HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	近交系モルモットJY1とstrain 13におけるBCG Cell Wallに対する免疫応答
Author(s)	山本, 健一; 奥山, 春枝
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 38, 38-45
Issue Date	1978-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26507
Type	departmental bulletin paper
File Information	38_P38-45.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

近交系モルモット JY 1 と strain 13 における BCG Cell Wall に対する免疫応答

山本健一
(北海道大学免疫科学研究所細菌感染部)
奥山春枝
(北海道大学免疫科学研究所病理部)

(昭和52年11月19日受付)

病原微生物をはじめ各種抗原に対し感受性を異にする近交系動物の育成が行われて来てから既に久しい。ことにマウスの近交系の確立は主要組織適応抗原を支配する遺伝子座と特異抗原に対する免疫反応を支配する遺伝子座との密接な関連を明らかにした[1]。ところで，モルモットでは1921年 Wright と Lewis が結核感染に対し感受性を異にする2つの系統のあることを報告した[2]。この2つの近交系は strain 2 と strain 13 であり，その後，これら近交系モルモットの種々な抗原に対する免疫反応の差異が検討されて来た。特に，Benacerraf ら[3]によって合成 polypeptide 抗原に対する細胞性免疫および抗体産生反応の特異免疫反応遺伝支配に大きな差異のあることが見出されている。一方，Freund の complete adjuvant に加えられた加熱結核死菌によるツベルクリン遅延型過敏症感作にみられる免疫応答を strain 2 と strain 13 で比較した Stone[4] の報告では余り顕著な差はみられない。また，Chase[5] によれば結核菌による granuloma 散布の状態からすると，strain 13 の方が strain 2 より感受性が高いと云われている。このように両近交系モルモットの結核感受性は必ずしも明確ではない。

さて，国立予防衛生研究所で結核菌に感受性の高いといわれるモルモットの近交系 JY 1 が開発され，これを本研究所実験動物施設で繁殖維持して来た。ところで，マウスでは少量の鉱物油に associate させた BCG Cell Wall (CW) を静注することによって肺に granuloma を容易に形成させることが出来る[6] のに反して，Hartley 系あるいは strain 2 のモルモットでは，マウスにみられる程 granuloma 形成が顕著にはみられない (W. Brehmer, 山本健一，未発表)。そこで，本報では，近交系モルモットの結核感受性を検討するために，この JY 1 と strain 13 の2つの strain を用いて，BCG CW による肺 granuloma 形成，ツベルクリン遅延型反応および液性抗体などをしらべた。

実験材料と方法

1) 動物：モルモット strain 13 は昭和45年，JY 1 は昭和48年にそれぞれ国立予防衛生研究所より分与を受け，我々の研究所の実験動物施設で繁殖維持して来たものである。主として雄の体重500乃至700 g のものを用いた。

2) BCG Cell Wall：米国 NIH, Rocky Mountain Laboratory の Dr. Ribi より分与を受けた。これを Ribi ら[7] の方法によって鉱物油 Drackeol の小滴に associate し，0.2% Tween 80 生食水に浮遊させ，0.4 mℓ に 600 μg 含ませて静脈内あるいは腹部皮下に接種した。

3) ツベルクリン反応：BCG CW 接種後3，6および9週に静脈および皮下群共にそれぞれ1群3匹ずつのモルモットの胸部に PPD (Robert-Koch 研究所の Dr. Brehmer より分与を受けた) 5 μg を皮内注射，24時間後に反応を観察，発赤は縦と横の長さの平均値で，硬結はその程度によって−，±，＋，＋＋として記載した。

4) 血清抗体価：ツベルクリン反応を行う直前に心採血を行い血清を得た。被検血清を56°C 30分加熱非働化後，藤田[8] の記載に従って抗体価を受身赤血球凝集反応によって測定した。

抗結核多糖体抗体：抗原は結核菌 H 37 Rv 加熱脱脂菌体より10% Urea 抽出の多糖体を用い，middlebrook-Dubos 反応によって検出した。

抗結核蛋白抗体：抗原は結核菌青山Bのソートン・ツベルクリン蛋白を90% phenol で精製したものを用い，Boyden 反応で測定した。

5) Macrophage Migration Inhibition (M 1) 活性：皮下，静脈群について，それぞれ腹腔滲出細胞と肺胞細胞の M 1 活性をしらべた。測定は既報[9] の方法に準じて行った。腹腔滲出細胞を集めるためには，ツ反応判定直後に10% Sodium caseinate 生食水を 20 mℓ 腹腔内に注入，3日後に 30 mℓ のヘパリン加 Hanks 液で腹腔内

