

原 著

## 結核菌体成分 cord factor のアジュバント効果

齋 藤 玲 子

九州大学医学部胸部疾患研究施設

受付 昭和 50 年 1 月 13 日

ADJUVANT EFFECT OF CORD FACTOR,  
A MYCOBACTERIAL LIPID COMPONENT

Reiko SAITO

(Received for publication January 13, 1975)

*M. tuberculosis* acts as an immunological adjuvant which enhances production of humoral antibody and induces delayed hypersensitivity. Its lipid fraction designated wax D had been widely regarded as an active principle responsible for its adjuvant activity, based on experiments in which guinea pigs were mostly used.

Recently, another lipid fraction, cord factor, but not wax D was reported to enhance antibody production in mice. However, in this connection we considered that there are at least two points to be clarified. First point is whether impurities in the cord factor preparation used might contribute to its adjuvant activity, since cord factor isolated by a usual method has been demonstrated to be contaminated with considerable amounts of wax D and other components. Second point is whether an adjuvant effect of a given mycobacterial component may be exerted only in some specific animal species.

In the present study we investigated primarily these two points. For this purpose two highly purified cord factor samples were employed; one was purified by DEAE-cellulose column chromatography and the other by pressure-accelerated chromatography. The cord factor samples and appropriate antigens incorporated in the Freund type water-in-oil emulsion were injected into the footpads.

Results were as follows:

1. In mice, the highly purified cord factor of as little as 1 mcg enhanced production of antibody.
2. In footpad test of mice, mycobacterial components including cord factor did not show such a definite effect on the induction of delayed hypersensitivity.
3. In mice, 1 mcg of cord factor induced remarkable swelling of injected footpads. When doses of cord factor were increased, the local reaction became stronger and a probable correlation was noticed between the degree of the local reaction and the adjuvant effect.
4. In guinea pigs, cord factor enhanced production of humoral antibody only slightly and did not induce delayed hypersensitivity even with a dose of as large as 500 mcg. The local reaction at the injection sites was also very slight and transient.
5. In rats, 40 mcg of cord factor not only enhanced antibody production but also induced

\* From the Research Institute for Diseases of the Chest, Faculty of Medicine Kyushu University, Maidashi, Fukuoka 812 Japan.



P<sub>3</sub> は阪大東市郎博士より, SL は Dr. Goren よりそれぞれ恵与されたものである。

#### B. 動物

1. マウス: 8週齢前後の CF<sub>1</sub> マウス雌を主として使用したが, 一部の実験においては, C<sub>3</sub>H および C<sub>57</sub>BL を使用した。

2. モルモット: 体重300グラム前後の Hartley 系雌モルモットを使用した。

3. ラット: 8週齢前後の SD 系雌ラットを使用した。

いずれの実験においても, 各群マウスは5~10匹, モルモットとラットでは5匹ずつ使用した。

#### C. 抗原

1. 卵白アルブミン (EA): Sigma 社製の2回結晶製品を生食水に溶解して使用した。感作には, 1匹当りマウスでは 100~250 mcg, モルモットでは 1 mg, ラットでは 100 mcg を使用した。

2. 羊赤血球 (SRBC): Alsvet 液に浮遊したものを購入し, 生食水で洗浄後, 最終濃度が 20% に, また一部の実験では 10% になるよう生食水に再浮遊させて使用した。

3. ハムスター赤血球 (HRBC): ヘパリン加採血後直ちに3回洗浄し, 最終濃度が 20% になるように生食水に再浮遊させて使用した。

4. Purified protein derivative (PPD): 予研製で, 生食水に溶解し, 感作, 足蹠反応ともに 10 mcg を使用した。

5. メチル化牛血清アルブミン (MBSA): Sigma 社製品を生食水に溶解し, 感作, 足蹠反応ともに 10 mcg を使用した。

#### D. 注射方法

実験結果中にとくに指示する, マウスの一部の実験を除いて, すべて菌体成分をドラケオールに溶解し, アラセルAを乳化剤として, 抗原液と 1:1 の割合に混じた油中水型エマルジョン (Freund type adjuvant) を用いた。菌体成分単独の効果をみる場合には, 抗原液の代わりに生食水を用いてエマルジョンを作製した。一部のマウスの実験では, 加藤の方法<sup>20)</sup>により作製した CF の水浮遊液と, 羊赤血球の生食水浮遊液とを用いた。

投与経路はすべて左後足蹠の皮内注射で, マウスでは 0.025 ml, モルモットでは 0.1 ml, ラットでは 0.05 ml を注射した。対照として, 常に菌体成分を除いた不完全

Table 1. Effect of Cord Factor on the Antibody Production of Mice

No. of mice/group	Antigen	Test substance	Mean antibody titer (log <sub>2</sub> )*		
			(day 21)	(day 23**)	(day 28***)
8	Egg albumin 250 mcg	Control (IFA)	7		10
		CF 20 mcg	9		14
		AD 6 100 mcg	8		12
5	Hamster red blood cell 8×10 <sup>7</sup>	Control		(day 17***)	(day 24***)
		CF 10 mcg	3		5.5
		Tb-bacilli 100 mcg	7		7.8
6	Sheep red blood cell 8×10 <sup>7</sup>	Control	(day 9)	(day 14)	(day 21)
		CF 10 mcg	3.5	4.8	6
		Tb-bacilli 50 mcg	6	5.8	8.8
8	"	Control	(day 7)	(day 14)	(day 21)
		CF 1 mcg	5	5.5	6.5
		Wax D 1 mcg	7	6.5	8
6	"	" 5 mcg	4.5	5.5	6.5
		Control	(day 5)	(day 10)	(day 17)
		CF 10 mcg	3	3	4.5
6	"	Wax D 100 mcg	4.5	7	8.3
		Control	3	5.5	7
		CF 10 mcg	3		

Antigen and mycobacterial components were incorporated in IFA, and injected into left hind footpad.

\* Numbers in parentheses indicate days after immunization.

\*\* Footpad test was performed on day 21.

\*\*\* Footpad test and secondary immunization were performed on day 10 and 24, respectively.

