

結核菌菌体成分(ロウ D)によりひき起こされる生体反応

—とくにアジュバント活性について—

田 中 崑

九州大学医学部胸部疾患研究施設

受付 昭和 45 年 10 月 31 日

BIOLOGICAL REACTIONS INDUCED BY A LIPOPOLYSACCHARIDE (WAX D) OF MYCOBACTERIA WITH SPECIAL REFERENCE TO ADJUVANT ACTIVITY*

Atsushi TANAKA

(Received for publication October 31, 1970)

Relationship between adjuvant activity of a lipopolysaccharide fraction of tubercle bacilli, wax D, and its chemical structures has been investigated and the following conclusions were obtained: (1) the presence of the peptide moiety is important for the activity; (2) mycolic acid plays an important role in the activity; (3) hydroxyl groups are not important; (4) the size of the polysaccharide portion should be large enough for wax D to exert the activity. These findings together with the isolation of a unit structure identical with wax D ('bound wax D') from delipidated BCG cell walls led us to the assumption that the similarity of wax D to the cell surface of mycobacteria in chemical and physicochemical structures may be required for wax D to be active as adjuvant.

Tubercle bacillary bodies which are usually used for Freund's complete adjuvant were shown to be disadvantageous particularly for a weak antigen, because the antigenicity of tubercle bacilli competes with that of an antigen incorporated, causing a negative effect on its adjuvant activity. In this connection, an acetylated and purified wax D subfraction, AD₆, was found to be a much better adjuvant in that it was virtually free from competing antigenic materials, exerting no negative effect. AD₆ was also found to be highly purified not only as a material but also in that it does not exert many other various biological activities and is considered to be advantageous as adjuvant for practical as well as research purposes.

Statistically significant increases in plaque number and size were obtained with spleen cells derived from mice which had received sheep red blood cells plus wax D or other several adjuvants when measured by Jerne's plaque technique. This strongly suggests that the adjuvants exert the adjuvant effect through increasing the number of antibody-forming cells as well as enhancing the capacity of each cell. The adjuvant effect in terms of the increase in plaque size was long-lasting, while that in terms of the increase in plaque number transitory. Memory cells appeared to be able to 'memorize' the adjuvant effect when wax D was used in the primary immunization, while wax D exerted no adjuvant effect on memory cells which had been produced by the injection of sheep red blood cells alone.

AD₆ was found to increase the phagocytic activity of the reticuloendothelial system in mice.

* From the Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine, Kyushu University, Meinohama, Fukuoka 814 Japan.

This effect of AD₆ was long-lasting, while other several adjuvants or stimulants were found to increase the activity only for short periods. The fact that AD₆ which possesses no other biological activities so far tested except the adjuvant activity exerted the adjuvant activity and reticuloendothelial system-stimulating activity may suggest that these two activities may be closely related.

生体は種々の防御反応を有しており、この防御反応なしに生体は生き伸びることはできない。結核菌は長い歴史を通じ、人類にとって最も危険な侵入者の一つであった。したがって身体のどこかに結核菌が侵入すると、組織は非常に活発な防御反応を示す。防御反応は宿主-寄生体相互反応であり、それぞれ複雑な2つの生命体間の反応だから、その解析と理解は容易でない。解析の有力な手段の一つは、両方の複雑な因子をできるだけ代表的な単一の因子にしぼることであろう。

私たちは宿主-結核菌間の相互反応を理解するために、菌体成分の代表としてリポ多糖体(ロウDともよばれる)を取り上げ、これをできるだけ精製して結核菌体側の因子を単一にした。最近安平らは種々の結核菌体成分を検討した結果、ロウDだけが結核結節をひき起こすことを見出した¹⁾。つまり結核菌特有の組織反応はロウDによりひき起こされることがはつきりした。このことはロウDは結核菌体が示す生物活性をかなり再現できる可能性が強いことを示唆している。たしかに後述のようにロウDは結核菌体が示す種々の生物活性をひき起こすことができるが、その中でわれわれはとくに免疫学的活性であるアジュバント活性(ア活性)に注目した。

以下ロウDのア活性とその化学構造の関係、ロウDの精製とその応用、ロウDのア活性のメカニズムなどについて、われわれの研究室で得られた成績について述べる。

1. 結核菌体中のアジュバント活性因子

(1) Freund's complete adjuvant (FCA)

Lewis らは結核菌をモルモット腹腔に注射しておき、数日して種々の抗原を同じ場所に注射すると、その抗原に対する抗体産生が高まることを観察した²⁾。また Diens らは通常モルモットは卵白抗原感作により即時型の皮膚反応を示すのに対し、結核モルモットは遅延型の皮膚反応を示すことをみた³⁾。Coulaud は結核菌にパラフィンを加えて注射すると、ツベルクリン反応が増強することを観察した⁴⁾。これらの過去の観察結果をもとにして、Freund はいわゆる Freund のアジュバントを作った⁵⁾。

一般にある物質が抗原に加えられて注射されるとき、その抗原に対する免疫反応が著しく増強される場合、そ

の物質はアジュバントとよばれる。アジュバントは数多く知られているが、Freund のアジュバントは代表的なものである⁶⁾。鉱物油と界面活性剤を抗原液とまぜ油中水型エミュルジョンにして用いるときは Freund's incomplete adjuvant とよばれ、この鉱物油にさらに結核菌体を加える場合、Freund's complete adjuvant (以下 FCA と略) とよばれる。

Freund アジュバントの応用範囲と頻度は大きい。一般に蛋白抗原に対する抗体産生の増強のためによく使われるが、遅延型過敏症をひき起こすためには FCA がしばしば用いられる。実験的に自己免疫疾患を作るために FCA は不可欠で、そのため最近 Burnet は実験的自己免疫疾患は FCA の所産であると表現した⁷⁾。たとえば Pasteur が狂犬病ワクチンを作ったところ、ワクチン注射後麻痺の発病率は 0.2% であった。これを動物に再現するため、兎脳をサルに 30~100 回注射したところ、25% の発病率が得られた。FCA を用いると 1 回の注射でほとんど 100% の発病率を得ることができる。

(2) ロウD

FCA の中でそのア活性に最も重要な成分は結核菌であるということが出来る。結核菌は生菌である必要はないので、結核菌体中のある物質が活性因子であると思われる。結核菌の特徴の一つは、それが多量の脂質を含んでいることであるが、Raffel は Anderson, Asselineau, Lederer の方法で抽出分画された菌体各脂質画分の中で、クロロホルム可溶画分であるロウDにア活性が存在することを見出した⁸⁾。

加水分解の結果ロウDの構造はだいたい図1に示すようなペプチドと多糖体とミコール酸とよばれる炭素 80 以上の高級分枝脂酸からなる複合体であるということが分かった⁹⁾。Freund らは結核菌とロウDの単位重量当りのア活性を比較し、結核菌体のほうが強かつたので、ロウDが果たして活性因子であるかどうか疑わしいと報告している¹⁰⁾。しかしわれわれはロウDがたしかに活性因子であるといえる成績を得ており、Freund らの疑義

