



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結核免疫におけるAdjuvantの作用について：(第1報) 生菌免疫と死菌免疫におけるAdjuvant作用の相違
Author(s)	寺本, 信之; TERAMOTO, Nobuyuki; 山田, 幸雄 他
Description	
Citation	結核の研究, 15, 19-24
Issue Date	1961
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26718
Type	departmental bulletin paper
File Information	15_P19-24.pdf



結核免疫における Adjuvant の作用について

(第1報) 生菌免疫と死菌免疫における Adjuvant 作用の相違

寺本信之 山田幸雄

(北海道大学結核研究所細菌部 主任 大原 達教授)

(昭和36年6月30日受付)

1937年に Freund¹⁾らが paraffin oil の結核菌に対する抗原性増強作用を見出して以来、かかる mineral oil は、それ単独に、又は mycobacteria と混合して、色々な免疫学的研究に広く用いられて来た。周知の如くこれが所謂 Freund の adjuvant である。Adjuvant の使用は著明に抗原の potency を高め抗体産生を助長せしめるから、antigen の量の少ない場合や、抗原性の弱い物質に対して力価の高い抗血清を得んとするような場合には、極めて効果的な手段である^{2),3)}。また adjuvant は、これと混合した抗原に対してツベルクリン型の感作を惹き起すことが知られており、contact sensitization^{4),5)}、homograft reaction⁶⁾、実験的自家アレルギー⁷⁾、蛋白抗原に対する遅延型感作⁸⁾等、色々な免疫学的現象の研究には、欠く事の出来ないものとなっている。かかる場合の効果は極めて顕著なもので、1例を挙げれば、猿にアレルギー性の encephalomyelitis を起させようとする場合、adjuvant なしでは30回から100回の脳乳剤注射が必要であるのに⁹⁾、adjuvant を使用すれば¹⁰⁾ただ1回の注射で迅速に同じ効果をあげることが出来ると云う。

結核の研究においても adjuvant は好んで用いられ、結核死菌ワクチンや結核菌体成分も、paraffin oil と混合接種することによって非常に感染防御能を高め得る事が報告されている^{11),12)}。然しこのような免疫力増強の機作については未だ明確な説明が与えられていない。よって我々は抗結核免疫における adjuvant の意義と作用機序の一端を知らんとし、先ず本報においては、(i) adjuvant は生菌に対しても死菌に対すると同様な免疫力増強効果を示すか否か、(ii) 生菌と共に接種された adjuvant は、菌の増殖に対しどのような影響を与えるか、の2点を追求した。以下に得たる成績を報告する。

実験材料及び方法

1) 使用菌株：Sauton 培地培養の牛型菌 Ravenel 株及び BCG 予研株。

2) 実験動物及び群別：体重 18~20 g の CF 系マウス(生後 4~5 週)を用い各群 20 匹ずつ次の如き 8 群に群別した。

第1群：(Ravenel 生菌+adjuvant) 接種群→接種菌の定量培養。

第2群：(Ravenel 生菌+生理食塩水) 接種群→同上。

第3群：(BCG 生菌+adjuvant) 接種群→同上。

第4群：(BCG 生菌+生理食塩水) 接種群→同上。

第5群：(BCG 生菌+adjuvant) 接種群→3 週後 Ravenel 株にて攻撃。

第6群：(BCG 生菌+生理食塩水) 接種群→同上。

第7群：(BCG 死菌+adjuvant) 接種群→同上。

第8群：(BCG 死菌+生理食塩水) 接種群→同上。

上記の如く、第1群から第4群までのマウスは生体内菌増殖に及ぼす adjuvant の影響を調べる為のもので、菌接種後5週目まで毎週各群とも at random に4匹ずつ撰んで屠殺し、肺、肝、脾内の生菌数を型の如き定量培養法によって求めた。第5群から第8群までは BCG の免疫効果に及ぼす adjuvant の作用を調べる為のもので、免疫3週後に強毒菌 Ravenel 株 1 mg (液量 0.25 ml) を静注して challenge し、その後の生存日数を Litchfield の方法により観察した。