アジュバント (IFA) 注射群をおき、成績を対比した。

#### E. 免疫反応の測定

1. 血清抗体価: マウスでは眼窩静脈叢より採血し、2~3匹ごとに同量ずつプールした血清について、モルモットでは心穿刺により、ラットでは尾静脈より採血された1匹ずつの血清について、凝集抗体価をマイクロプレートを用いて測定した。EA 感作羊血球は、マウスおよびモルモットの抗体価測定の場合は、タンニン酸処理血球法<sup>27)</sup>により、ラットの場合は Carbodiimide 法<sup>28)</sup>により作製した。

2. 足蹠反応: マウスでは感作後種々の時期に、右後足蹠皮内に 0.02 ml の抗原液を注射し、4, 24, 48 時間後の足の厚さを、顕微鏡下に 0.05 mm 目盛で読みとり、注射前の値と比較した。

3. 皮膚反応: モルモットでは感作後約4週、ラットでは15日後に、側腹部皮内に抗原液 0.1 ml を注射し、モルモットでは 6, 24, 48 時間後に硬結の直径を、ラットでは 24, 48, 72 時間後にダブルスキンスicknessを測定した。

モルモットでは 10 mg/ml の抗原液を、直径 2~3 mm の白濁を生じるように角膜内に注入し、24 および 48 時間後の白濁の有無を判定する角膜反応を併せ行つた。

#### F. 注射局所の腫脹の測定

マウスでは20倍顕微鏡を用いて、モルモットとラットでは 1 mm 目盛のノギスを用いて、足の厚さを測定した。無処置動物では左右の足の厚さはほぼ等しく、また種々の物質を一侧に注射された際に、他側の足の厚さには変化がみられなかつたので、足蹠の厚さの増加を次式で表した。

$$\frac{\text{注射側の厚さ}-\text{対側の厚さ}}{\text{対側の厚さ}} \times 100(\%)$$

#### G. リンパ節重量および細胞数の測定

マウスの膝窩およびそ蹠部リンパ節を剝離摘出し、0.1 mg 目盛の上皿天秤で重量を測定した。その後リンパ節を破碎し、メッシュを通して単一細胞浮遊液を作り、血球計算盤で数えた。

#### H. 有意差の検定

足の厚さ、リンパ節重量、皮膚反応については、平均値の対照との有意差を、Student の t-test によつて検定した。

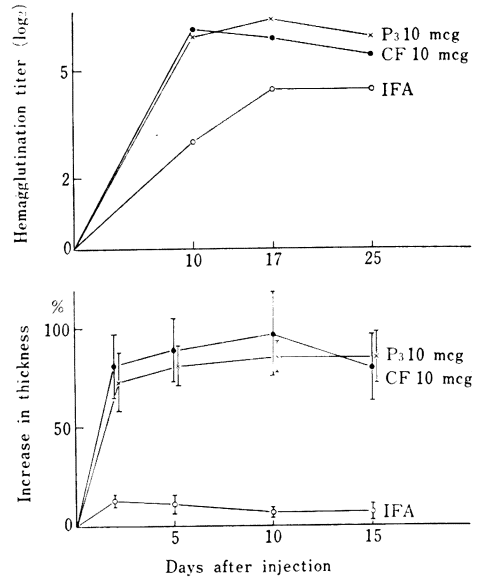
## 結 果

### A. マウス

#### 1. 抗体産生

CF 1 mcg 以上を油相に溶解し、EA, SRBC, および HRBC を油中水型エマルジョンとして注射すると、CF を加えない場合に比較して、2~16 倍の抗体価の上昇がみられた。この CF による抗体産生増強効果は極めて再

Fig. 3. Effect of Cord Factor and P<sub>3</sub> on the Antibody Production and Footpad Swelling of Mice



Six mice for each group were injected into left hind footpads with SRBC ( $1 \times 10^8$ ) incorporated in IFA (○-○), or in IFA containing either CF 10 mcg (●-●), or P<sub>3</sub> 10 mcg (x-x). Vertical lines indicate standard deviation of the group.

現性よく観察された。表1に代表的な結果が例示されているが、CF 10 mcg の効果は、結核菌 50~100 mcg に劣らず、Wax D 100 mcg よりも強いものであつた。P<sub>3</sub> でも図3のように、血中抗体価の上昇、注射局所の腫脹とともに、CF と同様の結果が得られた。以下図中における垂直線は標準偏差を示す。図3の P<sub>3</sub> は青山B株由来であるが、Arthrobacter 由来の P<sub>3</sub> によつても、全く同じ結果が得られた。CF 0.1 mcg では抗体価の上昇はみられなかつたが、SRBC を抗原として、CF 投与量を増加していくと、図4に示すように、血中ピーク抗体価と注射局所腫大のピーク値との間に、かなりの相関がみられた。

CF 水浮遊液と SRBC 浮遊液とを混合して注射した場合には、10 mcg によつても、表2のようにアジュバント効果はほとんどみられなかつた。しかし、CF 水浮遊液をあらかじめ注射されたマウスに、同一部位に抗原単独注射を行つた場合には、同時注射の場合より強いアジュバント効果がみられた(表2)。

SL は図5のように、10~100 mcg の SL-I あるいは SL-III の単独使用によつても、また SL-III 10 あるいは 50 mcg と CF 0.1 mcg との併用によつても、抗体価の上昇を来さなかつた。

#### 2. 足蹠反応

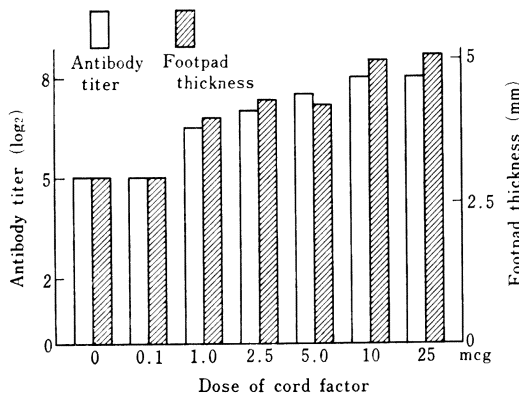
EA, PPD, SRBC, および MBSA を抗原として、感作後5~28日の種々の時期に足蹠反応を行つたが、以下

Table 2. Effect of Aqueous Suspension of Cord Factor and Pretreatment with Cord Factor on the Antibody Production of Mice to Sheep Red Blood Cell in Saline

Pretreatment*	Immunization	Mean antibody titer (log <sub>2</sub> )		
		day 5	day 10	day 15
None	SRBC in saline	4.5	6.5	6.0
"	CF 10 mcg+SRBC in saline	5.0	7.0	6.5
Saline	SRBC in saline	5.3	6.8	6.8
CF 10 mcg in saline	"	6.8	8.0	7.5
Drakeol	"	4.5	6.1	7.0
CF 10 mcg in drakeol	"	7.0	8.0	7.5

\* Materials for pretreatment were injected 5 days before immunization at the same site as antigen injection. 6 mice were used for each group.

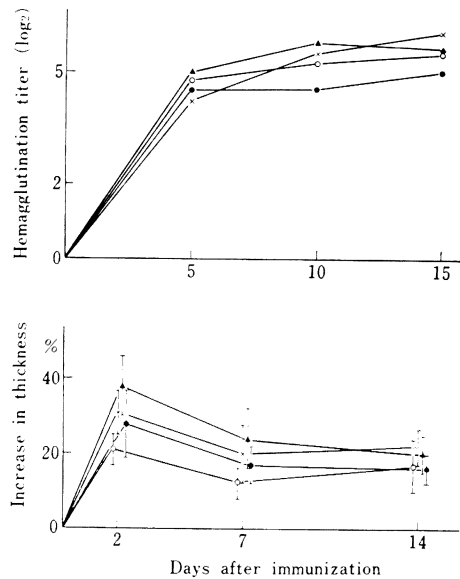
Fig. 4. Relationship between Footpad Swelling and Adjuvant Effect of Cord Factor in Mice



Six to eight mice for each group were injected into left hind footpads with SRB ( $1 \times 10^8$ ) incorporated IFA containing various doses of CF. Maximal values of footpad thickness and antibody titer are shown.