Fig. 1. Structure of Wax D

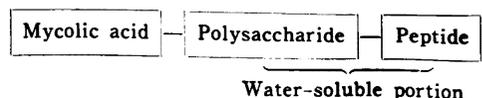


Table 1. Properties of Subfractions of Wax D (H₇₇Ra)*

Fraction	Yield, %	Melting point (°C)	Molecular weight	Amino acid	Adjuvant activity
AD ₁	6	40	(57,000)	—	—
AD ₂	9	63~65	24,000	—	—
AD ₃	8	170~225	19,000	—	—
AD ₄	7	225	16,000	—	—
AD ₅	11	250~260	16,000	Ala, Glu, DAP	+
AD ₆	19	260~270	20,000	Ala, Glu, DAP	+
Hexane insol. AD	14	200~240		Ala, Glu, DAP, Thr, Asp, Val Leu, Ileu, Arg, Gly, Pro	+

Table 2. Yields of Fractions of the Water-soluble Portions from Various Wax D Fractions Separated by Sephadex G-50

Mycobacteria strain	Fraction I (%)	Fraction II (%)	Fraction III (%)	Total recovery (%)
Aoyama B*	46.1	5.9	44.9	97.4
H ₇₇ Ra*	43.4	12.5	38.5	96.2
AD ₄ *	73.5	6.4	17.4	96.3
Hexane-insoluble AD*	86.0	13.0	0	99.0
P1**	1.0	6.5	85.5	94.6
BCG**	1.5	3.3	92.0	94.8
RO**	4.3	3.6	90.6	98.5
Fortuitum**	1.2	17.2	80.5	98.9
AD ₂ +AD ₃ **	5.4	10.9	66.3	82.6

* Adjuvant-active

** Adjuvant-inactive

についても答えている¹¹⁾¹²⁾。

(3) ロウDの構造とアジュバント活性

Raffel, Asselineau, Lederer らは最初ミコール酸と多糖体の結合物であることが活性発現にとって重要であり、ペプチド部分は活性には不必要であると報告した¹³⁾。しかしこの結論はその後、後述のようにわれわれおよび White, Lederer らにより否定され、ペプチドもまた重要であることが明らかになった。

ロウDの抽出法¹⁴⁾をみれば分かるように、ロウDはまだかなり不純な物質であると思われたので、われわれはロウDの化学構造と活性の間の関係を明らかにするには、まず精製することが先決と考えた。しかし、H. Noll がその総説の中で「脂質の精製には一般にクロマトグラフィーが有用であるが、ロウDの場合は通常のクロマトグラフィーによる精製は不可能で、この事実がロウDの化学的あるいは免疫学的研究を著しく困難にしている¹⁵⁾」と指摘していることでも分かる通り、その精製は容易でない。精製の困難性については Asselineau も当初に指摘しており¹⁶⁾、著者も珪酸あるいはマグネシウム・トリシリケートを使い種々クロマトグラフィーを試みたが、すべて失敗した。

しかしその後ロウDの水酸基をアセチル化すると、クロマトグラフィーによる分画が可能になるだけでなく、その他のいくつかの点で利点があることが分かった¹⁶⁾。

このアセチル化法によりロウDは7画分に分画された¹⁷⁾。各画分の性質は表1に示すとおりであるが、注目される点は4つの画分 (AD₁, AD₂, AD₃, AD₄) はロウD固有のアミノ酸を含んでおらず、またア活性をもっていないが、残りの3つの画分 (AD₅, AD₆, ヘキサン不溶 AD) はアミノ酸を含み、またア活性を有している点である¹⁸⁾。このことからわれわれは (1) ア活性にペプチドの存在は重要である、(2) ア活性に水酸基の存在は必要でない、と考えた。

その後の追試により、アセチル化法が他の結核菌ロウDの分画にも応用でき、またペプチドを含む画分のみが活性を有していることが確認された¹⁹⁾²¹⁾。Jollès らもアセチル化法により、ロウDの分画ができるようになることを追試確認した^{22,23)}。

上に述べた構造と活性に関する2つの結論の中の最初の結論である「ア活性にペプチドが必要である」という点については、すでに White, Lederer らが他の方法により同じ結論に達していた^{24,25)}。

しかし、第2番目の結論 (ア活性に水酸基は不必要) については White らはアセチル・ロウDがア活性を示さないという結果を得て、われわれの結論に異論をとらえた²⁶⁾。しかし、White はこのことを総説²⁶⁾⁷⁸⁾でのみ述べており、細かいデータや実験方法を示していないので、著者はそれらのことについて問い合わせたが返事は

得られなかつた。一方われわれはその後アセチル・ロウ D がア活性を有することを 2~3 の異なる方法でくり返し確認することができた^{11)12)27)~30)}、東らもわれわれの結果を確認している³⁰⁾³¹⁾、上記第 2 の結論は間違いないと考えている。生体内でアセチル基が除かれて活性を示すようになるという可能性は、アセチルロウ D の注射後、ロウ D の多糖体部分に対する抗体 (このことについてはなお後述する) が長期間全く生じなかつたことから否定できる¹⁹⁾²¹⁾。

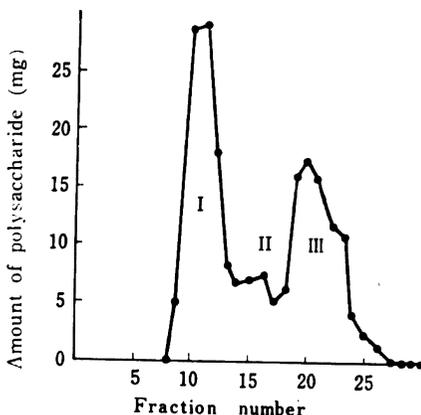
ミコール酸と多糖体部分のエステル結合は簡単に切れるが、この結合が切れれば、活性は完全になくなることを、White, Lederer らは報告した²⁴⁾。一方、著者はミコール酸をパルミチン酸で置き換えたロウ D を作ったが、これにも活性はみられなかつた²²⁾。したがって構造と活性についての第 3 番目の結論は、(3) ミコール酸が結合していることが活性発現には必要であるとなる。

上記のように、ロウ D の多糖体部分の水酸基はブロックされても活性は消失しないので、多糖体部分は活性に関係ないように感ぜられた。それでミコール酸と D-アミノ酸を直接結合することにより、活性に必要な最小単位が得られるかもしれないと思い、ミコール酸と D-グルタミン酸、あるいは D-アラニンとのアミド結合による結合体を合成したが、これには全く活性はみられなかつた¹⁸⁾。

ロウ D からミコール酸を除いた残りの部分は、大部分は多糖体からなっており、それにペプチドが結合しているが、水に溶けるので、以下この部分を水溶部とよぶことにする。この水溶部をセファデックスで分画すると、図 2 に示すように 3 つの画分 (Fractions I, II, III) が得られた³²⁾。

この 3 つの画分の量的比をいろいろのロウ D あるいは

Fig. 2. Elution Pattern of the Water-soluble Portion of Wax D of $H_{37}Ra$ on a Sephadex G-50 Column (2cm×40cm)



210.94 mg were applied and eluted with 0.01 M phosphate buffer (pH 7.4). Flow rate: 21 ml/h; one fraction: 5.2 ml.

