

遅発型皮膚反応の発現機序に関する研究

— Alum および *Bordetella pertussis* の adjuvant 効果の検討 —

金沢大学結核研究所細菌免疫部 (主任: 西東利男教授)

越 沢 み ち 子
佐 々 木 静
鷹 西 道 雄
佐 藤 次 雄

(受付: 昭和41年 4月25日)

緒 言

体液性抗体 (抗体) の産生には抗原を単独で動物に投与するより各種 adjuvant とともに投与することがきわめて有効であることはすでに周知のところである. adjuvant としては Freund's type adjuvant¹⁾, alum²⁾, *Bordetella pertussis*³⁾ あるいは endotoxin⁴⁾ などが常用されている. しかしながらこのような方法によらなくてもある状態下の動物において抗体の増産をもたらすことはすでに2~3の研究者の指摘しているところである. すなわち Diens ら⁵⁾ は結核病巣内に, Good et al.⁶⁾ はツベルクリン反応陽性動物の静脈内に old tuberculin とともに, Sterzl⁷⁾ は human serum albumin (HSA) in lipid adjuvant を注射後静脈内に HSA とともに, それぞれ抗原を注射すると抗体産生の増強が認められるという. また Humphrey & Turk⁸⁾ は Freund's type complete adjuvant で感作された動物に diphtheria toxoid を混合した PPD をもって皮膚反応をじゃっ起させると antitoxin の強い増産が認められると報告している. これらの中で抗体の増産以外に遅発型皮膚反応

の発現を認めているのは Freund's type adjuvant を用いたものと, Diens ら⁵⁾ であって他のもはこの点にふれていない. しかるに即時型皮膚反応と遅発型皮膚反応の発現機序に関し二つの異なる見解があり, その1つは両者は同一抗原に対し感作位相の差によって生ずる同一機序の異なる表現であるとし他は両者は全く異なる機序によるとしている. いずれにおいても決定的な根拠は提供されていない現況であって遅発型皮膚反応発現と抗体産生との関連性の解明はアレルギー学分野での重要研究課題である. 著者の1人は先に抗体の増産をみたという Humphrey & Turk⁸⁾ の方法が遅発型皮膚反応の発現をもたらさないことを実証したが⁹⁾ 今回は広く抗体増産効果の認められている alum および *Bordetella pertussis* adjuvant 法の遅発型皮膚反応発現効果について検討を加えた. その結果遅発型皮膚反応じゃっ起因子と抗体との間に必須な関係が認められず, 両者は別個の機序により発現することを示唆する成績がえられた. 以下はその概要を述べる.

実験材料ならびに実験方法

I. 実験材料

a) 実験動物: 一定期間一定条件下で飼育した体重

400gm 前後の健常モルモットを使用した.

b) 抗原

- (i) 免疫用抗原: 精製ニワトリ卵白アルブミン (HEA) を用いた.
- (ii) 皮膚反应用抗原: HEA および越沢ら¹⁰⁾に準じて作った o-aminophenol azo-HEA, p-aminobenzoic acid azo-HEA を用いた.

II. 実験方法

a) 免疫方法

- (i) HEA 単独注射: HEA の 0.25mg/ml 生食水溶液を 4 足臍におのおの 0.1 ml ずつ注射した.
- (ii) HEA precipitated with alum 注射 (HEA with alum と略称): HEA の 2 mg/ml 生食水溶液を作り, その 5 ml (HEA 10 mg) をとり, これに蒸留水 15 ml と 10% カリ明パン [Al K (SO₄)₂ · 12 H₂O] 溶液 18 ml を加えて静かに攪拌し, 2 N-NaOH 溶液で pH を 7.4 に調整, 白色沈澱をうる. これを 4°C 15 分間, 4000 rpm で遠心し, えられた沈澱を 0.1% マーゾニン加生食水で 2 回洗浄した後, 80 ml の生食水に懸濁させる. (HEA の 0.1 mg/0.8 ml 溶液となる) これを 4 足臍にそれぞれ 0.2 ml ずつ注射した.

- (iii) *Bordetella pertussis* 菌液加 HEA の注射:

Bordetella pertussis 18-323 株 (phase I) を Bordet-Gengou 平板培地 (ウサギ血液 20% 含有) に 48 時間培養した後, 0.1% マーゾニン加生食水で集菌し浮遊液をえた. この菌浮遊液 0.5 ml (5 × 10⁹ 個の菌を含む) に 1 mg/ml HEA 生食水溶液 0.1 ml と生食水 0.2 ml を加え, その 0.2 ml ずつそれぞれ 4 足臍に注射した.

- (iv) HEA in FCA 注射: 谷口¹⁴⁾に準じて行なった.

b) 皮膚反応

多田¹¹⁾および著者⁹⁾の方法に準じて行なった.

c) 沈降反応 (PPT)

- d) passive cutaneous anaphylaxis (PCA) はいずれも多田¹¹⁾および谷口¹⁴⁾の方法に準じて行なった.

e) anaphylaxis (AN)

抗原溶液 (10 mg/ml) 1.0 ml を心臓内に注射した.