のような多彩な結果が得られた。MBSA 以外の抗原に関しては、とくに感作後の期間が長い場合に、菌体成分の有無に拘らず4時間後かなりの腫脹がみられることが多かった。遅延型反応の示標としては、注射前と24時間後の足の厚さを比較した。IFA 感作群においても、SRBC と PPD に関しては、24時間後に有意の増加がみられる場合があった。しかし4時間後の腫脹よりさらに有意に増加している場合は少なく、また48時間後にはほとんど注射前と差がなかった。CF 使用群では、EA 以外の抗原に関してはほとんどの場合に24時間後に有意の腫大を示し、48時間後にもなお有意差を示している場合や、24時間後に4時間後よりも腫脹が増加している場合が、対照よりも多かった。しかし24時間後の増加はいずれも軽度であり、対照群と比較すると、PPD に関しては有意差が示されることが多かったが、SRBC に関しては差がみられなかった。結核菌体を使用したマウスでは、

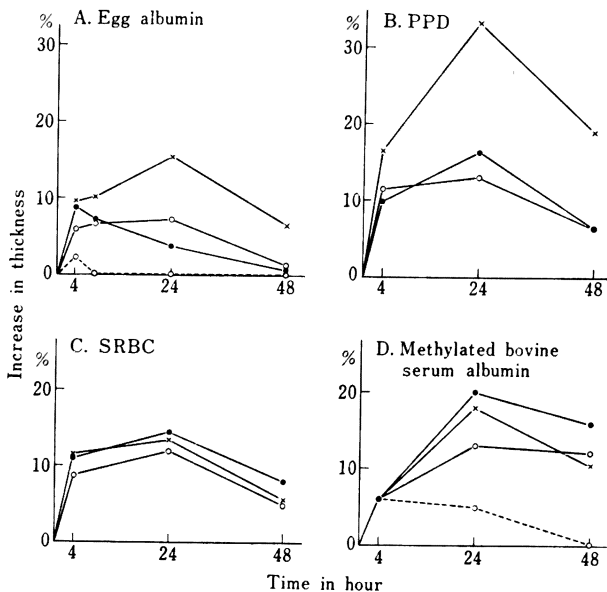
Fig. 5. Effect of Sulfolipid and Cord Factor on the Footpad Swelling and Antibody Production in Mice



Control mice were injected into left hind footpads with SRBC ( $1 \times 10^8$ ) incorporated in IFA (O-O). Inocula for other groups contained sulfolipid III 100 mcg (x-x), cord factor 0.1 mcg (●-●) or cord factor 0.1 mcg plus sulfolipid III 50 mcg (▲-▲). 7 mice were used for each group.

PPD をテスト抗原として用いた場合には、24、48 時間後に著明な腫脹がみられた。これは明らかな遅延型反応と思われ、感作後 7~14 日がピークであった。しかし EA, SRBC に関しては、CF 同様はつきりした遅延型反応と思われる反応は示されなかった。MBSA が抗原である場合には、菌体成分の有無に拘らず、感作後10~14日にピークを有する、明らかな遅延型反応が示された。以上のように、マウスの足蹠反応では、抗原およびアジュバントとして何を使うかによって、極めて多彩な結果が得られ、再現性も必ずしも高くなかった。感作10日前

Fig. 6. Effect of Cord Factor on the Footpad Reaction of Mice



Six to ten Mice for each group were immunized and tested by egg albumin (250 mcg, 50 mcg, respectively) PPD (10 mcg, 10 mcg), SRBC ( $8 \times 10^7$ ,  $4 \times 10^7$ ) and methylated bovine serum albumin (10 mcg, 10 mcg). Interval between immunization and footpad test were 11 days (A), 14 days (B), 9 days (C) and 12 days (D).  
 Type of inocula: antigen in saline (O-O), antigen incorporated in IFA (O-O), antigen incorporated in IFA containing CF 10 mcg (●-●) and tubercle bacilli 100 mcg (x-x).

Table 3. Footpad Reaction of Mice Measured at 24 hours

Adjuvant	EA	Antigen		
		SRBC	PPD	MBSA
None	-	-	-	-
IFA	-	±	-	+
CF	-	±	±	+
Tb-bacilli	±	±	+	+

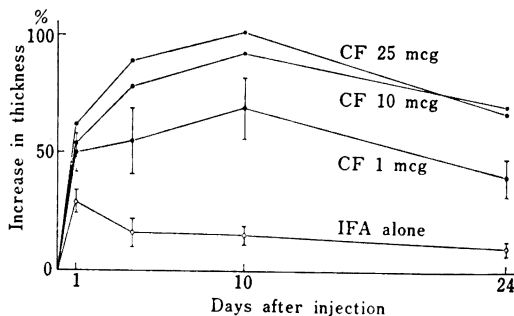
+: Unequivocally positive  
 ±: Not always positive; if positive, reaction is slight or moderate  
 -: Unequivocally negative

後の足蹠反応の代表的な例を図6に示しているが、全実験の結果を簡単にまとめると表3のようであった。

3. 注射局所の腫脹

ドラケオールや IFA のみを注射しても、1~2日をピークとして、軽度の注射局所の腫脹がみられたが、抗原が加わっても腫脹の程度は増加しなかった。ドラケオールや IFA に CF を加えて注射すると、抗原の有無に拘らず、1 mcg 以上の量で、図7に示すような著明な局所腫脹がみられた。この CF による腫脹は、1日後にすでに著明であり、10~14日頃ピークに達したのち徐々に減退するが、4週間の観察期間の終わりにも、なお対照群より有意に腫大していた。

Fig. 7. Effect of Cord Factor on the Footpad Swelling of Mice



Six mice for each group were injected into left hind footpads with IFA containing various doses of CF.

