

今村賞受賞記念講演

モルモットにおける細胞性免疫に
関する基礎的研究

片岡哲朗

国立予防衛生研究所細胞免疫部

受付 昭和 59 年 7 月 5 日

Commemorative Lecture of Receiving Imamura Memorial Prize

BASIC STUDIES ON THE CELL-MEDIATED IMMUNITY OF THE GUINEA PIG

Tetsuro KATAOKA*

(Received for publication July 5, 1984)

Recently, several inbred strains of the guinea pig had been established at the Department of Veterinary Science, National Institute of Health, Japan. Using animals of these new inbred strains and Wright's strain 2 and 13, the author have studied on the cell-mediated immunity of the guinea pig.

In this lecture, the author reviewed briefly the results obtained by a number of their experiments, and they were summarized as follows: (a) it was demonstrated that major histocompatibility complex (MHC) of the new inbred strains were different from each others and/or that of strain 2 and strain 13, by the analysis with mixed leukocytes reactions and alloantisera, (b) PPD-induced proliferative responses of BCG-sensitized T lymphocytes were restricted by the I-region of MHC of antigen presenting cells, (c) cytotoxic T lymphocytes against allogeneic cells or syngeneic tumor cells were not detectable, (d) the adjuvant effect of delayed-type skin reaction to PPD for the induction of DTH to weakly antigenic proteins was shown, (e) BCG-sensitized T lymphocytes with ability to transfer DTH and to produce MIF were dissociated from the T lymphocytes which proliferated *in vitro* by PPD-stimulation, (f) an animal model of suppression of DTH by measles virus infection was established and its mechanism was analysed, (g) the therapeutic potentials of various biological response modifiers including BCG on the guinea pig tumor systems and the mechanism for tumor-rejection were investigated, then it was strongly suggested that major effector may be macrophages activated with T cells of DTH in the guinea pig, (h) levels of NK activity were different among the new inbred strains of guinea pigs and were augmented by BCG-infection.

モルモットは、ヒトに類似した免疫学的特性を有することが知られており、特に結核症の実験モデル動物

として古くから重用されてきた。しかし、モルモットの近交系が確立されたのは比較的最近のことであり、

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

そのため急速な進展を遂げた細胞性免疫学の手法のモルモットへの導入は、著しく遅れることとなった。近年、予研獣疫部において永年の努力が実り、10系統近くの近交系モルモットが作出され、従来の Wright により作られた strain 2 と 13 の二系統に加わることになった。この近交系動物を用いることにより、モルモットの細胞性免疫機構について、特に BCG 感染に対する反応、PPD による遅延型アレルギーを中心に、細胞レベルでの研究が可能となった。以下に、著者の行なった研究の概要を述べる。

1. 各種リンパ球のマーカー：ウサギをモルモット胸腺細胞、脳ホモジネートあるいはBリンパ球白血病L2Cなどで免疫し、抗T、抗B血清、あるいは抗Ia血

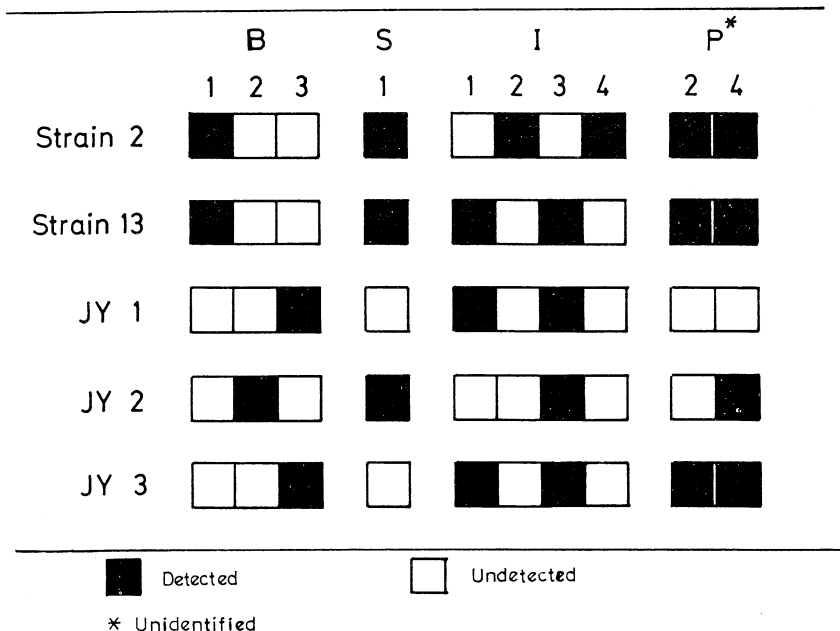
清を調製した。これらと各種レクチン等を用いて、免疫担当細胞の検索を行なった。マウスと異なり、モルモットB細胞はLPSに低応答であり、またマクロファージは、高い割合でIa抗原陽性であった。