ロウ D の画分について調べた結果、表 2 に示すように活性をもっているものはすべて大きい画分 (Fraction I) をもっていることが分かつた³²⁾。このことから構造と活性について次の第 4 の結論が得られた。(4) 活性発現のためには多糖体部分は一定以上の大きさをもっていることが必要である。

以上のように活性と構造の関係について、ミコール酸という自然界では結核菌にのみ見出される超高級脂肪酸と、哺乳動物体内には見出されない D-アミノ酸のペプチドがかなり大きい多糖体部分に結合していることが活性発現に必要であること、多糖体の水酸基は関係ないことが分かつた。結核菌が産生する形性物質として知られているコード因子の毒性はその水酸基がアセチル化されると完全に消失すること¹⁴⁾を考えあわせると、ロウ D の水酸基は活性に関係ないことは意味が大きいように感ぜられる。

以上の 4 つの結論はロウ D 分子がある特有の形をとることが活性をもつためには必要であることを示唆しているように思える。そして空間的に生体あるいは細胞膜が“認識”できるある形になるために、かなり大きい分子であることが要求されるのではなからうか。ある形とは何かということに関連して次の事実は興味がある。

BCG の完全脱脂菌膜 (ロウ D は除去されている) を酵素処理して取り出されたクロロホルム可溶画分は表 3 に示すように、調べられたすべての点について人型菌ロウ D と同じものであり、したがってわれわれはこれを“結合ロウ D” (bound wax D) とよんだ³⁴⁾。このことはそれらの収量を考えあわせると³⁴⁾³⁵⁾、結核菌の表面には菌膜にくみこまれた形 (bound wax D) と遊離の形 (“capsular” wax D) で、かなりの量のロウ D 構造が存在することを示している。生体細胞が侵入した結核菌体を“認識”するとき、菌体表面構造が重要であると思われる。

これらのこととロウ D 構造は結核菌に特有な成分からなり、かつ特徴的な構造と形をしていること、そしてア活性の発現のためには全体としてその特有な構造がそのまま保たれていなければならないようであること、小さい構造上の変化はア活性に影響しないこと (上記 4 つの結論) 等を考えあわせると、ロウ D は生体の中で、個々

Table 3. Comparison between “Capsular” Wax D ($H_{37}Ra$) and “Bound Wax D” (BCG)

	Wax D	“Bound wax D”
Infrared spectra	All the absorption bands are identical	
Chemical constituents	Identical	
Molecular weight	32,000	32,000
Melting point	200~210°C	227~228°C
Adjuvant activity	Active	Active

の単なる物質的レベルの変化を起こすのみにとどまらず、さらに高次の細胞レベルの変化をひき起こすように思われ、生体の細胞はロウDが注射されたとき、それを結核菌あるいは重大な侵入者と“認識”し、結核菌に対するのと似た反応を起こすのではなからうかと思われる。ロウDにより典型的な結核結節が生じること¹⁾、はこのことを支持している。そのような“認識”がア活性に関係しているように著者には感ぜられる。

(4) せりあい現象—結核菌が示すネガティブアジュバント活性

Alvord らは動物の脳と FCA を混ぜて動物に注射し、実験脳炎を起こす実験をしているうち、結核菌量を多くするとかえつてア活性は抑制されることを見出した³⁰⁾。しかし、そのメカニズムについては何も分かっていた。われわれはアジュバントと抗原をできるだけ精製した系(ロウDと結晶卵白アルブミン)を用い、この現象を調べた。その結果抗原量が少なくロウD量が多いと、抑制現象がみられることを知った³⁰⁾³¹⁾。また抑制現象が起きる場合、動物は必ずツベルクリン反応が陽性になることを観察し、さらに2~3の実験を行ない、その結果この抑制現象はロウDがもっている抗原性と卵白アルブミンの抗原性がせりあいを起こすためであることを明らかにすることができた³⁰⁾³¹⁾。このことは実際にFCAを使つて動物を免疫するさい、とくに抗原が弱いあるいは抗原量が小さいときに問題になる。それではロウDの抗原性にふれることにする。

2. ロウDの抗原性

(1) 即時型過敏症に関する抗原性

一般に脂質は抗原性をもたない。しかしロウDは化学的にはロウ(wax)つまり高級脂肪酸と高級アルコールのエステルではなく、糖脂質であるので抗原性をもっている。武田らはロウDの水溶部で赤血球を感作すると、結核動物血清により血球凝集反応が起こることを観察した³⁷⁾。

われわれはロウDの微粒子水浮遊液が結核動物および結核患者血清により、特異的に凝集することを見出し、結核病変の活動度と凝集価の間にかかなりの相関性がみられることを報告した^{38)~40)}。またミコール酸を除いた残りの水溶部は結核家兔血清により沈降反応を起こす。これらの反応にあずかる

抗原決定基は多糖体部分にあつて、ペプチドあるいはミコール酸部分にはないことが分かり、さらに抗原決定基は α -D-Arabinofuranosideを末端とするOligosaccharideからなつていることが報告された⁴¹⁾⁴²⁾。またこの抗原決定基の構造はMiddlebrook-Dubos反応に関係する抗原決定基と同様のものであること、水溶部はモルモットでPassive Cutaneous Anaphylaxisを起こすことが報告された⁴³⁾⁴⁴⁾。

