—原 著—

Streptokinase-Streptodornase (SK-SD) の免疫系に及ぼす影響

SK-SD 製剤中に含まれる免疫抑制物質について

高田 月彦

日本医科大学微生物学免疫学教室 (主任: 横室公三教授)
指導: 木村義民名誉教授

Studies of streptokinase-streptodornase (SK-SD) preparation on
immunological responses

The effect of the immunosuppressive factor contained in SK-SD preparation

Tsukihiko Takata

Department of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

Streptokinase-streptodornase (SK-SD) is one of the extracellular products produced from streptococci, mainly from group A and C streptococci. SK-SD preparation has been frequently used for the assay of lymphocyte proliferation as one of the clinical tests for immunological response in man.

In this paper, it is shown that some factors suppressing the responses of murine and human lymphocyte proliferations to mitogen and specific antigen may be contained in the commercial SK-SD preparation.

The results obtained are as follows:

1) Murine splenic lymphocytes in spontaneous turnover were incorporated with the ^3H -thymidine (^3H -TdR) in vitro. However, the incorporation of ^3H -TdR was suppressed by the addition of SK-SD preparation.

2) SK-SD preparation also suppressed the response of mitogen (Con A, PHA and LPS) and specific antigen induced-murine lymphocyte proliferation, and the suppression percentage was over 90% in the presence of 10 μg /well of SK-SD preparation.

3) Murine splenic lymphocytes were treated with SK-SD preparation for 24h at 37°C in 5% CO_2 prior to the addition of mitogens, and then the cells were washed with culture medium. Thereafter, mitogens were added to the cultured cells. In these cases, cell proliferation was not suppressed at all. On the other hand, the proliferations of cell treated with SK-SD preparation for 48h were remarkably suppressed.

4) SK-SD preparation dialyzed with dialysis tubing of mol. wt. 3,500 daltons cut off, non-dialyzable SK-SD fraction (non-D. SK-SD), could not suppress the murine mitogenic lymphocyte proliferation. These facts suggest that a suppressive factor to the lymphocyte proliferation contained in SK-SD preparation may be the substance of low molecular weight.

5) From the results of fractionation by gel filtration (employing Sephadex G-100 or Sephadex G-25) or high pressure liquid chromatography of the commercial SK-SD preparation, it was also

clearly demonstrated that the suppressive fraction was low mol. wt. having no SK and SD activity.

6) The responses of human lymphocyte transformation to mitogen (Con A) or non-D. SK-SD per se were found to be significantly decreased by the addition of the substance of low molecular weight. These results suggest that non-D. SK-SD preparation should be used for assaying immunological response when the commercial SK-SD preparation is utilized.

Key words : streptokinase-streptodornase, lymphocyte, proliferation, immunosuppressive factor

緒言

Streptokinase-streptodornase (以下 SK-SD と略す) は炎症緩解用酵素製剤^{1,2)}として臨床的に広く使用されているが、本製剤はレンサ球菌の菌体外代謝物質の一つである streptokinase (線維素溶解酵素^{3,4)}と streptodornase を含有したものとされている。本剤はまた近年、ヒトの免疫能を検討するための皮内反应用抗原⁵⁻⁷⁾として、あるいはヒトリンパ球の分裂増殖能を検索する目的⁸⁻¹⁵⁾としても使用されている。本実験において市販の SK-SD 製剤が免疫担当系細胞ないし免疫反応に及ぼす影響を及ぼすかを、主としてマウス およびヒトリンパ球を用いて検討し、SK-SD 製剤中に含まれる低分子物質に、免疫反応を抑制する活性因子が存在することを明らかにしたのでそれらの結果を報告する。

実験材料および方法

(1) 実験動物

6~8 週齢・雌性 BALB/c マウス (日本チャールスリパー K.K.) を使用した。

(2) SK-SD ならびに mitogen

1mg 当たり 3,600 単位の SK を含む SK-SD 製剤 (Varidase, 日本レダリー) を使用し、mitogen として concanavalin A (Con A, Miles Co.), phytohemagglutinin-P (PHA, Difco Lab.) および lipopolysaccharide (LPS, *E. coli* 0111, Difco Lab.) を使用した。また SK-SD 製剤を生食で溶解後、spectropor 3 membrane tubing (spectrum medical industries, INC.) を用いて生食中で 48 時間透析したものを non-dialyzable SK-SD (以下 non-D. SK-SD と略す) とし、一部の実験に使用した。

(3) 感作方法

orthochlorobenzoyl (和光純薬) と bovine gamma globulin (Miles Co.) を Remold ら¹⁶⁾の方法に準じて conjugate させ、この orthochlorobenzoyl-bovine

gamma globulin (以下 OCB-BGG と略す) を用いて、その 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液と等量の complete Freund's adjuvant (CFA, Difco Lab.) 混和液 0.2 ml をマウス側腹部皮内に注射した。抗原投与 14 日後に、OCB-BGG 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 溶液 0.025 ml をマウス右足趾部皮内に注射し、接眼レンズ内に 1 cm ゲージを内蔵し、実体顕微鏡下で足趾部の腫脹を測定し、24 時間後に 1 mm 以上の腫脹を示したものを遅延型アレルギー反応陽性のマウスとして実験に供した。

