マウスの免疫応答に及ぼす環境温熱条件の影響

Influence of Ambient Thermal Conditions on the Immune Response in Mice

順天堂大学医学部衛生学教室

菊池 正一

Masakazu Kikuchi

Department of Hygiene, Juntendo University School of Medicine, Tokyo

This article is a summarized report and discussion of a series of experiments carried out to elucidate the many-faceted effects of ambient thermal conditions on change in splenic plaque forming cells(PFC) and humoral antibodies which were chosen as examples of physiological functions. As the results, the following findings were obtained. (1) The effect of thermal environment is more intense just after a change of thermal condition than after acclimation. (2) The adverse effects of high or low ambient temperature do not appear symmetrically as the thermal conditions go up or down from the optimal range. (3) When animals are exposed repeatedly for short period of time to a temperature which would normally exert a suppressive effect on immune response, the results turned out to be stimulative of immune response. (4) In the case of a temperature shift from a moderate to a cold environment, the effect on PFC took place mainly when the shift occurred after immune stimulation, while in the case of temperature shift from a moderate to a hot environment, the effect appeared when the shift took place before immune stimulation and the duration of effect lasted longer. To explain these results an "effective period" in the course of physiological adaptation to the change in ambient temperature and a "susceptible period" in the course of immune response were postulated.

This series of experiments revealed that the effects of ambient temperature on the immune response were not simple but rather multilateral and complicated. Although the thermal environment rarely acts as the specific cause of a disease, more detailed knowledge on the influence of thermal environment will render prevention, diagnosis and treatment of diseases more precise and reliable.

Key words: Ambient thermal condition, Immune response, PFC, Hemagglutination, Hemolytic reaction, Mouse

環境温熱条件, 免疫応答, 脾抗体産生細胞, 赤血球凝集反応, 溶血反応, マウス

はじめに

生活環境の温熱条件が生体の多数の生理的機能に深い影響を与えることは古くから知られており、数多くの研究がなされてきている。

生体諸機能の総合的表現の1つとしての死亡についても環境温度の相違が大きく影響することが知られており¹⁾, また正確なデータを得るために実験動物飼育の際の温度管理の必要性が強調されるもの²⁾, 環境温熱条件が生理的諸機能に及ぼす影響の大きさが認められているからに外ならない。

温熱条件は、大きく分けるとその水準（例えば環境温度の絶対値）と変化（温度変化の幅、速度）の両面の作用がある。更に、暴露の長さ、頻度、また特定の刺激に対する反応への影響をみる際には刺激と温度変化の時間的關係についても観察する必要がある。そこで今回生体防禦機能の重要な役割を担う免疫反応を対象に、環境温熱条件の及ぼす影響をみるため一連の実験を行った。この研究の主眼は生体に及ぼす温熱環境の影響の仕方を多面的に捉えようとするものである。ばう大な範囲に互る免疫反応のうち、対象としてとりあげたのは脾臓の抗体産生細胞数を主に、液性抗体による赤血球凝集

反応と溶血反応に限り、これらが種々の環境温熱条件操作でどのような影響をうけるかを観察した。温熱条件変化によって影響を受ける免疫応答過程の個々のプロセスがどのように変化するかといった免疫学的な追求は行っていない。

実験材料と方法

実験動物

実験動物は ddY 系または C3H/HeNCrj 系雄性 4 週齢のマウス (日本生物材料センター) を用い、25°C、相対湿度 60±5%，明 07:00~19:00、暗 19:00~07:00 の人工気候室内で 3 週間順化後、“環境温熱条件”の項で述べる各温熱条件での実験に供した。固型飼料 CE-2 (日本クレア) と水は自由に摂取させた。

抗原刺激ならびに脾臓中抗体産生細胞数および血中抗体価の測定

新鮮ヒツジ赤血球 (SRBC, 日本バイオテスト研) を生理食塩水で 3 回洗浄後、15% (v/v) の濃度に浮遊させ、これを抗原としてマウス体重 10 g あたり 0.2 ml を腹腔内注射した。抗原刺激後、経日的にエーテル麻酔下でマウス股静脈より採血し、血清を分離した。また、採血後、直ちに脾臓をとり出し、イーグル培地を用いて遊離細胞浮遊液を作成し、抗体産生細胞数の測定に供した。