不安状態, 鼻をかく, クシャミをする, 毛を立てる, 排尿脱糞などの症状を呈するものから衝撃死に至るものまでを含めた.

実験成績

1. HEA 単独注射群における成績

表 1 はその成績を示したものである. HEA 単独注射後は HEA を Freund's type adjuvant とともに投与した後みられるような遅発型皮膚反応 (DHS) の発現はない. しかし注射後 5~10 日の間に全く硬結を伴わないきわめて淡い境界不鮮明な発赤を示す反応 (以下 DHSL と略記する) を生ずるものがみられた. 即時型皮膚反応 (IHS) は注射 10 ないし 12 日後より認められはじめ, その頃より PPT, PCA および AN も証明されるに至った.

2. HEA in FCA 注射群における成績

表 2 にその成績を示した. 注射 4 日後よりすでに明瞭な DHS および注射 10 日後よりすでに明瞭な IHS の発現が認められ, 谷口¹⁴⁾ および多田¹¹⁾ の報告を再確認した. PPT および PCA は HEA 単独注射群に比し明らかな早期出現が

実証された.

3. *Bordetella pertussis* HEA 注射群における成績

表 3 にその成績を示した. これによると HEA 単独注射群に比し DHSL はいくらか強いようであるが, DHS の発現はやはりみられなかった. HEA 単独注射群と顕著に異なる点は PPT, PCA および AN が注射後 8 日目より認められること, IHS もこれに準じて早期に出現しその程度も強いことであつた.

4. HEA with alum 注射群における成績

表 4 にその成績を示した. ここでも明らかに IHS, PPT, PCA および AN の早期出現が認められた. しかして DHSL 一時に境界の鮮明なものがあつた—は 4 日後よりみられたが, ついに DHS の発現は認められなかった.

5. 抗体価について

上記4群について注射12日後の血清について沈降抗体価(PPT価)およびPCAをしゃっ起する最高希釈度(PCA価)を比較した。(表1~4参照)HEA単独注射群では、それぞれ<1:1—1:1および1:1—1:4, *Bordetella pertussis* 加HEA注射群ではそれぞれ1:8—

1:8 および 1:32—1:64, HEA with alum 注射群では1:32 および 1:128—1:256, HEA in FCA 注射群では 1:32—1:64 および 1:256—1:256であった。このことは *Bordetella pertussis* および alum の体液性抗体増産効果を明らかに示している。

総括ならびに考案

Alum あるいは *Bordetella pertussis* の体液性抗体産生に対する adjuvant 効果はすでに実証されているところであるが²³⁾ その遅発型皮膚反応発現への効果の有無については全くふれられていない。現在のところ遅発型皮膚反応を人工的に発現させる手段としては微量の可溶性抗原の皮内注射¹²⁾、抗体過剰域でつくられた抗原抗体複合体の皮内注射¹³⁾あるいはこれらを Freund's incomplete or complete adjuvant¹⁾ とともに注射することなどが知られている。しかしながら抗原単独の皮内注射、抗原を FIA または FCA とともに投与した場合にみられるそれぞれの遅発型皮膚反応の間はかなり相違のみられることは谷口¹⁴⁾ および多田¹⁵⁾ らも指摘しており、著者の一人⁹⁾ もすでに確認しているところである。すなわち可溶性抗原単独投与および FIA 法によると注射数日後より遅発型皮膚反応(早期型)がみられ、さらに数日後より即時型皮膚反応が出現する。即時型皮膚反応の出現後遅発型皮膚反応は認められなくなる。一方 FCA 法によると前二者と同様経過で両皮膚反応が出現するが、即時型皮膚反応の出現後もなお遅発型皮膚反応(ツベルクリン型)

が持続する。また抗原単独投与により招来されるのは硬結を伴わない多くは境界の不鮮明な淡い発赤を示す反応(以下このような反応を DHSL と仮称する)であって、FIA または FCA 法によって早期に発現するような境界鮮明な明瞭な発赤を示す反応(以下早期型 DHS)ではない。DHSL と FIA 法あるいは FCA 法でみられる早期型 DHS が量的差異の表現であるのか、あるいは質的に異なる反応であるのかはさらに検討を要するところであろう。しかしながらこのような観点に立って alum あるいは *Bordetella pertussis* の adjuvant 効果をみると DHSL の発現増強を主体としており、ツベルクリン型 DHS の発現には貢献していない。一方体液性抗体の顕著な増産への効果は両者において明らかであり、ことに alum の場合には FCA 法のそれと差を示さないというきわめて示唆に富む成績がえられた。ここにツベルクリン型 DHS は体液性抗体増産に必須な免疫過程であるとは考えがたい重要な知見もたらされた。DHSL が体液性抗体の前提となっているのか否かの解明にはまた別な検索が必要と思われる。

結 論

alum あるいは *Bordetella pertussis* の体液性抗体産生への adjuvant 効果は Freund's type complete adjuvant に比肩しうるにもかかわらず、ツベルクリン型皮膚反応発現への