(4) SK-SD 製剤の高速液体クロマトグラフィー (High pressure liquid chromatography, HPLC) による分画

SK-SD 1 mg を 0.15 M リン酸緩衝食塩水 (phosphate buffer saline, PBS), pH 7.0 に溶解し、HPLC (HLC-803, 東洋曹達) にアプライし、同時に UV-8 model II (東洋曹達) を用いて 280 nm でその OD 値を測定した。カラム管は、Asahipak GS-310 (7.6 mmID $\times$ 500 ml, 旭化成) を使用した。HPLC より溶出してくる各分画は、使用まで 4°C で保存した。

(5) SK-SD 製剤のゲルろ過による分画

SK-SD 100 mg を蒸留水で溶解し、1.5 $\times$ 110 cm のカラム管を用い Sephadex G-100 (pharmacia fine chemicals) でゲルろ過した。溶出してくる各分画をフラクションコレクター (ATTO) を用いて試験管 1 本当たり 3 ml ずつ集め、280 nm でその OD 値を日立製 model 100-50 spectrophotometer で測定した。SK-SD 製剤は Sephadex G-100 で 4 分画に分けられた。さらに第 4 分画は、2.0 $\times$ 45 cm のカラム管を用い Sephadex G-25 (pharmacia fine chemicals) で再びゲルろ過され、同様に OD を測定した。得られた各分画は、使用まで 4°C で保存された。

(6) マウス脾細胞浮遊液の調整

正常および感作マウスから無菌的に脾臓を摘出し、Eagle's minimum essential medium (以下 MEM と略す, 日水製薬) で脾細胞浮遊液を型のごとく調整し、これに Ammonium chloride (和光純薬) 0.83% 溶液

を加えて、混在する赤血球を溶解させた。その後、MEM でよく洗浄したあとグラスウール (fine grade 1~6 μ , 日本硝子) カラムに通し、penicillin G (明治製薬) 100 u/ml, streptomycin (萬有製薬) 100 μ g/ml, N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethane-sulfonic acids (HEPES, Gibco) ならびに、非動化 fetal calf serum (FCS, Reheis chemical Co.) 15% を含む RP MI 1640 medium (culture medium, 以下 CM と略す, 日水製薬) 中で $4\sim 5\times 10^6$ 個/ml に調整した。細胞の viability は、trypan blue exclusion test で算定した。

(7) ヒト単核球の調整

正常ヒト末梢血をヘパリン (NOVO) 100 u 存在下で 10 ml 採取し、Böyum¹⁷⁾の方法に準じて Ficoll density gradient method で、単核球を分離した。分離後 MEM でよく洗浄し、CM で 1×10^6 個/ml に調整した。

(8) マウス脾細胞の増殖反応に及ぼす SK-SD の効果

(i) 上記に従って作製した正常マウス脾細胞浮遊液 ($4\sim 5\times 10^6$ 個/ml) 100 μ l を、U字型マイクロプレート (96 ウェル, Nunc Co.) の各ウェルに分注し、CM を用いて作製した各種濃度の SK-SD 製剤 50 μ l または CM 50 μ l のみと Con A 50 μ l (40 μ g/ml), PHA 50 μ l (100 μ g/ml) または LPS 50 μ l (400 μ g/ml) を添加し、対照として CM 50 μ l を加え全量を 200 μ l/well として、5% CO₂ 存在下で、37°C, 72 時間培養した。培養終了 24 時間前に、Tritiated-Thymidine (thymidine 6-³H, 21 Ci/mmol, ³H-TdR, Amersham) 0.4 μ Ci/well を加え、培養終了後 cell harvester (アベ科学) で細胞を採取し、これに 2,5-Diphenyloxazole (DPO, 和光純薬) 4 mg/ml, 1,4-Bis [2-(5-phenyloxazolyl)] benzene (POPOP, 和光純薬) 0.2 mg/ml を含む Toluene (和光純薬) 溶液 3 ml を加え、Liquid scintillation counter (Packard Instrument Co.) を用いて、その放射活性を測定した。

(ii) OCB-BGG で感作したマウス脾細胞浮遊液 ($4\sim 5\times 10^6$ 個/ml) 100 μ l をマイクロプレートに分注し、CM 50 μ l または OCB-BGG 50 μ l (2 mg/ml) を加え、さらに CM 50 μ l または各種濃度の SK-SD を添加し、37°C, 72 時間培養後、前述したと同様な操作で ³H-TdR の取り込みを測定した。

(iii) また同様の実験系で、脾細胞浮遊液 100 μ l に Con A 50 μ l (40 μ g/ml) と種々の濃度の HPLC 分

画、ゲルろ過分画ないしは non-D. SK-SD を加えて 72 時間培養し、細胞の ³H-TdR の取り込みを検討した。

(9) SK-SD 製剤前処理による マウス脾細胞の増殖反応の検討

マウス脾細胞浮遊液に 50 μ g/ml の濃度で SK-SD 製剤を添加し、37°C, 24 時間または 48 時間培養した。その後、MEM で細胞をよく洗浄し、CM に再浮遊させ、 5×10^6 個/ml に調整した。対照として、CM 中で SK-SD 製剤を添加せず培養し、同様の操作を行った。これら細胞浮遊液 100 μ l をマイクロプレートの各ウェルに分注し、Con A 50 μ l (40 μ g/ml), LPS 50 μ l (100 μ g/ml) または CM 50 μ l を加え、さらに CM 50 μ l を加え全量を 200 μ l/well として 37°C, 72 時間培養し、前述同様の操作で ³H-TdR の取り込みを測定した。