脾臓中抗体産生細胞数 (PFC) の測定 (直接法) は、Jerne らの方法を改変した Cunningham and Szenberg³⁾ の方法により脾遊離細胞に SRBC とモルモット補体を混合し、Cunningham chamber を用いて測定した。1 検体につき 3 回測定を行い、その平均をとって測定値とした。

血中抗体価は U 字型マイクロタイタープレート内で、分離した血清を倍々希釈し、血球凝集反応 (HA)、溶血反応 (HR) を行ってそれぞれ陽性終末点の希釈倍数を抗体価とした。

有意差検定

対照群と実験群の有意差検定には t 検定を用いた。

温熱環境条件

実験 I. 各温熱環境順化の影響

ddY 系マウスを 8°C の低温および 33°C、35°C、36.5°C の高温環境で 3 週間順化後、それぞれ SRBC で抗原刺激し、経日的に各群につき 10 匹のマウスの PFC、HA 価、HR 価を測定した。25°C の中等温で順化したマウスを対照群とした。

実験 II. 抗原刺激直後での温熱条件変動の影響

ddY 系マウスを 25°C の中等温環境で 3 週間順化した

のち SRBC を用いて抗原刺激した。その後、直ちにマウスを 8°C の低温または 35°C あるいは 36.5°C の高温環境に移動し、経日的に各群 10 匹のマウスの PFC、HA 価、HR 価を測定した。また、逆に 8°C の低温または 35°C、36.5°C の高温環境で 3 週間順化、抗原刺激した直後にそれぞれ 25°C の環境に移動した場合についても同様の実験を行った。いずれの場合についても対照は非移動群、すなわち抗原刺激後もそのまま 25°C あるいは 8°C、36.5°C で飼育したものとした。

実験 III. 免疫応答に影響する高温あるいは低温環境温度変化の範囲

ddY 系マウスを用い、実験 II と同様に、25°C 環境で 3 週間順化したのち、SRBC を用いて抗原刺激した。その後直ちに 33°C、35°C、36.5°C、または 38°C の各高温環境に移動、あるいは 18°C、15°C、10°C、8°C、4°C、2°C、または 1°C の各低温環境に移動し経日的に各群 15 匹のマウスの PFC、HA 価、HR 価を測定し、25°C 非移動対照群のそれと比較した。

実験 IV. 低温または高温反復暴露の影響

ddY 系マウスを用い、25°C 環境で 3 週間順化したのち、SRBC を用いて抗原刺激した。その後、8°C または 36.5°C の暴露温度で、一日の暴露時間を 4 時間と一定し、1 日 4 時間 1 回暴露群、1 日 2 時間 2 回暴露群、1 日 1 時間 4 回暴露群に分け、これらの反復暴露を連日 24 日間繰り返して、各群 10 匹のマウスの PFC、HA 価、HR 価を測定した。対照はこれらの温度非暴露群すなわち抗原刺激後、そのまま 25°C で飼育したものとした。

実験 V. 温熱環境変動の二次免疫応答に及ぼす影響

C3H/HeN マウスをもちいこれまでと同様 25°C 環境で 3 週間順化したのち、15% SRBC 浮遊液で一次抗原刺激を行い、その 2 週間後に同じ濃度の SRBC で二次抗原刺激を行った。この二次抗原刺激の 4 日前から 3 日後までの各日に 1 群 6 匹ずつのマウスを 8°C または 36.5°C の環境に移動した。対照群は移動せず各温熱環境でそのまま飼育した。これらはいずれも二次抗原刺激後 4 日目に間接法による脾臓中抗体産生細胞数 (大部分が IgG-PFC) と 2-Mercaptoethanol (2-ME) 処理後の IgG-HA 価を測定した。