3) Adjuvant：Arlacel A 1 量に Drackeol 9 量の割に混じたものを adjuvant として用い、これを菌液に等量加えて動物に接種した。

実験成績

1. 結核菌の体内増殖に及ぼす adjuvant の影響について

Adjuvant に包埋された結核菌(生菌)は、動物体内における細胞の増殖を妨げるような状態におかれているから、自然感染の場合とは異なった体内増殖を示す可能性が当然考えられる。この点について最近土井^{13),14)}は、次の如き甚だ興味ある観察を行なった。即ち流動パラフ

表 1. Ravenel 及び BCG 0.1 mg 接種マウスにおける臓器内生菌数の推移

group	organ	week				
		1 week	2 week	3 week	4 week	5 week
第 1 群 Ravenel + Adjuvant	Lg	16×10^5	110×10^5	31×10^6	94×10^6	68.5×10^6
	Lv	91×10^4	157.5×10^4	25×10^5	56×10^5	68×10^5
	Sp	60.5×10^5	27.3×10^5	43.5×10^5	62.5×10^5	16×10^6
第 2 群 Ravenel + Saline	Lg	26×10^4	41×10^4	20×10^5	104×10^5	44×10^6
	Lv	55×10^4	80×10^4	75.5×10^4	200×10^4	44×10^5
	Sp	81×10^4	22.3×10^5	226×10^4	470×10^4	570×10^4
第 3 群 BCG + Adjuvant	Lg	43×10^4	14.5×10^4	15×10^4	13.5×10^4	Cont
	Lv	62×10^4	15.5×10^4	4.9×10^4	5.6×10^4	30×10^3
	Sp	148×10^4	67.5×10^4	37.5×10^4	15.0×10^4	13×10^4
第 4 群 BCG + Saline	Lg	2.0×10^4	1.6×10^4	10×10^3	6×10^3	3×10^3
	Lv	29×10^3	25×10^3	20×10^3	30×10^2	20×10^2
	Sp	29.2×10^4	11×10^4	10×10^4	10×10^3	6.6×10^3

接種生菌単位: BCG= 3.1×10^6 Ravenel= 4.8×10^6 接種ルート: i.p

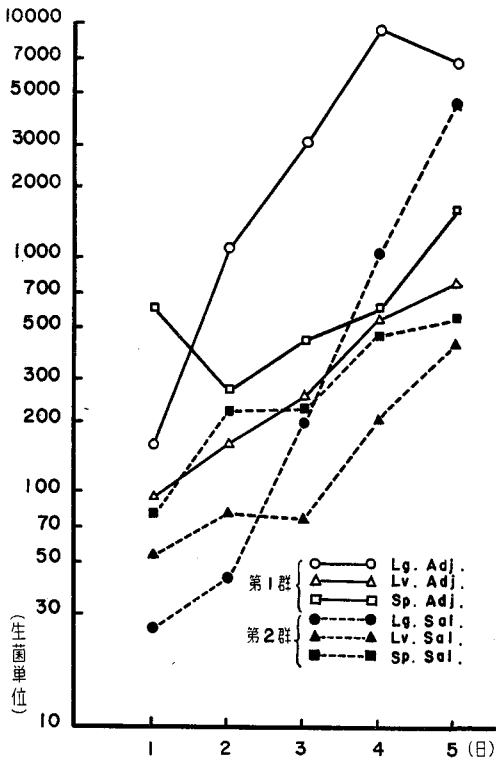


図 1. 肺, 肝, 脾内 Ravenel 生菌数の消長 (臓器 0.1 mg 中の生菌単位)