(10) SK-SD と Thymidine との競合作用の検討

正常マウス脾細胞浮遊液 ($4\sim 5\times 10^6$ 個/ml) 100 μ l をマイクロプレートに入れ、CM 50 μ l または SK-SD 50 μ l (200 μ g/ml) と同時に ³H-TdR 50 μ l (8 μ Ci/ml) を添加し、さらに CM 50 μ l または Con A 50 μ l (40 μ g/ml) を加え 37°C, 24 時間培養して、その ³H-TdR の取り込みを測定した。

(11) ヒト単核球の増殖反応に及ぼす SK-SD 製剤の影響

末梢血単核球浮遊液 (1×10^6 個/ml) 100 μ l をマイクロプレートに入れ、各種濃度の SK-SD 製剤, non-D. SK-SD, ゲルろ過で得た各分画または Con A (40 μ g/ml) を 50 μ l 加え、さらに CM 50 μ l ないしはゲルろ過第 4 分画 50 μ l を添加し全量を 200 μ l/well として、5% CO₂ 存在下で 37°C, 72 時間または 120 時間培養した。培養終了 24 時間前に ³H-TdR 0.4 μ Ci/well を加え、前述同様の操作で ³H-TdR の取り込みを測定した。

結 果

1. マウス脾細胞の増殖反応に及ぼす SK-SD の影響

正常マウスリンパ球の spontaneous な増殖反応、いわゆる background turnover に及ぼす SK-SD の作用を検討するために、マウス脾細胞浮遊液に種々の濃度の SK-SD 製剤を添加し、37°C, 72 時間培養して、³H-TdR の取り込みを測定した。

Fig. 1 に示すように、SK-SD はリンパ球の増殖反

Fig. 1 Effect of SK-SD on the proliferation of splenic lymphocytes

Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) separated from normal mice were incubated with 50 μ l of SK-SD and 50 μ l of culture medium (CM) for 3 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μ Ci ³H-TdR.

Results were expressed in mean $\pm$ SD of ³H-TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

応を dose-dependent に抑制し、SK-SD 10 μ g/well (50 μ g/ml) の濃度においては 90% 以上の抑制を示した。なお、Trypan blue dye exclusion test における viability の測定では、SK-SD 10 μ g/well で培養した群と CM のみで培養した対照群との間に差はみられず、この抑制が細胞死に基因するものとは思われなかった。またデータには示していないが、SK-SD 添加後、経時的な検討を行っても常に抑制パターンが示

されたことから、この抑制反応は脾臓リンパ球自体の培養経過に伴って起こる抑制とは考え難い。

2. マウス脾細胞の mitogen ならびに抗原刺激における SK-SD の影響

マウスリンパ球が mitogen ないしは抗原刺激により増殖する際に、SK-SD 製剤の添加がいかなる影響を及ぼすかを検討した。マウス脾細胞浮遊液に mitogen または抗原を加え、種々の濃度の SK-SD を添加し、37°C、72 時間培養後、³H-TdR の取り込みを測定した。なお抗原刺激する際には、OCB-BGG 感作マウスの脾細胞浮遊液を用いた。

Table 1 に示すように、正常マウス脾細胞の Con A 刺激により stimulation index (以下SI と略す) は 18.8 を示したが、SK-SD 10 μ g/well の添加で SI は 1.2 に減少し 93% の抑制を示した。同様に、PHA、LPS による増殖も SK-SD 10 μ g/well の添加で、それぞれ 94%、89% の抑制率を示した。さらに OCB-BGG 感作マウスの脾細胞を OCB-BGG で刺激すると SI は約 6 であったが、SK-SD 10 μ g/well の添加により 78% 抑制された。このように、SK-SD 製剤は mitogen ないしは抗原刺激による脾細胞の反応性を dose-dependent に抑制した。

3. SK-SD 前処理によるマウス脾細胞の増殖反応の検討

リンパ球をあらかじめ SK-SD 製剤で処理した後の mitogen 刺激によるリンパ球の増殖反応を検討した。

マウス脾細胞浮遊液中に 50 μ g/ml の濃度で SK-SD

Table 1 Effect of SK-SD on the mitogen and antigenic proliferation of splenic lymphocytes

concentration of SK-SD (μ g/well)	stimulation index (% suppression) ¹⁾			
	Con A 2 μ g/well	PHA 5 μ g/well	LPS 20 μ g/well	Antigen OCB-BGG ²⁾ 100 μ g/well
—	18.8 (0%)	12.2 (0%)	9.7 (0%)	5.9 (0%)
0.1	16.0 (15%)	8.7 (29%)	8.4 (13%)	3.9 (33%)
1	13.0 (31%)	5.8 (53%)	6.1 (38%)	2.7 (53%)
2	9.7 (48%)	5.5 (55%)	5.2 (47%)	2.4 (59%)
5	3.3 (82%)	2.1 (82%)	3.4 (65%)	1.9 (67%)
10	1.2 (93%)	0.8 (94%)	1.1 (89%)	1.3 (78%)

Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) were incubated with mitogen (Con A, PHA and LPS) or antigen (OCB-BGG) for 3 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μ Ci ³H-TdR.

Results were expressed in mean of ³H-TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

1) % suppression : $100\% - \left(\frac{\text{mean cpm of co-culture}}{\text{mean cpm of normal response}} \times 100 \right) \%$

2) Splenic lymphocytes separated from mice immunized with OCB-BGG were incubated with OCB-BGG.

