



Title	BCG-細胞壁のアジュバント作用：特に最小限抗原感作量に対する影響
Author(s)	奥山, 春枝; 大石, 勉; 太田, 明彦; 森川, 和雄
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 39, 32-38
Issue Date	1979-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26522
Type	bulletin (article)
File Information	39_P32-38.pdf



[Instructions for use](#)

BCG・細胞壁のアジュバント作用

—— 特に最少限抗原感作量に対する影響* ——

奥山春枝 大石 勉

太田明彦 森川和雄

(北海道大学免疫科学研究所病理部)

(昭和53年8月15日受付)

抗体産生を高める目的で昔から種々のアジュバント物質(「ア」)が用いられている。その主要な働きの1つは抗体産生増強作用で、産生抗体量を高めると共に、抗原性を発揮しないほど少量の、或いは弱い抗原性を、抗体産生に導く働きがある。更に「ア」は、免疫性状を質的に転換する作用があり、即時型反応を惹起する抗原に「ア」を同時に与えることにより遅延型に変えることができる¹⁾。このような両性状を有効に表わすのは結核菌であることはよく知られているが、その中の有効成分として Ribi ら²⁾により、結核菌細胞壁(CW)が分離されている。その後東ら³⁾により、CWから抗原活性のある蛋白分解酵素で消化した cell wall skeleton (CWS)が精製されている。「ア」活性を示す物質はこの他にも多数使用され報告されているが、田中ら⁴⁾の AD₆と同様に、強い「ア」活性を示す物質として、CWSはその作用機序の解明のために広く用いられているものである一方このような菌体成分以外に、油性物質にも免疫増強作用がみとめられており、古くから一般的に用いられている Freund's complete adjuvant (FCA)は、結核菌を油性物質、すなわち Freund's incomplete adjuvant (FIA)に浮遊させ、「ア」活性を高めたものである⁵⁾。FCAは、抗原液とFIAを等量混合して乳剤としたもの、すなわち大量の油を使用した water-in-oil (w/o)の形をしており、oil-in-water (o/w)の形は効果がないと Freund はのべている⁶⁾。CWはw/oの形でも用いられるが、少量の油滴に附着させたあと大量の生食水に浮遊させたo/wの形でも用いられ、抗感染、抗腫瘍、抗体産生等の「ア」活性を持つことが報告されている^{7,8,9)}。このo/w形は静注でき、しかも接種局所の傷害性が少ない¹⁰⁾という利点をもっている。

この報告は、「ア」物質であるBCG-CWSを、w/oとo/w形に作製し、モルモットの牛血清 γ -グロブリン(BGG)感作に対する「ア」活性の程度を、BGG抗原の

最少感作量をどの程度引き下げうるかという観点から研究し、遅延型過敏性誘導にはCWS自身の「ア」活性が強く働き、沈降抗体産生促進には、更に油の量も大きく影響することをみた。

実験材料及び実験方法

1) 動物: 市販(静岡動物実験研究所)のHartley系モルモット、350乃至400gの雌を使用した。

2) 抗原は牛血清 γ -グロブリン(BGG)(ICN Pharmaceuticals Inc.)を用いた。

アジュバントとして、BCG-CWS(大阪大学第三内科、東博士より提供された)Lot No. 182を用いた。

3) 抗原液の作り方

o/w emulsion: 各必要量のBGG及びCWSを、テフロンホモジナイザーに入れ、CWS 1mgに対しDrakeol 1滴(約0.06 ml)の割合で加えてよく混和し、そのあと適量の0.2% Tween 80-saline oilを加えて再びよく混和して乳剤とした。oil滴の表面にCWSが吸着して、小滴となって浮遊した形で存在することを顕微鏡下でたしかめてから接種液として用いた。

w/o emulsion: BGGは磷酸緩衝液加生食水(PBS)にとかし、一方CWSはDrakeol:Arlacel 9:1のFIAとあらかじめ混合しておき、この両者を等量混合して乳剤とした。

これらのo/w又はw/o乳剤は、接種量0.1 mlの中に希望する最終濃度に抗原及びCWSが入るようにそれぞれ作製した。

4) 接種方法: 上記のo/w又はw/o乳剤の0.1 mlを、右後肢足蹠に注射した。CWSを150 μ gに一定し、BGGを0.015 μ gから150 μ gまでの段階的の各量を与えた群(実験群)、BGG 15 μ gにCWSを150、100及び50 μ gと変えた群(CWS実験群)及び対照としてBGG 15及び150 μ gをCWSを加えずにo/w又はw/o乳

