

原 著

BCG 生菌大量静注によつて誘導される suppressor adherent 細胞

I) *In vitro* における遅延型反応抑制の解析

加 藤 一 之

北海道大学免疫科学研究所細菌感染部門

受付 昭和 55 年 6 月 4 日

INDUCTION OF SUPPRESSOR ADHERENT CELLS BY INJECTING
HEAVY DOSE OF LIVE BCGI. In Vitro Analysis of Suppression of BCG Cell Wall Induced
Delayed Type Hypersensitivity

Kazuyuki KATO*

(Received for publication June 4, 1980)

Previous injection of live BCG in mice produced a suppression of delayed hypersensitivity induced by oil-treated BCG cell walls (CW). This phenomenon was analyzed by the macrophage migration inhibition (MI) test in which peritoneal exudate cells (PEC) from live BCG-injected mice were mixed with PEC from BCG CW-immunized mice, and observed the former's suppression on the MI activity of the latter. The author examined the cell population involved in this suppression and found that the adherent cells of PEC did possess a suppressive effect which was retained even after treatment with either anti-mouse Ig serum or anti-brain associated θ antigen serum. This suggests that the suppressor cell may belong to macrophage compartments.

Furthermore, whether or not the suppression of delayed-type hypersensitivity by the pretreatment with live BCG is antigen-specific was examined in mice immunized with heat-killed *Listeria monocytogenes*. As a result, the live BCG-pretreatment produced a significant suppression of footpad response induced with *Listeria* antigen, suggesting that this suppression is not-antigen-specific.

I. 緒 言

免疫学の進歩と共に、今日、アジュバント活性を有する物質は数多く見出されているが中でも古くから最もよく知られているのは、Freund's complete adjuvant としての結核菌であろう。結核菌、特に BCG は生菌、死菌を問わず強力な immunopotentiator として免疫の実験のみならず、臨床においても一部で腫瘍の免疫療法に用いられている。

しかしながら、著者は BCG 細胞壁(CW) で誘導され

る遅延型反応が、あらかじめ BCG で前処置しておく、増強されずに逆に抑制されることを見出した。この現象について遅延型反応の *in vitro* の示標とされている Migration Inhibition (MI) assay を用いて、その抑制の機構を追究した。

II. 材料と方法

1) 動物：近交系マウスは国立遺伝研から分与をうけ、当研究所で繁殖している C3H/HeMs (C3H)、雄雌 6～10週齢を用いたが、個々の実験は性、週齢をそろえて行

* From the Division of Bacterial Infection, Institute of Immunological Science, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060 Japan.

なつた。

2) BCG: BCG は日本株を使用した。ソートン培地で8~10日間培養したものを生理食塩水で2回洗い、型のごとく水晶玉入りコルベンで磨砕し生理食塩水に浮遊させ、使用まで -70°C に保存した。使用時に室温で融解し、マウス1匹当たり約 10^8 Colony Forming Unit (CFU) 投与した。死菌作製には、これをコッホ釜で100°C, 30分間加熱した。

3) 抗原: BCG CW および BCG-protoplasm は米国 NIH, Rocky Mountain Laboratory の Dr. E. Ribi より、また PPD は西ドイツ Robert Koch 研究所の Dr. W. Brehmer よりそれぞれ供与を受けた。Listeria monocytogenes (Listeria) (EGD 株) はブレインハートインヒュージョン培地 (ニッスイ) で3日間培養したものをコッホ釜で100°C, 30分間加熱して死菌とした。そして、これを蒸留水でよく洗った後、乾燥させた。また Listeria の protoplasm は米国 Trudeau 研究所製のものを使用した。

BCG CW ワクチンの作製は、W. Brehmer¹⁾の方法に従った。その方法を要約すると、BCG CW に鉱油油の Drackeol-6VR を添加、充分に磨砕した後、oil の濃度が1%になるように 0.2% Tween saline に浮遊させ、oil-in-water (o/w) とする。Listeria で感作する際には、Freund's incomplete adjuvant と混合して、water-in-oil (w/o) として使用した。

