

マウスの BCG 免疫に対する酵母リボ核酸の Adjuvant 作用について

金沢大学結核研究所薬理部（主任：伊藤亮教授）

吉 村 政 弘
品 川 安 衛
南 部 利 汎

（受付：昭和41年5月30日）

緒 言

核酸の免疫学上における意義に関しては近年いろいろ注目すべき実証が行なわれているが、核酸の Adjuvant 効果を示すものとして次の2文献がある。即ち Rammon 等¹⁾は核酸を破傷風トキソイドに混合してウサギに免疫処置を施すと、トキソイド単独処置の場合に比して高抗体価の免疫血清が得られたと報告している。また Merritt 等²⁾はマウス実験において、ウシ

血清のガンマ・グロブリンの抗原性に対して、マウスの肝臓及び脾臓から得られたリボまたはデオキシリボ核酸が Adjuvant 効果を示したと報告している。著者らは dd 系マウスを使用して、酵母リボ核酸 (RNA) が BCG の免疫効果に対してどのような影響を及ぼすかについて検索を行なったので、ここにその成績を報告する。

実 験 方 法

1. 動物：体重 11—14gm の dd 系マウスを用いた。
2. 結核菌：使用した菌株は教室保存の BCG 菌ならびに強毒人型結核菌 H₃₇Rv である。
菌浮遊液の調製：結核菌をソートン培地に 8—11 日間 37°C で培養し、採取した菌苔を食塩水で洗滌した後、濾紙で水分をよく吸除し、その一定量を乳鉢中で充分に磨砕し、食塩水を追加して所要濃度の菌浮遊液とした。
3. 核酸：酵母リボ核酸（メルク製品）に 10% Na₂CO₃ を加えながら滅菌食塩水に溶解し、溶液の反応を中性とした後、100°C、10 分間加熱処置した。
4. 免疫実験：マウスを 1 群 20—35 匹として所要数の群に区分し、そのうち感染対照群を除く残りの各

群動物に BCG 菌液 0.2 ml (生菌単位約 10⁷) を単独（以下単独ワクチンと呼ぶ）または RNA 0.001—10 mg を混合して（以下 RNA 加ワクチンと呼ぶ）腹腔内に注射した。BCG 注射 1 週、2 週あるいは 1 カ月後に、無処置の対照群を含めて全群動物に H₃₇Rv 菌液 0.2 ml (生菌単位約 10⁷) を尾静脈内に注射して感染を行なった。感染後逐日動物を観察し、死亡したものは直ちに剖検して内臓の結核病変を確認した後、死亡数を累積死亡数（当日までの死亡数 / 総数）及び百分率をもって記録し、最後に各群の平均日数を算定した。また明らかに結核以外の死因によると認められたものは実験成績から除外した。

実 験 成 績

(1) 第 I 表は著者らがこの研究で行なった最初の実験成績である。5 群のマウスに下記の

如く単独ワクチンまたは RNA 加ワクチンを接種した。

- 第1群 ; RNA 10 mg 加ワクチン
- 第2群 ; RNA 1 mg 加ワクチン
- 第3群 ; RNA 0.1 mg 加ワクチン
- 第4群 ; 単独ワクチン
- 第5群 ; 無処置 (対照)

ワクチン接種1カ月後に全動物に一斉に H₃₇R_v 菌による感染を行なった。

この表から明らかなように、無処置の対照群では感染後20日以内に35匹のマウスのうち約半数の17匹 (48.6%) が、また40日以内には全部が結核症で死亡 (平均生存日数, 23.4日) したのに対し、BCG 単独ワクチン接種の第4群では感染後20日及び40日までの死亡数は 12/31 (38.7%) 及び 27/31 (87.1%) で、全員の死亡をきたすには感染後90日を要した。(平均生存日数, 28.4日) のであって、BCG 接種によってマウスの結核感染に対する抵抗力が増強されたことは明らかである。他方 RNA 加ワクチンを接種した第1, 2, 3群ではワクチンの延命効果の程度はこれら3群間において著しく異なっており、しかもここで特に注目されるのは RNA 0.1 mg 加ワクチン接種の第3群において延命効果が最大であったということである。即ち第3群では感染後20日, 40日, 90日までに死亡した動物数はそれぞれ 3/29 (10.3%), 20/29 (70%), 25/29 (86.2%) であって、しかも感染後120日においてもなお4匹のマウスが生存していたのである。この場合120日で全員死亡したものと仮定して算定すると平均生存日数は47.0日となる。これらの数値を単独ワクチン接種群のそれと比較するとき、RNA 0.1 mg 加ワクチンの免疫効果は単独ワクチンよりも遙かに優るといえる。ところが RNA 添加量を 1 mg に増量した第2群では感染後20日及び40日までのマウスの死亡数はそれぞれ 5/21 (23.8%) 及び 19/21 (90.4%) で、しかも感染後60日以内に全部が死亡しており、ワクチンの延命効果は第3群とほぼ同程度という成績であった。さらに RNA 10 mg 添加ワクチンを接種した第1群では感染後50日以内に全員死亡しており、無処置の対照群と比して大差がなく、ワクチン接種による延命効果はほとんど認めがた

