7	26.4	11.2
平 均 値			38.6	16.9	6.7
CFA 単独	A-10	1041	23.2	8.6	1.0
	A-11	1124	17.7	4.5	1.8
	A-12	1107	25.5	6.3	2.9
平 均 値			21.9	6.5	2.2
生理的 食塩水	C-10	1081	23.1	6.5	0.9
	C-11	1143	23.6	11.4	2.6
	C-12	1355	19.2	6.4	3.7
平 均 値			21.9	8.2	2.4

表4 マウス皮下に BGG と共に Complete Freund's adjuvant (CFA) を注射した場合, CFA のみの注射の場合, および生理的食塩水を注射した場合に, 領域リンパ節にあらわれる, ラベルされたリンパ球の比率. トリチウム・チミジンの最後の注射から13週間 (3ヶ月) 後.
抗原感作後12週間

実験の区分	マウスの番号	数えた 総細胞数	細胞 1 個あたりの銀粒子が		
			10個を超えるもの (%)	20個を超えるもの (%)	30個を超えるもの (%)
BGG + CFA	BA-17	977	15.3	9.2	4.1
	BA-18	676	19.2	13.3	7.4
	BA-19	872	22.9	14.9	10.3
	BA-20	822	15.8	12.2	9.7
	BA-21	733	23.1	16.4	9.5
平 均 値			19.0	13.2	8.2
CFA 単独	A-13	1000	—	—	—
	A-14	1205	—	5.0	4.3
	A-15	1018	—	3.0	2.0
平 均 値			—	2.7	2.1
生理的 食塩水	C-13	1000	—	—	—
	C-14	997	—	2.0	1.0
	C-15	1060	—	3.8	2.8
平 均 値			—	1.9	1.2

表5 表1より表4までの平均値だけをとりだしてまとめたもの

			1 週 後	2 週 後	5 週 後	13 週 後
BGG + CFA	細胞 一個 あたりの 銀粒子が	10個を超えるもの (‰)	120.8	46.2	38.6	19.0
		20個を超えるもの	43.7	20.1	16.9	13.2
		30個を超えるもの	16.9	7.4	6.7	8.2
CFA 単独		10個を超えるもの	77.1	37.9	21.9	—
		20個を超えるもの	44.5	16.1	6.5	2.7
		30個を超えるもの	20.9	5.5	2.2	2.1
生理的 食塩水		10個を超えるもの	52.0	27.3	21.9	—
		20個を超えるもの	28.8	11.1	8.2	1.9
		30個を超えるもの	14.9	5.8	2.4	1.2

図1 感作リンパ球のうち、核1個あたりの銀粒子の数が10以上のものの千分比の経時的減少。

図2 感作リンパ球のうち、核1個あたりの銀粒子の数が20以上のものの千分比の経時的減少。

Ⅲ. 実験成績と考案

本実験の主要な成績は、表1—5および図1—3にまとめた。本実験の主旨は、抗原刺激に応じて増殖したリンパ球（感作リンパ球）の寿命を追求するにあるが、まずTTHでラベルされた感作リンパ球のうち、核1個あたりの銀粒子の数が10以上のリンパ球についてみると、図1に示す如く、ラベルされたリンパ球の千分比がTTHの最後の注射から1週間（抗原刺激後2週間）で著減するが、その後はゆるやかに減少する。ここで注目すべきことは、Freundの完全アジュバント単独注射の場合でも、注射から1週間後にはラベルされたリンパ球の千分比が、生理的食塩水を注射した対照例におけるよりも著しく高いが、その後比較的すみやかに減少して、TTHの最後の注射から4週間後（抗原刺激から5週間後）には、生食水対照例

図3 感作リンパ球のうち、核1個あたりの銀粒子の数が30以上のものの千分比の経時的減少。

におけるとはほぼ同じ値を示す。これに対して、BGGと Freund の完全アジュバントを注射した場合にはラベルされたリンパ球の千分比が著しく高い。この差は抗原 (BGG) の存否による差であつて、抗原 (BGG) に対応する感作リンパ球の千分比をあらわすものである。そして、この差は TTH の最後の注射から12週間 (3月後) においてもほぼ不変であつた。

次に、核1個あたりの銀粒子の数が20以上のリンパ球の千分比についてみると、図2にみられるように、BGGと Freund の完全アジュバントを注射した場合と、Freund の完全アジュバント単独注射の場合ならびに生理的食塩水を注射した場合との間に、TTH の最後の注射から4週間以後 (抗原刺激から5週間以後) に明瞭な差があらわれる。また、核1個あたりの銀粒子の数が30以上のリンパ球の百分比についてみても、ほぼ同様である (図3)