* 本研究には文部省科学研究費特定研究(No. 211318, 昭和52年)、及び日米医学協力結核専門部会研究費の補助を受けた。

劑とした群 (対照群) を作った。各変量につき、3 乃至 6 匹のモルモットを使用した。

5) 検索方法: 感作後 3, 6, 10, 19, 28 及び 42 日後に次の検索をした。

① 皮内反応: BGG 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PBS 溶液 0.1 ml (1 μg) を背部剃毛部皮内に注射し、6, 24 及び 48 時間後に発赤を示す範囲の直径を測定し、硬結の程度はつまあげた時の反応部皮膚の厚さから正常部皮膚の厚さをひいた値で判定した。皮内反応陽性の限界は、発赤直径 10 mm とした。

② 血清抗体価: 皮内反応を行なう前に採血をして血清を分離し、その一部で、タンニン酸処理羊赤血球 SRBC に BGG を附着させた抗原による感作赤血球凝集反応のマイクロタイター法により凝集素価を測定した。また残りでは、BGG 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 液を使用して、血清倍数稀釈後に沈降反応重層法で沈降素価を測定した。

③ 接種足蹠の反応: 接種側である右足蹠の厚さから、非接種側である左足蹠の厚さを差引いた値を、足蹠の腫脹として記載した。

成 績

1) 最少感作抗原量に対する CWS の効果

① 皮内反応過敏性誘導

BGG を CWS を加えずに o/w 又は w/o 形として接種すると、図-1 に示すように、150 μg では明らかな陽性反応を示すが、15 μg では w/o 群の 10 日目にのみ 10 mm にやっと達する反応で、その他は両群共陽性限界に達しなかった。

CWS 150 μg を抗原液に加えると、o/w 群では 1.5 μg で明らかな陽性反応が、0.15 μg では 10 mm を越えない値しかえられなかった (図-2)。一方 w/o 群は、0.15 及び 0.015 μg で 10 mm 前後の反応の持続がみられるが、1.5

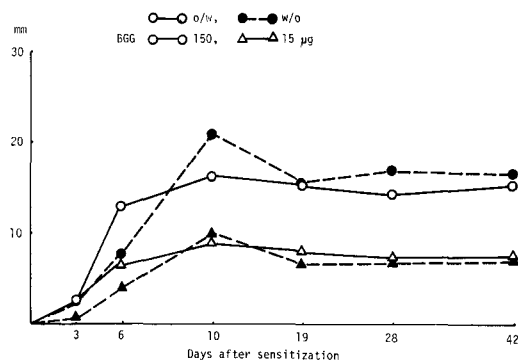


図-1 BCG-o/w, w/o 形感作モルモットの皮内反応 (発赤, 24 時間値)

μg 以上の陽性反応との間に明らかな差がみとめられた。

② 血清抗体産生

対照群では、凝集素の産生は 15 μg 抗原量でも上昇がみられた。しかし沈降素の産生は、w/o 群に 42 日目、8 倍稀釈陽性の軽度の上昇がみられたが、o/w 群は 2 倍以下の値しかえられなかった (図-3)。

抗原液に CWS を加えた時は、凝集素の産生は全例にやや上昇がみられる程度で CWS の著明な影響はみられなかった (図-4)。一方沈降素の産生は、w/o 群では 0.015 μg の少量抗原量でも対照群の 15 μg と同程度の抗体上昇がみられた。しかし、1.5 μg と 0.15 μg の間に約 4 倍の開きがみとめられた。o/w 群では、15 μg 以上に産生増強がみられたが、その程度は w/o 群より弱く、0.15 μg ではほとんど陰性であった。

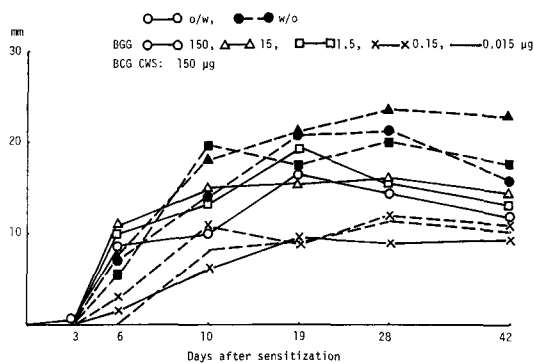


図-2 BGG, BGG CWS-o/w, w/o 形感作モルモットの皮内反応 (発赤, 24 時間値)