いという成績であった。

以上の実験成績から、マウスに対する BCG の免疫賦与能が適量の RNA を添加することによって増強されること、即ち BCG ワクチンに対して RNA が Adjuvant 作用を有することを窺い知ることができる。しかもここで特に指摘されることは添加 RNA 量と Adjuvant 効果との関連性の問題である。そこで著者らは RNA の BCG ワクチンに対する Adjuvant 効果を添加 RNA の量的面からさらに精しく検討を行なった。第II, 及び第III表はそのような実験例のなかから、ワクチン接種から感染までの期間をそれぞれ1週間及び2週間とした実験の成績を示したものである。

(2) 第II表実験では、無処置対照群マウスが感染後30日までに 18/22 (81.8%) の死亡数を示し、40日以内に全員が死亡 (平均生存日数, 21.3) したのに対して、単独ワクチン接種群のこれに相当する死亡数はそれぞれ 6/21 (28.6%) 及び 17/21 (81%) で全員死亡までには50日を要した (平均生存日数, 35.0) のであって、この実験では BCG 接種による延命効果は感染後30日間における生存動物数の増加として特に顕著に認めることができる。ところで RNA 10 mg, 1 mg, 0.1 mg, 0.01 mg 0.001 mg 添加ワクチン接種のマウス群 (第1~第5群) では、この表から明らかなように、全群において生存日数は甚だしく増加しており、これら RNA 加ワクチンの延命効果は、まさに単独ワクチンを凌駕する勢を示した。なかでも特に RNA 0.1 mg 及び 0.01 mg を加えた場合の BCG の免疫効果の増大は最も顕著であって、例えば、感染後30日及び40日までの死亡数は第3群ではそれぞれ 2/21 (9.5%) 及び 14/21 (66.7%); 第4群ではそれぞれ 1/20 (5%) 及び 10/20 (50%) であって、これを第6及び7群のそれと比較すれば延命効果の大きいことは一目瞭然である。

(3) 第III表はワクチン接種から感染までの期間を2週間とした実験の成績であるが、この場合でも上記第II実験とほぼ同様の結果が得られた。即ち感染後30日以内の死亡数を対照群と

ワクチン接種群とについて比較するに、対照群, 13/20 (65%); 単独ワクチン群, 5/18 (27.8%); RNA 0.001 mg 加ワクチン群, 6/17 (35.3%); RNA 0.01 mg 加ワクチン群, 5/16 (31.2%); RNA 0.1 mg 加ワクチン群, 0/19 (0%);

考

上に述べた3実験はいずれも皆BCGの免疫効力がRNAの添加によって増強されること、換言すればRNAにAdjuvant作用のあることを示したものである。そしてこれらの実験に共通して観察されたことは、RNAのAdjuvant効果がRNA量によって大きく影響される——ここに適用された条件下では0.1mg程度のRNAが最適である——ということである。

Merritt等²⁾は核酸のAdjuvant作用として流血中における抗体の早期出現を認めている。著者らの実験でも第II表に示したように、ワクチン接種から結核菌感染までの期間をわずか1

結

マウスの結核感染に対するBCGの免疫効果が適量の酵母リボ核酸をワクチンに添加するこ

文

- 1) Rammon, G., Classiques, A., Richon, R. and Gerbeaux, C., *Compt. rend.*, 235, 111, 1952, cited from *Chem. Abstr.*, 47, 195h, 1953.