4) 遅延型感作方法及足蹠反応: BCG CW (o/w) をマウス1匹当たり 300 μ g を注射量 0.2 ml として頸部皮下に感作し、4週後、生理食塩水 0.05 ml に含ませた PPD 10 μ g を左足蹠に、右足蹠には対照として生理食塩水を同量注射した。24時間後、ダイヤルゲージで両方の足蹠の厚さを測定し両方の足蹠の差をもつて腫脹の程度を表した。Listeria で感作する際には、Listeria (w/o) 1 mg を皮下に接種、9日後に Listeria protoplasm 10 μ g で PPD と同様の方法で足蹠反応を調べた。個々の実験条件にマウス6匹を使用した。

5) 脱感作血清: この血清の作製は K. Yamamoto²⁾の方法に従った。すなわち、C3H マウスに BCG CW (o/w) 300 μ g ずつ頸部皮下、および静脈にそれぞれ接種して40日後に生理食塩水に浮遊した BCG-protoplasm をマウス1匹当たり 500 μ g を静注した。静注24時間後に採血し、血清を集め 56°C, 30分間加温、非動化して脱感作血清として使用した。また BCG-protoplasm の代わりに生理食塩水を静注して得た血清を対照血清とした。

6) 抗血清: 抗 Brain associated θ 抗原 (抗 BA θ) の作製は E. S. Golub³⁾の方法に従った。すなわち、C3H マウスの脳細胞を Freund's incomplete adjuvant と共に家兎を1週おき3回免疫して得た血清を 56°C, 30分間加温、不活化し、この血清と packed cell として等量のマウス赤血球および肝細胞を用いて室温で1時間、2回、

吸収した。また抗マウス Ig 血清はマウスのプール血清を硫酸ナトリウムで沈殿後、更に 0.04 M リン酸緩衝液 pH 8.0 の DEAE セルロースカラムを通過して得た蛋白を Freund's complete adjuvant と共に家兎に免疫して作製した。この抗血清も不活化後、等量のマウス赤血球の packed cell で室温、1時間、2回、吸収して使用した。

7) MI 活性: 腹腔浸出細胞 (PEC) を採集する3日前に 12% Casein sodium (半井化学) Saline をマウス1匹当たり 3 ml ずつ腹腔に注射した。PEC 採集にはマウスを頸椎脱臼して屠殺し、直ちに腹腔にハンクス液 3 ml 注射し、腹部をよくマッサージした後、注入ハンクス液を回収した。このようにして採集した PEC に赤血球が混入していた場合は 0.83% 塩化アンモニウム-トリス緩衝液で赤血球を溶解した。いずれの場合も、ハンクス液で3回 PEC を洗った。この PEC を毛細管につめ、Sykes-Moore 型チャンバーを用いて PPD 50 μ g/ml を含む Eagle's Minimum Essential Medium (MEM) (千葉血清研究所) および対照として PPD 非添加培地でそれぞれ24時間遊走させた。MI 活性は次のように%遊走阻止で表した。

$$\%遊走阻止 = \frac{\text{PPD 添加培地の PEC の遊走面積}}{\text{PPD 非添加培地の PEC の遊走面積}} \times 100$$

通常、毛細管は各サンプルにつき4本を用いて毛細管の断端からの細胞遊走面積を測定し、MI 活性の有意差は Student t テストで検定を行なつた。

III. 結果

1. BCG 生菌、あるいは死菌前処置の BCG CW 遅延型感作に及ぼす影響

BCG CW でマウス頸部皮下に感作する3週間前に、BCG 生菌、あるいは死菌を腹腔 (ip) と静脈 (iv) にそれぞれ投与した。そして BCG CW 感作4週後に足蹠反応を行なつた。図1に示したように生菌前処置の場合は ip, iv 投与共に対照に比べて有意に足蹠反応は抑制を示した。一方、死菌の場合は ip 投与では抑制はみられなかつたが、iv 投与では著明な抑制がみられた。この際、これらの足蹠反応が抑制された群の PEC の MI 活性を調べてみると、生菌前処置による足蹠反応抑制群の MI 活性は ip 投与群で 92.0%, iv 投与群では 96.4% と明らかに低下しており *in vivo* と *in vitro* の現象は一致していた。しかし、死菌静注による足蹠反応抑制群の PEC の MI 活性は存在し、*in vivo* と *in vitro* の現象は一致しなかつた。