IgG-PFC の測定にあたっては、通常の PFC 測定操作に加えてさらに抗マウス IgG ウサギ血清を添加してインキュベートし、IgG 抗体産生細胞を測定した。また 2-ME 処理後、HA 価の測定にあたっては、血清を 0.2 M 2-ME-Phosphate buffered saline で 8°C、20~24 時間処理した後、通常の HA と同様に倍々希釈し、IgG 抗体に

よる HA 価を求めた。

実験 VI. 温熱条件変動と抗原刺激の時間的關係

C3H/HeN マウスを25°C環境で3週間順化したのち SRBC で抗原刺激を行った。その際、抗原刺激の4日前から3日後の各日に1群6匹ずつのマウスを8°Cまたは36.5°Cの環境に移動した (Fig. 1)。対照群は移動せず各温熱環境でそのまま飼育した。各群ともいずれも抗原刺

激後4日目に PFC と HA 価を測定した。

結果と考察

実験 I. 各温熱環境順化の影響

8°C低温および33°Cまたは35°C高温の各温熱環境条件に3週間順化したマウスの免疫刺激後の PFC, HA, HR は25°C順化マウスに比べてほとんど差がなかった。しかし、36.5°C高温に3週間順化したマウスのそれは25°C順化に比べて免疫反応の全経過を通じて明らかな低下が認められた (Fig. 2, 3)。

実験 II. 抗原刺激直後の温熱条件変動の影響

Fig. 4 上段に抗原刺激直後25°Cから8°Cに移動した場合の PFC, HA, HR を、また Fig. 5 上段に抗原刺激直後25°Cから36.5°Cに移動した場合の PFC, HA, HR を示した。Fig. 4, 5 上段に示したように、免疫応答はいずれも抑制された。特に、PFC はいずれもそのピークが低下しているのに対し HA, HR はピーク値はほとんど25°C対照群と変りないが、免疫応答初期の3日から5日の間に抑制がみられ、HA, HR の血中濃度上昇が遅れていた^{4), 5)}。

Fig. 4, 5 の下段にはそれぞれ抗原刺激直後に8°Cから25°Cに移動した場合と36.5°Cから25°Cに移動した場合の PFC, HA, HR を示した。それぞれ免疫刺激の直後に25°Cの環境にもどすと PFC は上昇し、HA, HR はいずれも血中濃度上昇が早まる傾向がみられた。

低温または高温への移動により、PFC 数は減少するが、血中抗体価は上昇は遅れるもののピークの値はほとんど変わらないという現象の説明として次のことが考えられる。即ち免疫応答の初期には IgM 抗体産生細胞が増加して血中 IgM が上昇し、遅れて IgG 抗体産生細胞数が

Fig. 1 Schedule of experiments to observe the time relationship between temperature shift and immunization.

Fig. 2 PFC, HA and HR titers of 25°C- and 8°C-acclimated mice.

Fig. 3 PFC, HA and HR titer of 33°C and 36.5°C-acclimated mice.

Fig. 4 PFC, HA and HR titers of the mice transferred from 25°C to 8°C and 8°C to 25°C.

Fig. 5 PFC, HA and HR titer of mice transferred from 25°C to 36.5°C and from 36.5°C to 25°C.

増加して血中IgGが上昇することが知られている (Fig. 6)⁶⁾。もし、温熱環境移動によって抑制的に影響をうけるのがIgM産生細胞であり、その際この細胞の数が大幅に抑えられるものとすれば、移動後のPFC総数は対照に比して少なくなる筈であり、一方温熱条件の変化で影響

を受けないIgG産生細胞は正常に増殖してIgG抗体を産生するため、血中抗体価の濃度上昇の立ち上がりは遅れるが、そのピークは対照と変わらないと説明できる⁷⁾。

実験 III. 免疫応答に影響する高温あるいは低温環境温度変化の範囲

一部を Fig. 3 に示した通り、25°C 中等温から高温への移動の場合、免疫刺激後25°Cから33°Cの環境への移動ではほとんど免疫応答に影響がみられなかったが、36.5°C、38°Cなどの36.5°C以上の環境温度に移動させた場合には、免疫反応の全経過を通じて抑制が見られた。