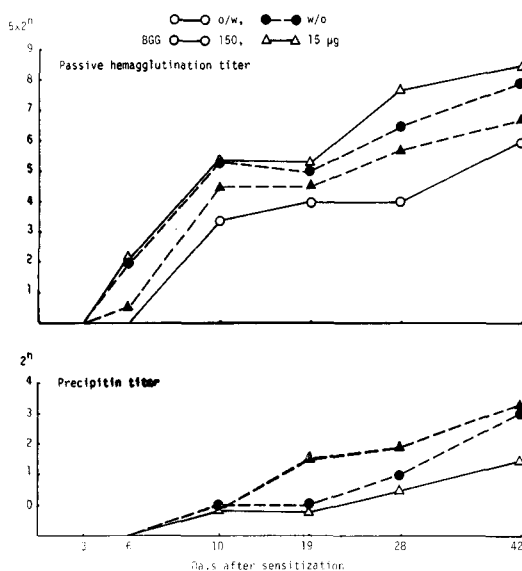


図-3 BGG-o/w, w/o 形感作モルモットの血清抗体価

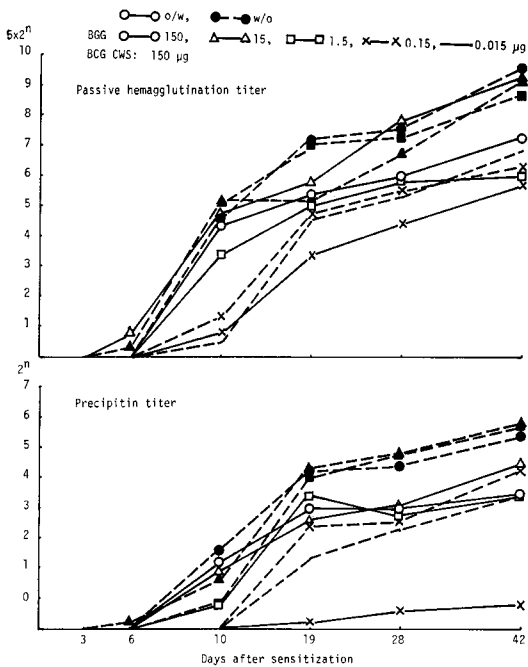


図-4 BGG, BCG CWS-o/w, w/o 形感作
モルモットの血清抗体価

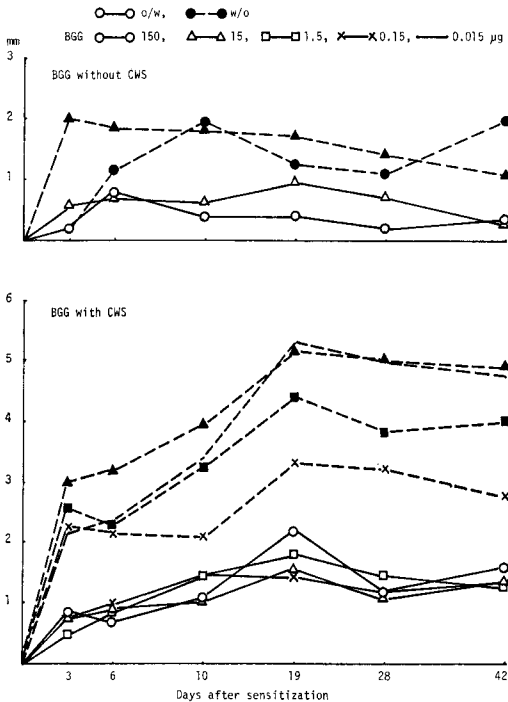


図-5 BGG, BCG CWS-o/w, w/o 形及び
BGG-o/w, w/o 形接種足蹠の腫脹

③ 接種局所の反応

BGG を o/w 形として接種した時は、その接種局所である足蹠の厚さには著明な増加はなく、1 mm 以下であった(図-5)。又 FIA を混じた w/o 形では、これよりやや厚く腫脹し、その後その厚さを接続した。しかし 2 mm を越えることはなかった。

CWS 150 µg を加えた実験群の o/w 形では、対照群より軽度の増加を示し、19 日目をピークとして 1.5 乃至 2 mm 前後の増加を示した。一方 w/o 群は、初期より非常に強い腫脹及び発赤がみられ、19 日まで漸増し、そのあと 42 日目までその厚さを持続した。又、少数例ながら皮膚表面に潰瘍を作ったものがあった。抗原量の違いでは、o/w 形では 150 µg から 0.15 µg まで同程度に軽い腫脹を示したが、w/o 形では、BGG 抗原量に比例して厚さの増加に差がみられた。ただ最低抗原量の 0.015 µg

