牛痘毒による Arthus 現象に酷似した皮膚反応

第4報 発痘に及ぼす Benzene の影響

翁 振 徳

東京大学伝染病研究所病理学研究部 (部長 宮崎吉夫教授)

[受付: 1月20日・1958年]

牛痘ウィールスによる発痘の組織学的所見については、既に Ledingham(1924), Ledingham and McClean (1928), Thompson and Buchbinder (1932), Downie (1939) 等によって報告されている。

一方, Gratia and Linz (1931) は牛痘ウィールスが Schwartzman 準備能を有していること、天野 (1949), 新保 (1949) 等は牛痘ウィールスの皮内注射で Arthus 反応が発現することをそれぞれ報告した。その後、宮崎、翁 (1950, 1951) は、牛痘ウィールスの適量注射時の発痘の組織反応が Schwartzman 並に Arthus 反応の組織所見に酷似しているものであることを明らかにし、恐らくは局所における抗原抗体反応に起因するものであろうと推測した。

Becker(1948), Thomas and Stetson(1949), Stetson and Good(1951), Stetson (1951) 等の報告で Nitrogen mustard がX線照射並に Benzene と同様に Schwartzman 並に Arthus 反応発現に抑制作用を有することが明らかにされているので、宮崎、翁 (1953) は、この Arthus 反応に酷似した組織反応発現の機序を解明するために、Nitrogen mustard 前処置家兎での発痘経過を組織学的に研究した。その結果、初期における発痘の抑制、その後における局所反応の増強、治癒遅延等の所見殊に、肉眼的に対照家兎の病変と同程度で、組織学的に病巣への白血球浸潤が比較的軽度なのに拘らず、水腫、充血がより高度であることが明らかにされた。又これ等の所見より、発痘抑制の時期でも、ウィールスの増殖は何等の影響をも蒙らないのではないかと示唆した。然しながら、Nitrogen mustard は一般にウィールス不活化剤として用いられ、またわれわれの実験範囲内では、より長期に白血球減少症を持続せしめることが困難であったので、本実験においては、同様の目的で、Benzene の発痘に及ぼす影響につき組織学的に研究すると共に接種局所のウィールスの定量を行い興味ある知見を得たので

報告する。

実験材料及び実験方法

1. 使用牛痘ウィールス。伝研痘瘡研究室より分与を受けた精製痘苗 1.0 ml を健康家兎辜丸内に注射、2 回通過後 4 日目に無菌的に別出した辜丸の50%乳剤 (健康家兎血清, Tyrode の等量混合液で稀釈す) の1000回転 5 分間遠心沈澱上清をアンプルに分注し凍結乾燥した。用に臨み滅菌蒸留水で再溶解、Tyrode 液で稀釈し実験に供した。本ウィールスの最小発痘量は $10^{-7} \times 0.2$ ml で、100乃至1000最小発痘量 $\times 0.2$ ml を体軀側部皮内に注射した。

2. 使用動物。体重2500 g の白色、雄家兎で不顕性感染防止のため入手後直に使用した。

3. Benzene 投与方法。体重 kg 当り 1.0 ml を等量のオリーブ油に混合し、腹部皮下に 3 日間、3 回注射した。

4. 局所ウィールスの定量法。ウィールス接種後一定時間に可及的丁寧な毛を刈り、滅菌蒸留水で 3 回洗滌、滅菌ガーゼで清拭した後、局所皮膚を別出し、乳鉢で海砂と共に、磨碎、Tyrode 液で10%乳剤をつくり、5 回凍結融解した後、1000回転 5 分間遠心沈澱して得た上清を10進法で段階的に稀釈し、各稀釈液 0.2 ml を健康家兎皮内に注射し、6 日後における最少発痘量を測定した。尚、同一時期における検体を同一健康家兎に注射し、個体差を可及的少くする様に努めた。

5. 組織学的検索。別出局所を Helly 氏液で18時間固定し、型の如くパラフィン切片標本をつくり、Hematoxylin-eosin 染色をしたものにつき組織学的に検索する

OW Shintoku: Arthus Phenomenon-like Skin Reaction Caused by Vaccine Virus. IV. Effect of Benzene. Institute for Infectious Diseases, University of Tokyo. —Jap. J. of Bact., 13 (4), 342-348, 1958.