(2) 遅延型過敏症に関する抗原性

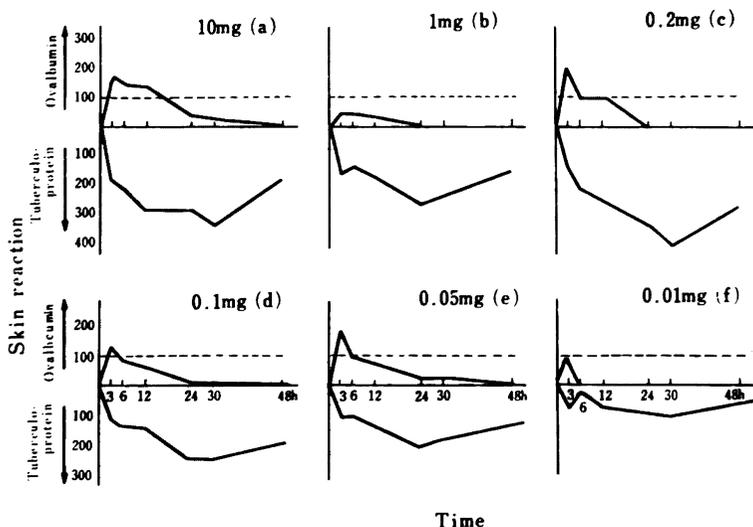
通常のロウDをモルモットに注射すると、ツベルクリンアレルギーが陽性となる³⁰⁾。一方結核モルモットの皮内にロウDの水溶部を注射するとツベルクリン反応と同じ遅延型の皮膚反応が起きる⁴⁵⁾。水溶部をセファデックス、DEAEセルロース等で分画精製すると、PPDに匹敵する力価をもつた画分が得られた⁴⁶⁾。現在この抗原性が混入している蛋白であるのか、ロウD中のペプチドであるのか、あるいは多糖体部分に関与しているのか、最終的な結論にはいたっていないが、通常のロウD中に強力なツベルクリン抗原物質が存在することは疑いない。そして前述のせりあい現象による結核菌あるいはロウDのネガティブ・ア活性は主にこの抗原性に由来している³⁰⁾³¹⁾。

3. ロウDの精製

—新しいアジュバントの開発—

前節で述べたとおり、ロウDあるいは結核菌がもっている固有の抗原性はそのア活性のためには、せりあい現象によりマイナスに作用する。抗原性がア活性に重要な

Fig. 3. Mean Skin Reactions Measured in the Course of Time



Guinea pigs (6 to 8 animals per group) were injected with 1 μ g of ovalbumin as antigen plus 10 mg (a), 1 mg (b), 0.2 mg (c), 0.1 mg (d), 0.05 mg (e) or 0.01 mg (f) of tubercle bacilli as adjuvant, respectively. Curves above the abscissae show reactions to ovalbumin and those under the abscissae reactions to tuberculo-protein.

役割を果たす他のアジュバント物質が知られているので⁽⁴⁷⁾⁽⁴⁸⁾, このことはロウDのア活性の作用機作をさぐるうえで、一つの重要な事実と考えている⁽⁴⁹⁾。また実際的な面から考えても、場合により重要な意味をもつてくる。とくに弱い抗原あるいは極少量の抗原で感作する場合、結核菌全体を使用した FCA は不利である。実際に 0.001 mg という少量の卵白アルブミンでモルモットを感作するため、結核菌を 0.01~10 mg まで種々量をかえて試みたが、モルモットに卵白アルブミンに対する即時型あるいは遅延型過敏症を成立させることはできなかった(図3)。このことは FCA が使用できるのはある程度強力な抗原性をもっている抗原に限られることを示しているといえる。したがってきわめて弱い抗原にも使える強力なアジュバントを作るためには、ロウDの抗原性を除去したものを作ればよいだろう。

ロウDは前記のとおり少なくとも2つの強い抗原性をもっている。このうち、多糖体の抗原性はアセチル化により完全に消失してしまう⁽¹⁰⁾⁽⁸¹⁾⁽⁴⁸⁾。またツベルクリン感作物質もアセチル化法により有効に除去されるが⁽²¹⁾⁽²⁰⁾⁽⁸¹⁾, 出発材料として用いるロウDが大量のツベルクリン物質を含んでいると、精製後も多少残るようである。われわれの研究室で偶然このツベルクリン感作物質をほとんど含まないロウDがとれたので、これからアセチル化法により AD₆ 画分を作つたところ、上記抗原性が全くみられなかつた。図4に示すとおり、この AD₆ 10 mg を鉱

Table 4. Biological Activities of Tubercle Bacilli, Wax D and AD₆

Biological activities	Tubercle bacilli	Wax D	AD ₆
Antigenicity { Polysaccharide Tuberculin	+	+	-
	+	+	-
Negative effect due to antigenic competition	+	+	-
Epithelioid granuloma formation	+	+	-
Tissue damaging effect	+	+	-
Adjuvant-arthritis including activity	+	+	-
Toxicity	+	+	-
Anti-complementary activity	+	+	-
Adjuvant activity	+	+	+
RES* stimulating activity	+	+	+

* Reticulo-endothelial system

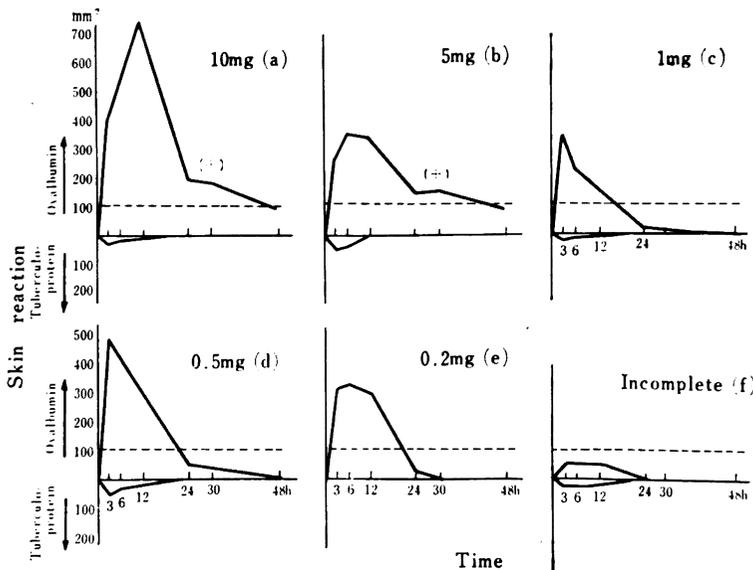
物油にとかしてモルモットに注射し、PPD 0.1 mg を用いて皮膚反応を行なつたが全く陰性であつたこと、また多糖体部分に対する抗体が長期間全く証明できなかつたことは⁽¹⁰⁾このことを明らかに示している。

この AD₆ を 0.001 mg の卵白アルブミンによる感作にさいし、アジュバントとして用いると、図4に示すように、モルモットは強く卵白アルブミンに対して感作された⁽⁶⁰⁾。この成績は図3の結核菌全体をアジュバントとして使つたときと比べると全く

対照的である。結核菌を使うと結核菌の抗原性が強くア活性がおさえられているが、この抗原性が全く除去された AD₆ は予想通り弱い抗原にも有効であることを図3と図4は示している。現在この AD₆ が ACTH などの弱い抗原に使えるかどうか検討中である。

AD₆ は表4に示されているように、ア活性以外の種々の生物活性を有しない。このことは AD₆ が物質としてのみならず、作用の点からも精製されていることを示していると同時に、それら他の種々の生物活性とロウDのア活性は直接には関係ないことを示している。たとえば Talmage らは抗補体作用がア活性に必要であろうと考えたが、表4のデータはこれを支持しない⁽⁵¹⁾⁽⁵²⁾。またある種のアジ

Fig. 4. Mean Skin Reactions Measured in the Course of Time



Guinea pig groups (5 to 8 animals per group) were injected with 1 μg of ovalbumin as antigen plus 10 mg (a), 5 mg (b), 1 mg (c), 0.5 mg (d) or 0.2 mg (e) of AD₆ as adjuvant, respectively. Curves above the abscissae show reactions to ovalbumin and those under the abscissae reactions to tuberculo-protein. The symbol (+) indicates the presence of induration. Incomplete (f) means the skin reactions of a control which was injected with ovalbumin incorporated in Freund's incomplete adjuvant.