2. BCG CW 感作マウス PEC と BCG 生菌、あるいは死菌静注マウス PEC と等量混合した際の MI 活性

BCG CW 感作4週後の PEC (CW-PEC) と BCG 生菌、

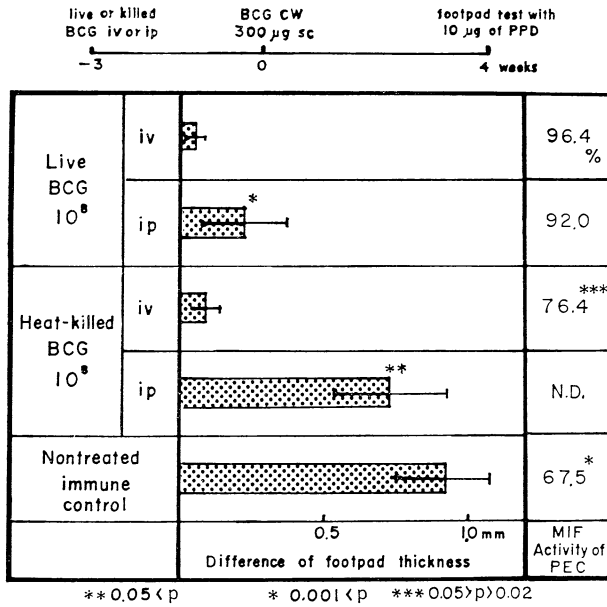


Fig. 1. DTH responses in C3H mice sensitized with BCG CW. C3H mice were injected by the live or heat-killed BCG iv, ip 3 weeks before the immunization with BCG CW. Footpad thickness was measured four weeks after the immunization with BCG CW. MI activity of PEC was estimated by the per cent migration of the cells.

ND : Not done

Table 1. Inhibitory Effect of PEC from Live BCG-injected Mice on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized Mice

PEC from	Mixed with PEC from	MI activity (%)
Mice ^{a)} immunized subcutaneously with 300 μg of oil-treated BCG CW	—	63.8*
	Normal mice	55.6*
	Live BCG-injected mice ^{b)}	124.1
	Killed BCG-injected mice ^{b)}	62.7*
Live BCG-injected mice ^{b)}		85.1**
Killed BCG-injected mice ^{b)}		112.5

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) These mice were injected intravenously with 10⁸ live or heat-killed BCG 3 weeks before cell harvest.

* p < 0.001

** 0.1 > p > 0.05

あるいは死菌を静注3週後の PEC (L-BCG-PEC あるいは K-BCG-PEC) を等量混合して MI 活性を調べた。この結果を表 1 に示した。CW-PEC 単独では 63.8% と活性はみられ、これに正常マウスの PEC(N-PEC) を等量加えても 55.6% と MI 活性は存在した。しかし、L-BCG-PEC を加えると MI 活性は 124.1% と消失した。一方、K-BCG-PEC を加えても MI 活性は 62.7% と消失しなかつた。

3. CW-PEC の MI 活性を抑制する L-BCG-PEC 中の細胞の性質

前の実験で明らかにされた CW-PEC の MI 活性を抑制する L-BCG-PEC 中の抑制に働く細胞の性質を調べるために、L-BCG-PEC を plastic adherent 細胞と non-adherent 細胞に分けた。plastic dish は米国 Falcon 社の #3003 を使用した。L-BCG-PEC を monolayer になるように dish にまき、炭酸ガス培養器で 2 時間培

Table 2. Inhibitory Effect of Adherent PEC from Live BCG-injected Mice on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized Mice

PEC from	Mixed with	MI activity
Mice ^{a)} immunized subcutaneously with 300 μ g of oil-treated BCG CW	PEC from normal mice	64.7 [*]
	PEC from live BCG-injected mice ^{b)}	110.3
	Adherent PEC from live BCG-injected mice	115.7
	Non-adherent PEC from live BCG-injected mice	73.9 ^{**}

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) These mice were injected intravenously with 10^8 live BCG 3 weeks before cell harvest.

* $p < 0.001$

** $0.01 < p < 0.02$

Table 3. Inhibitory Effect of Adherent PEC from Live BCG-injected Mice after Various Treatment on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized Mice

PEC from	Mixed with	MI activity
Mice ^{a)} immunized subcutaneously with 300 μ g of oil-treated BCG CW	Adherent PEC from normal mice	53.3 [*]
	Adherent PEC from live BCG-injected mice ^{b)}	112.8
	Anti-Ig treated adherent PEC from live BCG-injected mice	95.4
	Anti-BA θ treated adherent PEC from live BCG-injected mice	92.1

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) These mice were injected intravenously with 10^8 live BCG 3 weeks before cell harvest.