と共に、封入体の検索には同一パラフィン切片を Downie (1939) の方法で染色したものを供した。

実験成績

1. 血中白血球数に及ぼす影響。

体重 kg 当り 1.0ml の割に Benzene を健康家兎皮下に連日 3 回注射すると血中白血球数は 2～3 日後より減少し始め、4～5 日後には何れも 1000 前後の値を示し、その後、約 1 週間に亘り、持続的に白血球減少症を保持せしめることが出来た。尚、この観察期間中体重減少、体温上昇等は認められず、斃死したものはなかった。

次に同様の方法で、健康家兎 No. 53, No. 54 を Benzene で前処置し、48 時間後に体躯背部一侧に 1000 最少発痘量、他側に 100 最少発痘量の 0.2 ml を 2 カ所にそれぞれ皮内注射し、未処置対照家兎 No. 55 における感染後の血中白血球数の変動と比較観察した。

図 1 牛痘ウィルス接種家兎における
総白血球数の変動

図 1 に明らかな如く、No. 53 は 24 時間後より著明な白血球減少を示し、72 時間より以後 1000 前後の値を示した。一方、No. 54 も同様の白血球減少症を呈した。唯、120 時間後に一過性の増加を示した。対照家兎 No. 55 では、これに反し、著明な白血球増加症が認められた。予備実験で、Benzene のみの注射で斃死したものはなかったが、Benzene 前処置後ウィルスの注射を受けた家兎はいずれも斃死した。即ち、No. 53 はウィルス接種後 9 日目、No. 54 は 10 日目にそれぞれ斃死した。また図示しなかったが実験群、対照群共にウィルス接種後体温の上昇が認められた。

2. 発痘経過に及ぼす影響

1) 肉眼的所見。図 2 に示す如く、対照家兎 No. 55 では 1000 及び 100 最少発痘量接種の何れの場合でも、程度の差こそあれ、発赤、腫脹及び病巣中心性の壊死乃至出血等の定型的变化が起り、5～6 日を極期として漸次消退した。然るに Benzene 前処置によりかかる病変の

図 2 Benzene 前処置家兎での発痘経過

ウィルス量	兎番号	ウィルス接種後経過日数				
		2	3	4	5	8
1000MID	No. 53					
	No. 54					
	No. 55					
100MID	No. 53					
	No. 54					
	No. 55					

発現が著明に抑制された。即ち、1000 最少発痘量接種局所の所見は、4 日目までは微弱な発赤を示すに過ぎず、更に 5 日目になると局所の中心に出血性壊死が発現し、炎症もより増大したが、対照に比し非常に弱度で而も発赤を伴わない水腫が認められた。100 最少発痘量接種局所には、5 日目までは殆ど炎症性反応が認められず、発痘が顕著に抑制されたが、唯出血壊死が可成りの程度に認められたことは興味深い。8 日目になると、何れの場合にも対照に比し発赤は極めて弱いが、病巣がより大で、広範な出血壊死巣が認められた。

2) 組織学的所見。Benzene 前処置群で 1000 最少発痘量接種後 5 日目の病巣をみると肉眼的所見に一致して病変の拡りは対照動物に比し著しく小さい。

表皮及び毛根上皮に著明な増殖があり、上皮細胞は往々水腫様変性に陥り、互に融合し小水泡を形成している (附図 1, 2 参照)。上皮細胞中には Downie 染色で大多數のエオジン好性の細胞形質封入体が認められる。真皮乳頭層には出血があり、細胞浸潤が全くなく、水腫も認められないが、結合組織繊維の膨化、変性がみられ、斯る箇所を強拡大で検鏡すると顆粒状を呈し、エオジン小体が認められた。 (附図 3 参照)。併し、病巣は真皮深層には及んでいない (附図 4 参照)。1000 最小発痘量接種の対照群の 5 日目の所見では、表皮は可成り強く増殖しているが、Benzene 処置実験群に比して軽度であつた。真皮には強い細胞浸潤、水腫があり、白血球浸潤の強い処では壊死が起つていた (附図 5 参照)。皮下筋層に接する皮膚の深層に特に炎症が強く、白血球浸潤、毛細血管の強い怒張、充血、血管壁の変性、血栓形成強度の水腫等が存在し、Arthus 現象の場合の組織反応に酷似していた (附図 6, 7 参照)。