2. 混合リンパ球反応による主要組織適合性複合系(MHC)抗原の解析¹⁾：JY-1, JY-3がMHCのI領域においてstrain13と一致すること、その他の系統は互いに異なることが示された(表1)。その後、アロ抗血清による解析と、千葉ら²⁾の成績から、本研究に用いた系統が、strain 2 と 13 とは、B領域あるいはI領域が異なることがわかった(図1)。

3. マクロファージとT細胞の相互作用と組織適合性¹⁾：BCG感作T細胞を、PPDパルスマクロファージとともに培養すると、抗原特異的幼若化反応が起こる。

Table 1. Results of Mixed Lymphocytes Reactions (MLR-Indices)

| | JY 1 | JY 2 | JY 3 | JY 7 | Strain 2 | Strain 13 |
|-----------|------|------|------|------|----------|-----------|
| JY 1 | 1.0 | | | | | |
| JY 2 | 4.2 | 1.0 | | | | |
| JY 3 | 1.3 | 3.6 | 1.0 | | | |
| JY 7 | 1.5 | 5.6 | 2.0 | 1.0 | | |
| Strain 2 | 2.2 | 2.3 | 2.2 | 3.3 | 1.0 | |
| Strain 13 | 1.2 | 4.5 | 0.9 | 1.8 | 3.2 | 1.0 |



(Modified from Chiba et al, Microbiol. & Immunol. 22:1976)

Fig.1. MHC of guinea pig strains used.

その際に、表2に示したように、マクロファージとT細胞間にMHCのI領域の一致が必須であり、B領域の一致は必要でないことを明らかにし、ツベルクリン反応の細胞間相互作用が、Ir遺伝子による制御を受けることを示した。

4. 検出困難なキラーT細胞³⁾: 同種細胞あるいは腫瘍で免疫したモルモットの各種リンパ球について、キラーT細胞活性の検出を試みた。成績の一例を表3に示したが、マウスやヒトで用いられている種々の免疫方法と試験法により、詳細に検討したが、活性は検出されなかった。一方、強い遅延型アレルギーの成立および抗体の産生が認められた。この事実は、モルモッ

トの免疫応答がキラーT細胞でなく、遅延型アレルギーのT細胞に大きく依存していることを示すものであり、マウスと異なる最大の免疫学的特徴であるといえよう。

5. ツベルクリン皮膚反応関与細胞と抗原特異的幼若化細胞の異同⁴⁾: BCG感作モルモットのT細胞集団から、抗原特異幼若化反応を起こさせた細胞画分を、BudR添加、可視光線照射という処理で除いても、ツベルクリン皮膚反応の受身伝達能およびMIF産生能が保持されていた(表4)ことから、幼若化反応と後二者の反応とが異なるT細胞に担われている可能性が示唆された。