CF を水浮遊液として注射した場合にも、図8のように有意の腫脹がみられたが、その程度は、油や IFA に混ぜて注射した場合に比較してはるかに軽度であった。

SL の場合には、SL-III 100 mcg の注射時にのみ、初期に軽度の腫脹がみられた(図5)が、しかし SL-III 10 mcg および SL-I 10~100 mcg の注射時には、腫脹は全くみられなかった。

4. 領域リンパ節の腫大

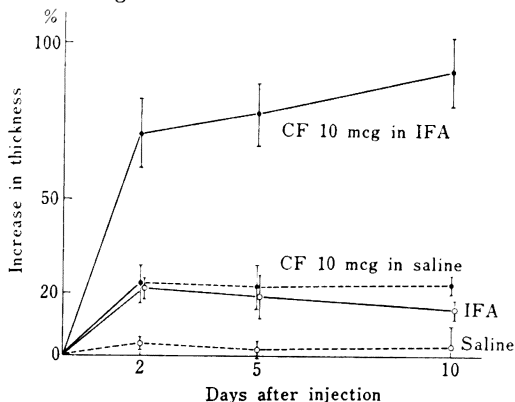
注射側の膝窩リンパ節では、IFA のみの注射によっても軽度の腫大がみられたが、CF 10 mcg が加わると、図9のように4日目頃より腫大は更に有意に増加し、10

Table 4. Effect of Cord Factor on the Draining Lymph Nodes of Mice

Materials tested*	Weight of lymph nodes (mg)**	
	Popliteal	Inguinal
None	1.3±0.3	5.0±1.0
Saline	1.4±0.1	6.4±1.6
CF in saline	4.6±2.2	5.2±1.2
SRBC in saline	3.2±0.8	5.4±1.4
CF+SRBC in saline	8.1±2.5	5.8±1.0
Drakeol	4.1±1.0	5.0±1.0
CF in Drakeol	7.7±2.8	9.2±2.6
SRBC in IFA	8.4±4.0	4.6±0.6
CF+SRBC in IFA	10.8±3.1	27.2±4.8

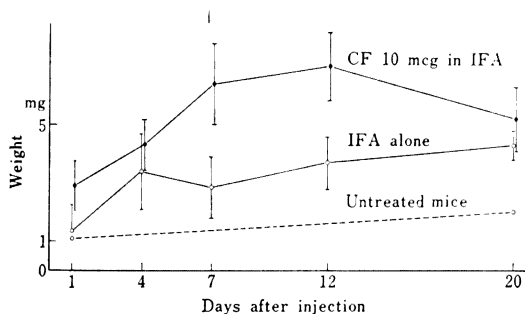
\* Each substance was injected at the hind footpads of 5 mice for each group 12 days previously. 10 mcg of CF were either suspended in saline or dissolved in oil.  
 \*\* Mean value±standard deviation.

Fig. 8. Effect of Cord Factor Injection in the Different Vehicles on the Footpad Swelling of Mice



Five mice for each group were injected into left hind footpads with CF 10 mcg in IFA (●—●), or in saline (●—●). Control mice were injected with IFA alone (○—○), or saline alone (○—○).

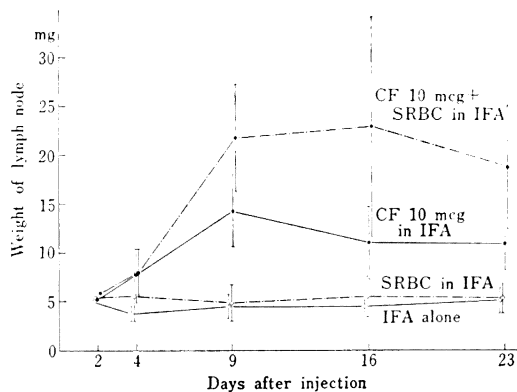
Fig. 9. Effect of Cord Factor on the Weight of the Popliteal Lymph Node of Mice



Six mice for each group were injected into left hind footpads with IFA (○—○), or IFA containing CF 10 mcg (●—●).

日目頃にピークとなり、20日過ぎると IFA 注射群との間に差がみられなくなる傾向が示された。CF 水浮遊液

Fig. 10. Effect of Cord Factor and Antigen (SRBC) on the Weight of the Inguinal Lymph Node of Mice



Six mice for each group were injected into left hind footpads with IFA (○—○), or IFA containing SRBC (1×10<sup>8</sup>) (○—○), CF 10 mcg (●—●), or both (●—●).

の注射の場合にも、膝窩リンパ節では有意の腫大がみられた。表4にピーク時の結果を示している。

注射側そ蹠リンパ節では、IFA 単独注射ではもとより、抗原が加わつても全く腫大はみられなかつた。それに反して、CF をドラケオールや IFA に混ぜて注射すると、図10のように著明な腫大がみられ、抗原が加わっている場合には、この腫大は一層高度であつた。一方 CF の水浮遊液を注射した場合には、そ蹠リンパ節の腫大は全くみられなかつた。表4は12日目のリンパ節重量を示しているが、5日から20日まで同様の結果が得られた。

なおリンパ節の腫大は重量によつて示されているが、細胞数についても、重量と全く同様の結果が得られた。

B. モルモット

1. 抗体産生

表5のように、50 mcg および 500 mcg の CF によ

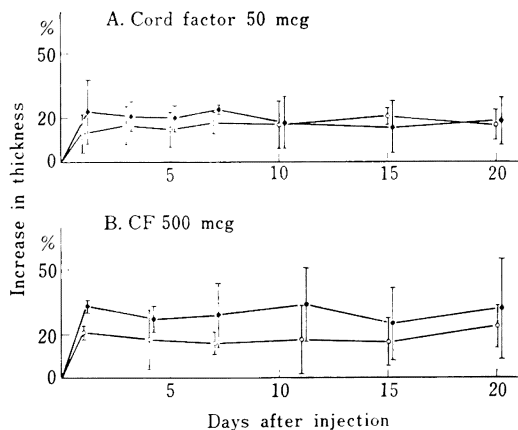
Table 5. Effect of Cord Factor on the Immune Response of Guinea Pigs

Materials tested	Mean antibody titer (log <sub>2</sub> )	Corneal reaction No. positive/total	Skin reaction*		
			Mean diameter of induration (mm)		
			6 h	24 h	48 h
Exp. 1 IFA (Control)	6.3	0/5	12.5±2.5	6.6±1.4	3.7±0.9
CF 50 mcg	8.4	0/5	10.5±1.6	5.5±1.0	3.0±0.7
Tb bacilli 100 mcg	10.6	5/5	10.4±2.1	9.8±1.6	8.5±1.1
Wax D 500 mcg	11.1	5/5	10.2±1.9	8.2±1.3	6.4±0.6
Exp. 2 IFA (Control)	2.8	0/5	14.8±1.9	8.9±0.9	4.2±0.7
CF 500 mcg	4.5	0/5	14.5±1.3	9.0±1.1	4.0±0.9
AD6 500 mcg	7.1	4/5	16.1±2.4	10.2±1.0	7.4±0.9

Immune responses were measured 4 weeks after sensitization with 1mg of EA incorporated in IFA, or in IFA containing mycobacterial components.

\* Doses of test antigen were 10mcg and 50 mcg for Exp.1 and 2, respectively.

Fig. 11. Effect of Cord Factor on the Footpad Swelling of Guinea pigs



Five guinea pigs for each group were injected into left hind footpads with IFA (O-O), or IFA containing CF (●-●).