次に、Benzene 前処置群の 100 最小発痘量接種局所では、上皮の増殖、エオジン小体の出現等は幾分軽度であ

るが、明瞭に認められ、真皮では所々に顆粒状の結合繊維膨化巣があり、これにエオジン小体が認められた。水腫は殆ど認められない。無処置対照群の病巣は広く、著明な水腫を伴い、多数の白血球浸潤が認められ、上皮の増殖は割合に軽度で一部は既に壊死に陥っていた。エオジン小体の出現は上皮にも真皮中にも認められたが、実験例に比べ却って少なかった。

10日孵化鶏卵漿尿膜に牛痘ウィルスを型通り感染せしめ、72時間後の病変をみると、漿尿膜の高度の白濁、肥厚、軽度の出血が肉眼的に存在し、また組織学的に外胚葉細胞の強度の増殖、変性があり、Downie 染色で、多数のエオジン好性小体が認められた(附図8、9参照)。細胞浸潤、浮腫は殆ど認められないが、線維芽細胞中にエオジン小体が見出された(附図10参照)。これ等の変化は Benzene 前処置家兎の皮膚発痘の所見に比較的良好一致するもの、如く考えられる。

3. 局所ウィルスの増殖に及ぼす影響。

Benzene 前処置家兎で、その発痘が殆ど完全に抑制されているに拘らず、殊に上皮の増殖並に変性が未処置対照家兎に比べ、高度であつたことより、Benzene 前処置が局所ウィルスの増殖に如何なる影響を及ぼすかは興味深いこと、と考えられる。

先ず、予備実験として、前述の方法で家兎2匹を Benzene で前処置し、48時間後に100最小発痘量を背側部両側に一カ所宛皮内注射し、72時間後におけるウィルス量を対照家兎におけるそれと比較した。その結果、肉眼的に全く発痘の認められない前処置家兎の局所においても、 7×10 mm の定型的発痘を示した対照家兎の局所におけると同程度のウィルス量が検出された。この際、対照家兎より得た材料での実験において、高濃度の域に毎常逆比的に発痘の抑制が認められた。Schnitzer and Goddard(1943)は、Benzene 前処置で家兎皮膚に滲透圧の変化が惹起されることを報告しており、又、前述した如く、血中白血球数の減少、病巣への浸潤も殆ど認められなかつたこと等より、ウィルスはより広範に分布し、親和細胞との接触の機会もより大であることが考えられたので、接種局所を中心として、約50 mm の直径で、剔出し、乳剤を作り、同様の実験を行つたが、無処置対照家兎の局所ウィルス量との間に有意な差を認めることが出来なかつた。

次に、局所ウィルスの増殖を逐日的に追求 Benzene 前処置の影響を観察した。

結果は図3に示す如くである。即ち、Benzene 前処置家兎及び無処置家兎の何れにおいても局所ウィルスは

図3 Benzene 前処置家兎接種局所における牛痘ウィルスの増殖曲線

殆ど同程度に増殖し、72乃至96時間でその極に達した。以後、対照家兎でのウィルス量は漸次下降する傾向を示したが、前処置家兎では比較的長期間に亘り同程度のウィルス量が検出された。

尚、血球凝集反応を用い、逐日的に血中抑制抗体の産生に及ぼす Benzene の影響を検討した処、一般に報告されている如く、抑制抗体の産生が抑制されていることが認められた。無処置対照家兎ではウィルス接種後10日頃より出現し、1024倍まで抑制していた。

考 察

白血球毒である Benzene が抗体産生、Arthus 並に Shwartzman 反応発現に抑制作用を有することは衆知のことである。われわれは本実験で Benzene 前処置家兎皮内に牛痘ウィルスを接種し、発痘経過に如何なる影響を及ぼすかにつき組織学的に研究すると共に局所ウィルスの定量を行い次の結果を得た。

未処置対照家兎ではウィルス接種後著明な白血球増加があり、発赤、腫脹及び出血性壊死を示す局所病変が発現し、約5、6日を極期として治療に赴くのであるが、Benzene 前処置家兎では著明な白血球減少が起り、局所病変は約5日間に亘り殆ど抑制されていた。その後却つて病変は、対照に比べ大きく、発赤を伴わない浮腫状、出血性変化を示し、治癒の著しい遷延を示した。