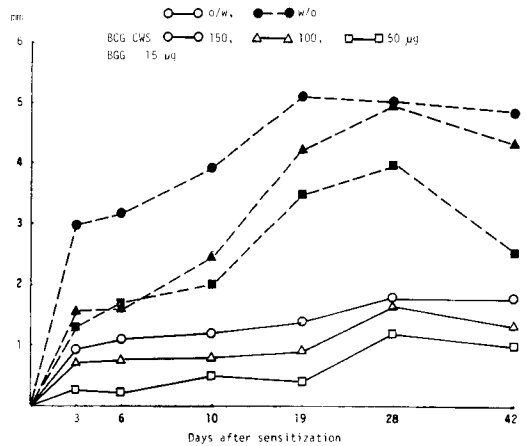


図-6 BGG, BCG CWS 50 乃至 150 µg-o/w,
w/o 形接種足蹠の腫脹

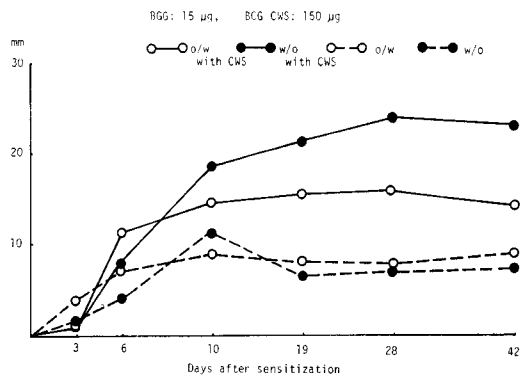


図-7 BGG, BCG CWS-o/w, w/o 形及び
BGG-o/w, w/o 形感作モルモットの
皮内反応(発赤, 24時間値)

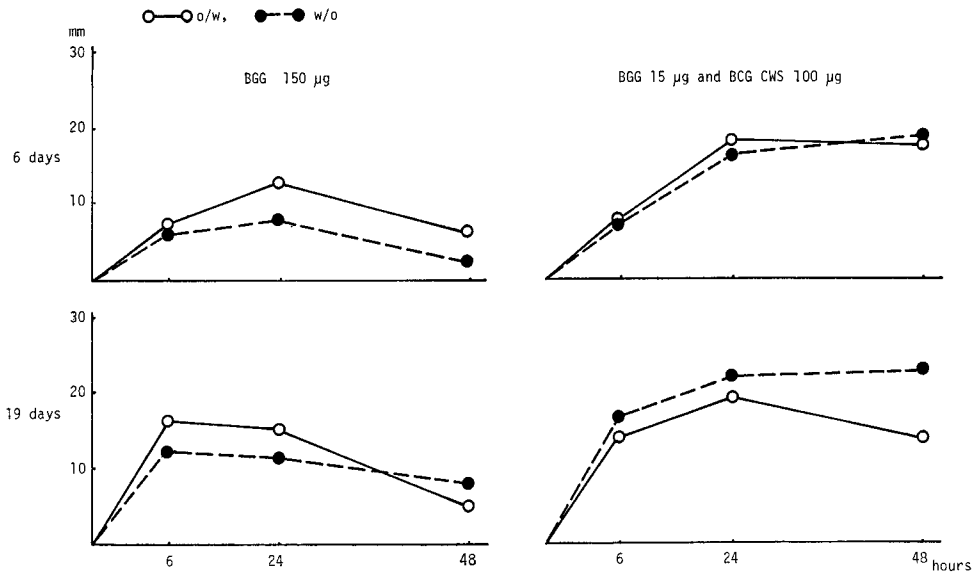


図-8 BGG-o/w, w/o 形及び BGG, BCG CWS-o/w, w/o 形感作モルモットの6及び19日後の皮内反応の時間的経過(発赤)

接種例が、15 µg 接種群と匹敵する値がえられた。

2) BCG-CWS 量の影響

CWS の量を 150, 100 及び 50 µg と変えて「ア」効果を比較した。BGG 抗原量は 15 µg の一定量を用いた。

皮膚過敏性誘導促進効果及び血清抗体産生促進効果、何れにも、この3変量の間には差がみられなかった。ただ接種局所の厚さの増加は、CWS の量と平行していた(図-6)。

