菌体内毒素の白血球 Migration の阻止作用に関する研究

第1報 In vitro 及び in vivo の白血球 Migration の阻止作用

田 中 章 雄

東京大学伝染病研究所第三細菌研究部

〔受付：8月24日・1959年〕

I. 序 言

菌体内毒素によっておこされる生体反応は、極めて複雑多様であるが^{1) 2) 12)}、このうち白血球に関するものが尠くない。即ち適当量の内毒素注射によって先ず leucopenia が現れ、次いで leucocytosis に移行してくる。又内毒素の最も主要な活性の一つである発熱作用にも白血球が関与しているとする幾多の実験報告もある³⁾。更に Schwartzmann 反応における白血球の重要性が指摘されたこと⁴⁾ もあった。これらの事実は内毒素作用と白血球との深い関連を示唆するものと考えられる。一方観点をかえて炎症という面からみる時、細胞反応の因子としての白血球の重要性は論ずるまでもない。たまたま本研究室において内毒素と炎症に関する研究が行われていたことから内毒素の白血球に対する作用を検討しようとしたが、そのためには、先ず白血球の如何なる機能を指標として、毒素の影響を調べるかゝ問題となるのは当然である。そこで私は、比較的簡単な手技によって毒素作用を直接観察することが出来る点で白血球の migration を選んだ。

in vitro の実験では、古く Wright が血液の殺菌性を調べる目的で毛細管法によって白血球 migration を調べており⁵⁾、その後ツベルクリンの影響を同様の方法によって観察した報告⁶⁾ があるが、その後小組織片を用いる方法⁷⁾、或は slide-cell を用いる方法⁸⁾ 等が報告されている。これらの実験では結核菌の菌力との関係^{10) 11)}、ツベルクリンの影響に関するもの^{9) 12)}、或は Brucella 抗原の monocytes に対する影響¹³⁾ をみたものが多い。一方毛細管法は Ketchel¹⁴⁾ 等によって最近再び使用されている。

さてここで報告しようとする内毒素の migration に関する報告は比較的少ないが、Martin 等⁷⁾ は 0.058~0.58 $\mu\text{g/ml}$ の毒素で migration の阻止をおこすと報じ、これ

に反して Cluff 等⁸⁾ は in vitro ではこのような作用は認められず、in vivo 即ち毒素を注射した動物の血液で初めて阻止を生ずると報告し、更に Meier 等⁵⁾ は 10^{-7} ~ 10^{-8} の高稀釈での促進をみている。この様に内毒素の migration に対する影響に関しては一致していない点がみられるので、私は先ずこれを確めることから実験を始め、第一報として in vitro での内毒素の直接作用による阻止と、毒素を注射した動物の血液でみられる migration の阻止とを比較検討した。

II. 材料及び方法

- a) 動物：体重 2~3 kg の雄の健康家兎を使用した
- b) 菌体内毒素：(1) 7 P₂, S. paratyphi B 8006 の菌体から分離精製したもので、稀醋酸抽出、アセトン分画沈澱及び超遠心による分画沈澱を反復して、110,000 g 60分間の沈澱部分をとったものである。電気泳動上略々均一の像を示す。(2) E₂ Sh. flexneri Type Mita (6) の菌体を水で抽出し、超遠心で細分劃したもので 80,000 g 60分間の沈澱部分をとったものである。蛋白 43%, 燐 0.85% を含む。(3) E₃・上記水で抽出した菌体残渣を Westphal の phenol-水抽出法で抽出し、上と同様超遠心で細分劃して 40,000 g 60分間の沈澱部分をとったものである。蛋白 1.3%, 燐 2.4% を含む。以上の内毒素分画は何れも本研究室の河西博士より分与をうけた。
- c) ヘパリン：第一化学薬品株式会社製の 1 mg 中 116単位を含有する Na 塩を使用した。
- d) Migration：既に述べた様に migration の方法と

TANAKA Fumio: Studies on the inhibitory effects of endotoxins on the leucocyte migration I. The inhibition of leucocyte migration in vitro and in vivo 3rd Div., the Institute for Infectious Diseases, Univ. of Tokyo—Jap. J. of Bact., 189-193, 1960.