* $p < 0.001$

養した。そして、adherent 細胞と non-adherent 細胞をそれぞれ集めた。adherent 細胞を集める際にラバーポリスマンを使用した。CW-PEC にこれらの細胞を等量混合して MI 活性を調べた。表 2 に示したように、non-adherent 細胞を加えた場合、73.9% と活性はみられたが、adherent 細胞を加えた場合は 115.7% と活性はみられなかった。更に、この adherent 細胞を抗マウス Ig(NaN₃ の存在下) および抗 BA θ とモルモット補体 (Nobel agar で吸収) で処置し、同様に抑制効果を調べた。表 3 に示したように、これらの処置を行なつても MI 活性はそれぞれ 95.4, 92.1% で抑制効果を依然として保持していた。なお、adherent 細胞の抗マウス Ig、および抗 BA θ の処置後の細胞を、抗マウスおよび抗 BA θ の抗血清をそれぞれ fluorescein isothiocyanate で標識して、蛍光抗体法で調べた結果、染めえた細胞は見出せなかった。

4. L-BCG-PEC の Migration Inhibition Factor (MIF) に対する感受性

先の実験で CW-PEC と L-BCG-PEC を等量混合した際の MI 活性はみられなかったことを示した。この現象は CW-PEC の感作 T 細胞が PPD の存在で MIF を分泌したとしても、L-BCG-PEC が MIF に感受性が

ないために遊走し、みかけ上、MI 活性の消失をもたらしたことも否定できない。そこで、L-BCG-PEC の MIF に対する感受性を調べるために MEM に 15% の割で加えた MIF を多量に含む脱感作血清²⁾ と、その対照血清の存在下で L-BCG-PEC を 24 時間遊走させ、遊走面積比を調べた。表 4 に示したごとく 59.3% で、脱感作血清で有意に遊走が阻止された。この実験から L-BCG-PEC の MIF に感受性を有することは明らかである。

5. BCG 生菌静注前処置されたマウスの Listeria 感作による足蹠反応への影響

BCG 生菌前処置による足蹠反応抑制は抗原特異的か否かを検討するために BCG と抗原性を異にする抗原として Listeria を用いて検討した。BCG 生菌静注 21 日後に、Listeria 1 mg を Freund's incomplete adjuvant と共に皮下に感作し 9 日目に Listeria protoplasm 10 μ g で足蹠反応を行なつた。結果は図 2 に示したように、BCG 生菌前処置群は対照に比べて有意に足蹠反応が抑制した。

IV. 考 案

BCG は強力な immunopotentiator として古くからよく知られている。今回、著者は BCG CW の遅延型感作に際し、あらかじめ大量の BCG 生菌および死菌で前処

Table 4. Sensitivity of PEC from Mice^{a)} Injected iv with Live BCG to MIF

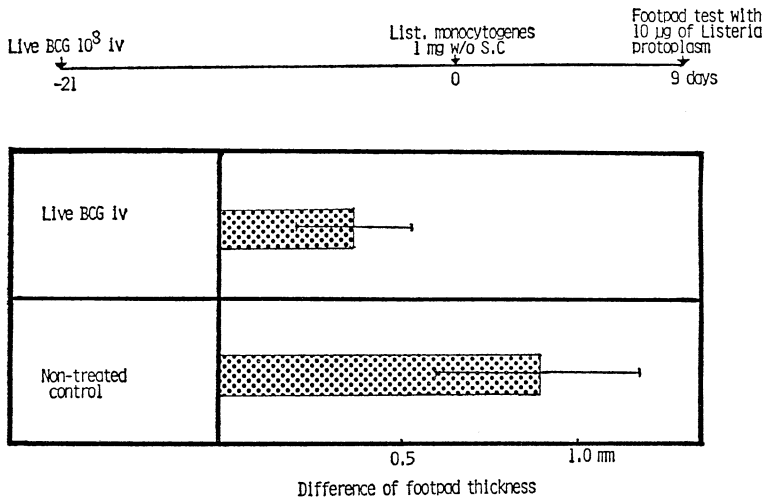
Serum added to MI-test medium	Area of migration of PEC (cm ²)	Percentage of migration
Desensitized serum ^{b)} containing MIF	1.97 ± 0.38	59.3*
Immune control serum ^{c)}	3.25 ± 0.30	

a) These mice were injected intravenously with 10⁸ live BCG 3 weeks before cell harvest.