3) 「ア」形の違いによる効果の比較

BGG 抗原 15 µg, CWS 100 µg を用いて、o/w 及び w/o 両「ア」形による促進効果を比較した。

① 皮内反応

BGG 15 µg を CWS を加えずに o/w 又は w/o 形として注射した対照群では、w/o 群の10日目の10 mm の反応を除き、終始陽性反応には達しなかった(図-7)。又 o/w, w/o 両形間にも差はみられなかった。「ア」として CWS を加えると、o/w 形では6日以後に10 mm 以上の反応が出現し、42日後まで15 mm 前後の反応が持続した。w/o 形では、10日以後から陽性反応となり、20 mm を越す反応が42日後まで持続した。両群の比較では、10日以後は常に w/o 群の方が発赤、硬結共に著明に強い反応を示した。

次に反応の時間的経過を感作後6日目と19日目について比較した(図-8)。対照群では陽性反応を誘導する最低量である BGG 150 µg 感作例では、6日目の反応は24時間をピークとする遅延型に近い反応が o/w 群にのみ

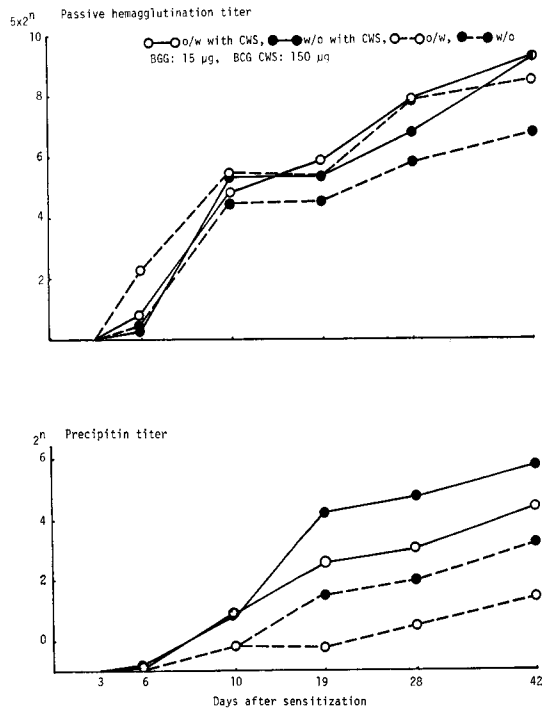


図-9 BGG, BCG CWS-o/w, w/o 形及び BGG-o/w, w/o 形感作モルモットの血清抗体価

弱いながらみられ、19日目は6時間ピークの即時型の反応に変わった。一方 CWS を加えた実験群では、6日目は o/w, w/o 両群共に24時間から48時間をピークとする

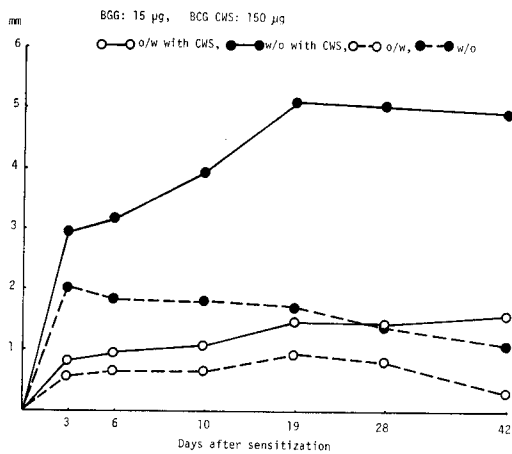


図-10 BGG, BCG CWS-o/w, w/o 形及び BGG-o/w, w/o 形接種足趾の腫脹

遅延型反応を示した。19日目は、24時間あるいは48時間をピークとする遅延型反応に、6時間の即時型反応を合併した経過がみられた。

② 血清抗体価

凝集素の産生については、CWSを加えた効果、あるいは「ア」形間の差は明確ではなかった(図-9)。一方沈降素産生は、19日以後に各形間の差が明らかであった。すなわち、CWSを加えることによって、抗体価は約8倍の上昇を示し、又 w/o 群は o/w 群の約4倍の増強を示した。

③ 接種局所の反応

接種部の足趾の厚さは、w/o 群は o/w 群より厚さの増加が強く、特に CWS を加えることにより w/o 群に著しい増加がみられた(図-10)。その強い反応は42日まで持続した。又 o/w 群も CWS 添加は弱いながら反応の持続をもたらした。一方対照群では、後期には両群共に腫脹の減退を示した。