Table 2. *In Vitro* Proliferative Responses of T Cells from BCG-Immune Guinea Pigs to PPD-Pulsed PECs

| PEC | PPD | T-cells | | |
|-----------|-----|---------------|--------------|---------------|
| | | JY 1 | JY 2 | JY 3 |
| JY 1 | - | 1,844(cpm) | 2,283(cpm) | 4,284(cpm) |
| | + | <u>23,525</u> | 2,233 | <u>11,081</u> |
| JY 2 | - | 6,292 | 1,335 | 13,982 |
| | + | 7,310 | <u>9,574</u> | 11,374 |
| JY 3 | - | 4,674 | 2,491 | 2,423 |
| | + | <u>11,307</u> | 2,580 | 7,950 |
| Strain 2 | - | 5,916 | NT* | 5,763 |
| | + | 6,329 | | 5,828 |
| Strain 13 | - | 7,052 | NT | 3,957 |
| | + | <u>11,180</u> | | <u>10,620</u> |

* NT; not tested

Table 3. Cytotoxicity Test by Spleen Cells Immunized *In Vivo* and Restimulated *In Vitro* with Allogeneic Cells

| Strains | Effector cells | | Target spleen cells | | |
|---------|-----------------------------|-------------------------------|---------------------|-----------|-------|
| | immunized with (in vivo) | stimulated with (in vitro) | Strain 2 | Strain 13 | JY 1 |
| 2 | — | strain 2 | -8.1* | -1.7 | -8.0 |
| 2 | — | JY 1 | 0.3 | 2.3 | -14.2 |
| 13 | — | strain 2 | 2.7 | -8.0 | -6.4 |
| 13 | — | JY 1 | 0.6 | -10.3 | -11.3 |
| 2 | JY 1 | JY 1 | -5.0 | -13.3 | -8.3 |
| 13 | JY 1 | JY 1 | 1.0 | -13.3 | -8.8 |
| 13 | strain 2 | strain 2 | -6.4 | -14.1 | -11.2 |
| Mouse | | | BALB/c | C57Bl/6 | EL 4 |
| BALB/c | C57Bl/6 | — | 0.4 | 18.7 | 35.2 |
| BALB/c | — | C57Bl/6 | 4.7 | 34.6 | 58.1 |

* Cytotoxicity (%).

6. ツベルクリン皮膚反応の場が有するアジュバント効果⁵⁾: BCG 感作モルモットに、牛血清アルブミンなどの蛋白抗原と PPD を混合して皮内注射すると、単独では遅延型アレルギーが誘導されない抗原に対して、強い感作が成立した(表5)。この事実は、ツベルクリン皮膚反応の場が、遅延型アレルギー成立のために有効なアジュバント的役割を果たしていることを示す。

7. 麻疹ウイルス感染によるツベルクリン皮膚反応の抑制⁶⁾: 麻疹感染小児において、ツベルクリン皮膚反応が陰性になることが知られているが、そのモデル系を作った。モルモットに麻疹ウイルス感染の条件を検討し、結核死菌感作モルモットに経鼻感染させると、皮膚反応が抑制された。腹腔内感染では抑制が弱かった(表6)。感作前の感染は、遅延型アレルギーの成立を抑制した。*in vitro* でのリンパ節細胞の MIF 産生、T細胞の幼若化反応およびリンフォカインによる皮膚反応試験などから、このツベルクリン反応の陰転は、ウイルスのT細胞に対する直接的影響ではなく、その

機能は正常であることが示された。

8. 腫瘍免疫に関して⁷⁻¹⁰⁾: 予研の近交系モルモットに化学発癌させ、継代可能な同系腫瘍系を確立し⁷⁾、米国の Zbar 博士、Shevach 博士より、それぞれ分与を受けた肝癌 line 10 と白血病 L 2 C を加え、BCG をはじめとする Biological Response Modifiers による、腫瘍の免疫療法に関する一連の研究を行なった。前述の腫瘍の一種を用い、3 M KCl 可溶化法で腫瘍特異遅延型皮膚反応抗原の分離精製を行なった⁸⁾。また、line 10 に特異的なマウス・モノクローナル抗体を作製できた⁹⁾。このモノクローナル抗体は IgG 2 a のサブクラスで、補体とともに作用させると line 10 細胞傷害性を示し、オートラジオグラフィにより、*in vivo* 投与後は腫瘍局所に集中することが見出された。

