

原 著

遅延型皮膚反応の場が有するアジュバント効果

片岡哲朗・徳永 徹

国立予防衛生研究所結核部

受付昭和54年3月24日

INDUCTION OF DELAYED-TYPE HYPERSENSITIVITY TO PROTEIN
ANTIGENS GIVEN INTRADERMALLY TOGETHER WITH
PPD IN BCG-SENSITIZED GUINEA PIGS

Tetsuro KATAOKA* and Tohru TOKUNAGA

(Received for publication March 24, 1979)

BCG-sensitized guinea pigs were injected intradermally(id) with either 2 μ g PPD alone, 2-0.02 μ g PPD plus 100 μ g bovine serum albumin (BSA), or 100 μ g BSA alone. Two weeks later, the animals were skin-tested with 5 μ g BSA. Positive delayed-type hypersensitivity (DTH) skin reactions to BSA sized more than 10mm in diameter were observed only in the animals which were injected id with PPD plus BSA (Table 1). When 1 μ g of bovine gamma globulin (BGG) was used instead of BSA, similar adjuvant effect of DTH to PPD on the induction of DTH to BGG was observed (Table 4). Arthus-type skin reaction had never been demonstrated. The DTH reactions induced were antigen-specific.

By the similar way, the adjuvant effect of DTH skin reaction to BGG was also tested; normal guinea pigs were sensitized with subcutaneous injection of 1mg BGG mixed with Freund's complete adjuvant, and challenged with 5 μ g BGG plus 100 μ g BSA 3 weeks later. Three weeks after the challenge, these animals were skin-tested with 5 μ g BSA. Although significant level of DTH to BGG was developed in these animals, no positive reaction to BSA was detected (Table 3).

Normal guinea pigs were injected id with crude lymphokines, obtained as a culture supernatant of spleen cells of a BCG-sensitized guinea pig mixed with PPD, plus 100 μ g BSA, and skin-tested with 5 μ g BSA 3 weeks later; no DTH to BSA was observed (Table 2). It is suggested that so-called tuberculin-type reaction, but not Jones-Mote-type reaction, is required for the adjuvant effect of DTH on the induction of the DTH to an unrelated antigen located at the site of the former DTH.

The intensity of DTH reaction to PPD seemed to affect the induction of DTH to BSA or BGG; in the BCG-sensitized guinea pigs challenged with 2 μ g PPD plus 100 μ g BSA, or 2 μ g PPD plus 1 μ g BGG, 3 of 5 animals and none of 5 developed DTH to BSA or BGG, respectively, whereas all of the animals challenged with 0.02 μ g PPD plus 100 μ g BSA, or 3 of 5 challenged with 0.02 μ g PPD plus 1 μ g BGG showed positive DTH reactions to BSA or BGG, respectively (Table 4). The sizes of the DTH reactions induced were larger in the latter group than in the former group (Table 4). It is possible that too vigorous inflammatory response to PPD reduce the adjuvant effect on induction of DTH to protein antigens.

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, 10-35, Kamiosaki 2-chome, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

緒 言

BCG 感作生体は、結核菌感染に対する抵抗性や、ツベルクリン皮膚反応のような結核菌に特異的な免疫応答を示すだけでなく、結核菌とは抗原的に関係のない種々の抗原に対しても、特徴のある応答を示す。たとえば、われわれの研究室においても、ヒツジ赤血球に対する抗体産生と遅延型過敏症 (DTH) とが、BCG 感作マウスにおいては共に著しく増強されること¹⁾や、BCG 注射部位にコバルト照射腫瘍細胞を接種すると、有効に腫瘍特異免疫が成立すること²⁾などを報告した。