考 案

免疫応答を高める補助作用をするものを「ア」と総称されるが、今迄そのような活性をもつ種々の物質が多数報告されている。更に抗原物質をどのような形で接種するかによっても、免疫応答の強さが大きく左右される¹⁰⁾。昔から用いられている FCA は、菌成分の中に強い「ア」活性をもつものが含まれる結核菌と共に、FIA といわれる局所の貯蔵効果により「ア」活性を示す鉱油物を w/o 形の乳剤としたものである。この FCA は、液性抗体産生を高め、同時に即時型過敏性を誘導する蛋白抗原感作において、遅延型過敏性に転換する活性の強い

効果的な「ア」物質であることはよく知られていて、実験的に高い力価の抗体を得るために最もよく用いられているものである。しかし、接種局所にはげしい傷害を来すことから¹¹⁾、臨床への応用は不相当と思われる。Ribi¹¹⁾らは、結核菌の中の「ア」活性物質である CW を分離し、水不溶性であるこの物質を、少量の油滴に附着させた形で用いると、静注出来ると同時に、強い「ア」活性も発揮出来ることを報告している。このような o/w の形は、遅延型過敏性を誘導する効果は w/o と同程度に強いが¹²⁾、液性抗体産生に対する促進効果は弱く¹³⁾、又皮内、皮下又は筋肉内に接種した時の局所の傷害性も弱く¹¹⁾、臨床的に応用するためには有利な形といえる。我々は「ア」活性をもつ BCG-CWS 自身、及び w/o と o/w 形が最少抗原感作量にどのように影響するかという観点から検索した。

「ア」活性の1つとして、最少感作抗原量を低くすることがあげられる。どの程度少なくできるかという定量的実験は殆んどないが、Cone ら¹⁴⁾が、poly A:U を「ア」として、SRBC に対する免疫応答を誘導するのに、最少感作量を 1/100 にすることが出来ると報告している。我々の成績では、皮膚過敏性誘導のためには、彼らと同様に CWS は 1/100 の抗原量で有効な皮膚過敏性を誘導する程度の促進効果がみられた。更に o/w と w/o 形何れにおいても 1.5 μ g がその最少感作量となり、両形間の効果に差はみられなかった。

一方血清抗体に対する影響は、沈降素産生にのみ差がみられた。すなわち、CWS の w/o 形では 0.015 μ g BGG 量でも低いながら抗体産生がおこったが、o/w 形では 1.5 μ g 以上でないと明らかな抗体産生を来さず、両者に 100 倍以上の最少感作量の差がみとめられた。この事から、皮膚過敏性誘導に対する促進効果は、CWS 自身の「ア」活性による所が大きく、一方血清抗体産生に関しては、CWS 自身の「ア」活性は勿論であるが、w/o という大量の oil の存在が更に効果を高めているといえる。ウサギを用いて、SRBC 及び CWS を足趾に注射した時の局所リンパ節内の plaque-forming cell (PFC) 産生をみた著者らの実験でも、19s 抗体産生 PFC の数は、w/o と o/w 両形間に大差はないが、7s 抗体産生 PFC の値は w/o 形に著明に高い値がえられている¹⁵⁾。このように、7s 抗体産生に特に強い促進効果を示すのは、FIA による接種局所の depot 形成が大きく働いていると思われる。BGG を CWS と共に w/o 形として足趾に注射した時の BGG を蛍光抗体法で染めてみると、抗原は足趾に大きな oil depot を作って長期間多量にみとめられ、その部では形質細胞による抗体産生もみとめられる

ことを我々はすでに報告している¹⁶⁾。古くは Talmage¹⁷⁾も、放射性同位元素を標識した BGG や卵白アルブミンを用いて、w/o 形で接種した足蹠からの抗原の吸収が非常におくれることを報告している。このような貯蔵所からの持続的な抗原の流出及びそれによる抗体産生記憶細胞の持続的の刺激が、7s 抗体産生には boost のくり返しと同じ意味で有効なのであろう。この depot 効果は、FIA に CWS が入ることにより、局所での高度の肉芽腫形成を来すことにより更に強調されている。接種局所の反応が CWS により高められていることは、CWS 量が多い程腫脹が強いことで裏付けられる (図-6)。

w/o 形に強く表われる depot 効果は、沈降素産生に対するほど効果的には皮膚過敏性誘導には影響しない。何故なら、CWS を入れない w/o と o/w 形の BGG 感作時の両者の最少感作量はどれも 150 μ g であり、更に CWS を入れても 1.5 μ g が両形の限界であった。すなわち、皮膚過敏性誘導に働いた最少感作量減少の為の因子としては、CWS 自身の「ア」活性が大きく作用しているといえる。また反応型を即時型から遅延型へ転換させる活性も CWS 自身に帰せられる (図-8)。