そこで、中等温から低温への移動の場合について観察した結果を Fig. 7 に示した。免疫刺激後25°Cから18°C、15°C、および10°Cへの移動では、対照群と比較し、免疫応答に差異はみられなかった。しかし、25°Cから8°Cないし4°Cに移動した場合にはPFCへの影響が最も大きく、いずれにおいても有意な低下がみられた。一方25°Cから2°Cまたは1°Cの環境に移動した場合には、免疫応答は対照群との間に差はあまりみられず、むしろ15°Cや

Fig. 6 免疫刺激後のIgM-, IgG-PFCの出現状態 (狩野恭一：免疫学入門，東京大学出版会，1980)。

Fig. 7 Temperature range which affects the immune response below 25°C.

10°Cの成績と類似していた⁸⁾。

この結果からみると、環境温熱条件の免疫反応に及ぼす影響は、温熱条件のある一定の範囲から上方又は下方へ移行するにつれて次第に強く抑制的に働くものでなく、環境温低下の途中の或る幅の範囲内では強い抑制が見られるが、それをこえて低下すると再び抑制がとれて対照とほとんど変わらない程度の免疫応答を示すことが知られた。

実験 IV. 低温または高温反復暴露の影響

Fig. 8 に高温反復暴露での免疫応答を示した。1日1回4時間連続暴露の場合、非高温暴露対照群に比べPFC, HAで有意差は認められなかったがHRでは10日目のみ有意な高値が観察された。1日2時間2回暴露さらに1時間4回暴露ではFig. 8に示したようにPFC, HA, HRでそれぞれ有意な高値を示し、暴露回数が増加

するにつれ、免疫反応促進が強まる傾向がみられた。

Fig. 9には低温反復暴露での免疫応答を示した。図に見られるように、1日1回4時間低温暴露ではHA, HRで免疫反応の中期から後期にかけて促進がみられた。1日2時間2回暴露ではPFCはさらに促進が強まる傾向が観察され、HA, HRは24日目にかんりの上昇がみられた。1日1時間4回暴露では、有意差を示すに至っていないがPFCの初期の促進がより大きく、HRで一時的低下した後、有意な上昇が認められた。低温反復暴露においても、暴露回数を増すにつれて免疫能の上昇傾向が強まる結果を得た⁹⁾。

本来ならば抑制が起こる筈の環境温度である8°Cあるいは36.5°Cに、暴露時間を一定にして暴露回数を増やす、つまり短時間暴露を繰り返すと免疫応答が増強されるという現象がみられたのである。これは免疫抑制を起こす

Fig. 8 PFC, HA and HR of mice exposed for four hours daily to 36.5°C.

程度の環境温度でも、短時間宛繰り返し暴露すると逆の刺激として働くようになるのか、あるいは暴露の繰り返しということは一定幅の環境温度の上昇下降の同数ずつの繰り返しということなので、上昇下降のどちらか又は両者かは不明であるが、このことが刺激となって免疫応答が促進されるのかなどの可能性が考えられる。

実験 V. 温熱環境変動の二次免疫応答に及ぼす影響

Fig. 10 下段に低温環境移動での二次免疫応答を示した。図示したように IgG-PFC は二次抗原刺激前 4 日から抗原刺激直後の移動により対照群よりむしろ増加しており、二次抗原刺激直後 1 日から 3 日後の移動では対照群との間で有意差は認められなかった。また、HA においても二次抗原刺激前後の低温移動では、対照群とほぼ同じ値を示し、低下傾向は認められなかった。