一方、近年いわゆる癌の免疫療法剤として BCG が使用されている。われわれも、BCG の抗腫瘍効果の機作について一連の研究を続けてきた^{3)~7)}。その結果得られた知見と、他の研究者の報告とに立脚して、徳永⁸⁾は、BCG の抗腫瘍効果の機作に関する 3 ステップ・モデルを提唱した。すなわち、(1) BCG に対する炎症反応により、接種局所に動員される各種細胞、特にマクロファージが、BCG と共に局所に存在する腫瘍細胞をも傷害し、いわゆる 捲き込み効果を示す。(2) BCG に特異的に感作された T リンパ球が、BCG 抗原と反応してリンフォカインを産生し、マクロファージを活性化する。この活性化マクロファージによつて、腫瘍細胞が更に非特異的に破壊される。(3) 破壊された腫瘍細胞の特異抗原がマクロファージにより処理され、その情報が有効に T リンパ球に提示されて、最終的に、全身的な腫瘍特異免疫が成立する。このモデルの各ステップを検証するために、更に研究を続行中であるが、本報告の狙いは、上述の中の (2) の効果が (3) の効果とどのように結びつくかを示すための実験である。すなわち、BCG 感作リンパ球と BCG の接触による局所の遅延型アレルギー反応が、非特異的に腫瘍細胞を捲き込んで破壊すると同時に、腫瘍特異免疫の成立を促すという事実、すなわち、遅延型アレルギー反応の場が、その場に存在する別個の抗原 (unrelated antigen) に対する宿主の免疫反応を増強するという一般的事実として捉えうるかどうかを、検索しようとして企図したものである。このような可能性については、Bloom⁹⁾ が Freund 完全アジュバントで感作したモルモットに、ウン・ガンマグロブリン (BGG) を PPD と一緒に皮内注射すると、BGG 単独では成立しない DTH が検出されるようになることを、簡単ながら記載しており、われわれは、この方法を準用して検討を行なつたものである。

実験材料および方法

1. モルモット: 体重 400~450 g のハートレイ系雌を、船橋農場より購入したものをを用いた。
2. BCG: 経皮用凍結乾燥ワクチン (生菌数、約 $1 \times$

10^9 /アンプル; 日本 BCG 研究所) を生理食塩液に浮遊し直後に用いた。

3. 皮膚反応抗原: PPD (予研製), ウン血清アルブミン (BSA; Armour Pharmaceutical Co., Kankakee, Ill.), ウン・ガンマグロブリン (BGG; Nutritional Biologicals Corp., Cleveland, Ohio), 卵白アルブミン (EA; Miles Laboratories, Inc., Elkhart, Ind.) を、それぞれ燐酸緩衝液に溶解して使用した。

4. 皮膚反応惹起因子 (SRF): 結核菌青山 B 株の流動パラフィン浮遊液筋肉内注射で感作したモルモットの、脾細胞 1×10^7 /ml を PPD $50 \mu\text{g}/\text{ml}$ と共に炭酸ガスふらん器内で 24 時間培養した後、その上清を分離した⁹⁾。正常モルモットで、その上清が強い皮膚反応を惹起する活性を有することを確認した後、使用した。

5. BCG 感作: BCG 生菌 1×10^7 を含む菌液を皮下注射し、3~4 週後の動物を使用した。

6. BGG による感作: BGG 1 mg を単独、あるいは Freund の不完全または完全アジュバントと混合して、モルモットの皮下に注射し 3 週後の動物を用いた。

7. 皮膚反応: BSA, BGG および EA $5 \mu\text{g}/0.1 \text{ ml}$ をモルモット皮内に注射し、6 時間後 (アルサス型反応)、24 および 48 時間後 (遅延型反応) の発赤を伴う硬結の長径と短径を、キャリバスで計測した。両者の算術平均値 (mm) をもつて、反応の大きさを表した。10 mm 以上の値を示したものを、陽性反応とした。

実験成績

BCG 感作モルモットに、BSA $100 \mu\text{g}$ を単独、あるいは PPD と共に皮内注射後、2 週目に BSA $5 \mu\text{g}$ による皮膚反応を調べた成績を、表 1 に示した。BSA 単独注射群では、BSA に対する感作が全く成立しなかつたのに反し、PPD と共に注射された動物では、PPD $2 \mu\text{g}$ の群で 6 匹中 4 匹、 $0.2 \mu\text{g}$ の群では全例で、強い陽性反応が認められた。なお 6 時間後の反応は、すべて陰性であつた。

ここでみられた BSA に対する DTH の成立が、感作抗原と異なるタンパク、あるいはリンフォカインが混在していたことでもたらされたか否かを明らかにするため、次の実験を行なつた。BSA $100 \mu\text{g}$ を PPD $5 \mu\text{g}$ あるいは BGG $5 \mu\text{g}$ と共に、または SRF 原液に溶解して正常モルモットに皮内注射し、2 週後に BSA $5 \mu\text{g}$ で皮膚反応をみたが、どの動物においても感作が成立していなかつた (表 2)。

次に、PPD 以外のタンパクに対する DTH 皮膚反応が、同じようなアジュバント効果を有するか否かを、BGG 感作モルモットを使つて調べた。表 3 に示したごとく、BGG 1 mg で Freund の完全アジュバントと共に感作した動物では、10 匹中 8 匹に BGG に対する

Table 1. Induction of DTH to BSA Given Intradermally Together with PPD in BCG-sensitized Guinea Pigs

Intradermal injection	Skin reaction at the injection site	Skin reaction to BSA after 2 weeks
BSA 100 μ g alone	0	0 (0/8)*
BSA 100 μ g + PPD 2 μ g	23.5 \pm 0.8	9.3 \pm 7.9(4/6)
BSA 100 μ g + PPD 0.2 μ g	20.1 \pm 1.1	17.9 \pm 4.6(6/6)

BCG-sensitized guinea pigs were injected intradermally with BSA together with or without PPD. Skin reactions at the injection sites were measured after 24 hrs. Two weeks later, the animals were skin-tested with 5 μ g of BSA. Skin reactions were expressed as the mean (mm) \pm S.D.