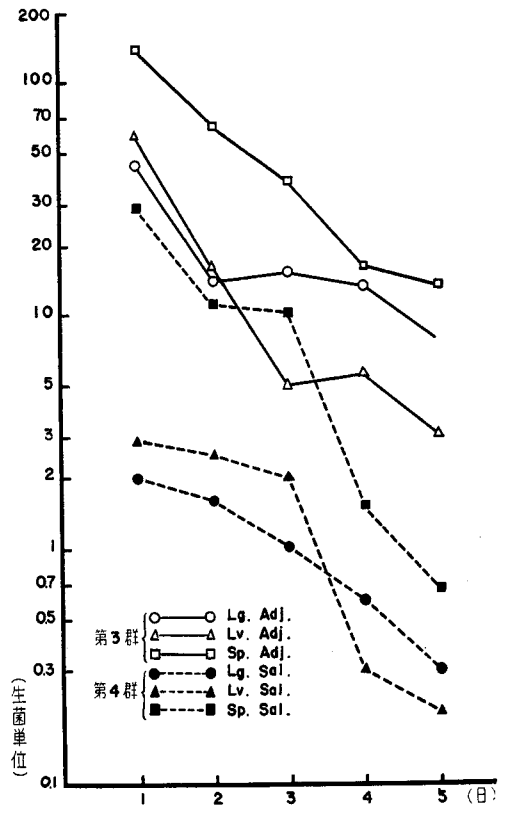


図 2. 肺, 肝, 脾内 BCG 生菌数の消長 (臓器 0.1 mg 中の生菌単位)

インと共にマウスに接種された結核菌は、食塩水菌液の場合より速かに且つ大量に臓器組織内に運搬されるが、ここで菌は殆んど細胞に摂取されることなく、パラフィン滴の表面に密着したまま体液中に露出した状態で存在する。しかもこのような状態におかれた菌はその病原性に特殊な修飾を受けるらしく、弱毒菌(人型 Frankfurt 株, 牛型 RM 株)が旺盛な発育を示して動物を斃すに反し、強毒菌(人型 H₃₇Rv 株, 牛型 Ravenel 株)は増殖を著しく抑制され、動物の死亡率も明らかに低下すると云う奇異なる成績を得た。この成績を追試、検討する為に牛型菌から強毒株 Ravenel と弱毒株 BCG の 2 株を選びこれに adjuvant を添加した場合と然らざる場合(同量の食塩水添加)とについて、菌の増殖状態を比較してみた。表 1 は臓器 1 g 中における平均生菌数を 1 週から 5 週までまとめたもので、これを臓器 0.1 mg あたりの生菌単位に換算して graph にしたものが図 1, 図 2 である。得たる結果は土井¹³⁾の成績と異なり、弱毒たと強毒たとを問わず、何れの場合にも adjuvant を添加した場合に菌の増殖は促進するのをみた。但し Ravenel 株と BCG の相互の間には、adjuvant の有無に拘わらず、生体内における増殖の態度においてかなり違ったものが観察された。即ち図 1 と図 2 を比較してみれば明らかな如く、強毒菌 Ravenel は 1 週目より 5 週目に到る観察期間中、どの臓器においても菌数は増加の一途をたどるが、弱毒菌 BCG においては、これと反対に 1 週目の菌数が最も多く、以後時間の経過と共に次第に菌数の減少

するのを認めた。従って Ravenel についてはすべて上向きの増殖線、BCG についてはすべて下向きの増殖線が得られた。又各臓器について菌の増殖状態を眺めてみると、強毒菌たる Ravenel は肺において好んで増殖するらしく、adjuvant 添加時も然らざる場合も共に肺内生菌単位が最も高かったのに対し、弱毒菌 BCG は脾内において最も強い増殖を示した。尚両菌株とも、肝臓内の菌数が最も少ない事は一致していた。今、第 5 週目における両菌株の生菌数を比較してみると、毒力の差を反映して著しい相違が認められ、Ravenel 株の場合はこの実験において最高生菌単位は 6850 (肺 0.1 mg 中の生菌単位) から最低 440 (同じく肝 0.1 mg 中) の値を示したのに対し、BCG では最高でも 13 (脾 0.1 mg 中の生菌単位)、最低では 0.2 (肝 0.1 mg 中) に過ぎなかった。このように強毒菌と弱毒菌の間には菌の増殖力において 10⁻² から 10⁻³ order の開きを認めたが adjuvant を加えた場合と加えない場合の増殖を比較してみると、前述した如く何れの strain, 何れの臓器においても、例外なく adjuvant 添加群に菌の増殖昂進を認めたことは注目して良い。