一方、腫瘍特異免疫が成立したモルモットにおいては、常に腫瘍抗原に対する遅延型皮膚反応が示されたが、キラーT細胞は検出されなかった。しかし、免疫脾細胞と line 10 細胞を混合して皮内に注射すると、T

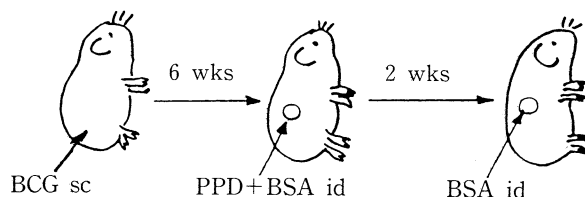
Table 4. Reactivities of Sensitized Lymphocytes Treated by Antigenic Stimulation and BudR Plus Visible Light

| Antigenic stimulation | BudR + light | Transfer of DTH | | MIF production | | Blastogenesis | |
|-----------------------|--------------|---------------------|---------------|----------------|--------------------|---------------|------------------------------|
| | | No. of cells | Skin reaction | PPD | Migration | PPD | Uptake of ³ H-TdR |
| - | + | 3 × 10 ⁶ | 11.0 ± 0 (mm) | - | 38.0 ± 2.1 (units) | - | 555 ± 115 (cpm) |
| | | 1 × 10 ⁶ | 8.5 ± 1.0 | + | 29.0 ± 4.1* | + | 2,853 ± 132** |
| | | 3 × 10 ⁵ | 6.5 ± 0.5 | | | | |
| + | + | 3 × 10 ⁶ | 11.7 ± 1.8 | - | 43.0 ± 4.6 | - | 302 ± 30 |
| | | 1 × 10 ⁶ | 8.7 ± 2.1 | + | 28.5 ± 6.5* | + | 289 ± 22 |
| | | 3 × 10 ⁵ | 5.7 ± 1.2 | | | | |

* p < 0.05, ** p < 0.01

Table 5. 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 μg alone | 0 | 0 (0/8)* |
| BSA 100 μg + PPD 2 μg | 23.5 ± 0.8 | 9.3 ± 7.9 (4/6) |
| BSA 100 μg + PPD 0.2 μg | 20.1 ± 1.1 | 17.9 ± 4.6 (6/6) |



細胞が存在した時のみ、腫瘍の発育を抑えた。また、遅延型アレルギーも受身伝達された(表7)。即ち、モルモットでは、遅延型アレルギーのT細胞を介して活性化されたマクロファージが、主要な腫瘍拒絶エフェクターであることが強く示唆された。腫瘍部位で、マクロファージを活性化させることにより、腫瘍細胞を傷害するという原理を応用して、BCG感作動物に腫瘍接種後、上記モノクロナール抗体とPPDを化学的に結合して投与したところ、有意の延命効果がみられ(表8)、この治療法のモデルとして有用であることが示さ

れた。

9. ナチュラルキラー細胞(NK)¹¹⁾:モルモットのNKについての報告は、殆んどない。標的細胞など検出の諸条件を検討した。その上で、種々の系統のモルモットの脾細胞と末梢リンパ球について、NK活性を比較検討した。脾細胞中のNKの成績を表9に示したが、系統によって差がみられた。また、ウサギ抗モルモット脳抗血清と補体による処理で、NK活性が低下することがわかった(図2)。しかし、抗アシアロGM₁抗体によっては失活せず、マウス、ラットなどのNKと異なる。

Table 6. Effect of Measles Virus Infection on PPD Skin Reaction in Sensitized Guinea Pigs

| Route of inoculation | Days after inoculation | Skin reaction (mean±S. D.) | Reduction(%) |
|----------------------|------------------------|----------------------------|--------------|
| Intranasal | 0 | 16.6±1.1(mm) | |
| | 7 | 9.3±0.9** | 43.9 |
| | 11 | 9.0±1.3** | 47.5 |
| | 33 | 17.0±1.0 | -1.5 |
| Intraperitoneal | 0 | 15.6±1.2 | |
| | 3 | 13.9±2.4 | 10.2 |
| | 7 | 11.3±2.7 | 22.9 |