高温環境移動での二次免疫応答を Fig. 11 下段に示した。PFC, HA とともに非移動対照群に比べ、二次抗原刺

激前での高温移動により有意な低下がみられるものの抗原刺激後の 2 日または 3 日での高温移動により、むしろ対照群より有意の上昇が認められた¹⁰⁾。

Fig. 12¹¹⁾ に示すように、一次免疫応答の際、主役を演じるのは IgM であり、二次免疫応答ではほとんど大部分が IgG であってかつ総抗体産生量は一次反応に比して圧倒的に多い¹¹⁾。そこで二次免疫応答では低温移動により PFC 数が増大するのは、先にのべたように IgG は温熱環境移動の影響をうけにくく、また二次反応の際は産生量が著しく増大することから説明できよう。しかし、二次免疫応答の場合、高温移動の際には、免疫刺激後の移動では、PFC 数が対照に比して増加するが、刺激前の移動ではむしろ減少している。この現象は、温熱条件移動に敏感なのは IgM で、IgG は影響をうけにくいという事実のみでは説明できず、高温の場合は IgG も抑制される可能性を残している。

Fig. 9 PFC, HA and HR of mice exposed for four hours daily to 8°C.

実験 VI. 温熱条件変動と抗原刺激の時間的關係

低温移動の影響は Fig. 13 左に示したように、抗原刺激前1日から刺激後2日までの移動により PFC の有意な減少がみられたが、刺激前4日から2日での低温移動および刺激後3日での移動では対照群と有意な差異は認められなかった。一方高温移動の影響については Fig. 13 右に示したように、抗原刺激前4日から刺激後2日での比較的長い期間にわたり高温移動により免疫応答の抑制がみられた^{12,13)}。

すなわち、低温移動の免疫応答に対する影響は、免疫刺激よりも後の移動で強く現れ、高温移動のそれは、免疫刺激よりも前の移動で強く現れ、かつ期間が長い。影

響期間が免疫刺激時点より前に偏るか後に偏るかの説明のため、次のような仮説をたてた¹⁴⁾。

動物を異なる温熱環境条件下に移すと、この新しい環境に適応すべく諸種の生理的適応現象がおこる。一方動物に免疫刺激を与えると免疫応答の一定のプロセスが進展する。この際温熱環境変化に対する生理的適応過程が一定程度以上の期間のみ、免疫応答過程に影響を及ぼし、他方免疫応答の一定の過程の期間のみ生理的適応現象の影響をうけるものとする。Fig. 14 の effective period と名付けた期間が前者であり、susceptible period と名付けた期間が後者に当たる。下半の図は単純化のため矩形になおしたものである。温熱環境変化に対する生理的適

25°→8°C

Fig. 10 Effect of temperature shift to a cold environment on the primary and secondary immune response.

25°→36.5°C

Fig. 11 Effect of temperature shift to a hot environment on the primary and secondary immune response.

Fig. 12 Change in class of antibody during a primary and a secondary response.

応過程における effective period と、免疫応答過程における susceptible period が一致したときに免疫応答へ影響が現れる筈である。

Fig. 15 に示すように effective period (E) と susceptible period (S) が等しい ($E=S$) 場合には(A), 免疫応答に影響が現れる期間は免疫刺激日を中心にその前後対称になる。

$E < S$ の場合には(B), 免疫応答に影響が現れる期間は抗原刺激日よりも後の方にずれる, $E > S$ の場合には(C), 抗原刺激日よりも前の方にずれる。この仮説によれば低温暴露は susceptible period が effective period よりも長

Fig. 13 Effect of temperature shift to a cold or a hot environment on the immune response.

Fig. 14 Effective period and susceptible period.

Fig. 15 Relative length of duration of effective period and susceptible period and effects on immune response.
 0: Temperature shift on the day of immunization, -1: Temperature shift one day prior to immunization,
 +1: Temperature shift one day after immunization, +: Appearance of suppression in immune response.