Benzene 前処置群の5日目の病巣を組織学的に検すると、肉眼的に非常に軽度であつたに拘らず、上皮細胞の増殖、変性は著しく高度で多くは水腫性変性に陥っている。病巣の拡がり是对照に比べ著しく小さい。真皮層には軽度の斑状水腫、巣状の結合繊維の膨化変性があり、Downie 染色で上皮細胞中と同様エオジン好性形質内封入体が多数みられた。小血管壁も往々変性像を示した。

然し、細胞浸潤は極めて少く、殊に白血球は殆ど認められなかった。反応、未処置対照家兎では病巣は広く、著明な水腫を伴い、多数の白血球浸潤が認められた。特に皮下筋層に接する真皮の深層に特に炎症が強く、白血球浸潤、血管壁の fibrinoid 変性、充血及び血栓形成等の変化があり、Arthus 反応に酷似した所見が認められた。エオジン小体の出現は上皮にも真皮中にもみられるが却つて少なかった。Rhodes and van Rooyen (1937) は牛痘ウィールスによる角膜炎の組織所見において、Benzene は殆ど作用を有しなかつたと報告しているが、発痘に対しては著明な影響を有することが明らかにされた。一方、抗体産生をみない宿主である孵化鶏卵漿尿膜の病変については、Goodpasture, Woodruff and Buddingh (1932), Buddingh (1936), Tang and Wei (1937), Levaditi and Voet (1937), Downie (1939) 等による記載があるが、われわれも亦同様の所見を得、而も、これ等の変化は Benzene 前処置家兎の皮膚所見に比較적으로一致していた。

近時、X線照射宿主におけるウィールスの増殖に関し Taliaferro and Taliaferro (1951), Beutler and Gezon (1952), Syverton, et al. (1952), Cheever (1953) 等によつて興味ある所見が報告されているが、Benzene 前処置家兎の局所ウィールスの定量に関する本実験において、ウィールスは未処置対照家兎の場合と殆ど同程度に増殖、72~96時間ていづれもその極に達し、以後対照家兎でのウィールス量は漸次減少するが、前処置家兎では比較的長期間殆ど一定量のウィールスが検出されることが認められた。従つて、発痘抑制時でもウィールスは対照例と同様に増殖するものであり、その後における局所反応の増強及び治癒遷延は、より多くのウィールスの増殖によるものではなくて、局所組織の反応性の変調によるものと考えられる。

Rusk (1914), Simonds and Jones (1915), Hektoen (1916) 等は Benzene の抗体産生抑制能について報告しているが、本実験においても Benzol 前処置により著明な血球凝集反応阻止抗体産生の抑制が認められた。

以上の実験成績より、Benzene 前処置家兎における牛痘ウィールス接種局所の組織学的所見は、抗体産生をみない孵化鶏卵の漿尿膜における所見に略々一致しており、それ等は、ウィールスの増殖に伴う直接的組織反応の結果に基因するものと考えられる。然しながら、無処置対照家兎にみられる Arthus 現象に酷似した組織反応の発現の機序が局所における抗原抗体反応に存するものと直に結論することは早計であり、その点に関しての今

後の実験によつて解明されねばならない。

結 論

1. 家兎皮下に Benzene を注射すると著明な白血球減少症が起り、かゝる前処置家兎では牛痘ウィールスによる発痘が顕著に抑制される。

2. 肉眼的に発痘が抑制されているに拘らず、組織学的には上皮細胞の高度の増殖及び変性像があり、真皮層には細胞浸潤が殆んど認められず、結合組織の巣状の変性があり、エオジン好性小体が多数に存在し、孵化鶏卵漿尿膜感染の所見に非常によく一致している。