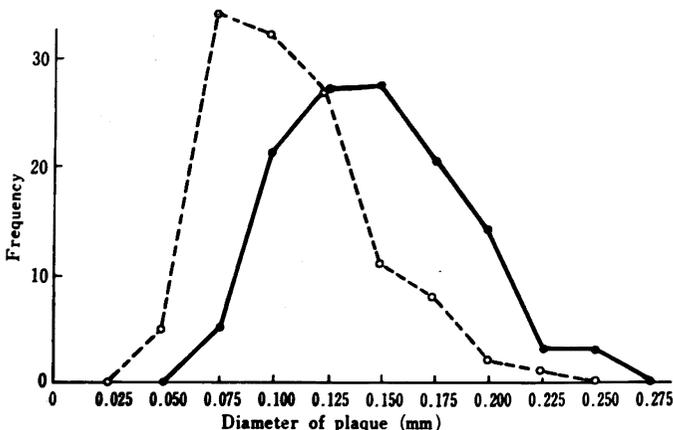
ジュバント（エンドトキシン、赤血球など）はそれ自身の抗原性がア活性の発現に必要であると考えられているが⁴⁷⁾⁴⁸⁾、ロウDに関してはア活性と抗原性の間には関係がないようである⁴⁹⁾。またFCAを使えば注射局所が強い炎症を起こすことはよく知られており、この注射局所の炎症性肉芽腫の形成とア活性の間に関連性があることを強調する論文は多い^{44)~46)}。Burnetも最近の著書⁷⁾によるとこの局所の炎症とア活性の関連性を重視しており、これを Freund granuloma と呼んだ。しかしAD₂を使うとほとんど注射局所に炎症はみられないにもかかわらず、強いア活性がみられた⁴⁰⁾。それに対し、たとえば1~10 mgの結核菌と0.001 mgの卵白アルブミン注射で、モルモットは注射局所に強い炎症を示したが、ア活性はみられなかった。したがってわれわれは少なくともモルモットに関する限り局所の炎症の大部分はアジュバントとして用いる結核菌の抗原性と関係して、ア活性とは無関係であると考えている。このように結核菌は複雑な物質の集合体であるから、そのア活性を解析したり、ア活性を他の種々の生物活性と関連づけようとする実験のためには、結核菌そのものを使うことは不利であるといえることができる。いいかえるとAD₂が示す他の生物活性はア活性と関係している可能性が強いということになる。このことについてはまた後に述べる。

4. ロウDのアジュバント活性の作用様式

(1) 細胞レベルでの解析

抗原にFCAの形で結核菌体やロウDを添加することにより、血液中の抗体量が著しく増量することはよく知られているが、この抗体生産量の増大は(1)抗体産生細胞の数の増加によるのか、(2)1細胞当り抗体生産量の増加によるのか、(3)その両者のどちらにもよるの

Fig. 5. Distribution of the Diameter of Plaques Produced by Spleen Cells Derived from Mice Injected with Sheep Red Blood Cells Alone (○---○) and Sheep Red Blood Cells Plus Wax D (●—●)



か分かっていない。

われわれは羊赤血球でマウスやラットを感作し、Jerneのブラク法でブラクの数つまり抗体産生細胞の数をかぞえ、同時にブラクの直径を測ってみた。その結果血球にロウDを添加して感作すると、ブラク数は対照に比べ2~3倍に増加するのみならず、ブラクの直径も大きくなることを見出した(図5)²⁷⁾。

それでは最初に、このブラクの直径がア活性以外の因子によっても変動するかどうかを調べた。その結果、ブラク径は抗原量、抗原注射部位、動物の種類、リンパ臓器の種類、ブラク測定法の種類、等によつて影響されないことが分かった⁴⁰⁾。またWigzell⁴⁵⁾やTakeya⁴⁷⁾らは抗体や胸腺除去による抗体産生の抑制にさいして、ブラクの数は減るが、ブラクの径は減らないことを報告している。種々の条件の中で、今のところブラク径を増大させる因子はア活性のみである。そして結核菌、気管支常在菌、ロウD、アセチルロウD、エンドトキシン、DNP-エンドトキシン、リシン(ヒマの毒性蛋白)^{48)~49)}等のアジュバントはすべてブラク径を増大させる。そしてアジュバントによるブラク径の増大は、抗原量やアジュバント量、動物の種類、ブラク測定法の種類、リンパ臓器の種類、炭末による細網内皮系のブロック⁴¹⁾等とは無関係に、アジュバントさえ抗原に添加されておれば、高い再現性をもつて起こってくる。この点でブラク数の態度とは対照的である。そしてエンドトキシンでは0.01 μg、ロウDでは1 μgという少量で、ブラクの径は増大した⁴¹⁾。このように鋭敏なア活性の測定法は他にないようである。

ブラク法によるア活性は少数のマウスにより測定が可能である⁴¹⁾。この点でもブラクの数によるア活性の測定と対照的である。必要ならば1~2匹を1群としても測定が可能である。それはマウス1匹当り多数のブラクを測定することができるからで、そのブラク径平均の個体差はアジュバントによるブラク径の増大の程度に比べ小さいので、少数のマウスでも多数のブラクの径を測定すれば、ブラクの差は有意になるからと思われる。このように径の平均が安定している理由の一つはブラク径が抗原量と無関係であり、またアジュバントの添加により大きくなるが、その量に比例して大きくなることはないためであると考えられる³⁰⁾。

このように、ブラク径はア活性により特異的に、高い再現性をもつて、鋭敏に増大し、その測定に要するマウスは少数でいいので、この方法はア活性

Table 5. Relationship between Plaque Size and Conditions for Immunization

Pretreatment	First inj.	Second inj.	Plaque size	
			Primary resp.	Second resp.
Wax D	SRBC*	—	Normal	
	SRBC + wax D	—	Enlarged	
	SRBC	—	Enlarged	
	SRBC	SRBC	Normal	
	SRBC + wax D	SRBC	Enlarged	
	SRBC	SRBC + wax D	Normal	