を洗滌した。また,肺胞細胞については Myrvick[10] の方法によって,ヘパリン加 Hanks 液を気管より肺胞内に注入,洗滌により集めた。M1活性の測定は毛細管に被検細胞をつめ, Sykes-Moore 型 chamber を用い, 30 μg/mℓ PPD 存在下, 37°C, 5% CO_2 incubator 内での遊走の程度を観察することにより行った。その程度は M1 inhibition index として示した。なお,本実験条件下では, Bergstrand ら[11] によれば, その値 70% 以下の場合, 有意な阻止が起ったと考えるのが妥当と思われる。

6) 肺重量 index: 肺 granuloma 形成の指標として肺重量を用い[12], 全肺重量を体重で割り, 100 倍した数値を肺重量 index として示した。

7) 病理組織学的検索: 各群の肺および脾の組織標本を作製, ヘマトキシリン・エオジン染色, また, 必要に応じて鍍銀染色を行って病変を観察した。

実験結果

1) BCG CW による Delayed Hypersensitivity の発現

i) ツベルクリン皮膚反応: 静脈および皮下群の PPD による皮内反応の結果をそれぞれ Fig. 1 と 2 の下段のヒストグラムで示した。両群とも, いずれの観察期日においても JY 1 が strain 13 に比して明らかに強い発赤を呈し, また硬結の程度も発赤に平行した。特に静脈群の3週目では JY 1 が強い反応を示したのに反して strain 13 では反応はほとんど陰性にとどまった。また, 静注群では6週がピークであったのに対し, 皮下群では9週に至っても低下の傾向をみせなかった。

ii) M1 活性: 静注群の肺胞細胞および皮下群の腹腔細胞の M1 活性の結果をそれぞれ Fig. 1 と 2 の上段に示した。肺胞細胞では3週で JY 1, strain 13 共に差のない強い活性を示したが, 6週以降, 両 strain 共に低下を示した。一方, 腹腔細胞のそれは JY 1 が明らかに strain 13 より強い活性を呈した。また, 両 strain 共に9週でもなお活性を認め, PPD 皮膚反応の陽性と平行した。

2) 血中抗体

i) 抗多糖体抗体: 静脈および皮下群の Middle-brook-Dubos 反応の結果をそれぞれ Fig. 3 と 4 の上段に示した。JY 1 の静脈群は3週目で血清稀釈 40 倍程度の陽性であった他は両群共いずれの時期においても極めて低い値あるいは陰性に終った。

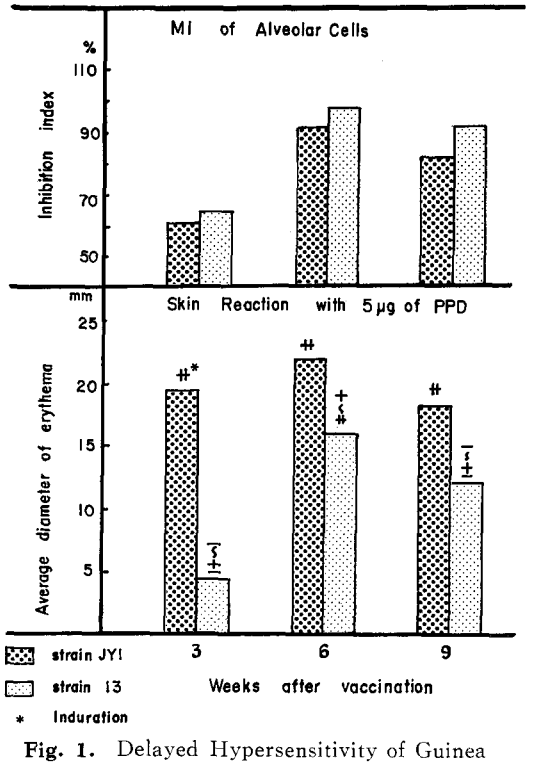

Fig. 1. Delayed Hypersensitivity of Guinea Pigs Vaccinated Intravenously with 600 μg of Oil-treated BCG CW