い場合に相当し、高温暴露は逆の場合に相当することとなり、影響の期間も長い。

おわりに

上記の一連の実験は、免疫応答の特定の過程に環境温度がどのような影響を及ぼすかを明らかにする目的ではなく、ある種の免疫反応特に PFC 数を 1 つの指標として、種々の温熱環境のレベルあるいはその変化がどのような影響の仕方を示すかを見ようとしたものである。環境温熱条件の変化は影響が著しいが、温熱条件変化後一定期間経過して順化した後にはその影響は消失すること、環境温熱条件のある幅の間に至適条件が存在して、それより上方又は下方に移動するにつれ生理機能に不利な影響が次第に強くなるものとは必ずしも言えないこと、免疫応答に抑制的に働く温熱条件でも、短時間繰返し暴露するとむしろ促進的に働くこと、温熱環境移動と免疫刺激の時間的關係による影響のあらわれ方の相違は高温と低温で異なることなどが知られた。このように、1 つの生理機能に対してであっても温熱環境条件の影響の仕

方は極めて多面的であることが示唆された。

近代の医学は疾病の特異的原因を見出し、特異的予防法、特異的治療法を確立することを主な目標としている。従って温熱環境条件については、極端な値をとった場合それ自身疾病の原因となりうるが、その他の場合は比較的軽視されてきたきらいがある。しかし、温熱環境条件は常に存在し、それに対してヒトはたえず調節をしつづけていて、体内のいわゆる内部環境の恒常性を保とうとしている。たとえ病的状態を直接にはひきおこさない条件下でも、既存の疾病の軽快や悪化、特定の疾病に対する罹患し易さの程度などに及ぼす温熱条件の影響は必ず存在する筈である。こうした観点から温熱環境条件の生体に及ぼす影響を種々の生理機能について明らかにしてゆくことにより、疾病の予防と治療を従来にまして精密に行うことができるようになる。

文 献

- 1) Tromp, S.W.: In "Medical Biometeorol.", 249-251, Elsevier Publ. Co. (1963).

- 2) Weihe, W.H.: In "Progress in Biometeorol." (Ed: S. W. Tromp) Div. A., vol. 1, Pt. III, 119-128, Swets & Zeitlinger, (1972).
- 3) Cunningham, A.J. and Szenberg, A.: Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells, *Immunology*, **14**, 599-600 (1968).
- 4) Fujita, K., Yamashita, K. and Kikuchi, M.: The influence of thermal environment on the immune response of mice (1) Cellular and humoral effects of low ambient temperature, *Jpn. J. Hyg.*, **29**, 491-497 (1974).
- 5) Fujita, K., Tsukidate, S., Katayama, M. and Kikuchi, M.: The influence of thermal environment on the immune response of mice (2) Effects of high ambient temperature, *Jpn. J. Hyg.*, **31**, 693-702 (1977).
- 6) 狩野恭一: 免疫学入門, 28, 東京大学出版会, (1980).
- 7) Kikuchi, M., Fujita, K., Hayashi, O., Katayama, M., Sugiyama, M. and Okuwaki, Y.: The influence of ambient temperature on the immune response, *Biometeorology* 8, Part 2, Suppl. Int. J. Biometeorol., vol. **26**, 101-115 (1982).
- 8) 奥脇義行: 低温環境のマウス抗体産生能に及ぼす影響, *日衛誌*, **36**, 895-903 (1982).
- 9) 杉山雅俊: 温熱反復暴露のマウス抗体産生能に及ぼす影響, *日衛誌*, **36**, 613-620 (1981).
- 10) 林 修, 青木伸江, 志村昭典, 菊池正一: 二次免疫応答に及ぼす温熱環境の影響, 第54回日本衛生学会総会, *日衛誌*, **39**, 360 (1984).
- 11) Golub, E.S.: *The Cellular Basis of the Immune Response*, 213, Sinauer Associates, Inc. (1978).
- 12) 林 修, 青木伸江, 志村昭典, 菊池正一: 温熱環境が及ぼすマウス免疫応答への影響, 第21回日本生気象学会総会, *日生気誌*, **19**, 94 (1982).
- 13) 菊池正一: 温熱環境変動にともなう生体防禦機能変化の研究, 昭和56, 57年度科学研究補助金研究報告書 (1983).
- 14) Kikuchi, M.: Effective period and susceptible period in the course of the influence of ambient temperature change on immune response, *Biometeorology* 11, Suppl. Int. J. Biometeor., in press (1988).

(受付 1988年4月23日 受理 1988年6月15日)