して slide-cell によるものと、毛細管法の二つの主要な方法があるが、簡単な点、読みやすい点及び多数の標本を一度に作る事が出来、従つて間違の少い結果を得ることが出来るという点等から、私は毛細管法を用い、Ketchel 等¹⁰⁾の法を基礎として、以下の要領で行つた。

血液を採取する小試験管に 0.5mg/ml のヘパリン生理食塩水溶液を夫々 0.04ml づつ分注し、37°C のフラン器中で乾燥し、heparin-tube として用意しておく。in vitro の実験には、これに所要の濃度の被検液(内毒素)を $1/10$ 量、即ち 0.1ml 加える。血液は何れも家兎の心血を用い、heparin-tube に 1 ml ずつ採取し、軽く振盪混和

表 1 各家兎における migration の時期的変動

家兎 番号	実験 番号	日 付	migration distance			
			1 時間	2 時間	3 時間	4 時間
K 5	27	19, Jul.	12	17	26	31
	50	9, Aug.	11	13	32	43
	61	22, Aug.	10	19	28	42
K 6	27	19, Jul.	14	31	47	64
	37	27, Jul.	26	36	44	51
	62	22, Aug.	22	40	51	60
K 7	51	9, Aug.	10	20	25	35
	52	12, Aug.	10	23	35	45
	63	22, Aug.	15	30	42	—
K 10	24	16, Jul.	24	40	55	—
	53	12, Aug.	16	38	52	63
	94	22, Aug.	20	38	51	67

し、更に約 5 分間室温に放置した後暫らく氷水中に浸して静置し、内径約 1 mm の毛細管の端をこれに浸し、血液を毛細管現象により吸収して両端を火焰にて溶封する。その際アルコール中に入れて冷却する。この様にして同一血液サンプルについて約 10 本前後の毛細管を作製した。これを氷水を充たした小試験管に入れ、1500rpm 5 分間遠心すると、上から血漿、白血球層 (buffy coat) 及び赤血球層の三層に分れる(図 1 a)。これを直ちに水からとり出して別の小試験管に移し、37°C のフラン器中に入れ、血漿の凝固を待つて 30 分後にスライドガラス上にパラフィンで固定し、第一回のよみとりを行う。その後一時間毎にフラン器中よりとり出し migration distance をよむ。結果は buffy-coat と mass migration の前端との距離を ocular-micrometer の読みで表わした。この場合 5×10 の拡大で観測し、ocular-micrometer の目盛の 100 は 2 mm に相当した。同一の血液から作製した約 10

図 1. 白血球 migration

本の毛細管の平均値(5以下四捨五入)をその血液の migration の値として記載した。

e) 白血球数は家兎の耳静脈の血液について、通常の方法によつて算定し、又体温の測定は直腸温によつた。

III. 実験成績

A. 家兎の個体差

人については個体差の相当著しいことが知られている¹⁰⁾ので、家兎の場合どの程度かを知るため四羽の家兎について日を変えて採血し実験を行つた。図 2 に示す如く何れの場合も migration の距離は、少くとも略々 4 時間迄は大体直線的に増加していることが解る。図 2 は各家兎について 1~2 カ月の期間中日を変えて行つた三度の実験の平均値と標準偏差とを示したもので、F 試験を行つてみると家兎間の個体差は 5% の危険率で有意であるという結果になる。即ち少くともこの位の期間では時期的変動よりも、家兎間の個体差の方が大きい。

B. in vitro の実験

上述した様に Martin 等⁷⁾は種々の菌体成分の in vitro における阻止実験で、肺炎球菌の莢膜多糖体等には阻止作用を認めていないが、腸内細菌の菌体内毒素では 1μg

図 2. Migration の時間推移と家兎の個体差

以下の濃度で阻止を示すと報告し、一方 Cluff 等⁸⁾ は *Sh. flexneri* の毒素等を用い、 $25\mu\text{g}$ でも尚阻止がみられないと述べており、両者の結果が一致してない。更に興味あることには、Meier 等¹⁵⁾は 10^{-7} , 10^{-8} の高稀釈濃度において却つて促進を示すと報告している。そこで私は、先ず *S. paratyphi* の菌体内毒素 ($7P_2$) 及び *Sh. flexneri* の菌体内毒素 (E_2) を用いて *in vitro* の実験を行つた。表 2 に示すように、最終濃度が $0.001\mu\text{g/ml}$ ~ $0.1\mu\text{g/ml}$ になる様な 3 つの 10 倍稀釈系列を作り、対照として生理食塩水を入れ比較して見たが、その差は著

表 2 高稀釈内毒素の影響 (in vitro)

内毒素	E_2				$7P_2$			
	家兎番号				家兎番号			
毒素濃度	1	S5	29	18	24	18	26	
$0.001\mu\text{g/ml}$	40	45	40	35	55	30	35	
$0.01\mu\text{g/ml}$	70	50	30	75	70	40	35	
$0.1\mu\text{g/ml}$	65	40	30	40	70	40	35	
0 (Control)	45	55	40	50	60	45	30	