2. BCG 生菌及び死菌の免疫効果に及ぼす adjuvant の影響について

緒言に述べたように、adjuvant の使用によって抗原の potency が昂められる事はすでに知られているが、結核の場合、BCG 生菌ワクチンに対しても死菌に対すると同様の免疫促進作用を示すか否かは問題である。この点を追究した報告は甚だ少ないが、Bloch¹⁵⁾らの最近の実

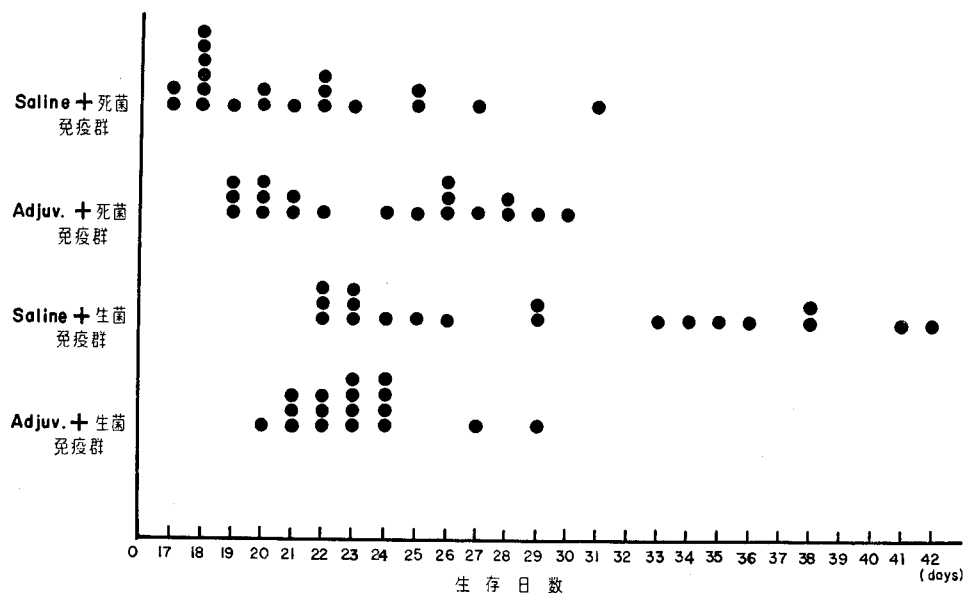


図 3. Ravenel 株 (1 mg) で challenge した BCG ワクチン接種マウスの死亡分布

験によれば、生菌ワクチンに対する adjuvant の使用はかえって BCG の免疫原性を低下せしめると云う。我々はこの成績を追試、検討する目的で、BCG の生菌及び死菌ワクチンについて adjuvant を等量加えた場合と同じ量の生理食塩水を加えた場合の免疫効果を比較してみた。即ち第5群 (BCG 生菌+adjuvant)、第6群 (BCG 死菌+生理食塩水)、第7群 (BCG 死菌+adjuvant)、第8群 (BCG 死菌+生理食塩水) の各20匹ずつのマウスを免疫3週後 (免疫 BCG 量: 0.1 mg の生菌単位 3.1×10^6) に Ravenel 株 1 mg (生菌単位 $= 6.4 \times 10^7$) の静注を以て攻撃し、マウスの累積死亡率を 図4~図7 の如く正規対