上述のいずれの場合においても、TTH の最後の注射から3月後 (抗原注射からもほぼ3月後) になると、抗原に対応する感作リンパ球のうちで寿命の長いものの千分比がほぼ安定してくる。またこの時期になると、抗原刺激を加えない場合においても (Freund の完全アジュバントの単独注射ならびに生理的食塩水注射の場合においても) 出現するところのラベルされたリンパ球の千分比が著しく低下する。

上述の如く、抗原に対応する感作リンパ球のうちには、寿命の長いものがかなり多数あるが、TTH をとりこんだリンパ球が死滅、崩壊して TTH を遊離し、その TTH が他のリンパ球にとりこまれる可能性、すなわち DNA 再利用の可能性が Robinson

ら⁶⁾ によつて指適されている。しかし、そのような再利用の場合には、TTH が著しく稀釈されるために、リンパ球の核1個あたりの銀粒子の数がすくなく、10個を越えることはまずないと思われる。したがつて、核1個あたりの銀粒子の数が20以上の場合、より厳密に言えば30以上の場合には、上述の再利用の可能性を除外して差支えないと思われる。

いと思われる。

このようにみえてみると、核1個あたりの銀粒子の数が30以上のリンパ球でしかも寿命の長いリンパ球について、BGGと Freund の完全アジュバントを注射した場合の千分比から Freund の完全アジュバント単独注射の場合の千分比を差引けば、それが抗原 (BGG) に対応する寿命の長い感作リンパ球ということになる。その値を TTH の最後の注射から12週間後について計算すると、全リンパ球の6.1%となる。このような寿命の長い感作リンパ球は免疫情報を伝達する、いわゆる“免疫学的記憶細胞”

(immunological memory cell) と推定されるが、もし免疫情報がリンパ球の核 DNA に組みこまれていると仮定すれば、必ずしも記憶細胞の寿命が長いことは必要ではない、というのは、記憶細胞が増殖しても、DNA の複製に異常さえなければ差支えない筈だからである。しかしまた、リンパ球の寿命が長いことと免疫学的記憶との間には密接な関係があると考えても差支えないわけで、Fitzgerald (1964)⁶⁾ はその方がより合理的であると述べている。

IV. 結 語

成熟マウスの体幹皮下にウシの γ -グロブリン (BGG) 3 mg を Freund の完全アジュバント 0.4 ml とともに注射し、第5, 6, 7日目に ^3H -thymidine (TTH) を体重1gあたり $0.5\mu\text{c}$ の割合で注射し、領域リンパ節内における TTH でラベルされたリンパ球の千分比を経時的に調べた。別に対照実験として、Freund の完全アジュバントならびに生理的食塩水を単独に注射して、上記と同様の実験を行なつた。

本実験は、抗原 (BGG) の刺激によつて増殖したリンパ球(すなわち感作リンパ球)のうちで、寿命の長いものが免疫情報を伝達する記憶細胞 (memory cell) であるまいかという想定のもとに行なつたも

のであるが、実験の結果、抗原に対応する寿命の長い感作リンパ球が、抗原刺激を加えてから3月後においても、リンパ球1000個につきおよそ6個の割合で出現することが明らかにされた。

文 献

- 1) 尾曾越文亮：リンパ球の回転とリンパ腺の構造。日本臨床, 22: 2333-2341, 1964.
- 2) 尾曾越文亮：リンパ球の動態, とくに抗原刺激に対する増殖反応 (第75回岡山医学会総会特別講演)。岡山医誌, 78別巻: 1-16, 1966.
- 3) 尾曾越文亮：リンパ球の抗原刺激に対する増殖反応。日本医事新報, 42: 9-12, 1965.
- 4) Osogoe, B.: Kinetics of immune cellular proliferation of lymphocytes in lymph node. Acta Path. Jap. (in preparation).
- 5) Robinson, S. H., Brecher, G., Lourie, I. S. and Haley, J. E.: Leukocyte labelling in rats during and after continuous infusion of tritiated thymidine: Implications for lymphocyte longevity and DNA reutilization. Blood, 26: 281-295, 1965.
- 6) Fitzgerald, P. H.: The immunological role and long life-span of small lymphocytes. J. Theoret. Biol., 6: 13-25, 1964.

Cytodynamics of Sensitized Lymphocytes

by

II. Life-span of Sensitized Lymphocytes

Akinobu Yamamoto

1st Department of Anatomy (Director: Prof. B. Osogoe)
and Department of Orthopedic Surgery (Director: Prof. T. Kodama)
Okayama University Medical School

Mice were sensitized with bovine gamma globulin and complete Freund's adjuvant and had received tritiated thymidine at 5, 6, 7 days after the immunization. Among sensitized lymphocytes in the draining lymphnodes, some had long life-span more than 3 months. Such long-lived, sensitized lymphocytes were estimated to be about 0.6% of total lymphocytes in the lymph nodes.