を添加し、37°C、24 時間または 48 時間培養した後、SK-SD を洗浄により除去し、CM に再浮遊した脾細胞に mitogen を加え、その反応を検討した。なお SK-SD の代わりに CM を添加し同様の操作を行い、これを対照群とし両者の反応を比較した。

SK-SD で脾細胞を 24 時間前処理し、洗浄後 Con A ないしは LPS を添加すると、その反応は SK-SD 無処理の場合と同様に mitogen とよく反応した。すなわち洗浄により SK-SD の抑制効果は解除された (Fig. 2A)。しかし 48 時間前処理では、洗浄後も SK-SD による抑制効果は残り、mitogen に対する反応性は回復しなかった (Fig. 2B)。

4. SK-SD と thymidine との同時添加による影響

脾細胞培養時に SK-SD 製剤と ^3H -TdR とを同時に添加し、37°C、24 時間培養して SK-SD の抑制効果に対する影響を検討した。

Table 2 に示すように、SK-SD (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) は、正常脾細胞の spontaneous turnover に基づく増殖反応の際の thymidine の取り込みを約 58% 抑制した。

Fig. 2 Effect of pretreatment of SK-SD on mitogenic response of splenic lymphocytes

Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) pre-treated with SK-SD (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h (A) or 48 h (B) were incubated with mitogen (Con A and LPS) and culture medium (CM) for 3 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μCi ^3H -TdR. Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) pretreated with CM alone were used as control.

Results were expressed in mean of ^3H -TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

Table 2 Competitive effects of SK-SD and Thymidine

	SK-SD 10 $\mu\text{g}/\text{well}$	cpm $\pm$ SD (% suppression)
CM	—	10810 $\pm$ 1109
	+	4583 $\pm$ 456 (58%)
Con A 2 $\mu\text{g}/\text{well}$	—	58680 $\pm$ 1433
	+	14065 $\pm$ 718 (76%)

Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) were incubated with 50 μl of SK-SD (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) and 50 μl of culture medium (CM) or 50 μl of Con A (2 $\mu\text{g}/\text{well}$) in CM containing Thymidine (^3H -TdR, 0.4 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) for 24 h at 37°C in 5%CO₂.

Results were expressed in mean $\pm$ SD of ^3H -TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

さらに Con A で刺激した際には 76% の抑制率を示した。

5. マウス脾細胞増殖反応に及ぼす non-D. SK-SD の影響

分子量約 3,500 以下の物質を cut off するといわれている透析膜を用いて SK-SD を透析し、得られた内液 (non-dialyzable SK-SD, non-D. SK-SD) を用いてリンパ球増殖反応への影響を検討した。脾細胞浮遊液を Con A で刺激する際に、種々の濃度の non-D. SK-SD を添加し、37°C、72 時間培養後 ^3H -TdR の取り込みを測定し、透析前の SK-SD による反応と比較した。

Table 3 に示すように、透析前の SK-SD においては 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ の濃度でリンパ球の増殖反応を 94% も抑制するのに対し、透析後の SK-SD (non-D. SK-SD) 標品では 50 $\mu\text{g}/\text{well}$ の高い濃度を添加しても抑制作用は認められなかった。

6. SK-SD 製剤の HPLC による分画での検討

SK-SD を高速液体クロマトグラフィー (HPLC) にかけると、Fig. 3 に示すようなパターンを示した。SK-SD の HPLC 分画を大きく三つの分画に分け、分子量の大きいものから順に F_a, F_b, F_c とした。さらにこの 3 分画を用いてリンパ球の増殖反応へ及ぼす影響を検討してみた。マウス脾細胞浮遊液を Con A で刺激する際に、HPLC で得られたそれぞれの分画を希釈することなく、あるいは一部の分画は希釈して添加し、37°C、72 時間培養した。

Table 4 に示すように、Con A で刺激したリンパ球の増殖反応を、F_a, F_b では溶出液そのものを用いて (1:1)、それぞれ 28%, 17% と軽度抑制したの

Table 3 Effect of non-dialyzable SK-SD (non-D. SK-SD) on Con A induced lymphocyte proliferation

		Con A 2 μ g/well	cpm $\pm$ SD (% suppression)
SK-SD	10 μ g/well	+	11115 $\pm$ 1031 (94%)
non-D. SK-SD*	10 μ g/well	+	178237 $\pm$ 7036 (0%)
	20 μ g/well	+	159727 $\pm$ 8557 (8%)
	50 μ g/well	+	160941 $\pm$ 4323 (7%)
CM		+	173978 $\pm$ 15703 (0%)

Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) were incubated with Con A (2 μ g/well) and SK-SD (10 μ g/well) or non-D. SK-SD for 3 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μ Ci ³H-TdR. Splenic lymphocytes were incubated with Con A and culture medium (CM) as normal response.

Results were expressed in mean $\pm$ SD of ³H-TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

*Non-D. SK-SD is the preparation which was dialyzed for 48 h at 4°C using dialysis tubing with mol. wt. 3,500 cut off against 0.9% saline.