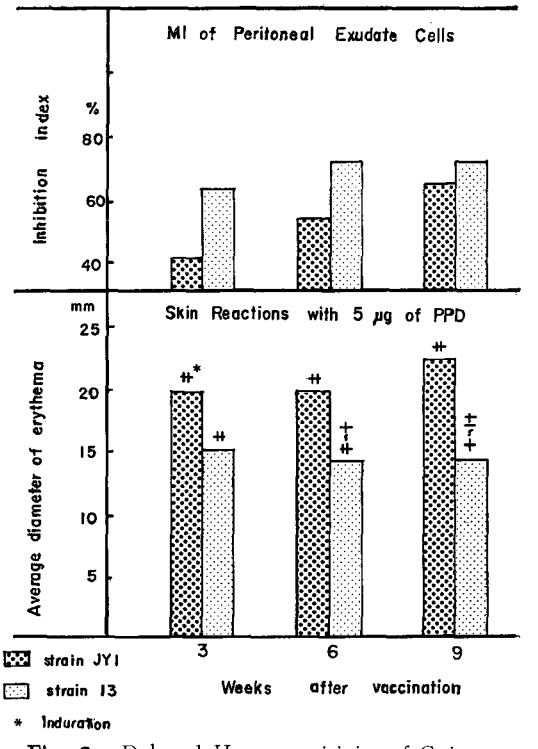

Fig. 2. Delayed Hypersensitivity of Guinea Pigs Vaccinated Subcutaneously with 600 μg of Oil-treated BCG CW

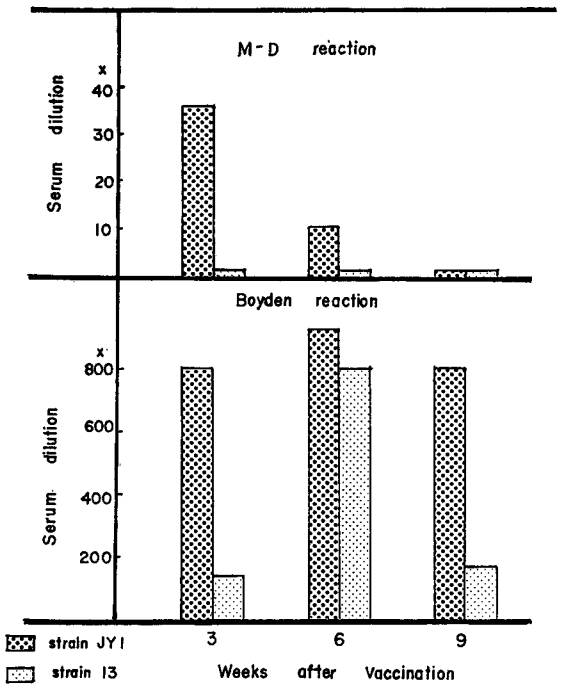

Fig. 3. Passive Hemagglutination Titer of Guinea Pigs Vaccinated Intravenously with 600 μg of Oil-treated BCG CW

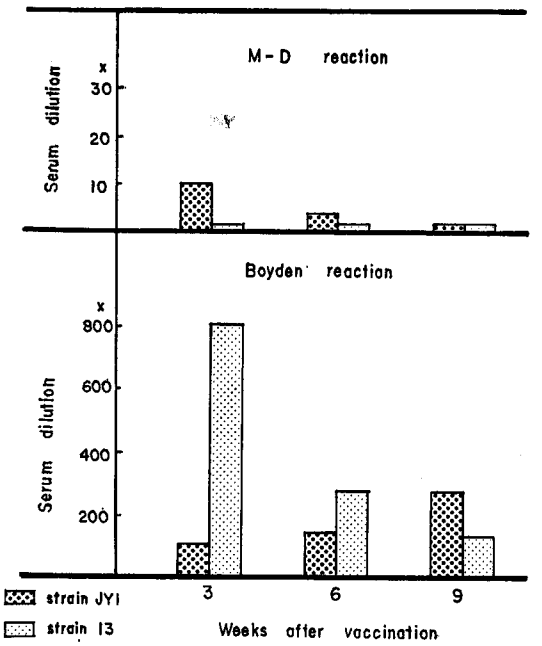

Fig. 4. Passive Hemagglutination Titer of Guinea Pigs Vaccinated Subcutaneously with 600 μg of Oil-treated BCG CW

ii) **抗蛋白抗体：** 静脈および皮下群の Boyden 反応の結果をそれぞれFig. 3 と 4 の下段に示した。静脈群では JY 1 はいずれの時期にもかなりの高値を示したが，strain 13 では 6 週でのみ高値がみとめられた。一方，皮下群では strain 13 の 3 週目にかなりの高値がみられた他は両 strain 共にどの時期でも低い値しかみられなかった。