* No. of animals with positive skin reaction (larger than 10mm)/No. of animals tested.

Table 2. Induction of DTH to BSA Given Intradermally Together with PPD, BGG or SRF in Normal Guinea Pigs

Intradermal injection	Skin reaction at the injection site	Skin reaction to BSA after 2 weeks
BSA 100 μ g alone	0	0
BSA 100 μ g + PPD 5 μ g	0	0
BSA 100 μ g + BGG 5 μ g	0	0
BSA 100 μ g + SRF*	22.4 \pm 2.2	0

Normal guinea pigs were injected intradermally with BSA together with or without PPD, BGG, or SRF. Skin reactions at the injection sites were measured after 24 hrs. Two weeks later, the animals were skin-tested with 5 μ g of BSA. Skin reactions were expressed as the mean (mm) \pm S.D. (5 animals).

* BSA was dissolved in SRF at a concentration of 100 μ g/0.1 ml, then injected.

Table 3. Induction of DTH to BSA Given Intradermally Together with BGG in BGG-sensitized Guinea Pigs

Sensitization	Intradermal injection	Skin reaction at the injection site	Skin reaction to BSA after 3 wks.
BGG alone	BSA 100 μ g + BGG 5 μ g	0 (0/4)*	0
BGG + CFA	BSA 100 μ g + BGG 5 μ g	10.6 \pm 4.2(8/10)	0
BGG + IFA	BSA 100 μ g + BGG 5 μ g	0 (0/10)	0

Normal guinea pigs were sensitized by subcutaneous injection of 1mg of BGG with/without complete (CFA) or incomplete Freund's adjuvant (IFA), and three weeks later, challenged intradermally with 100 μ g of BSA together with 5 μ g of BGG. Skin reactions at the injection sites were measured after 24 hrs. Then, three weeks later, the animals were skin-tested with 5 μ g of BSA. Skin reactions were expressed as the mean (mm) \pm S.D.

* No. of animals with positive skin reaction (larger than 10mm)/No. of animals tested.

DTH が成立していた。BGG 5 μ g で皮膚反応をテストしたときに、BSA 100 μ g が一緒に皮内注射されたが、3週後に調べた BSA に対する DTH は、BGG 感作が成立していたモルモットにおいても、陽性になつていなかった。すなわち、BGG による DTH 皮膚反応は、PPD によるそれとは違つて、BSA 感作に対してアジュバント効果を示さなかつた。

表1に示した成績で、PPDの量によりDTHの成立する割合、その強さが影響される傾向がみられた。そこで、PPDの量を2 μ g~0.02 μ gと10倍間隔で3段階の濃度を取り、それぞれBSA 100 μ gと共に注射して、BSAに対するDTHが成立する割合と反応の大きさと

を調べた。同時に、BSA以外のBGG、EAに対するDTHの成立に及ぼす影響をみると共に、反応の特異性をも確認した。予備実験で、BGG、EAは100~10 μ gを用いると、単独で皮内接種しただけでDTHが成立することが分かつたので、1 μ gという少量を用いた。この実験の成績を、表4に示した。EA単独でもDTHの成立がみられた点を除いて、次の3点が明らかとなつた。すなわち、(1) BSA、BGGに対するDTH成立に、PPDによる皮膚反応がアジュバント効果を示した、(2) 成立したDTHは、感作抗原に特異的であつた、(3) DTHの成立する割合と、その強さはPPDの量(すなわち、PPDによる皮膚反応の強さ)と、反比例す

Table 4. Adjuvant Effect of DTH Skin Reaction on Induction of DTH to BSA, BGG or EA in BCG-sensitized Guinea Pigs