**p<0.01

Table 7. Winn's Assay of Spleen Cells from Line 10 Immune Guinea Pigs

| Effector cells | DTH reaction | cured/tested | Survival days |
|--------------------------------------|--------------|--------------|---------------|
| PBS | 0 | 0/6 | 45±5* |
| Normal SpC | 3.0±0.8** | 0/3 | 43±4 |
| Immune SpC | 11.8±0.5 | 2/6 | 70±1 |
| Immune SpC(anti-T+C') | 0 | 0/3 | 46±6 |
| Immune SpC(anti-L ₂ C+C') | 14.3±0.5 | 2/3 | 70 |

*mean±S.D.

**mean size±S. D. (mm)

Effector/Line 10 ratio=20 : 1.

Table 8. Effect of Administration of 3C4 Antibody-PPD Conjugates on Line 10 Tumor Growth

| Injected with | Survival days | cured/tested |
|---------------|---------------|--------------|
| PBS | 20.0±0 | 0/3 |
| PPD | 27.0±0 | 0/3 |
| 3C4 | 21.0±1.7 | 0/3 |
| Conjugates | 60.1±3.5 | 1/4 |

Line 10 1×10⁵ip

100 μg conjugates contain 3 μg PPD

Injected ip on day 1, 3, 6

る。

BCG 生菌 1 mg を腹腔内注射後、経時的に脾細胞の NK 活性を調べたところ、7 日目をピークとする上昇がみられ、2 週以降正常値にもどった (図 3)。

以上、簡略に且つ、広範囲にわたり、いささかまとまりを欠くくらいはあるが、マウスを中心に進歩を遂げてきた免疫学的手法の一部が、モルモットの研究にも取り入れることが出来たことを示した。その結果、モルモットの免疫応答がマウスと異なる点も見出され、今後の免疫学の進歩の中で、モルモットによる研究が、一層価値を増すものと考えられる。

終りに、この研究に携わっている間、種々ご指導、ご協力を賜った徳永徹部長をはじめとする細胞免疫部 (前・結核部) の皆様および獣疫部の方々に、衷心より謝意を表します。

文 献

- 1) Kataoka, T. and Tokunaga, T. : Restriction by the major histocompatibility complex of antigen-induced T lymphocyte proliferation in new inbred guinea pig strains, *Microbiol Immunol*, 23 : 197, 1979.
- 2) Chiba, J. et al. : Serological studies on the major histocompatibility complex of new inbred

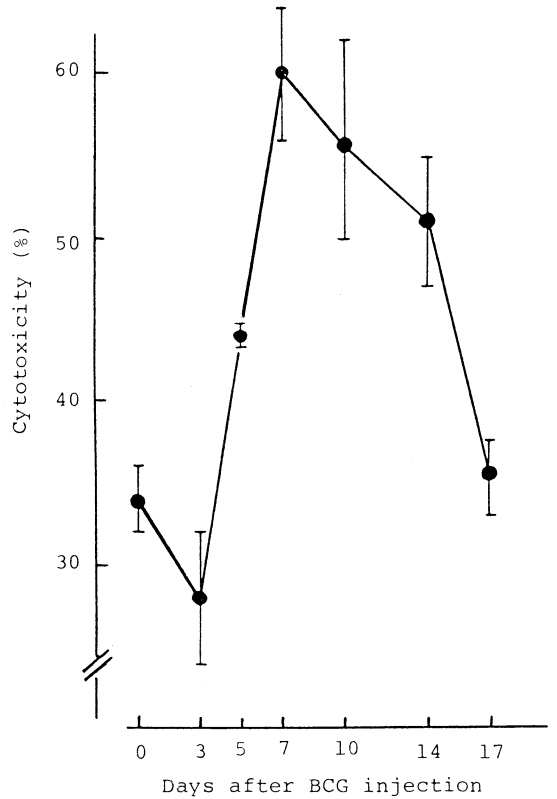


Fig.3. NK activity in spleen cells of BCG-injected guinea pig.