3) 肺重量 index

Fig. 5 に示した如く，静脈群では JY 1 が 3 週で最高値を示し，以後，低下し 9 週では strain 13 と大差はなかった。皮下群では JY 1 がいずれの期日においても strain 13 よりやや高い値を示したが，静脈群に比べて両 strain 共に余り高い値ではなかった。

4) 病理組織学的所見

病変の程度に応じ一から卄に分けて Table 1 に記載した。

i) **肺：** strain 13 および JY 1 共に皮下群より静脈群の方が滲出性および増殖性炎症共に強かった。静脈群では，大食細胞および類上皮細胞に変化した細胞が中心壊死を伴った大きな結節を作ったり，あるいは肺胞内にびまん性に増殖した病変を示しており，3 週に最も強かった。6 週以後はその範囲および結節数の減少がみられ，9 週には胞隔に類上皮細胞又は単球の小さな病巣として

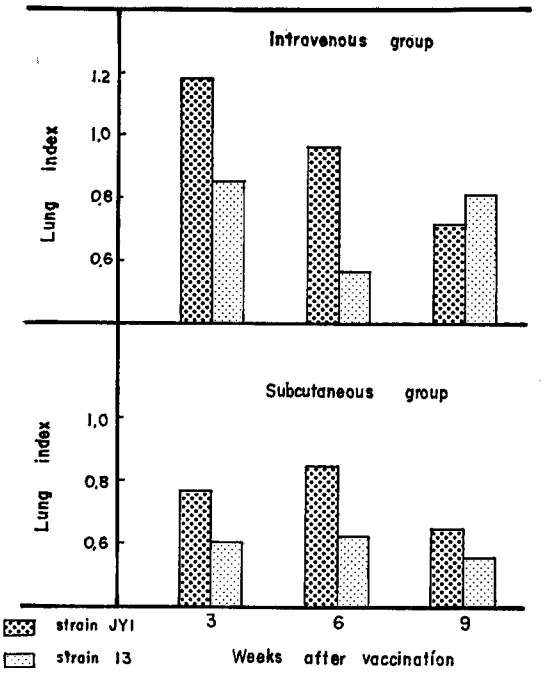

Fig. 5. Lung Index of Guinea Pigs Vaccinated with 600 μg of Oil-treated BCG CW

残っているにすぎなかった。しかしこの9週での病変でもJY1にやや結節の数が多かった。さらに，泡沫状細胞質をもった大滲出細胞と多形核白血球の浸潤を伴った滲出性病変が，strain 13では静脈群の3週に，皮下群の3および6週に，一方JY1では静脈群の3，6週および皮下群6週にみとめられた。両群を比較すると，この様な変化は，JY1静脈群が最も強かった。胞隔肥原は全例にみとめ，胞隔内に単核細胞が増加し，少数例にわずかの多形核白血球の浸潤がみとめられた。

以上，類上皮細胞増殖による増殖性炎および肺胞内単

Table 1 Histological Findings of Lung and Spleen from Guineapigs Vaccinated with BCG Cell Walls

Strains of Guineapigs		JY 1						No. 13					
Route of Vaccination		Intraveneous			Subcutaneous			Intraveneous			Subcutaneous		
Weeks after Vaccination		3	6	9	3	6	9	3	6	9	3	6	9
Lung	Congestion	−	+	−	−	−	−	+	±	+	−	−	−
	Septitis	++	++	++	+++	+	++	++	++	+	++	++	++
	Exudat change (Polymorphonuclear)	++	+	−	−	+	−	±	−	−	−	+	−
	Exudat change (Mononuclear)	+++	+++	−	+	+++	−	++	±	−	++	+	−
	Product change	+++	++	+	±	++	±	+++	++	±	±	±	±
Spleen	Congestion	++	++	+	+	+	−	+	+	±	−	−	−
	Follicular hyperplasia	++	±	−	±	−	−	−	+	±	+	+	−
	Marginal cell proliferation	+	−	±	−	−	−	−	+	±	++	+	+
	Reticulosis	++	+	±	++	+	±	+++	++	++	+++	++	++
	Germinal center	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	±	±
	Epithelioid cell	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