「ア」活性表現の為には、前述の oil の混合による depot 効果の他に、局所リンパ節への流入細胞数の増加¹⁸⁻²²⁾、T-細胞²³⁻²⁵⁾ 或いは抗体産生前駆細胞²⁶⁻²⁸⁾ への直接的刺激作用、網内系²⁹⁾ 乃至は大食細胞³⁰⁾ への作用、更には大食細胞と T-細胞間の相互作用を高める^{31,32)} など、多彩な作用機作が報告されている。これらの種々な過程は、「ア」の種類、形態により何れかが強く表われたりするが、一般的にはいくつかの作用機作が同時に働いていると考えられる。CW に関しては、T-細胞を刺激して可溶性物質を遊離し、B-細胞を間接的に刺激するという報告があるが^{33,34)}、B-細胞を直接刺激するという報告はない。更に結核菌の water-soluble adjuvant 或いは結核菌の lipid の生食水乳剤は、網内系、或いは大食細胞を刺激するといわれる^{35,36)}。活性の高まった大食細胞による抗原物質のより高度の分解が、遅延型過敏性誘導に効果的に働らくと Pearson ら³⁷⁾ がのべているが、CWS 及び抗原が oil 滴に附着した形で与えることが、大食細胞への貪食を高め、更にこれらの細胞の活性をより高めるであろう。Singh and Leskowitz³⁸⁾ が BSA を炭素数 12 個の脂肪酸に化学的に結合させた抗原で免疫すると、遅延型過敏性のみを誘導し、抗体産生がおこらないことをみているが、o/w の oil 滴上の CWS と BGG の密な関連の存在による大食細胞の刺激性が、これと共通した働らきをもつと思われる。これらのことが、CWS 自身の T-細胞刺激作用と共に相乗的

に働いて、遅延型過敏性を誘導すると思われ、又 CWS の o/w 及び w/o 形何れにおいてもこの機序は同様に働いていると考えられる。

結 論

モルモットを、BGG 及び BCG-CWS 「ア」と共に、o/w 或いは w/o 形で感作し、CWS 自身及び両「ア」形の最少感作抗原量に及ぼす影響をしらべた。

皮膚過敏性誘導に対しては、CWS は最少感作量を約 1/100 に減少させた。更に即時型より遅延型への転換効果も強くみとめられた。しかし、o/w 及び w/o 形間には差がなかった。血清抗体のうち沈降素産生には、CWS 自身の促進効果の他に、w/o 形が o/w 形より著明に高い促進効果を示した。

接種局所の腫脹は、w/o 形が o/w 形より強く、更に CWS はその強さを更に高めた。

以上から、沈降素産生には「ア」に用いた油性物質による depot 効果が大きく作用し、皮膚過敏性誘導には BCG-CWS に含まれる「ア」活性物質の T-細胞及び大食細胞への直接的作用が重要であると推論した。

文 献

- 1) 安平公夫：臨床免疫，6，153，昭49。
- 2) Ribi, E., Larson, C. L., List, R. and Wicht, W.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 29, 263, 1958.
- 3) Azuma, I., Ribi, E. E., Meyer, T. J. and Zbar, B.: J. Nat. Cancer Inst., 52, 95, 1974.
- 4) Tanaka, A. and Kitagawa, M.: Biochem. Biophys. Acta: 98, 182, 1965.
- 5) Freund, J. and McDermott, K.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49, 548, 1942.
- 6) Freund, J., Thomson, K. J., Hough, H. B., Sommer, H. E. and Pisani, T. M.: J. Immunol., 60, 383, 1948.
- 7) Barclay, E. R., Anacker, R., Brehmer, W. and Ribi, E.: J. Bacteriol., 94, 1736, 1967.
- 8) Azuma, I., Kishimoto, S., Yamamura, Y. and Petit, J. E.: Jap. J. Microbiol., 15, 193, 1971.
- 9) Yamamura, Y., Azuma, I., Taniyama, T., Ribi, E. and Zbar, B.: GANN, 65, 179, 1974.
- 10) Munotz, J.: Adv. Immunol., 4, 397, 1964.
- 11) Okuyama, H. and Morikawa, K.: GANN monograph on Cancer Res., 21, 1978, in press.
- 12) Azuma, I., Kanetsuna, F., Taniyama, T., Yamamura, Y., Hori, M. and Tanaka, Y.: Biken J., 18, 1, 1975.
- 13) 東市郎, 谷山忠義, 杉村和久, 山村雄一: 日免疫記録, 4, 204, 1974.