RNA 1 mg 加ワクチン群 1/14 (7.1%); RNA 10 mg 加ワクチン群 6/14 (42.8%) であって、BCG接種による延命効果がRNA 0.1 mg 及び1 mg 添加によって著明に増強されたことがわかる。

察

週間にした場合でもRNAによるBCG免疫力の増強は非常に顕著であって、RNAがワクチン接種から免疫成立までのInduction periodの短縮をもたらしたものと考えられる。

さて、このようなRNAのAdjuvant作用が如何なる機序によるものかについては種々論議されてはいるが、今日なお定説はない。殊に著者らの実験では、Merritt等²⁾の研究と異なっていて、使用したRNAが被免疫体動物と生物学的には全く類縁関係のない酵母由来のものであったことは、RNAのAdjuvant作用の機序問題に関連して大いに注目されねばならない。

論

とによって増大されることが実証された。

献

- 2) Merritt, K. and Johnson, A. G., *J. Immunol.*, 94, 416, 1965.

Table I Effect of yeast ribonucleic acid on BCG vaccination
against one-month-later infection with H37Rv

Group No.	Vaccine	Cumulative mortality (%) of mice at the following intervals after challenge infection (days)						Average survival time (days)
		20	40	50	60	90	120	
I	1 mg BCG added with 10 mg RNA	11/20 (55)	18/20 (90)	20/20 (100)				23.1
II	1 mg BCG added with 1 mg RNA	5/21 (23.8)	19/21 (90.4)	20/21 (95.3)	21/21 (100)			26.9
III	1 mg BCG added with 0.1 mg RNA	3/29 (10.3)	20/29 (70)	20/29 (70)	20/29 (70)	25/29 (86.2)	* S ₄	47.0
IV	1 mg BCG	12/31 (38.7)	27/31 (87.1)	29/31 (93.5)	29/31 (93.5)	31/31 (100)		28.4
V	Non-treated controls	17/35 (48.6)	35/35 (100)					23.4

* S = Mice were surviving at the indicated day of termination of experiment.

Table II Effect of yeast ribonucleic acid on BCG vaccination
against one-week-later infection with H37Rv

Group No.	Vaccine	Cumulative mortality (%) of mice at the following intervals after challenge infection (days)							Average survival time (days)
		30	40	50	80	90	100	110	
I	BCG added with 10 mg RNA	4/20 (20)	13/20 (65)	19/20 (95)	19/20 (95)	20/20 (100)			38.4
II	BCG added with 1 mg RNA	3/21 (14.3)	12/21 (57.2)	17/21 (81)	20/21 (95.3)	20/21 (95.3)	21/21 (100)		43.8
III	BCG added with 0.1 mg RNA	2/21 (9.5)	14/21 (66.7)	16/21 (76.3)	20/21 (95.3)	20/21 (95.3)	20/21 (95.3)	21/21 (100)	43.3
IV	BCG added with 0.01 mg RNA	1/20 (5)	10/20 (50)	15/20 (75)	17/20 (85)	18/20 (90)	20/20 (100)		46.1
V	BCG added with 0.001 mg RNA	3/21 (14.7)	13/21 (61.9)	15/21 (71.5)	21/21 (100)				41.9
VI	BCG	6/21 (28.6)	17/21 (81)	21/21 (100)					35.0
VII	Non-treated controls	18/22 (81.8)	22/22 (100)						21.3

Table III Effect of yeast ribonucleic acid on BCG vaccination against two-weeks-later infection with H37Rv

Group No.	Vaccine	Cumulative mortality (%) of mice at the following intervals after challenge infection (days)						Average survival time (days)
		30	50	70	110	130	135	
I	BCG added with 10 mg RNA	6/14 (42.8)	11/14 (78.6)	11/14 (78.6)	12/14 (85.7)	13/14 (92.8)	S* 1	47.4
II	BCG added with 1 mg RNA	1/14 (7.1)	9/14 (64.3)	13/14 (92.8)	14/14 (100)			44
III	BCG added with 0.1 mg RNA	0/19 (0)	7/19 (36.8)	11/19 (57.9)	14/19 (73.7)	17/19 (89.5)	S 2	68.6
IV	BCG added with 0.01 mg RNA	5/16 (31.2)	13/16 (81.3)	14/16 (87.5)	16/16 (100)			39.6
V	BCG added with 0.001 mg RNA	6/17 (35.3)	10/17 (58.9)	12/17 (71.6)	14/17 (81.4)	15/17 (88.3)	S 2	43.9
VI	BCG	5/18 (27.8)	15/18 (83.4)	15/18 (83.4)	17/18 (94.5)	17/18 (94.5)	S 1	43.9
VII	Non-treated controls	13/20 (65)	17/20 (85)	18/20 (90)	19/20 (95)	19/20 (95)	S 1	35.4

*S = Number of surviving animals at 135th day after the challenge infection.