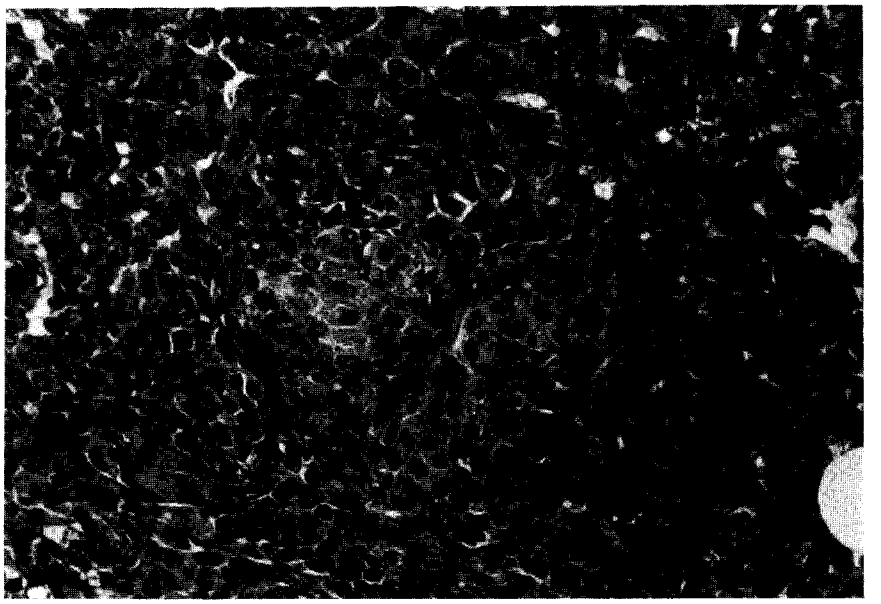

写真1 Strain 13, BCG CW 静注3週
単核球に周囲を取り囲まれた類上皮細胞の結節形成がみられる。
ヘマトキシリン・エオジン染色 (HE) 250×

核細胞滲出を主とする滲出性炎症が主なる病理組織学的変化であるが，2つの strain を比較すると，JY 1 の方が高度であった。(写真1～4参照)

脾：両 Strain 群を通じ，明らかな類上皮細胞結節の形成はみとめられなかった。目立つ変化は赤髄の細網細胞増生であるが，静脈群，皮下群共に strain 13 の方が

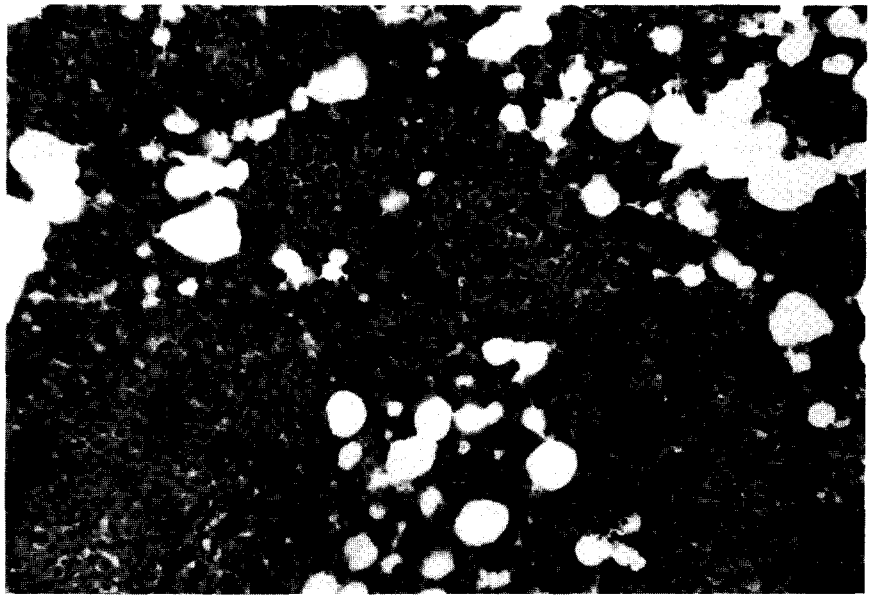

写真2　JY 1, BCG CW 静注3週
単核細胞増加による胞隔肥厚と肺胞内への大食細胞の滲出およびその類上皮細胞化による大小の結節が多数認められる。　HE 100×