り、平均約4倍の抗体価の上昇がみられたが、結核菌やロウDによる上昇と比較すると軽度のものであった。

### 2. 遅延型反応

EA 感作4週後の皮内反応では、結核菌やロウD使用群では、24, 48 時間に対照群より大きい硬結を生じたが、CF 群では対照群に比較して差がみられなかった。同時に行った角膜反応でも、結核菌、ロウD群では全例、AD6 群でも5例中4例に明らかな陽性反応が示されたが、CF 群では IFA 群と同様、1例も陽性反応を示さなかった(表5)。

### 3. 注射局所の腫脹

CF 50 mcg では図11Aのように、注射局所の腫脹は認められず、500 mcg の場合は、図11Bのように、初期に軽度の腫脹がみられたが、一過性で、4~5日以降は対照群と差がなかった。この結果は、抗原としてEAが加わっていても全く同様であった。

### C. ラット

Table 6. Effect of Cord Factor on Antibody Production of Rat

Materials tested	Mean antibody titer (log <sub>2</sub> )		
	day 10	day 15	day 21*
Exp. 1			
IFA (Control)	2	4	7.8
CF 40 mcg	2	6	9.2
Wax D 200 mcg	3	6	8.9
Exp. 2			
IFA (Control)		5.3	7.0
CF 250 mcg		6.3	9.3
Wax D 500 mcg		6.5	8.5

Five rats for each group were immunized with 100 mcg of EA incorporated in IFA or in IFA containing mycobacterial components.

\* Skin test was performed 15 days after immunization.

### 1. 抗体産生

表6のように、CF 40 mcg および 250 mcg によって、EA に対する抗体産生は2~4倍に増強された。Wax D 200 mcg および 500 mcg によっても同程度の上昇がみられた。

### 2. 遅延型反応

EA 感作15日後に行った皮内反応では、4時間後には各群とも発赤なく、硬結も軽微であった。24時間後には、図12のようにCF 群およびロウD 群では、IFA 群に比較し、有意の硬結の増大と発赤を来し、48時間も持続し、明らかな遅延型反応が示された。

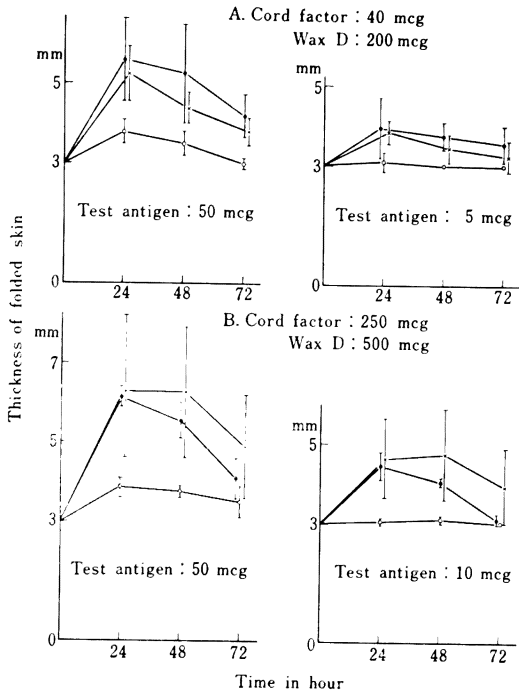
### 3. 注射局所の腫脹

EA で感作する際に、CF 40 mcg を加えて注射された群においても、図13Aのように局所の腫脹は対照群と差がなかった。250 mcg では、図13Bのように、対照群に比較すると有意の腫大がみられたが、マウスの場合に比較して、極めて軽度であった。

以上の結果を、とくにアジュバント効果に関して簡単にまとめると表7のとおりである。



Fig. 12. Effect of Cord Factor on the Skin Reaction of Rats



Five rats for each group were immunized with EA (100 mcg) incorporated in IFA (○-○), or in IFA containing either CF (●-●), or Wax D (x-x). Skin test was performed 2 weeks after immunization.

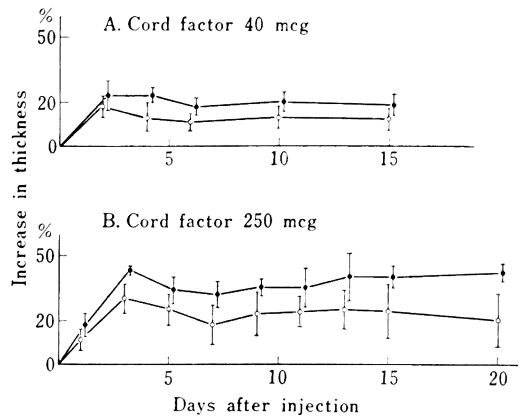
考 察

Cord factor は、結核菌の特有の紐状発育の原因となる因子として、かつマウスに対し強い毒性を持つ物質として、Bloch により分離され<sup>29)</sup>、その後の分析により、二糖類トレハロース1分子と2分子のミコール酸とのエステル結合によつて出来ている、糖脂質であることが証明されている<sup>30)</sup>。またその毒性のメカニズムに関しては、加藤の広範な仕事がある<sup>31)</sup>。

CF は、White らのモルモットにおける実験では、抗体産生増強、遅延型反応誘起能ともに示さず<sup>13)</sup>、アジュバント作用を有しないものと考えられてきた。ところが最近、Bekierkunst らは、マウスにおいて、CF の水中油型エマルジョンを注射後同一部位に羊赤血球を単独注射した場合や、油中水型エマルジョンとして CF と抗原とを同時に注射した場合に、抗体産生が増強されることを報告した<sup>17)</sup>。

しかし、彼らの使用した CF の純度については疑念が持たれている。Ribi の遠沈クロマト法によると、通常の方法で分離された CF には、主として trehalose-6,6'-dimycolate が含まれているほかに、種々の他成分が混在していることが示されている<sup>18)32)</sup>。Bekierkunst らは、CF の静注により、マウスの肺に肉芽腫反応が惹き起され

Fig. 13. Effect of Cord Factor on the Footpad Swelling of Rats



Five rats for each group were injected into left hind footpads with EA (100 mcg) incorporated in IFA (○-○), or incorporated in IFA containing CF (●-●).

Table 7. Comparison of Activity of Mycobacterial Adjuvant among Some Animal Species

	Tubercle bacilli		Cord factor		Wax D	
	Ab*	DH**	Ab	DH	Ab	DH
Mouse	+++	?	+++	?	+	?
Rat	++	+++	++	+++	++	+++
Guinea pig	+++	+++	+	-	+++	+++

\* Enhancement of antibody production.

\*\* Induction of delayed hypersensitivity.