効果は認められなかった。このことからツベルクリン型皮膚反応と即時型皮膚反応の発現機序の独自性を推測した。

文 献

- 1) Freund, J. and McDermott, K. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49, 548, 1942.
- 2) Glenny, A. T. et al. : J. Path. Bact., 29, 31, 1926.
- 3) Farthing, J. R. : Brit. J. Exp. Path., 42, 614, 1961.
- 4) Johnson, A. G. et al. : J. Exp. Med., 103, 225, 1956.
- 5) Diens, L. and Schoenheit, E. W. : J. Immunol., 14, 9, 1927.
- 6) Good, R. A. et al. : Fed. Proc., 16, 415, 1957.
- 7) Sterzl, J. : Experimentia, 16, 518, 1960.
- 8) Humphrey, J. H. and Turk, J. L. : Immunology, 6, 119, 1963.
- 9) 佐々木 静 : 金大結研年報, 24(上), 27, 1966.
- 10) 越沢みち子, 他 : 金大結研年報, 23(下), 143, 1966.
- 11) 多田信平 : 金大結研年報, 24(上), 17, (1966)
- 12) Jones, T. D. and Mote, J. R. : cf. J. Exp. Med., 108, 823, 1958.
- 13) Uhr, J. W. et al. : J. Exp. Med., 105, 11, 1957.
- 14) 谷口恭子 : 金大結研年報, 23(下), 149, 1966.

Table 1. Development of skin hypersensitivity and production of humoral antibodies after injection of antigen alone

Sensitization (S)	Days after S	Animal No.	Reaction				
			DHS	IHS	PPT	AN	PCA
HEA alone	5	1	-	-			
		2	±	-			
	7	3	±	-			
		4	-	-			
		5			-	-	-
		6			-	-	-
	9	7	±	-			
		8	±	-			
		9			-	-	-
		10			-	-	-
	10	11	-	-			
		12	±	+			
		13			-	+	+
		14			±	+	+
	12	15	-	+			
		16	-	+			
		17			-	+	+(1)
		18			+(1)	+	+(4)

note ; HEA = hen egg albumin
DHS = delayed skin reaction
IHS = immediate skin reaction
PPT = precipitation reaction
AN = anaphylaxis
PCA = passive cutaneous anaphylaxis

Numerals in () = reciprocal of terminal serum dilution showed positive reaction

Table 2. Development of skin hypersensitivity and production of humoral antibodies after injection of antigen emulsified with FCA

Sensitization (S)	Days after S	Animal No.	Reaction			
			DHS	IHS	PPT	PCA
HEA in FCA	4	1	++	-		
		2	+	-		
	7	3	##	-		
		4	##	-		
	8	5			-	+
		6			+	+
		7			+	+
	10	8	++	++		
		9	##	##		
	12	10			+(32)	+(256)
		11			+(64)	+(256)
	14	12		##	##	
		13		++	++	

Table 3. Development of skin hypersensitivity and production of humoral antibodies after injection of antigen with *Bordetella pertussis*

Sensitization (S)	Days after S	Animal No.	Reaction				
			DHS	IHS	PPT	AN	PCA
HEA with <i>Bordetella pertussis</i>	3	1	-	-			
		2	-	-			
		3	-	-			
		4	-	-			
	4	5	±	-			
		6	±	-			
		7	-	-			
		8	±	-			
	5	9	±	-			
		10	±	-			
		11			-	-	-
		12			-	-	-
	7	13	±	-			
		14	±	-			
		15			-	-	-
		16			-	-	-
	8	17			-	+	-
		18			±	+	+
	9	19	-	+			
		20	-	+			
		21			+	+	+
		22			-	+	+
	10	23			+	+	+
		24			+	+	+
	12	25	-	+			
		26	-	++			
		27			+(8)	+	+(64)
		28			+(8)	+	+(32)
	14	29	-	++			
		30	-	++			
	21	31	-	+			
		32	-	+			

Table 4. Development of skin hypersensitivity and production of humoral antibodies after injection of antigen precipitated with alum

Sensitization (S)	Days after S	Animal No.	Reaction				
			DHS	IHS	PPT	AN	PCA
HIEA with alum	3	1	-	-			
		2	-	-			
		3	-	-			
		4	-	-			
	4	5	+	-			
		6	+	-			
		7	+	-			
		8	+	-			
	5	9	+	-			
		10	+	-			
		11			-	-	-
		12			-	-	-
	7	13	+	-			
		14	+	-			
		15			-	-	-
		16			-	-	+
	8	17			-	+	+
		18			±	+	+
	9	19	-	++			
		20	-	++			
		21			+	+	+
		22			+	+	+
	10	23			+	+	+
		24			+	+	+
	12	25	-	++			
		26	-	++			
		27			+(32)	+	+(128)
		28			+(32)	+	+(256)
	14	29	-	++			
		30	-	++			
	21	31	-	++			
		32	-	++			