表中の数字は migration distance の 3 時間値を示す

明でなく、特に促進しているとも思われない。更に濃度を増し、 $1\mu\text{g/ml}$ においても対照同様の migration がみられたが、 $10\mu\text{g/ml}$ 、或は $100\mu\text{g/ml}$ の毒素濃度では、 $7P_2$ 及び E_2 何れの場合においても殆ど migration がみられなかつた。即ち $10\mu\text{g/ml}$ 以上の高濃度において内毒素は白血球に直接的作用を及ぼし、migration の阻止

表 3 内毒素注射量と阻止の時間的關係

毒素種類	注射量 $\mu\text{g/kg}$	実験番号	家兎番号	migration distance ***						
				採血時間						
				前	5分	30分	2時間	4時間	6時間	
E_2	1.0	6・3	63	20	0	0	0	0	30	
		6・3	66	40	0	0	0	0	30	
		6・4	67	60	0	0	0	0	45	
		6・4	68	55	0	0	0	35		
	0.2	6・5	69	35	(20)	0	0	0	50	
		6・19	74	25	0	0	0	20	25*	
		6・21	79	20	(15)	0	0	15		
		6・21	80	20	0	0	0	(10)	20*	
		6・23	81	40	0	0	0	40	25*	
		6・23	82	40	0	0	0	20	35*	
		6・24	83	25	25	0	0	35		
		6・24	84	(25)	0	0	0	25		
		6・30	87	30	0	0	0	20	60	
		6・30	88	45	20	0	0	30	45	
		6・37	85	50	0	0	(0)	60		
		6・37	86	(15)	0	0	0	45		
	0.1	6・9	73	35	20	0	(0)	40		
		6・9	74	25	20	0	30	40		
		6・9	68	40	25	0	20	40		
		6・9	70	40	30	0	(0)	40		
		6・18	71	30	20	0	0	30		
		6・18	72	25	(10)	0	0	25		
		6・16	K66	25		0	5	30		
		6・15	68**	30	25	0	0	30		
		6・15	70**	30	35	0	30	45		
	0.04	6・8	71		20	20	25			
		6・8	72		25	15	25			
		6・8	75	20		25	45			
		6・8	70	20	15					
$7P_2$	0.04	6・29	68	25	(35)	25	40			
		6・29	70	20	(20)	0	35			
		6・29	K66	35	25	0	35			
		6・29	K70	40	45	0	30			

* 1 時間値

** 1 週間後の同一家兎における migration distance

*** 2 時間値

をおこした。

C. 毒素注射家兎の血液での実験

以上の実験により内毒素が *in vitro* においても直接白

血球に傷害を与えることが判つたが、次に in vivo では如何なる作用を及ぼすかが当然問題になってくる。先ず内毒素 E_s を $1\mu\text{g}/\text{kg}$ 家兎の耳静脈内に注射し、注射前(対照)、5分後、30分後、2時間後、4時間後及び6時間後に心血を採取して、夫々 migration に対する影響を調べた。同様にして $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.04\mu\text{g}/\text{kg}$ 、亦 E_s より毒性の強い $7P_2$ では $0.04\mu\text{g}/\text{kg}$ を静脈内注射して実験した。その結果は表3に見られる様に、 E_s の $1\mu\text{g}/\text{kg}$ では5分後、30分後、2時間後では全例 migration の阻止(以下阻止と略す)を認め4時間後においても、大部分の例で阻止が持続していたが、6時間後では全例再び migration を示している。 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ では、30分後及び2時間後では、全例に阻止が認められるが、5分後で阻止を示さぬものもあり、12例中8例に阻止をみ、4時間後では大部分の例で阻止がとれ、再び migration を示している。 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ においても30分後は、全例完全阻止しているが、2時間後において9例中4例は migration を示し、5分後及び4時間後では、略々全例とも migration を示している。 $0.04\mu\text{g}/\text{kg}$ では例数は少ないが、全例とも5分後から4時間後に亘つて阻止は認められなかった。ところが、 $7P_2$ $0.04\mu\text{g}/\text{kg}$ を注射して30分後のみに4例中3例に完全阻止が認められた。この $7P_2$ の LD_{50} は約 $4\mu\text{g}/\text{g}$ で、上記の *Shigella* の毒素 E_s の約 $11\mu\text{g}/\text{g}$ に比し約3倍毒性が強い分面であり、その阻止作用も毒性に平行的に強いものと思われる。尚 $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ を注射した同一家兎に一週間後に、再び $0.1\mu\text{g}/\text{kg}$ を注射して migration を調べて見たが、一週間前と類似の成績を示し、先の注射の影響は認められなかった。以上を通じて注射毒素量の減少に従つて阻止の持続時間も短縮し、最も少い注射量でも阻止がみられる時期は、注射後大体30分前後になるものと思われる。換言すればこの時期が阻止作用の極大点ということになる。又 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ を注射した場合には、30分後及び2時間後で略々確実に阻止がおこることが出来る。従つて以後の実験では、この毒素量を用い30分後及び2時間後の完全阻止を指標として実験を行った。