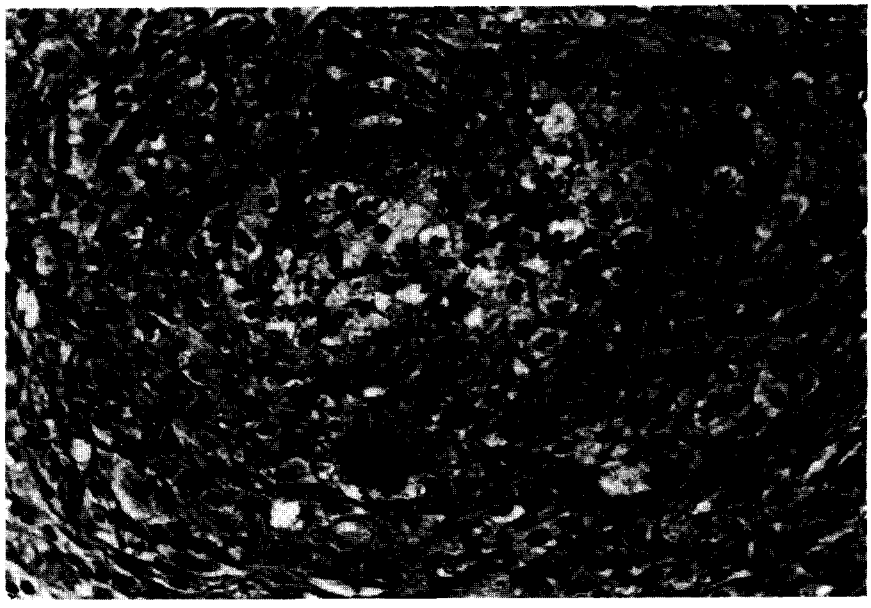

写真3　JY 1, BCG CW 静注6週
大食細胞および一部類上皮化した細胞，単核細胞による結節で，中心は壊死におち入り，巨細胞の形成を伴っている。　HE 250×