Fig. 3 Elution profile of SK-SD (1 mg) by HPLC on a Asahipak GS-310 column, using 0.15 M PBS pH 7.0 as effluent

に対して、F_c では 1:1 の濃度で 99% 抑制され、5 倍希釈 (1:5) においても 79% と強い抑制を示した。なお今回データには示していないが、各分画の SK 活性、SD 活性を測定してみたところ、両活性ともに F_a 分画にのみ存在し、F_b、F_c 分画には活性が認められなかった。

7. SK-SD 製剤のゲルろ過による分画での検討

SK-SD を Sephadex G-100 で分画すると、Fig. 4 にみられるようなパターンを示した。これを大きく四

つの分画に分け、分子量の大きいものから順に F₁、F₂、F₃、F₄ とした。F₄ 分画をさらに Sephadex G-25 で再分画すると、Fig. 5 にみられるような単一のピークを示す分画が得られこれを F₅ とした。これらゲルろ過分画のマウスリンパ球への影響を調べるために、Con A で刺激した正常マウス脾細胞浮遊液中にそれぞれ分画を添加し、37°C、72 時間培養後の ³H-TdR の取り込みを比較検討した。

Table 5 に示したように、F₄ 分画に強いリンパ球増殖反応抑制活性を認め、1:20 の濃度で 81%、1:5 で 99% の抑制を示した。F₁、F₂、F₃ 分画もわずかながら抑制を示したが、F₄ にみられるような強い抑制はみられず、したがって SK-SD による抑制作用は、主として F₄ 分画に存在するよう思われた。さらにこの分画を Sephadex G-25 で再分画した F₅ に強い抑制活性作用が認められ、前方の低いピークの F₃ には抑制作用が認められなかった。

8. ヒトリンパ球増殖反応に対する SK-SD 製剤の影響

SK-SD は、ヒト末梢血単核球を用いて、特異的ないしは非特異的な免疫応答能の検索によく使用されている⁸⁻¹⁶⁾。マウスリンパ球を用いた実験で明らかにされた SK-SD 製剤中の抑制物質が、正常ヒトリンパ球

Table 4 Effect of SK-SD fraction (HPLC) on Con A induced lymphocyte proliferation

		Con A 2 μ g/well	cpm $\pm$ SD (% suppression)
F _a	1:1	+	177557 $\pm$ 17294 (28%)
F _b	1:1	+	205507 $\pm$ 5242 (17%)
F _c	1:1	+	2012 $\pm$ 825 (99%)
	1:5	+	50904 $\pm$ 19255 (79%)
	1:10	+	146084 $\pm$ 19134 (41%)
	1:20	+	222844 $\pm$ 15427 (10%)
SK-SD 10 μ g/well		+	12423 $\pm$ 5205 (95%)
CM		+	246599 $\pm$ 8735 (0%)
		-	19725 $\pm$ 2049 —

Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) were incubated with 50 μ l of each eluate (F_a, F_b and F_c) obtained by HPLC and 50 μ l of Con A (2 μ g/well) for 3 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μ Ci ³H-TdR. Results were expressed in mean $\pm$ SD of ³H-TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

Fig. 4 Elution profile of SK-SD (100 mg) obtained on a Sephadex G-100 (1.5×110 cm) column, using distilled water as effluent

Fig. 5 Elution profile of F_4 fraction obtained on a Sephadex G-25 (2.0×45 cm) column, using distilled water as effluent

に対し、いかなる影響を与えるかを検討した。すなわちヒト末梢単核球浮遊液に SK-SD または non-D. SK-SD を添加し、37°C, 72 時間培養し、 ^3H -TdR の取り込みから SK-SD と non-D. SK-SD との反応性を比較した (Table 6)。

non-D. SK-SD では濃度が高くなるにつれてリンパ球の増殖反応が亢進するのに対して、SK-SD は濃度が高くなるにつれて逆に増殖反応が抑制され、50 $\mu\text{g}/$

well の濃度で 95% 以上の抑制を示した。これは、SK-SD 中に含まれる透析性の低分子物質がヒトリンパ球の増殖反応をマウスの場合と同じように抑制するためと考えられる。

次にゲルろ過分画による影響を検討してみた。同様の実験系で Sephadex G-100 による各分画を単核球培養中へ添加し、その反応性を検討すると、Table 7 に示したごとく F_1 , F_2 , F_3 分画に対してはヒト単核球は反応し抑制作用が認められなかった。しかし non-D. SK-SD 10 $\mu\text{g}/\text{well}$ で反応する系に F_4 分画を加えると、その反応は 80% 以上も抑制された。さらに Table 8 に示すように、Con A で刺激した単核球に F_4 分画を添加した際にも、リンパ球の増殖反応は強く抑制された。このように、ゲルろ過分画中の抑制活性物質はマウスのみならずヒトリンパ球の増殖反応に対しても抑制的に作用するように思われた。

Table 5 Effect of fractions obtained by gel filtration on the proliferation of splenic lymphocyte

concentration of fractions	Con A 2 $\mu\text{g}/\text{well}$	cpm $\pm$ SD (% suppression)
F_1 1: 5	+	114477 $\pm$ 5524 (34%)
1: 10	+	139973 $\pm$ 14415 (19%)
1: 20	+	149886 $\pm$ 2227 (13%)
F_2 1: 5	+	106160 $\pm$ 11293 (38%)
1: 10	+	118978 $\pm$ 11167 (31%)
1: 20	+	157277 $\pm$ 8564 (9%)
F_3 1: 5	+	86169 $\pm$ 14732 (50%)
1: 10	+	155372 $\pm$ 6332 (10%)
1: 20	+	146099 $\pm$ 9233 (15%)
F_4 1: 5	+	1056 $\pm$ 177 (99%)
1: 10	+	3746 $\pm$ 221 (98%)
1: 20	+	31962 $\pm$ 635 (81%)
F_5 1: 5	+	143498 $\pm$ 19839 (17%)
1: 10	+	179159 $\pm$ 5830 (0%)
1: 20	+	177482 $\pm$ 4521 (0%)
F_6 1: 5	+	2931 $\pm$ 288 (98%)
1: 10	+	3347 $\pm$ 946 (98%)
1: 20	+	15598 $\pm$ 1603 (91%)
CM	+	172614 $\pm$ 12524 (0%)
	-	29561 $\pm$ 4215 —