数確率紙上に plot して median survival time (ST_{50}) を求めた。尚個々のマウスの生存日数は 図3 に示す如くである。

この実験の結果は表2に総括した如く、4群のうちでは BCG 生菌を食塩水浮游液として与えた群が最も強い免疫力を示し ($ST_{50}=28$ 日)、BCG 死菌を食塩水に浮游せしめて免疫した群の免疫力が最も低かった ($ST_{50}=20$ 日)。このように生菌免疫が死菌免疫に勝るのは当然のことであるが、興味あるのは生菌ワクチン及び死菌ワクチンの効果を修飾する adjuvant の態度である。即ち、adjuvant は死菌ワクチンに対してはその免疫効果を増

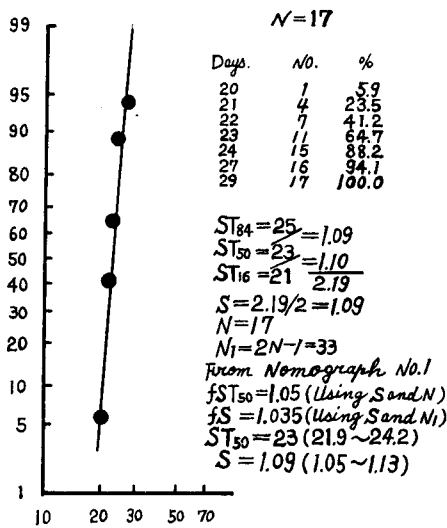


図4. 第5群マウスの ST_{50}

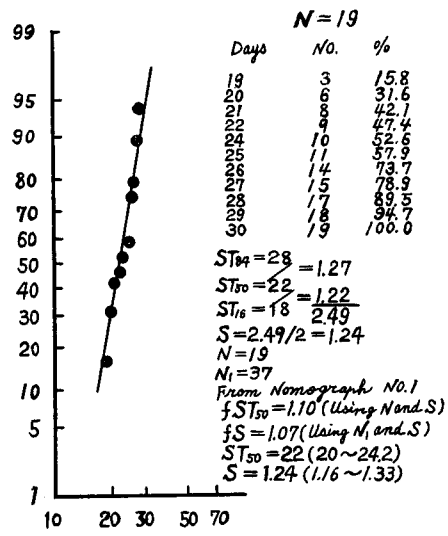


図6. 第7群マウスの ST_{50}

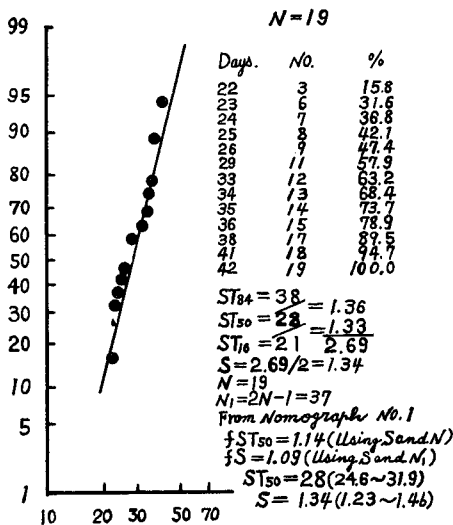


図5. 第6群マウスの ST_{50}

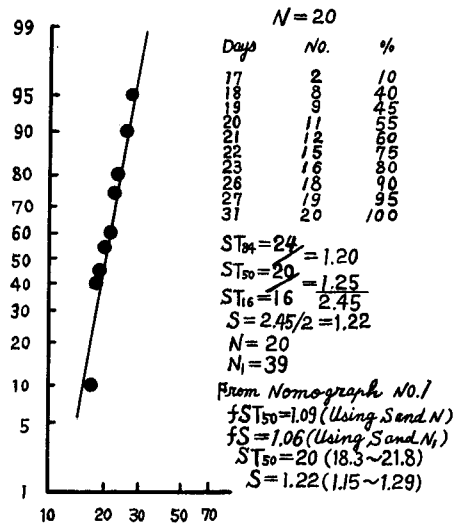


図7. 第8群マウスの ST_{50}

表 2. Adjuvant の BCG 免疫効果に及ぼす影響の総括
Ravenel 1 mg で challenge した
BCG 免疫マウスの ST₅₀

群	免疫方法	ST ₅₀	95% 信頼限界
5 群	BCG 生菌+Adj.	23	21.9~24.2
6 群	BCG 生菌+Saline	28	24.6~31.9
7 群	BCG 死菌+Adj.	22	20.0~24.2
8 群	BCG 死菌+Saline	20	18.3~21.8