DTH to PPD		DTH skin reaction to		
		BSA	BGG	EA
BSA 100 μ g alone	0	0.6 \pm 1.3*(0/5)**	0 (0/5)	3.0 \pm 3.7 (0/5)
BSA 100 μ g + PPD 2 μ g	24.4 \pm 1.5*	8.8 \pm 5.9 (3/5)	0.4 \pm 1.3 (0/5)	1.4 \pm 3.1 (0/5)
BSA 100 μ g + PPD 0.2 μ g	17.6 \pm 1.1	10.0 \pm 3.9 (3/5)	0 (0/5)	3.0 \pm 2.1 (0/5)
BSA 100 μ g + PPD 0.02 μ g	14.2 \pm 1.9	16.6 \pm 4.0 (5/5)	1.4 \pm 3.1 (0/5)	4.4 \pm 3.0 (0/5)
BGG 1 μ g alone	0	0 (0/5)	0.6 \pm 1.3 (0/5)	0 (0/5)
BGG 1 μ g + PPD 2 μ g	20.0 \pm 2.4	0 (0/5)	0 (0/5)	0 (0/5)
BGG 1 μ g + PPD 0.02 μ g	14.4 \pm 1.3	0 (0/5)	7.4 \pm 6.9 (3/5)	0 (0/5)
EA 1 μ g alone	0	0 (0/3)	0 (0/3)	20.7 \pm 2.5(3/3)
EA 1 μ g + PPD 2 μ g	20.3 \pm 0.6	0 (0/3)	0 (0/3)	14.0 \pm 12.2(2/3)
EA 1 μ g + PPD 0.02 μ g	15.3 \pm 0.6	0 (0/3)	0 (0/3)	15.0 \pm 13.0(2/3)
PPD 2 μ g alone	20.2 \pm 1.6	0 (0/5)	1.6 \pm 2.3 (0/5)	1.6 \pm 3.6(0/5)

BCG-sensitized guinea pigs were injected intradermally with BSA, BGG or EA with or without PPD. Two weeks later, the animals were skin-tested with 5 μ g each of BSA, BGG and EA.

* Mean (mm) \pm S.D. after 24 hrs.

** No. of animals with positive skin reaction (larger than 10 mm)/No. of animals tested.

る傾向がみられた。いずれの場合にも、アルサス型反応が全くみられなかつた。

考 察

ここに報告した成績は、充分に BCG 感作が成立しているモルモットに、微量の PPD と共にタンパクを皮内接種すると、それ単独では DTH が成立しない 100 μ g の BSA、あるいは 1 μ g の BGG によつても、強い DTH が誘導されることを示した。アルサス型の反応は、全く認められなかつた。条件はやや異なるが、Bloom も同様な知見を報告している⁸⁾。しかし BGG 感作モルモットでは、BGG に対して十分な DTH が成立しているにもかかわらず、その皮膚反応は BSA の DTH 成立に効果を示さなかつた。

PPD による DTH 皮膚反応の場合には、極めて多彩な現象が起こるが、それを trigger するのは、感作 T リンパ球が PPD により刺激されて放出する、リンフォカインによるものと考えられる。このようなリンフォカインは、種々の生物学的活性を異にする因子を含み、その場に多型核白血球、マクロファージあるいはリンパ球の集積をもたらす、またマクロファージを強く活性化することが知られている。このような反応の場面に集積した種々の免疫担当細胞が、BSA に対する DTH の成立に、重要な役割を演じたことは明らかである。しかし一方、BGG 感作動物における BGG による DTH 皮膚反応、あるいは正常動物における SRF による皮膚反応によつては、BSA に対する DTH に何の効果も認められなかつたことから、DTH 皮膚反応の場が有するアジュバ

ト効果発現のためには、BCG 感作動物でみられるような、Jones-Mote 型でない、いわゆるツベルクリン型の反応が必要であることが考えられる。実際に、ここで示された成績と類似する現象を記載した報告が幾つかある。すなわち、古くは Dienes と Schönheit が結核感染モルモットの病巣内に、卵白アルブミンを注射することにより、それに対する DTH を誘導したこと¹⁰⁾、また Zbar らは strain 2 モルモットの同系肝癌を用いて、腫瘍細胞と BCG の混液の皮内注射により、腫瘍細胞単独では成立しない腫瘍特異的 DTH を誘導したこと¹¹⁾、われわれも数種の近交系モルモットあるいはマウスの化学発癌腫瘍系で、同様の事実を確認したこと⁵⁾⁶⁾¹²⁾、Hawrylko と Mackaness¹³⁾¹⁴⁾ および中村ら²⁾ は、単独では特異免疫が成立しない弱い抗原性のマウス同系腫瘍の系で、あらかじめ足蹠に BCG を接種し 10 日後に同一部位にコバルト照射腫瘍細胞を接種することで、特異免疫が誘導できたこと、などを挙げる事ができる。このような BCG 前処置による免疫増強の機構として、Hawrylko と Mackaness は、BCG 感作生体では特に所属リンパ節で T リンパ球の多クローンの増大があり、それが細胞性免疫反応の成立に有利に働くと説明している。BCG 感作モルモットのツベルクリン皮膚反応の場においても、類似の現象が生じていることが想像される。