Splenic lymphocytes (5×10^5 cells/well) were incubated with 50 μl of each fraction (F_1 , F_2 , F_3 , F_4 , F_5 and F_6) obtained by gel filtration and 50 μl of Con A (2 $\mu\text{g}/\text{well}$) for 3 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μCi ^3H -TdR. Results were expressed in mean $\pm$ SD of ^3H -TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

Table 6 Effect of non-D. SK-SD and SK-SD on the proliferation of human mononuclear cells

concentration ($\mu\text{g}/\text{well}$) of		cpm of donors $\pm$ SD		
		A	B	C
non-D. SK-SD*	1	9115 $\pm$ 1560	21886 $\pm$ 1910	18303 $\pm$ 1591
	5	13694 $\pm$ 2855	21178 $\pm$ 681	17110 $\pm$ 2898
	10	15379 $\pm$ 1690	21587 $\pm$ 2332	18860 $\pm$ 4873
	50	19105 $\pm$ 3094	24404 $\pm$ 1655	23896 $\pm$ 608
	100	18582 $\pm$ 667	25874 $\pm$ 1449	23601 $\pm$ 4182
SK-SD	1	11220 $\pm$ 1970	19107 $\pm$ 880	18653 $\pm$ 2940
	5	12055 $\pm$ 4276	15966 $\pm$ 1459	14589 $\pm$ 3340
	10	11643 $\pm$ 1971	15381 $\pm$ 613	8060 $\pm$ 1860
	50	455 $\pm$ 212	1021 $\pm$ 549	184 $\pm$ 40

Human mononuclear cells (1×10^5 cells/well) separated from peripheral blood (A, B and C) were incubated with 50 μl of culture medium (CM) and 50 μl of non-D. SK-SD or SK-SD for 5 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μCi ³H-TdR. Results were expressed in mean $\pm$ SD of ³H-TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

*Non-D. SK-SD is the preparation which was dialyzed for 48 h at 4°C using dialysis tubing with mol. wt. 3,500 cut off against 0.9% saline.

Table 7 Effect of fractions obtained gel filtration (Sephadex G-100 column) on the proliferation of human mononuclear cells

concentration of fractions	non-D. SK-SD* 10 $\mu\text{g}/\text{well}$	cpm of donors $\pm$ SD (% suppression)	
		A	B
F ₁ 1:10	—	22167 $\pm$ 1358 (0%)	19967 $\pm$ 5581 (0%)
	—	19230 $\pm$ 1947 (11%)	18802 $\pm$ 7351 (0%)
F ₂ 1:10	—	24800 $\pm$ 323 (0%)	18950 $\pm$ 1816 (0%)
	—	20254 $\pm$ 2464 (6%)	16447 $\pm$ 1894 (13%)
F ₃ 1:10	—	22645 $\pm$ 332 (0%)	20511 $\pm$ 2231 (0%)
	—	24461 $\pm$ 634 (0%)	18121 $\pm$ 2948 (4%)
F ₄ 1:5	+	3115 $\pm$ 434 (86%)	860 $\pm$ 189 (95%)
CM	+	21587 $\pm$ 2332 (0%)	18860 $\pm$ 4873 (0%)

Human mononuclear cells (1×10^5 cells/well) were incubated with 50 μl of culture medium (CM) and 50 μl of each fraction (F₁, F₂, F₃ and F₄) obtained by gel filtration for 5 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μCi ³H-TdR.

Non-D. SK-SD was added to the solution of F₄ on the same experiment and mean cpm of non-D. SK-SD (10 $\mu\text{g}/\text{well}$) was used to normal response.

Results were expressed in mean $\pm$ SD of ³H-TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

*Non-D. SK-SD is the preparation which was dialyzed for 48 h at 4°C using dialysis tubing with mol. wt. 3,500 cut off against 0.9% saline.

Table 8 Effect of fraction (F₄) on Con A induced lymphocyte proliferation

concentration of fraction (F ₄)	Con A 2 $\mu\text{g}/\text{well}$	cpm of donors $\pm$ SD (% suppression)	
		A	B
F ₄ 1:10	+	517 $\pm$ 80 (99%)	358 $\pm$ 39 (100%)
	+	45965 $\pm$ 2296 (24%)	88314 $\pm$ 858 (9%)
	+	57995 $\pm$ 966 (4%)	102398 $\pm$ 4013 (0%)
CM	+	60553 $\pm$ 3176 (0%)	97551 $\pm$ 3403 (0%)

Human mononuclear cells (1×10^5 cells/well) were incubated with 50 μl of Con A and fraction (F₄) obtained by gel filtration for 3 days at 37°C in 5%CO₂, and exposed to 0.4 μCi ³H-TdR.