Ravenel の生菌単位: 6.4×10^7
challenge route: 静脈内
ST₅₀: Median survival time (in days)

強せしめたが、生菌ワクチンに対しては却ってこれを低下せしめるという結果を得た。この事は第 8 群と第 7 群及び第 6 群と第 5 群の ST₅₀ をそれぞれ表について比較してみれば明らかで、前者即ち死菌ワクチンにおいては adjuvant の使用によりマウスの生存日数が平均 2 日延長したのに反し、後者即ち生菌ワクチンにおいては adjuvant の使用により ST₅₀ が 28 日から 23 日へと大幅に短縮するのを見た。この成績からみれば、adjuvant に免疫増強効果を期待し得るのは死菌ワクチンと併用した場合のみに限り、生菌と共に用いれば却って免疫効果を阻害する結果を招くように思われる。この成績は Bloch¹⁵⁾ らのそれと一致するものであった。

総括並びに考案

油脂類を加えた死菌ワクチンの免疫増強機序については未だ充分鮮明にはされていないが、大体次のような事が考えられる。(i) 油を加えた結核死菌ワクチンは注射局所に炎症を起し、菌体は長く局所に止まる^{16),17)}。従って組織に強い変調を来たす事。(ii) 油脂類は結核菌を良く包囲する。このため、生体内での破壊吸収が緩慢になり^{18),25)}、抗原刺戟の持続が長いこと。(iii) 油脂類の特異作用として滲出する単球¹⁹⁾ は菌運搬者として病巣を転移せしめ、局所ばかりでなくリンパ腺、肺等に広範囲に亘って良性の結核性変化^{1),16),20)~23)}を生ずる。この事も結核免疫の成立と密接な関係があるらしい²⁴⁾。(iv) 油脂類には抗原性物質抽出作用^{26)~31)}があり、これによって有効な抗原刺戟が得られること。

かかる機序の何れが主役であるにせよ、結核死菌ワクチンが油脂包埋によってその免疫力を著しく改善される事は事実である。然しそれにも拘わらず、現在までの段階では、なお弱毒生菌に勝る免疫効果は期待出来ないとみるのが実状であろう。ここで当然心に浮ぶのは、上述の如き油脂類の性状から、これを生菌免疫に用いたなら