ることを報告している<sup>19)20)</sup>が、東らは精製された CF によつては、かかる反応は生じないと述べている<sup>21)</sup>。またマウスの結核菌感染防御<sup>32)</sup>や腫瘍の退縮<sup>33)</sup>に関して、精製 CF である P<sub>3</sub> と BCG 細胞壁成分との間に相乗作用がみられることや、CF と Sulpholipid との間に、マウス毒性に関し相乗作用がみられる<sup>34)</sup>ことが報告されている。このように、生体成分の生物活性は、微量の混入物により大きく影響を受けることがあるので、物質の純粋さが重要となる。

そこでわれわれは、2種類の精製 CF を用いて実験を行った。これら製品は、それぞれ物質の純度検定に高い感度を示す薄層クロマト法および Ribi の遠沈クロマト法によつて、単一と認められたものである。その結果、マウスでは 1 mcg という微量の精製 CF によつて、確かに抗体産生が高まることが認められた。

P<sub>3</sub>の実験では、Arthrobacter 由来のものも Mycobacterium 由来のものと同じアジュバント効果と局所の腫脹を示した。Arthrobacter の P<sub>3</sub>は、炭素 80 以上のミコール酸でなく、炭素 32 以上の Corynomycolic acid を持つことがわかっている<sup>35)</sup>ので、アジュバント活性発現には、6,6'の炭素にエステル結合している脂肪酸の炭素

数は、32コあれば十分であると考えられる。Asselineauらにより数多くのCF類似物質が合成されており、加藤らの研究によりその毒性与構造との関係もわかっている<sup>34)</sup>ので、CFはアジュバント効果と毒性与構造との関係を追求するのに適した物質と考えられる。Sulfolipidは図2に示されるように、CFと極めて類似した物質であるが、アジュバント効果は全くみられず、注射局所の腫脹もほとんどみられなかつた。加藤らのマウスに対する毒性に関する成績<sup>34)</sup>と異なり、われわれの行ったような足蹠注射では、本実験に用いた量のSLとCFとの間に、局所の炎症反応に関してもアジュバント効果に関しても、相乗作用はみられなかつた。

CFのアジュバント作用機序について考察を試みたい。従来よりX線照射<sup>36)~38)</sup>をはじめ、エンドトキシン<sup>39)~41)</sup>、コルヒチン<sup>42)43)</sup>、6MP<sup>44)</sup>などのいわゆる cytotoxic agentsにより、ある条件下に免疫反応が増強されることが報告されている。一般に、その細胞障害作用のため、核酸やその分解産物が生成遊離されて、免疫系細胞に非特異的刺激を与えることが、これら物質のアジュバント作用の原因と考えられて<sup>37)40)~42)44)</sup>いる。

一方、代表的なデポ型アジュバントである Freund の不完全アジュバントについては、抗原が接種部に長くとどまり徐々に持続的に放出利用される<sup>3)~5)9)12)45)</sup>こと、全身的に抗原の散布が助けられて多くの組織で利用されるようになる<sup>9)46)47)</sup>こと、油による細胞反応により、抗体産生細胞が抗原周囲にひきつけられる<sup>9)46)</sup>ことなどが、主な作用機序と考えられている。

結核菌体に加わつた完全アジュバントについては、上述のオイルの効果の他に、結核菌による特殊の細胞反応に意味があると考えている人が多い。すなわちモルモット、ウサギ、サルなどでは、注射部や所属リンパ節のみならず、遠隔リンパ節や肺などにも、大単核細胞、類上皮細胞、リンパ球、形質細胞等より成る肉芽腫が形成されることが知られて<sup>6)7)9)48)~50)</sup>おり、ロウDについても、モルモットの注射局所や所属リンパ節などに結核菌同様の類上皮細胞肉芽腫を作ることが報告されている<sup>9)12)13)51)</sup>。このような細胞反応により、抗体産生細胞が抗原周囲に集簇増殖し抗原と有利に接触する<sup>9)52)53)</sup>ことや、遅延型感作に関与するような細胞系列が刺激される<sup>9)46)</sup>ことなどが推定されている。マウスにおいては、結核菌やロウDの注射では、局所に肉芽腫を生じないことが Carter<sup>47)</sup>や Bekierkunst<sup>54)</sup>らにより報告されている。一方 Bekierkunst らは、CFによるマウスの組織学的変化の特徴として、注射局所に強い炎症性細胞反応による腫脹が招来され、次第に類上皮細胞も出現すること、所属リンパ節でも類上皮細胞、マクロファージ、リンパ球より成る肉芽腫形成がみられ、また paracortical area のリンパ球過形成とマクロファージの集簇がみられることを

挙げている<sup>54)</sup>。

われわれの精製CFによる成績でも、同様にマウスの注射局所は著明に腫脹し、所属リンパ節も腫大した。これらの腫脹は、CFの組織障害作用により惹起された炎症反応と考えられ、CFは直接に細胞を障害して核酸やその分解物等のアジュバント活性のある物質を遊離させるとともに、宿主の細胞反応を誘起して、より多くの免疫系細胞が抗原と接触することを可能にするのではないかと推定される。CFによる組織反応が、そのアジュバント効果と密接な関係を有する可能性は、以下のことから推論される。

まずCFの投与量を変えた場合、注射局所の腫脹のみられない量ではアジュバント効果はみられず、投与量を増加して生じた局所反応の程度と、抗体産生増強の程度との間に平行関係がみられた。次にCFの投与様式が違つたと、組織反応とアジュバント効果も異なり、両者の間に関連がみられた。すなわちCFを油中水型エマルジョンに加えて注射した場合には、著明な局所反応と強いアジュバント効果がみられたが、水浮遊液と抗原との混合液の場合には、局所反応は軽度であり、アジュバント効果もほとんどみられなかつた。CF水浮遊液でアジュバント効果がみられなかつたことは、組織反応が弱かつたためと思われるが、水溶液の形の抗原は局所よりの排除が速やかで、局所反応が生じた時期にはすでに抗原が十分残存していないことも一因と考えられる。事実、CF水浮遊液をあらかじめ注射されて反応が生じている局所に、抗原を単独で注射すると、同時注射の場合よりも強いアジュバント効果が得られた。これは Bekierkunst らもすでに報告している<sup>17)</sup>ことであるが、CFによる組織反応の生じている局所に抗原が接触することの必要性を示唆しているように思われる。

なおCFの投与様式による組織反応の差は、リンパ組織においても認められた。所属膝窩リンパ節では、CF水浮遊液によつても、エマルジョンの場合と同様の腫大がみられたが、そ蹠リンパ節では、エマルジョン注射時には著明な腫大がみられたのに反し、水浮遊液の場合には、腫大は全くみられなかつた。データを示していないが、脾臓もエマルジョン注射時のみ軽度の腫大を示した。この違いは、エマルジョンの場合、油によつてCFの全身への散布、とくにリンパ組織へのリンパ行性の輸送が促進されたためと考えられる。