* Sheep red blood cell

測定のための優れた方法であることが分かった。

この方法により、ア活性の時間経過による消長を調べた結果、プラクの数は抗原注射後4日目にピークに達し、このときアジュバント使用群は対照の2~3倍多いプラクを作るが、それ以後両群とも急速に減ること、それに反し、プラク径に関しては長期間にわたり、両群間に有意の差がみられることが分かった⁶⁰⁾。このようにロウDによるプラクの数の増加は一過性であるが、径の増大効果は持続的で、後述のように、二次反応にまで及ぶ。抗体産生細胞は通常主として形質細胞とされているが(とくに7S抗体に関して)、大部分の形質細胞の寿命は1週間以内で、小部分(1%以内)は数カ月生きることが分かっている⁶²⁾。リンパ球系の細胞は19S抗体を作り⁷⁹⁾、またプラクも作ることが報告されており⁶³⁾、リンパ球の中にも生存期間が長いものが知られている⁶²⁾、⁶⁰⁾ので、プラク径の持続的な増大効果はこの長く生きる細胞によると思われる。

抗原とロウD注射を時間的にずらせて行なつた実験結果を表5にまとめた。抗原刺激と同時にあるいはそれ以前(1, 2, 3, 4, 7, 30, 70日前)にロウDを注射すると一次反応のプラクは増大する。初回抗原刺激と同時にロウDを注射すると、おくらせて(7, 28, 70, 150日後)二次刺激を抗原のみで行なつてもプラク径は増大する。それに反し、初回刺激を抗原のみで行なつて後(30日後)、二次抗原刺激のさいにロウDを添加しても、プラク径は増大しない。また抗原単独刺激後時間をずらしてロウDを与えると、プラク径増大効果は両注射時期の時間的へだたりに逆比例して減つていき、4日目のプラク径測定直前にロウDを与えてもプラクは大きくなる⁶¹⁾。

これらの結果から、(1)プラクが大きくなるのは抗体産生細胞に対するロウDの直接作用によるのではなく、抗原刺激以前あるいは同時に起こっている生体の変化による、(2)ロウDのア活性を“記憶”した特殊な細胞群が出現する、(3)抗原単独刺激により生じた通常の記憶細胞(memory cell)に対してアジュバントはその効果

を発揮しえない、というようなことが分かってきた。

これらの結論は、さらに Sercarz がいう Y-cell, つまり免疫記憶細胞が存在することを支持する⁶⁴⁾。Sercarz のことばでいえば、われわれの結果はアジュバントを使えば(アジュバントは抗体産生細胞に直接働くのではないから)、大きいプラクを作る Z-細胞, つまり Z' 細胞といえるものが出現することを示している。Z' が出現する可能性は、(1) $X \rightarrow Y \rightarrow Z'$, (2) $X \rightarrow Y' \rightarrow Z'$, (3) $X' \rightarrow Y' \rightarrow Z'$ の3つに分けて考えられる。上記のように一次抗原刺激にさいしロウDと抗原を同時に使用すればすでにア活性をあたかも“記憶”したような、違った記憶細胞が出現しているという結果を得ているので、(2)か(3)の可能性が残る。われわれは(3)の可能性、つまりロウDの使用により、新しいクローンが出現する可能性が強いと考えているが、現在検討中である。

プラクの径が増大することがただちに1コ細胞当りの抗体産生量の増大を意味しているとはもちろんいえない。抗体の溶血能はその avidity と関係している⁶⁵⁾、FCA を添加した抗原感作後、avidity は時間とともに強くなつていくことが分かっている⁶⁶⁾⁶⁷⁾、抗体の質的变化により大きなプラクができる可能性はある。しかしこの avidity の変化は抗原量の違いによつても起こってくるが⁶⁸⁾、プラクの径は前述のように抗原量の変化とは無関係なので⁶⁹⁾、avidity の変化によつてのみ径が大きくなるという可能性は小さい。

Bussard は最近 microcinematograph で、プラクの中心の細胞が生きて動いている間、プラクの径は増大しつづけることを示したが⁶⁰⁾、プラクの径が抗体産生量を直接あらわしている可能性は高いと思われる。いずれにしろ多くのアジュバントの抗体量増大効果は、この節の最初にあげた3つの可能性の中で、第3番目の機作による、つまり抗体産生細胞の数を増すのみならず、1コ細胞当りの免疫能力を高めることによるという結論は間違いないようである。

しかし他のアジュバント、たとえば Freund's incomplete adjuvant はプラクの数を増したが、径を全く増大させなかつた⁶¹⁾。したがつてこのアジュバントは主に抗原の状態を物理化学的に変えていて、生体側に働きかけている度合は少ないと思われる。

(2) 細網内皮系 (RES) に及ぼす作用

われわれは結核菌体が示す種々の生物活性を取り上げ、AD₆もそれら活性を示すかどうかを調べ、ずつとマイナスの成績(表4)を得てきた。つまり前述(表4)のようにAD₆はア活性は強いが、即時型および遅延型の抗原性、組織障害性、毒性、抗補体作用、アジュバント関節炎誘起能⁶⁹⁾、結核節形成作用等を示さないで、これら種々の生物活性はア活性と直接関連していないと考えられる。このことは生体内のどのような変化がア活

性と結びつかないことを明らかにする目的の実験には(そのような報告は非常に多いが),結核菌体やロウDは不利であること,反対に,AD₆が示すア活性以外の生物活性はア活性と関係している可能性が高いことを示唆している。

Nicol⁷⁰⁾その他の人びとは⁷¹⁾(Biozziら, Schoenbergら, Dicarloら)結核菌体を使い,これがRESの働きを高めることを観察し,それと結核菌のア活性とを関連づけている。

しかし菌体を使っているので上記のようにただちにア活性とRESの働きを結びつけるのは無理と思われる。

最近われわれは炭粒子のクリアランスを測ることにより,AD₆がマウスのRESの働きを高めることを観察した⁶⁹⁾。一方同時にコントロールの意味で用いたア活性をもたないもの,たとえばCord factor,ロウB,ミコール酸等もRESの働きを高めることを観察した。したがってこの意味でもRESの働きの高まりをただちにア活性と結びつけるのは無理と思われる。それで時間経過をおつてくわしく調べた結果,それらの非アジュバント物質は24時間後をピークとし,一過性にRESの働きを高めるにすぎないことが分かった。またロウDや結核菌体のようなアジュバントはRESの働きを高めるが,やはり持続的な効果は少なく,その持続性はアジュバントの量に関係しているが,最適の場合でも4~5日が限度でそれ以後はもとにもどり,量が多すぎるとかえってはじめからRESの働きを抑制した。これはそれらアジュバントが不純なためであろうと思われる,不純物として抗原性物質を第一に考えているが,このことについてはなお後述する。AD₆はそれに反し,1週間後もひき続きRESの働きを高めており,抑制因子が全くみられなかった。