Results were expressed in mean $\pm$ SD of ³H-TdR cpm incorporated to the cells in triplicate culture.

考 察

今回の研究から、SK-SD 製剤 (Varidase) は、マウスリンパ球の spontaneous turnover に基づく増殖反応を dose-dependent に抑制し、さらに mitogen ないしは抗原刺激における増殖反応に対しても強い抑制を示すことが明らかにされた。この抑制作用は、T 細胞ならびに B 細胞 mitogens いずれの反応に対しても認められ、T 細胞、B 細胞の区別なく作用するものと考えられた。

SK-SD によるこの抑制機構についてはなお明確でないが、SK-SD は mitogen 非存在下におけるマウスリンパ球の増殖反応いわゆる background turnover を抑制し、競合的にリンパ球の Thymidine の取り込みをも抑制した。また SK-SD による単核球の 24 時間処理では、洗浄によりその抑制が解除され、48 時間処理では洗浄しても抑制作用が解除されなかった。さらに、培養中に KCl, indomethacin, interleukin-2 (IL-2) を添加してもその抑制作用に影響を与えないという結果 (第 35 回日本アレルギー学会総会) などから考え、SK-SD による抑制作用は単核球からのメディエーターの産生、放出ないしはその作用を抑制するのではなく、また mitogen の単核球に対する作用それ自体を抑制せず、直接細胞に作用することが想定されるように思われる。

SK-SD を分子量約 3,500 以下の物質を、cut off する透析膜を用いて透析すると、その抑制作用は消失し、SK-SD を HPLC ならびにゲルろ過で分画すると低分子分画 (F_c , F_d) に強い抑制活性が認められた。さらに、HPLC 分画の SK, SD 活性の測定では、 F_d 分画にのみ両活性が存在し、 F_b , F_c 分画には存在しなかった。それゆえ SK-SD にみられる抑制活性作用は、SK-SD 中に含まれる SK, SD 活性をもたない低分子物質によって起こることが示唆された。しかし、HPLC 分画とゲルろ過分画の高分子分画に軽度ながら抑制活性がみられたが、これは高分子分画中の蛋白にこの抑制活性物質が何らかの形で存在しているためかもしれない。

なお、plaque forming cell assay において、ヒツジ赤血球とともに SK-SD をマウス腹腔内へ注入すると、リンパ球のヒツジ赤血球に対する抗体産生が抑制されることが観察されており (第 34 回日本アレルギー学会総会)、これもまた恐らくこの低分子抑制活性物質に基づくものと考えている。

一方、SK-SD はヒトリンパ球の免疫能を検索する目的で用いられてきた。しかし、本稿で示したように SK-SD のもつ抑制作用は、ヒト単核球でも観察され、SK-SD と non-D. SK-SD に対してその反応性に相違があり、ゲルろ過による低分子分画 (F_d) が mitogen ならびに SK-SD による刺激におけるリンパ球活性化を抑制し、マウスリンパ球の反応性における場合と同様な結果が示された。この事実は、SK-SD 中に含まれる低分子の抑制物質が、ヒトリンパ球に対しても同様にその増殖反応を抑制する可能性を示す。それゆえ、SK-SD 製剤を用いて、ヒトリンパ球の免疫能を検討する際に、この物質の存在は十分に考慮しなければならない。

Greenberg ら¹⁹⁾が SK-SD に対するヒトリンパ球の反応性から、高反応群、中反応群、低反応群の三つのグループがヒトに存在することを示し、また Sohnle ら¹⁰⁾は SK-SD に対する反応性が年齢により相違することを報告した。しかし上記の抑制物質の存在を考えると、全体の反応パターンに変わりはなくとも、示された値は必ずしも真の値を示していない可能性がある。したがって臨床的に患者リンパ球の免疫能を検討する際に、一つの指標として SK-SD によるリンパ球の反応性がしばしば取り上げられるが、その判定にあたっては、慎重な評価が必要であろう。SK-SD そのものの反応性は透析後でも失活せず、比較的安定だと思われるので、透析により抑制物質を除去した標品を用いたほうがより正しい値が反映されるものと思われる。

レンサ球菌代謝物質中には免疫反応を抑制する物質が存在することがすでに報告されている^{10,20)}が、これらは比較的高分子な蛋白質質であるとされ、本実験に使用した SK-SD 中に含まれる抑制物質とは異なるものと考えられるが、これら高分子物質のフラグメントが一部 SK-SD 中に混入しているか、あるいはこれとは全く別のものか、“物”としての同定をさらに詳細に検討する必要がある。

結 論

レンサ球菌代謝物質の一つである Streptokinase-streptodornase (SK-SD, Varidase) を用いて、リンパ球の増殖反応を中心に免疫系に及ぼす影響を検討し、以下のような結果を得た。

1) SK-SD 製剤は、マウスリンパ球の増殖反応を dose-dependent に抑制し、さらに mitogen ならびに

抗原刺激における活性化に対しても強い抑制作用を示した。

2) この抑制物質は、透析膜を通過しうる低分子分子画に存在し、SK ならびに SD 活性を保有しない物質によって惹起された。

3) SK-SD 製剤中の低分子抑制物質は、ヒトリンパ球に対しても同様に抑制的に作用した。

4) その抑制は prostaglandin の誘導に基づくものではなく、また IL-2 の活性阻害によるものとは思われず、さらに SK-SD 製剤の前処理による影響や thymidine の取り込みの競合的抑制から SK-SD 製剤は何らかのメディエーターを介して抑制作用を発揮するというよりも、細胞に対する直接作用と考えられた。