次に、BSA と同時に注射された PPD の量が少ないほど、BSA に対する DTH が成立しやすい傾向がみられた。この現象は、BGG を抗原とした場合でも同様であり、被検動物数は少ないが、単独注射でも DTH の成立した EA の場合には、むしろ PPD の存在が阻害的と思

われる成績が得られた(表4)。PPD 2 μ g では、強い皮膚反応が惹起され、全例が中心壊死を示した。また 0.2 μ g でも半数近くに軽度の中心壊死がみられたが、0.02 μ g ではそれが観察されなかつた。このことは強い炎症反応が、pH の変化など抗原タンパクの変性をもたらす原因となつた可能性、あるいはマクロファージの活性化の段階に差があり、活性化が進みすぎると抗原処理の過程が DTH の誘導には不適当な方向にすすむ可能性などが、考えられよう。これらの点については更に検討中である。

以上の事実は、BCG の抗腫瘍効果の3ステップ・モデル¹⁾の正当性を示唆するものであろう。すなわち、BCG 特異的な肉芽腫反応が局所に生じ、その反応の場に腫瘍抗原が共存することにより、腫瘍特異的細胞性免疫の誘導に好都合な状況が現出しているものと考えられよう。ただし、その場における炎症反応の強さと、免疫誘導に有利な条件との間のバランスが、重要なファクターとして考慮されるべきであることを示唆するものといえよう。

結 論

BCG 感作モルモットに、単独注射では感作の成立しない BSA 100 μ g を PPD 2~0.02 μ g と混合して皮内注射すると、BSA に対する強い DTH が誘導できた。誘導された DTH は抗原特異的であり、また即時型反応(アルサス型反応)は認められなかつた。PPD の量が少ない方が、DTH をより良く誘導する傾向がみられた。同じように、正常動物に、PPD 2 μ g と BSA 100 μ g を混合して皮内注射した対照群では、BSA に対する DTH の成立は認められなかつた。一方、BGG 感作モルモットに、BGG 5 μ g と BSA 100 μ g を混合して皮内注射しても、BSA に対する DTH は成立しなかつた。更に、正常動物に、BSA 100 μ g を SRF 原液と混合して皮内注射した場合も、BSA 感作の誘導がみられなかつた。

以上のことは、BCG 感作動物における PPD による DTH 皮膚反応の場が、PPD とは抗原的に無関係なタンパク抗原に対する特異的な DTH の成立に、アジュバント効果を有することを示すものである。

文 献

- 1) Tokunaga, T., Kataoka, T., Nakamura, R. M., Yamamoto, S. and Akagawa, K. S.: in *Cancer Immunotherapy and Its Immunological Basis*, (Yamamura, Y., Kitagawa, M. and Azuma, I. Ed.), Japan Scientific Societies Press, Tokyo, p.59, 1978.
- 2) 中村玲子・山本三郎・徳永徹: 日本癌学会総会記事, 34:70, 1975.
- 3) Kataoka, T., Nakamura, R. M., Yamamoto, S. and Tokunaga, T.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 25: 377, 1972.
- 4) Tokunaga, T., Kataoka, T., Nakamura, R. M., Yamamoto, S. and Tanaka, T.: *Jap. J. Med. Sci. Biol.*, 26:71, 1973.
- 5) Tokunaga, T., Yamamoto, S., Nakamura, R. M. and Kataoka, T.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 53:459, 1974.
- 6) Kataoka, T., Tokunaga, T. and Murohashi, T.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 58:803, 1977.
- 7) 徳永徹: 結核, 52:527, 1977.
- 8) Bloom, B. R.: in *Mediators of Cellular Immunity*, (Lawrence, H. S. Ed.) Academic Press, New York, p.249, 1969.
- 9) 綿貫まつ子・吉田彪・橋本達一郎: 医学と生物学, 79:67, 1969.
- 10) Diens, L. and Schönheit, E. W.: *J. Immunol.*, 14:9, 1927.
- 11) Zbar, B., Bernstein, I. D., Tanaka, T. and Rapp, H. J.: *Science*, 170:1217, 1970.
- 12) Kataoka, T., Kamiyama, T. and Tokunaga, T.: *Gann*, 69:427, 1978.
- 13) Hawrylko, E. and Mackness, G. B.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51:1677, 1973.
- 14) Hawrylko, E. and Machaness, G. B.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 51:1683, 1973.