b) The serum was obtained from BCG CW-immunized mice which had been injected iv with BCG protoplasm 1 day before serum harvest.

c) The serum was obtained from BCG CW-immunized mice without injecting BCG protoplasm.

* 0.001 < p < 0.01



* 0.02 > p > 0.01

Fig. 2. DTH responses in C3H mice sensitized with Listeria. C3H mice were injected with the live BCG iv 3 weeks before the immunization with Listeria. Footpad thickness was measured 9 days after the immunization with Listeria.

置することによって遅延型反応が抑制される現象を認めた。この現象は G. Lamoureux と R. Poisson⁴⁾ によつて報告された現象と類似していると思われる。すなわち、彼らによれば Freund's complete adjuvant と *Candida albicans*, *varidase* あるいは *mumps* でそれぞれ感作されたモルモットは感作後に頻りに BCG 生菌の皮下投与をうけると、PPD のみならず *Candida*, *varidase*, *mumpus* に対する皮膚反応も成立しないという。この現象はいかなる機構によるものか明らかにされていない。著者は BCG 大量生菌前処置によつて起こる遅延型反応抑制の現象を解明するために、遅延型反応の *in vitro* の示標とされている MI assay を用いて解析した。BCG 生菌の ip, iv の前処置によつて足蹠反応が抑制されたマウスの PEC の MI 活性は明らかに低下し、一方 BCG 死菌の iv による前処置では足蹠反応は抑制を示したにもかかわらず MI 活性は消失しなかつたことを見出した。この

現象を解析するため、CW-PEC に L-BCG-PEC および K-BCG-PEC, 更に対照として N-PEC を等量加えて行なつた MI assay の結果は上述の現象をよく説明できるものであつた。さて、CW-PEC は L-BCG-PEC を等量加えた場合にみられた MI 活性の抑制に関して次の2つの可能性が考えられた。

1) CW-PEC 中の感作 T 細胞が PPD の存在下で MIF を分泌していても、L-BCG-PEC が、MIF に感受性がないため遊走し、みかけ上の MI 活性の抑制を来した。

2) L-BCG-PEC 中に抑制細胞が存在し、CW-PEC の MI 活性を抑制した。

そこで、1)の可能性を検討するために L-BCG-PEC の MIF に対する感受性を調べた。表4の結果が示すごとく、MIF を多量に含む脱感作血清²⁾における L-BCG-PEC の遊走阻止が対照血清と比べて明らかに認められ、