CFエマルジョン注射時に、膝窩リンパ節よりもそ蹠リンパ節において、腫大が高度であつたことは、興味ある事実と思われるが、その理由はよくわからない。Askonas らもロウDを注射されたモルモットで同様の所見を報告しており<sup>51)</sup>、到達する刺激の濃度や、リンパ節自体の組織解剖学的な問題など種々の因子が関係していると考えられる。

マウスにおける、CFの遅延型反応誘起能に関しては、抗体産生の場合と異なり、はっきりした結論は下せなかつた。マウスは元来モルモットと異なり、*in vivo*で遅延型過敏症を示し難い動物と考えられているが、Nelsonら<sup>56)</sup>、Hoyら<sup>56)</sup>は、SRBCや異種抗原、腫瘍抗原などに対して足蹠反応を示標として、遅延型過敏症を報告している。一般に足蹠反応では、24時間後の足の厚さの増加の程度が遅延型反応を表すものとみなされているが、われわれの実験条件では、足蹠反応はアジュバントとして用いられた物質よりも、むしろ抗原の種類によつて大きく左右された。また必ずしも良い再現性は示されなかつた。馬場らも、マウスの足蹠反応の誘起には、抗原の性質が重要な関係を持つことを報告している<sup>57)</sup>。足蹠反応は遅延型過敏症の一表現であるとしても、その発現にはアジュバントの存在の他に、抗原そのものの性質や量など、他の因子がより重要ではないかと考えられる。この点で、菌体アジュバントの作用が強く表現される、モルモットの皮内反応や角膜炎とは異なつた点があるように思われる。したがつて、足蹠反応は、フロイント型アジュバントに加えて注射された物質の、遅延型反応誘起に関するアジュバント効果を判定する示標としては良い方法と考え難いので、CFの遅延型誘起能に関しては、方法を変えて検討する必要があると考えられる。

CFの組織障害作用は、動物種により感受性に差がみられ、マウスと異なりモルモットでは、注射局所の反応がほとんどみられなかつた。その抗体産生増強作用も、モルモットでは結核菌やロウDに比較すると極めて弱く、遅延型誘起能は全く示されなかつた。

このマウスおよびモルモットの成績から、CFのアジュバント効果はその組織障害作用に基づくものであり、マウスとモルモットにおけるアジュバント効果の差は、組織のCF毒性に対する感受性の差の反映であると考えられることも可能のように思われる。

しかしラットにおいては事情は全く異なつていた。ラットではCFによつて、局所反応が軽度であるにも拘らず、抗体産生増強のみならず、遅延型皮膚反応が誘起された。

遅延型過敏症を誘起する物質としては、種々の菌体とその成分が知られており、中でも結核菌とそのロウDが最も強力であると一般に認められている。これらの遅延型反応に関する実験は、主にモルモットを用いて行われていることが多い。またモルモット-ロウDの系では、disaccharide peptide monomerが活性構造部分であることが最近わかつてきた<sup>58)59)</sup>。CFは上述のようにモルモットでは遅延型反応を誘起しないが、ラットではロウDと同じく遅延型反応を誘起した。CFはペプチドを有さず、ロウD活性部分とCFとの間に構造的な共通性は存在しない。しかし、いずれも哺乳類には存在しない物

質から成つていることは、菌体成分アジュバントの作用機序を考える上に、興味深い点であると考えられる。

ラットでは、注射局所の反応はマウスに比較し極めて軽度であつたが、ロウDに劣らぬアジュバント効果がみられた。したがつてラットでは、CFの作用機序として、マウスの場合に想定されるような、核酸崩壊産物の遊離や、炎症性細胞反応による免疫担当細胞の増生促進などとは異なる機序が働いている可能性が示唆される。もちろんアジュバント活性に必要な最小限の組織変化はラットにおいても起こつており、注射局所反応にみられるマウスとラットとの差は、アジュバント作用とは何ら関連がない組織反応である可能性も考えられる。しかしモルモットでは500 mcgの大量でも、遅延型反応誘起能はみられなかつたので、ラットとモルモットとのCFに関する免疫学的感受性の差異は否定できないであろう。

なお本実験で用いたロウDは、モルモット、ラットにおいては強いアジュバント効果を示したが、マウスでは5 mcgでは効果がなく、100 mcgでもCF 10 mcgより弱い効果しか示さなかつた。BekierkunstらはCFを含まないロウD 5~10 mcgは、マウスではアジュバント効果を示さないことを報告している<sup>17)</sup>。われわれの用いたロウDもCFを含んでいないが、100 mcg用いるとアジュバント効果を示したので、ロウDはマウスにおいては弱いアジュバントであるため、彼らの用いた量では効果が表れなかつたものと考えられる。また本実験で用いたロウDをアセチル化したADは、モルモットでは強いアジュバント効果を示したが、ラットおよびマウスではアジュバント効果を示さなかつた(未発表)。

結核菌体は全体として用いれば、調べられたほとんどすべての実験動物において、強いアジュバント効果を示すことが知られている。しかし、本実験の結果は、結核菌体中にはアジュバント活性を有する成分が幾つか存在し、それら各成分のレベルで考えると、その効果の発現や作用機序は、動物種によつて全く異なる場合があることを示唆している。現在臨床分野において、悪性腫瘍を主として、免疫学的療法の研究開発が盛んに行われている。実験動物の種類、腫瘍の種類、アジュバント物質の種類、あるいは注射経路などによつて、その効果は多様であると考えられるので、動物実験の段階から進んで、アジュバントの臨床的応用を考える場合には、十分慎重であるべきことを、われわれの成績は示唆していると考えられる。

## 結 語

結核菌体中の毒性物質として知られている cord factorのアジュバント作用を、マウス、モルモット、ラットについて、2種の精製された cord factor 標品を Freund 型エマルジョンの形で用いて検討した。マウスでは抗体

産生に関して強いアジュバント効果が示された。かつ注射局所の炎症反応が高度で、アジュバント効果との間に相関が示された。モルモットにおいては、アジュバント効果、局所反応ともに極めて弱いものであつた。ラットでは局所反応は軽度であつたが、抗体産生増強のみならず、遅延型反応を誘起しうることが示された。またロウ D は、モルモットおよびラットにおいては強いアジュバント作用を示すが、マウスでは弱い作用しか示さなかつた。以上のことから、菌体成分のレベルでは、少なくとも Freund 型エマルジョンの形で用いられるとき、アジュバント効果の発現に、動物により差がみられることが示された。

(稿を終わるに臨み、ご指導とご校閲を賜つた恩師杉山浩太郎教授、田中渥助教授に衷心より感謝いたします。なお本研究の要旨は、第49回日本結核病学会総会において発表した。)