ば更に免疫効果は増強するのではないかと云う期待である。然し乍ら実験の結果はこの逆であった。我々の成績が示すところによれば、BCG 生菌の持つ免疫力は、adjuvant の使用によってかなり弱められ、生菌の効果は油脂包埋死菌ワクチンと変らない程度にまで低下せしめられていた。従って生菌に adjuvant を用いることは、生菌免疫の具えている長所を損ずるものと云わざるを得ない。然らば何故 adjuvant は生菌に対して免疫賦与力を減殺するように仕向くのであろうか?。これについてもやはり明確な解答は与えられていないが、可能な説明として Bloch ら¹⁵⁾ は次の如き機序を挙げている。(i) 菌のある成分が adjuvant たる oil によってとり除かれ、これがワクチンとしての potency を減少せしめるのかも知れない事。既に Bloch³²⁾ が観察しているように、paraffin oil には増殖力を奪う事なしに菌の毒力を失なわしめる作用があるから、このように毒力を失なった菌は喰菌作用により破壊を受け易く、免疫原としての効率が低くなると云う可能性は充分に考えられる。(ii) 油脂類に suspend した菌は、体内における分布が食塩水浮游液としたものと異なり、ワクチンとして余り効果的でないような localization をとるのかも知れない事。(iii) 結核菌は非常に複雑な抗原構造をもっており、或る抗原部分は個体に対し結核を軽減せしめるような response を生ぜしめるが、ある抗原部分は却って結核を増悪せしめるように仕向くという可能性も考えられること。若しこのように、いわば免疫抗原とアレルギー抗原とでも名付くべきものが菌体内に独立して存在し、adjuvant は撰択的に後者の抗原性のみを増強せしめるものと仮定すれば、adjuvant 添加による免疫効果の減少はアレルギー抗原の potency 増強によって獲得抗抵抗力が蔽われてしまった為とみる事も可能であろう。事実 Dubos ら³³⁾ は、結核菌のある菌体成分がマウスにおいて免疫とは反対の効果を与える事を観察している。然し我々は教室における一連の研究から、アレルギーと免疫とは機転を同じくする一元的な現象と考えており、アレルギーに関与する抗原抗体系と免疫に与かるそれとが別個に存在するものとは考えていない。何れにせよ免疫の眞の機構が明確でない今日、上述の説明ははまだ仮説の域を出ないものと云わなければなるまい。従って最後の説明として考えられるのは、host の体内における菌の増殖に対して adjuvant が阻害的な作用を与え、その為に生菌の免疫効果が低下するのではないかと云う可能性である。前述した土井^{13),14)} の成績は毒力菌に関する限りこれに肯定的な根拠を与えるものであった。即ち人型強毒菌 H₃₇Rv、牛型強毒菌 Ravenel は、何れも流動パラフィンと共にマウスに接種すると、

臓器内での増殖は明らかに抑制され、且マウスの生存日数も食塩水浮游菌液接種に比し著明に延長する事を彼は観察している。然しこの際注目しなければならないのは同じ流動パラフィン添加によっても弱毒株 (Frankfurt RM, BCG) は臓器内において顕著な増殖を示し、マウスを短時日内に死亡せしめると報告している事である。彼の実験によれば、流動パラフィンと共に接種された菌はすべてパラフィン滴の表面に吸着され、このような菌は殆んど細胞内に摂取される事なく体液中に露出した状態で存在する。従って彼は、上述の実験成績からみて、強毒菌は細胞内での増殖能力は強いが体液中での増殖力は弱く、逆に弱毒菌は細胞内での増殖能力に乏しいけれど体液中でのそれは強いのであろうと推論している。然し乍ら adjuvant 作用の強毒株と弱毒株に対するこのような態度の差は、我々の実験においては実証する事が出来なかつた。図1, 図2から明らかなように、強毒菌たる Ravenel 株も弱毒菌たる BCG も、共に adjuvant を加えた方が臓器内の生菌数は例外なく多い。我々の成績と土井^{13), 14)} のそれとの相違が何に基因するかは明らかでないが、少なくとも弱毒菌 BCG だけについてみれば彼我の成績は一致しており、adjuvant は BCG 生菌に対してその増殖を促進こそすれ決して阻害的に働くものでない事は認めてよいであろう。かくみれば最後に述べた説明もまた捨てるを得なくなる。然らば何故 adjuvant は死菌免疫の場合と生菌免疫の場合に異なった作用を示すのであろうか？ 何故死菌ワクチンに対しては免疫効果を助長せしめるにも拘わらず、生菌ワクチンに対してはかえってこれを減殺せしめるのであろうか？ 現在までのところ、遺憾ながらこれに答える段階には至っていない。ただ我々が免疫効果を調べた時期、即ち BCG 接種後3週目と云う期間は更に検討してみる必要がある。この期間は充分なる免疫を期待するには些か短か過ぎたと云う所しは免かれ得ない。従ってもう少し遅い時期に challenge を行なったならばあるいは生菌に対しても adjuvant 効果が発揮されるのかも知れない。然しながらもしそうであるとするならば、何故 BCG 生菌単独ではかなりの免疫力増強を認め得るにも拘わらず、adjuvant 添加により免疫獲得時期が遅れて現われるようになるのであろうか？ 我々は今後の研究により、これ等の点を少しでも解明して行きたいと考えている。