ここで用いられた炭粒子自身は抗原ではない。マクロファージにはいろいろの種類があり,そのPhagocytosisが免疫反応につながるものと,単なる清掃の意味しかないもの(Scavenger cell)がある⁷²⁾,またマクロファージが示すPhagocytosisにはとりこまれる物について選択性がある⁷³⁾ので,炭粒子のクリアランスによつて表わされるRESの働きを高める作用がただちにア活性とは結びつかないのはむしろ当然であろう。しかし他の種々の生物活性をもたずア活性のみをもっているAD₆が持続的に強くRESの働きを高めていることは,RESあるいはマクロファージに対する抗原のとりこみが抗体産生にとつて重要な意味をもっているという最近の知識を考えあわせると,ロウDは免疫反応につながるRESの働きを高め,これが結核菌体のア活性の一つの要因であることを示唆する。

5. ロウDの結核結節形成作用

Macknessによると感染症において成立するマクロファージの非特異的な細胞免疫(細胞内の殺菌能)の成立に,特異的な遅延型過敏症は重要な役割を果たしている。つまりマクロファージは特異的に感作されたリンパ球と侵入細菌中のHomologousな抗原との相互作用を手がかりとして,その侵入細菌に対し急速な細胞免疫を作りあげる⁷⁴⁾。そして,Lurie, Dannenbergによると,結核菌の場合は,細胞免疫が成立するに従い,マクロファージは未熟類上皮細胞から成熟類上皮細胞へと分化していく⁷⁵⁾。安平も類上皮細胞集はリンパ球と関連する超遅延型アレルギーによつて作られると考えている⁷¹⁾。

通常ロウDは前述のように典型的な結核結節形成能をもっており,一方通常のロウDは遅延型過敏症を起こす抗原性とア活性をもっている。これに対し,AD₆はア活性を有するが抗原性をもたず,また結節形成作用をもたない。少量の抗原性が残っているAD₆は弱い結節形成作用をもっている。

これはMackness, Dannenberg, 安平らの成績に上述のわれわれの成績をあわせて考えると次のように説明することができる。

つまりロウDはそれ自身でツベルクリン抗原に対する遅延型過敏症を誘導することができる。同時にロウDはそれ自身で結核菌の表面のような印象を細胞に与えるらしい。この2つが相まつて,マクロファージは結核菌に対する細胞免疫を獲得するさい現われる変化のうち少なくとも類上皮細胞への形態変化を行なうのであろう。AD₆は抗原性がないので,遅延型過敏症が成立しないから,マクロファージに特有の形態変化を起こさせないと思われる。

感染動物のマクロファージは細胞免疫つまり殺菌力や形態的变化以外に,他の機能的な変化ないし高まりを示す⁷⁴⁾。それらの変化がすべてア活性と抗原性あるいはその他の性質を要求するかどうか分からない。しかし少なくともア活性のみで(AD₆で)Phagocytosisは,上述のように高まる。Phagocytosis, Pinocytosis, Spreadingのような機能的な可逆的变化はア活性により起こり,不可逆的な,形態学的変化,つまり細胞の分化が起こるためには,それ以外に抗原性が要求されるのではなからうか,このマクロファージから類上皮細胞への形態的变化に伴つてPhagocytosisの能力は失われていくことが分かっている⁷⁶⁾,このことが前述した現象,つまりAD₆は持続的にRESの働きを上昇させつづけるのに反し,抗原性のあるWax Dや結核菌には抑制効果が現われることを説明するかもしれない。そのさい何が個々の感染菌に特有な分化ないし組織像を決定するのか等の問題についてはほとんど何も分かっておらず⁷⁷⁾,今

後に残されている。

おわりに

以上結核菌と生体の複雑な反応の中で、結核菌から取り出された精製物質が示すア活性にとくに注目して行なわれた仕事について、最近の成績になるほどやや詳しく述べた。これはいわば宿主-寄生体反応の一断面をみているにすぎないが、それだけでもきわめて複雑な生命現象がうかがわれる。

今後同じようなア活性の機作をさぐるとともに臨床的に有用なアジュバントの開発を行ないたいと考えている。

(終りにご指導とこの研究を自由に行なう場を与えて下さった杉山教授、およびこの研究を可能にして下さっている研究室の若い同僚たちに感謝します。またこの研究にご理解とご支援を賜わった戸田忠雄名誉教授、山村雄一教授および諸先生方に感謝いたします。)