## 文 献

- 1) Freund, J. and Bonato, M. V.: *J. Immunol.*, 48 : 325, 1944.
- 2) Herich, W. E., Halbert, S. P., Mertens, E. and Mudd, S.: *J. Exp. Med.*, 82 : 343, 1945.
- 3) Halbert, S. P., Mudd, S. and Smolens, J.: *J. Immunol.*, 53 : 291, 1946.
- 4) Talmage, D. W. and Dixon, F. J.: *J. Infec. Dis.*, 93 : 176, 1953.
- 5) McKinney, R. W. and Davenport, F. M.: *J. Immunol.*, 86 : 91, 1961.
- 6) Fischel, E. E., Kabat, E. A., Stoerk, H. C. and Bezer, A. E.: *J. Immunol.*, 69 : 611, 1952.
- 7) Weigle, W., Dixon, F. J. and Deichmiller, M. P.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 105 : 535, 1960.
- 8) Freund, J. and McDermott, K.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 49 : 548, 1942.
- 9) Freund, J.: *Advan. Tuberc. Res.*, 7 : 130, 1956.
- 10) Raffel, S.: *J. Infec. Dis.*, 82 : 267, 1948.
- 11) Raffel, S., Arnaud, L. E., Dukes, C. D. and Huang, J. S.: *J. Exp. Med.*, 90 : 53, 1949.
- 12) White, R. G., Coons, A. H. and Connolly, J. M.: *J. Exp. Med.*, 102 : 83, 1955.
- 13) White, R. G., Bernstock, L., Jones, R. G. S. and Lederer, E.: *Immunol.*, 1 : 54, 1958.
- 14) White, R. G. and Marshall, A. H. E.: *Immunol.*, 1 : 111, 1958.
- 15) Colover, J. and Consden, R.: *Nature*, 177 : 749, 1956.
- 16) Kies, M. W., Alvord, E. C., Jr. and Roboz, Z.: *Nature*, 182 : 104, 1958.
- 17) Bekierkunst, A., Yarkoni, E., Flechner, I., Morecki, S., Vilkas, E. and Lederer, E.: *Infect. Immunity*, 4 : 256, 1971.
- 18) Azuma, I., Ribi, E. E., Meyer, T. J. and Zbar, B.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 52 : 95, 1974.
- 19) Bekierkunst, A., Levij, I. S., Yarkoni, E., Vilkas, E., Adam, A. and Lederer, E.: *J. Bacteriol.*, 100 : 95, 1969.
- 20) Bekierkunst, A. and Yarkoni, E.: *Infect. Immunity*, 7 : 631, 1973.
- 21) 東市郎・谷山忠義・山村雄一: *綜合臨床*, 22 : 2185, 1973.
- 22) Noll, H. and Bloch, H.: *J. Biol. Chem.*, 214 : 251, 1955.
- 23) Goren, M. B. and Brokl, O.: *Recent Results in Cancer Research*, 47 : 251, 1974.
- 24) Goren, M. B.: *Biochim. Biophys. Acta*, 210 : 116, 1970.
- 25) Tanaka, A. and Kitagawa, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 98 : 182, 1965.
- 26) Kato, M.: *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 96 : 553, 1967.
- 27) Frisch, A. and Persellin, R. H.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 124 : 344, 1967.
- 28) Johnson, H. M., Brenner, K. and Hall, H. E.: *J. Immunol.*, 97 : 791, 1966.
- 29) Bloch, H.: *J. Exp. Med.*, 91 : 197, 1950.
- 30) Noll, H., Bloch, H., Asselineau, J. and Lederer, E.: *Biochim. Biophys. Acta*, 20 : 299, 1956.
- 31) 加藤允彦: *結核*, 47 : 93, 1972.
- 32) Meyer, T. J., Ribi, E. and Azuma, I.: Eighth joint conference on tuberculosis. U.S.-Japan Cooperative medical science program, p. 250, 1973.
- 33) Meyer, T. J., Ribi, E., Azuma, I. and Zbar, B.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 52 : 103, 1974.
- 34) 小谷三三・加藤允彦: *代謝*, 11 : 67, 1974.
- 35) Asselineau, J.: *Les lipides bacteriens*, Herman. Paris, p. 121, 1962.
- 36) Dixon, F. J. and McConahey, P. J.: *J. Exp. Med.*, 117 : 833, 1963.
- 37) Taliaferro, W. H. and Taliaferro, L. G.: *J. Immunol.*, 104 : 1364, 1970.
- 38) Schmidtke, J. S., and Dixon, F. J.: *J. Immunol.*, 111 : 691, 1973.
- 39) Luecke, D. H. and Sibal, L. R.: *J. Immunol.*, 89 : 539, 1962.
- 40) Merritt, K. and Johnson, A. G.: *J. Immunol.*, 91 : 266, 1963.
- 41) Claman, H. N.: *J. Immunol.*, 91 : 833, 1963.
- 42) Jaroslow, B. N.: *J. Infec. Dis.*, 107 : 56, 1960.
- 43) Taliaferro, W. H. and Jaroslow, B. N.: *J. Infec. Dis.*, 107 : 341, 1960.
- 44) Chanmougan, D. and Schwartz, R. S.: *J. Exp. Med.*, 124 : 363, 1960.
- 45) Herbert, W. J.: *Nature*, 210 : 747, 1966.
- 46) Lipton, M. M.: *Allergic encephalomyelitis*. Thomas, Springfield, Illinois, p. 388, 1959.
- 47) Carter, R. L., Jamison, D. G. and Vollum, R. L.: *J. Path.*, 97 : 503, 1969.
- 48) Kabat, E. A., Wolf, A. and Bezer, A. E.: *J. Exp. Med.*, 88 : 417, 1948.
- 49) Steiner, J. W., Langer, B. and Schatz, D. L.: *A. M. A. Arch. Path.*, 70 : 424, 1960.
- 50) Dvorak, A. M., Bast, R. C. and Dvorak, H. F.: *J. Immunol.*, 107 : 422, 1971.

- 51) Askonas, B. A. and White, R. G.: *Brit. J. Exp. Path.*, 37 : 61, 1956.
- 52) Moore, R. D., Lamm, M. E., Lockman, L. A. and Schoenberg, M. D.: *Brit. J. Exp. Path.*, 44 : 330, 1963.
- 53) French, V. J., Stark, J. M. and White, R. G.: *Immunol.*, 18 : 645, 1970.
- 54) Bekierkunst, A., Levij, I. S., Yarkoni, E., Vilkas, E. and Lederer, E.: *Infect. Immunity*, 4 : 245, 1971.
- 55) Nelson, D. S. and Mildenhall, P.: *Austral. J. Exp. Med. Sci.*, 45 : 113, 1967.
- 56) Hoy, W. E. and Nelson, D. S.: *Nature* 222 : 1001, 1969.
- 57) 馬場満男・原田孝三・森川茂: 第3回日本免疫学会発表, 1973.
- 58) Adam, A., Ciorbaru, R., Ellouz, F., Petit, J. F. and Lederer, E.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 56 : 561, 1974.
- 59) Fleck, J., Mock, M., Tytgat, F., Nauciel, C. and Minck, R.: *Nature*, 250 : 517, 1974.