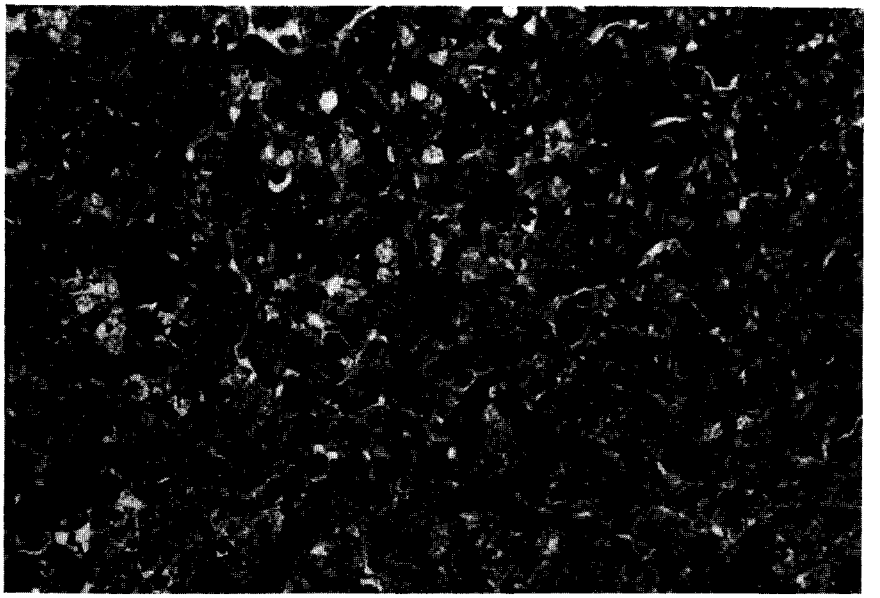

写真4　JY 1, BCG CW 皮下注6週
滲出炎の強い皮下注射例で，泡沫細胞および多形核白血球が肺胞内および肺胞隔にび慢性に滲出している。　HE 250×

高度であった。

なお，各個体における肺 index と結節形成との間には一定の関係はみとめられなかった。

考　　察

BCG CW を oil に associate させたワクチンを近交系モルモット strain 13 と JY 1 に静脈あるいは皮下に接種して，ツベルクリン遅延型皮膚反応，血中抗体の出現および肺の granuloma 形成をしらべた結果，JY 1 が strain 13 に比べて BCG CW に対し明らかに強い反応を示すことが観察された。

本実験では JY 1 と比較対照の strain として，strain 13 を用いたが，strain 13 については，はじめに記した報告[4),5)]にみられるように，その結核感受性は strain 2 あるいは Hartley 系に比して必ずしも低いとは思われない。また，Delayed Hypersensitivity の1つと考えられる Allergic Encephalomyelitis 発現に関しても strain 2 と strain 13 の差は絶対的なものでないことが報告されている[13)]。このような strain 13 に比べて本実験で用いた JY 1 は期待通り BCG CW に対して高い反応性を示したわけである。

ツベルクリン遅延型反応の出現をみると，モルモットでは一般に BCG 生菌静注後のツ反応陽転は皮下接種に比べて遅れることが知られている[14),15)]。strain 2 の実験で，BCG CW 300 μg の皮下接種4週で PPD に反応を示すようになったが，静脈接種では4週は勿論8週に至るも陽転はみられなかった（山本健一，W. Brehmer, 未発表）。本実験では用いた BCW CW 量が2倍ではあるが，JY 1 では静注後3週で皮下接種群と同様な強い硬結を伴うツ反応を示しており，この strain が BCG CW に対し，かなり感受性が高いことをうかがわせるのである。一方，strain 13 では BCG CW 静注で6週目にツ反応のピークがあり，9週目では硬結は明らかに減少し，JY 1 のそれとは著しい差異を示した。

次に M 1 活性とツ反応の関係をみると，静脈群の肺胞細胞の M 1 活性は3週でのみ強くみられ，ツ反応陽性の成績とは一致しなかった。このような関係はわれわれ[16)]がマウスで既に明らかにしているが，このことは BCW CW 感作リンパ球の体内分布が時期によって，ある部位に偏る所謂 compartmentalization[17)] のためかも知れないし，また，M 1 活性とツ反応に関与する感作リンパ球の T 細胞 subpopulation が異なっていることによるかも知れない。しかし，皮下群では腹腔滲出細胞の M 1 活性とツ反応はおおよそ平行しているので，やはり静脈群の M 1 活性とツ反応の非相関は感作リンパ球の compartmentalization がその原因と考えた方がよさそうである。

BCG あるいはその cell wall をマウスに静注して形

成される肺 granuloma の指標には肺重量の増加を用いることが出来る[12),18)]が，本実験の場合は JY 1 の静脈群を除くと肺 index が病理組織像をよく反映しているとはいえない。肺 granuloma 組織像と肺重量の増加の不一致がモルモットで何故多くみられるのか不明である。

strain 2 および Hartley 系においては BCG CW 静注によって形成される肺 granuloma が肺重量によっても，病理組織像によっても明確に示されなかった実験成績がある（W. Brehmer 他，未発表）。このようなモルモットの Granuloma 形成がマウス[18)]や猿[19)]に比して低いのは種属の差かも知れないとわれわれは考えていた。ところで，マウスにおいてはこの BCG CW による granuloma 形成が明らかな遺伝支配を受け，strain によって差があることをわれわれは明らかにした[20)]。モルモットにおいても strain 差の存在が充分考えられる。確かに，本実験で示された成績からすると，JY 1 は BCG CW による granuloma 形成に関して high responder と云えるかも知れない。

BCG CW 接種後の血中抗体をみたが，多糖体抗体は両 strain 共，接種経路に関係なくすべて低値を示し，一方，蛋白抗体は JY 1 静脈群が全観察期間高値を示したが，その他は 3 週から 9 週のある一時期のみ高値であった。このような抗体価の推移は BCG 生菌接種の strain 2 における実験（山本健一他，未発表）あるいは同様なウサギの実験結果[15)]とも異なったもので，これをどの様に説明するかは困難である。