D. 阻止と発熱及び白血球数の変動との関係。

以上の実験によつて、阻止をおこす毒素量及び時間的経過を略々明らかにすることが出来たので、次に阻止作用と内毒素による他の生体反応との関係を調べるため、先ず発熱及び白血球数の変動をとりあげた。前者については、後の報告で述べる様に発熱耐性と阻止耐性とが、類似しているからである。後者は同じ白血球を対照とした現象であるからである。さて上述の毒素量に対応して

図3. 体温、白血球数の変動及び Migration との関係

$1.0\mu\text{g}/\text{kg}$ 、 $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ 及び $0.04\mu\text{g}/\text{kg}$ 注射の場合の体温及び白血球数の変動と、この場合の阻止実験の結果とを図3に示した。これらに対応してみると、例えば $0.2\mu\text{g}/\text{kg}$ の時は leucopenia の時期が3時間後まで、完全阻止は5分後より2時間までであり、その他の例を通じてみても白血球数減少期と阻止の持続期間とが大体一致している様に思われる。こゝに示したのは一例に過ぎないが、この事実は多数の実験を通じてみられたことで両者間に直接的関係が存在することを推察させる。

IV. 考 察

Cluff 等⁹⁾ によると migratoin 阻止の状態にある buffy-coat をとり出してほぐすと、個々の白血球細胞は、再び運動性を示すという。即ちこの阻止現象の本態は、細胞の運動性の障害というよりも、その表面性状の変化(粘着性 stickiness の増大)によつて遠心操作の際に細胞がお互同志粘着するために游出がおこらないことであると推論している。本報告において、阻止限界前後の内毒素注射によつて生ずる他の生体反応と阻止現象との関連を調べて、種々の内毒素の生体反応の pattern のうちで、この阻止現象がどういう位置を占めるものかを知ろうとした。その結果白血球減少の生じている期間と阻止のみられる期間とが一致しているようにみえる。内毒素注射による leucopenia は主に肺及び脾等の毛細管網に白血球が segragate され、体循環から分離されることによると考えられている¹⁰⁾。上述のように阻止の本態が、粘着性の増大に基くものとすれば、この同じ現象が原因となつて、上記の segragation とそれに基く leucopenia がおこり、従つて時期的関係が一致するものと解釈できよう。本実験の結果得られた主要な結論は、この阻止が内毒素の白血球に対する直接的作用ではなくて、生体反応

によつて mediate されて生じた二次的反應と考えられるという点である。これは以下の簡単な計算によつて明らかであろう。即ち *in vitro* の完全阻止濃度は $10\mu\text{g/ml}$ であるに反して, *in vivo* 即ち内毒素を注射した場合には $0.2\mu\text{g/kg}$ で完全な阻止がみられる。家兎の血液量を体重の約 7% とすれば, kg あたりの血液量は 70ml となり, $0.2\mu\text{g/kg}$ の内毒素注射によつて生ずる最大濃度は $0.2\mu\text{g}/70\text{ml} \approx 0.003\mu\text{g/ml}$ となり, *in vitro* の阻止濃度の約 $1/3000$ に相当する。従つて *in vivo* の阻止を毒素の直接作用として説明することは到底不可能であつて, 毒素が生体に作用して何らかの mediator を生じ, これが白血球の変化を招来すると考えざるを得ない。更に重要な点は, 阻止発現の時間的関連と, 量の問題とである。即ち $1\mu\text{g/kg}$ の注射量では, 注射後 5 分で既に阻止がみられる。これは発熱反應の潜伏期が 15~30 分であるのに比べて極めて短い。又阻止量も $0.2\mu\text{g/kg} \sim 0.1\mu\text{g/kg}$ という極めて少量である。以上の二つの事実は二次的作用であつても, 比較的一次作用点に近い反應であつて, 急性毒性の本質的反應に深い関係があるものではないかということを推察させる。先に述べたように内毒素の作用機序は不明であるが, その一次作用点は漠然と中枢神経系, 殊に視床下部 (Hypothalamus) 等が考えられている様である。これに関連して犬の脳循環と体循環とを連絡した parabiose の実験¹⁷⁾ は非常に興味深い。こゝで自身には毒素を受けないで, 毒素注射を受けた犬の頭部循環と連絡せしめた他の犬に白血球数変動, 体温上昇及び高血糖等の反應が現われることが知られている。この場合も一次作用点が中枢にあつて, そこで產生された mediator が二次的に血流を介して, これらの反應を起すものと解釈されよう。発熱反應における所謂 endogenous pyrogen もこの様なものゝ一つと考えられるが, この場合には脳室内への直接注射で, 潜伏期がなくなり, 発熱度も上昇すること等¹⁸⁾ が判明してきて, 種々複雑である。何れにしてもこの様な mediator が判明すれば, 作用機序の解明に大きな一歩を進めることが出来ると思われる。そこで白血球 migration の阻止というこの系はその手技としても有利な点が多いと考える。