Table 9. Effect of Treatment of Effector with Antisera Plus Complement on Guinea Pig NK Activity

| Treatment | Cytotoxicity(%) | Reduction(%) | t-assay |
|--------------------------------|-----------------|--------------|---------|
| C' alone | 28.3 | | |
| Anti-thymocytes+C' | 26.8 | 5.2 | NS* |
| Anti-brain+C' | 14.6 | 48.3 | p<0.01 |
| Anti-asialoGM ₁ +C' | 30.9 | -9.2 | NS |

*NS=not significant

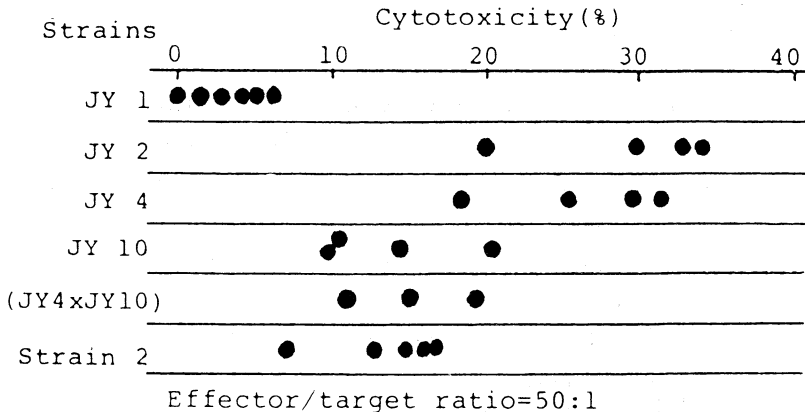


Fig.2. NK activities in spleen cells of several inbred strains of guinea pig.

- strains of the guinea pig, *Microbiol Immunol*, 22 : 545, 1978.
- 3) Kataoka, T. and Tokunaga, T. : Absence of detectable cytotoxic lymphocytes in the spleens of guinea pigs immunized with allogeneic cells, *Microbiol Immunol*, 27 : 619, 1983.
 - 4) 片岡哲朗・徳永徹 : 皮内反応および MIF 産生と幼若化反応に関する感作 T リンパ球の解離, *結核*, 59 : 235, 1984.
 - 5) 片岡哲朗・徳永徹 : 遅延型皮膚反応の場が有するアジュバント効果, *結核*, 54 : 413, 1979.
 - 6) 片岡哲朗他 : 遅延型アレルギー皮膚反応に及ぼす麻疹ウイルス感染の影響, *結核*, 55 : 133, 1980.
 - 7) Kataoka, T. and Tokunaga, T. : Responses of tumors induced in inbred guinea pig strain JY-1 and strain Hartley/F to BCG, *J Natl Cancer Inst*, 58 : 803, 1977.
 - 8) Kataoka, T. et al. : Tumor-specific skin-reactive antigen solubilized from a syngeneic guinea pig liposarcoma by 3 M potassium chloride, *Gann*, 69 : 427, 1978.
 - 9) Kataoka, T. et al. : Mouse monoclonal antibodies against specific antigen(s) of guinea pig hepatocarcinoma line 10, *Proc. of 5th Int. Congress Immunol*, Kyoto, 1983.
 - 10) 片岡哲朗他 : モノクローナル抗体とマクロファージ活性化物質の結合物による癌治療モデル, 第42回日本癌学会総会記録, 1983.
 - 11) Kataoka, T. et al. : Natural killer cell activities of several inbred strains of the guinea pig and their susceptibilities to rabbit antiserum directed to guinea-pig brain tissue, *Jpn J Med Sci Biol*, 35 : 97, 1982.