3. 局所ウィールスは対照家兎の場合と殆ど同程度に増殖するが、対照に比し、より長期に亘り、一定量のウィールスが検出される。

4. Benzene 前処置で牛痘ウィールスに対する血球凝集反応阻止抗体の産生が抑制される。

終りに臨み終始御懇篤な御指導を賜つた宮崎吉夫教授に深甚なる謝意を表すると共に御協力下さつた伝研第五細菌研究部飯田毅博士に感謝します。

文 献

- 1) Amano, S.: Trans. Soc. Path. Japon., 38, 15, 1949.
- 2) Becker, R.M.: Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 69, 247, 1948.
- 3) Beutler, E. and Gezon, H. M.: J. Immunol., 68, 227, 1952.
- 4) Buddingh, G.J.: Am. J. Path., 12, 511, 1936.
- 5) Cheever, F. S.: J. Immunol., 71, 431, 1953.
- 6) Downie, A.W.: J. Path. and Bact., 48, 361, 1939.
- 7) Goodpasture, W.W., Woodruff, A.M. and Buddingh, G. J.: Am. J. Path., 8, 271, 1931.
- 8) Gratia, A. and Linz, R.: C.R. Soc. Biol., 108, 238, 1931.
- 9) Hektoen, L.,: J. inf. Dis., 19, 69, 1916.
- 10) Ledingham, J. C. G.: Brit. J. exp. Path., 5, 332, 1924.
- 11) Ledingham, J. C. G. and McClean, D.: Brit. J. exp. Path., 9, 216, 1928.
- 12) Levaditi, C. and Voet, J.: Pres. Med., 45, 113, 1937.
- 13) Miyazaki, Y. and Ow. S.: Trans. Soc. Path. Japon., 39, 191, 1950, 40, 237, 1951, 42, 83, 1953.
- 14) Rhode, A.J. and Van Rooyen, C.E.: J. Path. and Bact., 44, 357, 1937.
- 15) Rusk, G. Y.,: Univ. California Publ. Path., 2, 139, 1914.

- 16) Schnitzer, R.J. and Goddard, I.G. : J. Immunol., 46, 133, 1943.
- 17) Simonds, J. P. and Jones, H. M. : J. Med. Research, 33, 197, 1915.
- 18) Sinpo, K. : Trans. Soc. Path. Japon. 38, 249, 1949.
- 19) Stetson, C.A. and Good, R.A. : J. exp. Med., 93, 49, 1951.
- 20) Stetson, C. A. : J. exp. Med. 93, 347, 1951.
- 21) Syverton, J. T., Werder, A. A., Friedman, J., Roth, E. J., Graham, A. B. and Mira, O. J. : Proc. Soc. exp. Biol. and Med., 80, 123, 1952.
- 22) Taliaferro, W. H. and Taliaferro, L. G., : J. Immunol., 66, 181, 1951.
- 23) Tang, F.F. and Wei, H. : J. Path. and Bact., 49, 317, 1937.
- 24) Thomas, L. and Stetson, C.A. : J. exp. Med., 89, 461, 1949.
- 25) Thompson, R. and Buchbinder, L. : J. Immunol., 22, 267, 1932.

附 図 1

附 図 2

附 図 3

附 図 4

附 図 5

附 図 6

附 図 7

附 図 8

附 図 9

附 図 10

写 真 附 図 説 明

1. Benzene 処置兔の接種局所、上皮細胞の増殖が強度で、乳頭部に出血、真皮に巣状の壊死巣があるが、細胞浸潤は殆どない。H. E. 染色。
2. 上皮細胞の強拡大像。上皮細胞の小水泡状変性とエオジン好性小体がある。Downie 染色。
3. Benzene 処置兔の真皮層における巣状壊死巣。結合組織線維の膨化、顆粒状変性とエオジン好性小体が見られる。Downie 染色。
4. Benzene 処置兔の真皮深層部。この部には病変の波及は認められない。H. E. 染色。
5. 対照兔の接種局所。上皮細胞の増殖、高度の細胞浸潤、水腫、壊死像がある。H. E. 染色。
6. 対照兔の真皮深層部、細胞浸潤、血栓形成、水腫、出血等が著明である。H. E. 染色。
7. 対照兔の真皮層にみられる血管壁の fibrinoid 変性、H. E. 染色。
8. 牛痘毒接種 72 時間後の漿尿膜、外胚葉の肥厚と線維芽細胞の増殖がある。H. E. 染色。
9. 漿尿膜外胚葉の強拡大像。上皮細胞の増殖とエオジン好性小体が見られる。Downie 染色。
10. 漿尿膜中胚葉における線維芽細胞の増殖、エオジン好性封入体が見られる。Downie 染色。