V. 結 論

1. 家兎心血の白血球 migration は少くとも 4 時間迄は大体直線的に増加し, 特定個体における時期的変動は大きくない。

2. *in vitro* では約 $10\mu\text{g/ml}$ の毒素濃度で初めて阻止を来すに反し, 家兎に静脈注射した場合には, $0.2 \sim$

$0.1\mu\text{g/kg}$ の注射量で阻止がおこる。この量的関係から生体内でおこる変化は, 内毒素の直接作用ではなくて, 生体反應を介する二次的作用の結果と解される。

3. $0.2\mu\text{g/kg}$ の内毒素注射で注射後 30 分及び 2 時間後に採取した血液では, 毎常確実に阻止がおこる。この阻止持続期間は注射後大体 5 分~4 時間後に及ぶが, 毒素量を増すと, この阻止持続期間が延長し, 又減量して最後に残るのは, 注射後 30 分前後で, この時が, 阻止作用発現の極期と考えられる。

4. 阻止作用の発現と体温及び白血球数の変動との關係をみたが, 阻止は leucopenia の時期と一致してみられる様である。

拙筆するに当り御懇篤な御指導並びに御校閲を賜つた武田徳晴教授に衷心より感謝するとともに, 終始多大な御援助及び御助言を戴いた渡辺貞博士はじめ研究室の諸学兄に尙貴重な材料を提供下さつた河西信彦博士に謝意を表する。

本研究は一部文部省科学研究費 (炎症發生機構研究班) の援助を受けたので茲に謝意を表する。

文 献

- 1) 武田徳晴: 日本細菌学会誌, 8, 441, 昭28.
- 2) Eichenberger, E. et al.: Angewandte Chemie, 49, 1190, 1955.
- 3) Benett, I. L. and Beeson, P. B.: J. Exp. Med., 98, 493, 1953.
- 4) Stetson, C. A.: J. Exp. Med., 93, 489, 1951.
- 5) Wright, A. E.: Proc. Roy. Soc. Med., 8, 41, 1915.
- 6) Holst, P. M.: J. Hyg., 20, 342, 1921.
- 7) Martin, S. P. and Chaudhuri, S. N.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 81, 286, 1952.
- 8) Berthrong, M. and Cluff, E. L.: J. Exp. Med., 98, 331, 1953.
- 9) Hall, H. E. and Schrago, M.: Am. Rev. Tbc., 75, 807, 1957.
- 10) Martin, S. P., Bloch, H. and Allgöwer, M.: Am. Rev. Tbc., 59, 562, 1949.
- 11) Martin, S. P., Middlebrook, G. and Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 91, 381, 1950.
- 12) Seibert, F. B. and Fabrizio, A. M.: Am. Rev. Tbc., 66, 314, 1952.
- 13) Heilman, D. H., Howard, D. H. and Carpenter, C. M.: J. Exp. Med., 107, 319, 1958.
- 14) Ketchel, M. M. and Favour, G. B.: J. Exp. Med., 101, 647, 1955.
- 15) Meer, R. u. Schär, B.: Experimentia, 10, 376, 1954.
- 16) Thomas, L.: Annual Rev. Physiol., 16, 467, 1954.
- 17) Penner, A. and Klein, S. H.: J. Exp. Med., 96, 59, 1952.
- 18) Petersdorf, R. G. et al.: J. Exp. Med., 106, 787, 1957.