- 14) Cone, R. E. and Marchalonis, J. J.: *Aust. J. Exp. Biol. Med. Soc.*, **50**, 69, 1972.
- 15) Okuyama, H., Onoe, K., Takeda, J. and Morikawa, K.: *Rec. Adv. RES Res.*, **16**, 67, 1976.
- 16) Okuyama, H., Takeda, J., Onoe, K. and Morikawa, K.: *Bull. Inst. Immun. Sci., Hokkaido Univ.*, **38**, 13, 1978.
- 17) Talmage, D. W. and Dixon, F. J.: *J. Inf. Dis.*, **93**, 176, 1953.
- 18) Dresser, D. W., Taub, R. N. and Krantz, A. R.: *Immunol.*, **18**, 663, 1970.
- 19) Taub, R. N. and Gershon, R. K.: *J. Immunol.*, **108**, 377, 1972.
- 20) Frost, P. and Lance, E. M.: *Imm. Potent., Ciba Found. Symp.*, **18**, 29, Assoc. Sci. Pub., New York, 1973.
- 21) Athanassiades, T. J.: *Inf. & Immun.*, **18**, 416, 1977.
- 22) Gery, I., Navok, T. and Stupp, Y.: *Immunol.*, **33**, 727, 1977.
- 23) Maillard, J. and Bloom, B. R.: *J. Exp. Med.*, **136**, 185, 1972.
- 24) Hamaoka, T. and Katz, D. H.: *J. Immunol.*, **111**, 1554, 1973.
- 25) Reinich, C. L., Gleiner, N. A. and Schlossman, S. F.: *Immunol.*, **116**, 710, 1976.
- 26) 田中 渥: *結核*, **47**, 279, 1972.
- 27) Andersson, J., Sjöberg, O. and Möller, G.: *Eur. J. Immunol.* **2**, 349, 1972.
- 28) Sjöberg, O., Andersson, J. and Möller, G.: *Eur. J. Immunol.*, **2**, 326, 1972.
- 29) Rupp, J. C., Moore, R. D. and Schoenberg, M. D.: *AMA Arch. Path.*, **70**, 43, 1960.
- 30) Mitchell, M. S., Kirkpatrick, D., Moky, M. B. and Gery, I.: *Nature, New Biol.*, **243**, 216, 1973.
- 31) Allison, A. C. and Davies, A. J. S.: *Nature*, **233**, 330, 1971.
- 32) Guercio, P. D.: *Nature, New Biol.*, **238**, 213, 1972.
- 33) 渡辺 武, 谷山忠義, 東 市郎, 山村雄一: *日免会記録*, **3**, 273, 1973.
- 34) Taniyama, T., Watanabe, T., Azuma, I. and Yamamura, Y.: *Jap. J. Microbiol.*, **18**, 415, 1974.
- 35) Pound, A. W. and O'Rourke, G. E.: *J. Med. Microbiol.*, **4**, 495, 1971.
- 36) Modolell, M., Luckenbach, G. A., Parant, M. and Munder, P. G.: *J. Immunol.*, **113**, 395, 1974.
- 37) Pearson, M. N. and Raffel, S.: *J. Exp. Med.*, **133**, 494, 1971.
- 38) Singh, S. B. and Leskowitz, S.: *Cell. Immunol.*, **37**, 96, 1978.

Adjuvant Activity of BCG-Cell Wall Skeleton

— Effect on minimal sensitizing dose of Antigen —

Harue OKUYAMA, Tsutomu OH'ISHI, Akihiko OH'TA
and Kazuo MORIKAWA

Guinea pigs were sensitized with bovine γ -globulin (BGG) and BCG-cell wall skeleton (CWS) in oil-in-water (o/w) or water-in-oil (w/o) form and then the effect of adjuvant on the minimal sensitizing dose of BGG antigen was examined.

By the addition of the CWS the minimal sensitizing dose was reduced to about one hundredth for induction of skin reactivity and in the same time the skin reaction was converted to delayed type. These effects on the skin reactivity were of the same degree in both types of o/w and w/o. On the other hand, the precipitin production was strongly enhanced with CWS only in the form of w/o. Swelling of the inoculated footpads was more intensive in the w/o groups than in the o/w groups, and the use of CWS accelerated the reaction.

From these results, it was concluded that the precipitin production is enhanced in great part by deposition of the antigen together with oily substances, while for the induction of the delayed skin hypersensitivity the direct action to T-cells and macrophages of the active substances in BCG-CWS is important.