以上の事実は、SK-SD 製剤を用いてヒトリンパ球の免疫能を検討する際に、この抑制物質の存在を十分に考慮しておく必要があること、またその判定にあたっては慎重でなければならないことが示唆された。

稿を終えるにあたり、終始御懇切なる御指導、御校閲を賜った大國寿士助教授に深謝するとともに、本研究に御協力いただいた留目優子講師、野呂瀬嘉彦助手を始めとする微生物学免疫学教室員各位に深謝いたします。また、本研究の機会を与えて下さった代田明郎名誉教授、恩田昌彦教授に深謝いたします。

なお、本論文の要旨は、第 34 回日本アレルギー学会総会 (1984)、第 35 回日本アレルギー学会総会 (1985) において講演した。

文 献

- 1) Agren, M.S. and Stromberg, H.E.: Topical treatment of pressure ulcers; A randomized comparative trial of varidase and zinc oxide. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, **19**, 97~100, 1985.
- 2) Blomgren, I., Eriksson, E. and Lauritzen, C.: A clinical study of trypure or varidase on minor burns. *Scand. J. Plast. Reconstr. Surg.*, **19**, 101~103, 1985.
- 3) Cunningham, M.W., May, S., Tucker, W.Y. and Gerlok, A.J., Jr.: Response of an abdominal aortic thrombotic occlusion to local low-dose streptokinase therapy. *Surgery*, **93**, 541~544, 1983.
- 4) Katzen, B.T. and van Breda, A.: Low dose streptokinase in the treatment of arterial occlusion. *Am. J. Roentgenol.*, **136**, 1171~1178, 1981.
- 5) Neuvonen, P., Salo, M., Viljanen, M. and Helander, I.: Delayed hypersensitivity skin testing of 150 volunteers; Retesting results and antibody measurements. *Allergy*, **40**, 208~212, 1985.
- 6) Revhaug, A. and Giercksky, K.E.: Preoperative cutaneous hypersensitivity reaction related to postoperative complications following elective surgery. *Acta Chir. Scand.*, **150**, 279~283, 1984.
- 7) Ransanen, L.: Skin test reactivity and in vitro responses to microbes and microbial antigens. *Clin. Exp. Immunol.*, **40**, 566~572, 1980.
- 8) Triebel, F., Missenard-Leblond, V., Couty, M.C., Charron, D.J. and Debre, P.: Differential inhibition of human antigen-specific T cell clone proliferative responses by distinct monoclonal anti-HLA-DR antibodies. *J. Immunol.*, **132**, 1773~1778, 1984.
- 9) Lillie, M.A., Cody, C.S., Douglas, S.D. and Polin, R.A.: In vitro lymphocyte proliferation in response to type III group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, **16**, 111~114, 1982.
- 10) Sohnle, P.G., Collins-Lech, C. and Huhta, K.E.: Age-related effects on the number of human lymphocytes in culture initially responding to an antigenic stimulus. *Clin. Exp. Immunol.*, **47**, 138~146, 1982.
- 11) Greene, W.C., Fleisher, T.A. and Waldmann, T.A.: Soluble suppressor supernatants elaborated by concanavalin A-activated human mononuclear cells. I. Characterization of a soluble suppressor T cell proliferation. *J. Immunol.*, **126**, 1185~1191, 1981.
- 12) Greene, W.C. and Waldmann, T.A.: Inhibition of human lymphocyte proliferation by the nonmitogenic lectin wheat germ agglutinin. *J. Immunol.*, **124**, 2979~2987, 1980.
- 13) Dottner, A.M. and Levis, W.R.: Clonal priming of human lymphocytes with soluble microbial antigens; High-dose paralysis, restoration, and autologous leukocyte preference. *Scand. J. Immunol.*, **8**, 403~412, 1978.
- 14) Cohen, L., Holzman, R.S., Valentine, F.T. and Lawrence, H.S.: Requirement of precommitted cells as targets for the augmentation of lymphocyte proliferation by leukocyte dialysates. *J. Exp. Med.*, **143**, 791~804, 1976.
- 15) Greenberg, L.J., Gray, E.D. and Yunis, E.J.: Association of HL-A5 and immune responsiveness in vitro to streptococcal antigens. *J. Exp. Med.*, **141**, 935~943, 1975.
- 16) Remold, H.G., Katz, A.B., Haber, E. and David, J.R.: Studies on migration inhibitory factor (MIF); Recovery of MIF activity after purification by gel filtration and disc electrophoresis. *Cell. Immunol.*, **1**, 133~145, 1970.
- 17) Böyum, A.: Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 77~109, 1968.
- 18) Stoek, M., Northoff, H. and Resch, K.: Inhibition of mitogeninduced lymphocyte proliferation by ouabain; Interference with interleukin 2 production and interleukin 2 action. *J. Immunol.*, **131**, 1433~1437, 1983.
- 19) Malakian, A. and Schwab, J.H.: Immunosuppressant from group A streptococci. *Science*, **159**, 880~881, 1968.
- 20) Hanna, E.E. and Watson, D.W.: Host-parasite relationships among group A streptococci. IV. Suppression of antibody response by streptococcal pyrogenic exotoxin. *J. Bacteriol.*, **95**, 14~21, 1968.

(受付: 1985 年 12 月 28 日)