L-BCG-PEC の MIF 感受性が明らかにされ、1)の可能性は除外されよう。そこで2)の可能性が強く示唆されることになる。

そこで、L-BCG-PEC 中の抑制細胞を検討するため、まず L-BCG-PEC を plastic adherent と non-adherent 細胞に分けて、いずれの分画に抑制細胞が存在するかを調べた。この結果、adherent 細胞にその存在が認められた。更に、この adherent 細胞を抗マウス Ig および抗 BA θ とモルモット補体で処理したが、この処置に影響を受けなかつた。この結果から、この抑制細胞はおそらく macrophage に属すると考えられる。したがって、BCG 生菌前処置されたマウスにおける BCG CW 感作の足蹠反応抑制には macrophage に属する抑制細胞が関与していることが推察された。この抑制はマウスを BCG 生菌で前処置し、感作抗原に BCG CW を使用しているため、抗原特異的抑制か否かは明らかではない。そこで BCG と抗原性を異にする *Listeria* を感作抗原に使って調べた。その結果、BCG 生菌前処置を受けた群は対照に比して明らかに *Listeria* 感作に対する足蹠反応が抑制された。このことは BCG 大量生菌前処置によつて起こる抑制は抗原非特異的と考えられる。著者は BCG 大量生菌投与によつて PEC に CW-PEC の MI 活性を抑制する adherent 細胞が誘導されることを明らかにしたが、これに類似した実験として、大量の BCG 生菌を ip に投与されたマウスの脾臓中の macrophage が T 細胞の mitogen である Con A や PHA に対する T 細胞の反応を抑制するという報告⁵⁹⁻⁷⁾、更に cytotoxic T 細胞の誘導を抑制するという報告⁶⁾がある。最近 J. Bennet⁸⁾は、このような細胞は骨髄に natural suppressor cell として存在し、BCG 生菌の静注によつて刺激され、脾臓中に放出される可能性を考えている。BCG 生菌以外にも、*Corynebacterium parvum*⁹⁾¹⁰⁾ をマウスに投与することによつて Con A や PHA に対する T 細胞の反応性を抑制する suppressor macrophage が誘導されることや、*Schistosoma mansoni*¹¹⁾ の感染をうけたマウスの脾細胞に cytotoxic T 細胞の反応を抑制する suppressor macrophage の存在が知られている。更にヒトの疾患においてもホジキン氏病¹²⁾¹³⁾、多発性骨髄腫¹⁴⁾、SLE¹⁵⁾、真菌症¹⁶⁾、肺結核¹⁷⁾等におそらく monocyte/macrophage と考えられる免疫反応を抑制する細胞がみられるとの報告がある。このような macrophage の免疫反応抑制は macrophage の抗原 presentation や macrophage activation と並んで興味のある問題であろう。

なお、今回の実験で BCG 死菌を静注前処置することによつても足蹠反応は抑制されたが、PEC 中に MI 活

性を抑制する細胞は見出せなかつた。このことは、BCG 生菌、死菌の静注前処置によつて起こる抑制は互いに異なつた機構によるものと推定される。

BCG 生菌によつて誘導される suppressor adherent 細胞の性質について引続き検討中である。

V. 結 語

BCG CW の感作に際し、あらかじめ大量の BCG 生菌 (10⁸CFU) の投与を受けたマウスの遅延型反応は抑制される。この現象を MI assay を用いて *in vitro* の系で解析を行なつたところ、BCG 生菌静注によつて T 細胞、B 細胞に属さない plastic adherent 細胞が働いていることが推定された。また BCG と抗原性を異にする *Listeria* による感作に対する遅延型反応をも抑制することから、この抑制は抗原非特異的と考えられた。

謝 辞

稿を終るにあたり、ご指導とご校閲を賜りました有馬 純教授、山本健一教授に深謝致します。また、抗マウス Ig、抗 BA θ 血清作製にご教示いただいた柿沼光明助教授、実験にご協力をいただいた大里光子、立花キヨ、栗山静恵諸氏に厚くお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Brehmer, W. et al.: J. Bacteriol., 95 : 2000, 1968.
- 2) Yamamoto, K. and Takahashi, Y.: Nature (New Biol), 233 : 261, 1971.
- 3) Golub, E.S.: Cell. Immunol., 2 : 353, 1971.
- 4) Lamourex, G. and Poisson, R.: The Lancet, 18 : 989, 1974.
- 5) Mitchell, M.S. et al.: Nature (New Biol), 243 : 216, 1973.
- 6) Klimpel, G.R. and Henney, C.S.: J. Immunol., 120 : 563, 1978.
- 7) Tarcotte, R. et al.: Infect. Immun., 21 : 696, 1978.
- 8) Bennett, J.A. et al.: Pro. Natl. Acad. Sci. 75 : 5142, 1978.
- 9) Scott, M.T.: Cell Immunol., 5 : 469, 1972.
- 10) Kirchner, H. et al.: J. Immunol., 115 : 1212, 1975.
- 11) Coulis, P.A. et al.: J. Immunol., 120 : 58, 1978.
- 12) Towomey, J.J. et al.: J. Immunol., 115 : 1212, 1975.
- 13) Goodwin, J.S. et al.: N. Engl. J. Med., 297 : 963, 1977.
- 14) Broder, S. et al.: N. Engl. J. Med., 293 : 887, 1975.
- 15) Markenson, J.A. et al.: Pro. Soc. Exp. Biol. Med., 158 : 5, 1978.
- 16) Stobo, J.D.: J. Immunol., 119 : 918, 1977.
- 17) Ellner, J.J.: J. Immunol., 121 : 2573, 1978.