三浦ら[21)]は予研獣疫部で開発されたモルモット JY 2 において，Hartley 系に比して結核アレルギーをはじめとする細胞性免疫反応の低下ならびに液性抗体産生反応の低下をみとめ，JY 2 が immune response 全般にわたる low responder であることを報告している。この JY 2 に対し JY 1 が high responder であるとは直接比較した実験がないので決めることは出来ないが，JY 1 があらゆる抗原に対して高い反応性をもつ Ir gene に無関係な high responder であるとすれば，その遺伝的背景を知りたいところである。しかし，残念ながらわれわれは全くその検討を行っていない。

結　　語

BCG CW を oil に associate させて近交系モルモット JY 1 および strain 13 の静脈あるいは皮下に接種して，ツベルクリンに対する遅延型反応，血中抗体の出現および肺と脾における granuloma 形成による病理組織学的変化をしらべた。その結果，JY 1 が strain 13 に比べて，明らかに BCG CW に対する反応の強いことが示された。

終りに本稿を御校閲下さった有馬純教授に深謝いたします。また実験を終始熱心にお手伝いいただいた山崎静恵技官にお礼申し上げます。

文　　献

1) Benacerraf, B. and McDevitt, H. O.: Science, **175**, 273, 1972.
2) Parker, D., Sommer, G. and Turk, J. L.: Cellular Immunol., **18**, 233, 1975.
3) Benacerraf, B.: "Genetic Control of Immune Responsivenss" edited by H. O. McDevitt and M. Landy, 1972, Academic Press, New York.
4) Stone, S. H.: Int. Arch. Allergy, **20**, 193, 1962.
5) Chase, M. W.: Dessemiated granuloma in the guinea pig. In Mechanisms of Hypersensitivity. 1959, Little Brown Co. Boston.
6) Anacker, R. L., Barclay, W. R., Brehmer, W., Larson, C. L. and Ribi, E.: J. Immunol, **98**, 1265, 1967.
7) Brehmer, W., Anacker, R. L. and Ribi, E.: J. Bactriol., **95**, 2000, 1968.
8) 藤田誠一：結核の研究，**13**, 13, 1960.
9) 山本健一：北大免疫科学研究所紀要，**35**, 8, 1975.
10) Myrvik, Q. N., Leak, E. S. and Faries, B.: J. Immunol., **86**, 128, 1961.
11) Bergstrand, H. and Källen, B.: Scand. J. Immunol., **2**, 173, 1973.
12) Youmans, G. P. and Youmans, A. S.: J. Inf. Dise., **114**, 135, 1964.
13) Stone, S. H., Lerner II, E. M. and Coode, Jr. J. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **132**, 341, 1969.
14) 山本健一，久世彰彦：結核の研究，**4**, 62, 1956.
15) Takahashi, Y., Onodera, T. and Yamamoto, K.: J. Exp. Med., **114**, 555, 1961.
16) Yamamoto, K., Anacker, R. L. and Ribi, E.: Inf. & Immunity, **1**, 595, 1970.
17) Schlossman, S. F., Levin, H. A., Rocklin, R. E. and David, J. R.: J. Exp. Med., **134**, 741, 1971.
18) 山本健一：結核，**51**, 453, 1971.
19) Ribi, E., Anacker, R. L., Barclay, W. R., Brehmer, W., Harris, S. C. Leif, W. R. and Simmons, J.: J. Inf. Dise., **123**, 527, 1971.
20) 柿沼光明，岡田昌彦，山本健一：日本免疫学会総会記録，**7**, 341, 1977.
21) 三浦　馨，橋本達一郎：アレルギー，**23**, 174, 1974.

Immune Response in Inbred Guinea Pigs, Strains JY 1 and 13, to BCG Cell Walls

Ken-ichi YAMAMOTO and Harue OKUYAMA

Guinea pigs of inbred, strains JY 1 and 13, were intravenously or subcutaneously vaccinated with 600 μg of oil-treated BCG cell walls and were examined their development of tuberculin delayed hypersensitivity, anti-tuberculous serum antibody and granuloma in lung and spleen 3, 6 and 9 weeks after vaccination. The results showed that strain JY 1 is more sensitive to BCG cell walls than strain 13.