文 献

- 1) 安平公夫: 結核, 44: 273, 昭 44.
- 2) Lewis, P. and Loomis, D.: J. exp. Med., 40: 503, 1924.
- 3) Diens, L.: J. Immunol., 17: 531, 1929.
- 4) Coulaud, E.: C. R. Soc. Biol., Paris, 119: 368, 1935.
- 5) Freund, J.: Fortschritte d. Tuberkuloseforsch., 7: 130, 1956.
- 6) 田中渥: 福岡医学雑誌, 57: 441, 昭 41.
- 7) Burnet, M.: Cellular Immunology, Cambridge and Melbourne Univ. Presses, p. 593, 1969.
- 8) Raffen, S.: Experientia, 6: 410, 1950.
- 9) Asselineau, J.: Thèses, p. 99, Librairie Arnette, Paris, 1951.
- 10) Freund, J. and Stone, S. H.: J. Immunol., 82: 560, 1959.
- 11) Tanaka, K., Tanaka, A. and Sugiyama, K.: Int. Arch. Allergy, 35: 495, 1968.
- 12) 萩本伝次: 九州大学胸研紀要, 13: 19, 昭 44.
- 13) Raffen, S., Asselineau, J. and Lederer, E.: Experimental tuberculosis, p. 174, Little Brown and Co. Boston, 1955.
- 14) Noll, H.: Adv. Tuber. Res., 7: 149, 1956.
- 15) Asselineau, J., Buc, H., Jollès, P. and Lederer, E.: Bull. Soc. Chim. biol., 40: 1953, 1958.
- 16) Tanaka, A.: Biochim. Biophys. Acta, 70: 483, 1963.
- 17) Tanaka, A. and Kitagawa, M.: Biochim. Biophys. Acta, 98: 182, 1965.
- 18) Tanaka, A., Tanaka, K., Tsubone, T., Kuroda, Y. and Sugiyama, K.: Int. Arch. Allergy, 28: 340, 1965.
- 19) 田中国雄: 九州大学胸研紀要, 10: 115, 昭 40.
- 20) 東市郎: 日本臨牀, 8: 1588, 昭 40.
- 21) Yamazaki, S., Koyama, K., Someya, S., Azuma, I. and Yamamura, Y.: Amer. Rev. Resp. Dis., 100: 691, 1969.
- 22) Jollès, P., Migliore, D. and Bonhomme, F.: Immunol., 14: 159, 1968.
- 23) Bonhomme, F., Boucheron, C., Migliore, D. and Jollès, P.: Experientia, 24: 716, 1968.
- 24) White, R. G., Bernstock, L., Johns, R. G. S. and Lederer, E.: Immunol., 1: 54, 1958.
- 25) White, R. G., Jollès, P., Samour, D. and Lederer, E.: Immunol., 7: 158, 1964.
- 26) White, R. G.: Brit. med. Bull., 23: 39, 1967.
- 27) Koga, T., Ishibashi, T., Sugiyama, K. and Tanaka, A.: Int. Arch. Allergy, 36: 233, 1969.
- 28) Tanaka, A., Tanaka, K., Hagimoto, D. and Sugiyama, K.: Int. Arch. Allergy, 32: 224, 1967.
- 29) 古賀敏生・田中渥・石橋凡雄・杉山浩太郎: 九州大学胸研紀要, 13: 35, 昭 44.
- 30) 桑野毅: 九州大学胸研紀要, 印刷中.
- 31) Tanaka, A.: Int. Arch. Allergy, 36: 310, 1969.
- 32) 田中渥: 第1回日米医学協力計画シンポジウム, 1966.
- 33) Koga, T., Ishibashi, T., Sugiyama, K. and Tanaka, A.: Biochim. Biophys. Acta, 158: 144, 1968.
- 34) Kotani, S., Hashimoto, S., Matsubara, T., Kato, K., Harada, K., Kogami, J., Kitaura, T. and Tanaka, A.: Biken J., 6: 181, 1963.
- 35) Asselineau, J.: Les lipides bactériens. Hermann, Paris, p. 235, 1962.
- 36) Shaw, C. M., Alvord, E. C., Jr., Fahlberg, W. J. and Kies, M. W.: J. exp. Med., 115: 169, 1962.
- 37) Takeda, Y., Aoki, Y., Wakita, N., Watanabe, T., Kasai, N. and Suzuki, H.: Japan J. Tuberc., 2: 361, 1954.
- 38) Tanaka, A., Kohashi, O. and Sugiyama, K.: Int. Arch. Allergy, 32: 208, 1967.
- 39) Tanaka, A., Hirota, N. and Sugiyama, K.: Int. Arch. Allergy, 32: 349, 1967.
- 40) 広田暢雄: 九州大学胸研紀要, 11: 1, 昭 41.
- 41) Tanaka, A., Ishibashi, T. and Sugiyama, K.: Int. Arch. Allergy, 32: 215, 1967.
- 42) 石橋凡雄: 九州大学胸研紀要, 10: 1, 昭 40.
- 43) Ishibashi, T., Fujiwara, Y., Tanaka, A. and Sugiyama, K.: Int. Arch. Allergy, 36: 506, 1969.
- 44) 藤原靖生: 九州大学胸研紀要, 11: 35, 昭 41.
- 45) 古賀敏生・石橋凡雄・田中渥・杉山浩太郎・小谷尚三・加藤隆正: 九州大学胸研紀要, 印刷中.
- 46) 古賀敏生・石橋凡雄・田中渥・杉山浩太郎: 九州大学胸研紀要, 13: 61, 昭 44.
- 47) Braun, W. and Nakano, M.: Adjuvants of Immunity, S. Karger, Basel, p. 227, 1967.
- 48) Schierman, L. W. and McBride, R. A.: Science, 156: 658, 1967.
- 49) Ishibashi, T., Tanaka, A., Sugiyama, K. and Koga, T.: Experientia in press.
- 50) Tanaka, A., Ishibashi, T., Sugiyama, K. and Takamoto, M.: Unpublished data.

- 51) Shinozaki, S., Tanaka, A. and Sugiyama, K.: *Int. Arch. Allergy*, 35 : 313, 1969.
- 52) 篠崎晋輔:九州大学胸研紀要, 11 : 79, 昭 41.
- 53) White, R. G., Coons, A. H. and Connolly, J. M.: *J. exp. Med.*, 102 : 83, 1955.
- 54) Fischel, E. E., Kabat, E. A., Stoerk, H. C. and Bezer, A. E.: *J. Immunol.*, 69 : 611, 1952.
- 55) Freund, J.: *Fort. Tuberkuloseforsch.*, 7 : 130, 1956.
- 56) Wigzell, T.: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 32 : 507, 1967.
- 57) Takeya, K., Rori, R. and Nomoto, K.: *Proc. Japan Acad.*, 40 : 572, 1964.
- 58) 古賀敏生・田中渥・石橋凡雄・杉山浩太郎:九州大学胸研紀要, 13 : 35, 昭 44.
- 59) 古賀敏生・田中渥・桑野毅・杉山浩太郎:九州大学胸研紀要, 13 : 49, 昭 44.
- 60) Koga, T., Sugiyama, K. and Tanaka, A.: *Experientia*, in press.
- 61) 未発表.
- 62) Miller, J. J. III: *J. Immunol.*, 92 : 673, 1964.
- 63) 入交清博:最新医学, 24 : 1450, 昭 44.
- 64) Sercarz, E. E. and Coons, A. H.: *Mechanism of Immunological Tolerance*, Prague, p. 73, 1962.
- 65) Nelson, R. A., Jr. : *The Inflammation Process*, Academic Press, New York/London, p. 819, 1965.
- 66) Siskind, G. W. and Benacerraf, B.: *Adv. Immunol.*, 10 : 1, 1969.
- 67) Andersson, B.: *J. exp. Med.*, 132 : 77, 1970.
- 68) Bussard, A. E.: 九大医学部での講演, 昭 45.
- 69) Wood, F. D., Pearson, C. M. and Tanaka, A.: *Int. Arch. Allergy*, 35 : 456, 1969.
- 70) Nicol, T., Quantook, D. S. and Vernon-Roberts: *Nature*, 209 : 1142, 1966.
- 71) Nelson, D. S.: *Macrophages and Immunity*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London, p. 130, 1969.
- 72) Jerne, N. K.: *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 32 : 591, 1967.
- 73) Nelson, D. S.: *Macrophages and Immunity*, North-Holland Publishing Co., Amsterdam-London, p. 111, 1969.
- 74) Mackaness, G. B.: *Infectious Agents and Host Reactions*, W. B. Saunders Co., Philadelphia, London-Paris, p. 61, 1970.
- 75) Dannenberg, A. M., Jr., Shima, K., Kambara, T., Meyer, O. T., Esterly, J. R. and Fabrikant, J. I.: *Japan-US Co-operative Medical Science Program*, 第5回シンポジウム, 予稿集, p. 189, 1970.
- 76) Sutton, J. S. and Weiss, L.: *J. Cell Biol.*, 28 : 303, 1966.
- 77) Spector, W. G.: *Int. Review exp. Path.*, 8 : 1, 1969.
- 78) White, R. G.: *Adjuvants of Immunity*, S. Karger Basel, New York, p. 49, 1967.
- 79) 花岡正男:免疫の病理, 朝倉書店, p. 261, 昭 44.
- 80) 天木一太・堀内篤・入交清博:免疫の病理, 朝倉書店, p. 291, 昭 44.