結 論

BCG 死菌を adjuvant と混合して接種した場合、これを食塩水浮游液として用いるよりも免疫効果は大であったが、生菌の場合はこれに反し、adjuvant の使用はかえ

って結核に対する免疫賦与力を低下せしめる。後者の場合、adjuvant の使用がマウス体内における BCG の増殖を抑える為ではないか、と云う推測も可能であるが、培養の結果はこれと反対で、菌の増殖は寧ろ adjuvant を加えた場合の方が大であった。この矛盾に対する充分な説明は未だ不明である。

参 考 文 献

- 1) Freund, J. Casals, J. & Hosmer, E. P.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med, **37**, 509 (1937).
- 2) Cohn, M.: Methods in Medical Research, **5**, 271 (1952).
- 3) Freund, J.: Adv. in Tuberc. Res. **7**, 130 (1956).
- 4) Landsteiner, K. & Chase, M. W.: J. Exper. Med, **71**, 237 (1940).
- 5) Chase, M. W.: Internat Arch. Allergy, **5**, 163 (1954).
- 6) Voisin, G. A. & Maurer, P.: Ann. New York Acad. Sci, **64**, 1053 (1957).
- 7) Waksman, B. H.: Internat. Arch. Allergy, **14**, Suppl., (1959).
- 8) Freund, J. & McDermott, K.: Proc. Soc. Exper. Biol. Med. **49**, 548 (1942).
- 9) Rivers, T. M., Sprunt, D. H. & Berry, G. P.: J. Exper. Med, **58**, 39 (1933).
- 10) Kabat, E. A. Wolf, A. & Bezer, A. E.: J. Exper Med, **85**, 117 (1947).
- 11) Weiss, D. & Dubos, R. J.: J. Exper. Med, **101**, 313 (1955).
- 12) Weiss, D.: Am. Rev. Tuberc, **77**, 719 (1958).
- 13) 土井和雄: 結核, **35** (11), 738 (1960) (昭 35).
- 14) 土井和雄: 結核, **35** (12), 831 (1960) (昭 35).
- 15) Bloch, H. & Ferreira, I.: J. Immunol. **83** (4), 372 (1959).
- 16) Rist, N.: Ann. Inst. Pasteur, **61**, 121 (1938).
- 17) 金井興美, 志賀康夫, 伊藤文子: 結核, **26** (6), 289 昭 26 (1951).
- 18) Freund, J. & Casals, J.: J. Immunol. **38**, 67 (1940).
- 19) 大野 乾, 他: 結核, **27**, 306 (1927).
- 20) Casals, J. & Freund J.: J. Immunol, **36**, 399 (1939).
- 21) 岡 捨己: 抗研誌, **1**, 25 (1946).
- 22) 岡 捨己, 山田俊一郎: 抗研誌, **3**, 53 (1948).
- 23) 河内重三: 新潟医学雑誌, **68**, 38 (1954).
- 24) 山口 登: 日本細菌学雑誌, **11** (3), 185 (1956).
- 25) 山口 登: 日本細菌学雑誌, **11** (4), 279 (1956).
- 26) Hehre, E.: J. Immunol, **36**, 285 (1939).
- 27) Choucroun, N.: C. R. Acad. Sc. **208**, 1957 (1939).
- 28) Choucroun, N.: Ibid **210**, 511 (1940).
- 29) Choucroun, N.: Am Rev. Tuberc. **56**, 203 (1947).
- 30) 金井興美: 結核, **27**, 124 (1952).
- 31) 山田俊一郎: 抗研誌, **10**, 59 (1954).
- 32) Bloch, H.: J. Exper. Med, **91**, 197 (1950).
- 33) Dubos, R. J. & Schaedler, R. W.: J. Exper. Med, **106**, 703 (1957).