ヒト末梢リンパ球に及ぼすプラトニンの作用

耿 排 力・近藤 直実・元吉 史昭
金子 英雄・寺澤 総介・平野 通子・折居 忠夫

Jpn. J. Clin. Immun., 10 (1): 66~70, 1987.

Effects of platonin on human peripheral blood lymphocytes

Hairiki Ko, Naomi Kondo, Fumiaki Motoyoshi,
Hideo Kaneko, Sosuke Terasawa, Yukiko Hirano and Tadao Oriei

Department of Pediatrics, Gifu University School of Medicine

【Summary】

The effect of Platonin on human peripheral blood lymphocytes (PBL) was studied *in vitro*. Platonin showed proliferative effect on PBL. When PBL was stimulated with T cell mitogen Phytohemagglutinin (PHA) and B cell mitogen *Staphylococcus aureus* Cowan I (Cowan I), it showed enhancing effect on the former and suppressive effect on the latter. In Pokeweed mitogen (PWM) induced immunoglobulin (Ig) productive system, both of the T.B cells, T cells only, or B cells only were pretreated with Platonin and then co-cultured. The Ig secreting cells were demonstrably decreased than that of the absent Platonin pretreated in any groups. However, the ^3H -thymidine incorporation failed to give a significant variation in any groups. In the experiment of T cell subsets detected with monoclonal antibodies and by Fluorescent Activated Cell Sorter (FACS), the OKT8⁺ T cells showed a high proportion in the Platonin treated groups. In summary, B cells were directly suppressed by Platonin and concerning T cells, the T cell subsets showed a high proportion of suppressor/killer T cells. So it is suggested that Platonin suppressed Ig production through suppressing B cells and enhancing suppressor/killer T cells.

Key words : Platonin,
peripheral blood lymphocytes

【概 要】

プラトニンのヒト免疫系に及ぼす作用を末梢リンパ球 (PBL) を用いて検討した。プラトニンは PBL の幼若化反応に対しては促進的に作用したが、T 細胞マイトゲン Phytohemagglutinin (PHA)、B 細胞マイトゲン *Staphylococcus aureus* Cowan I (Cowan I) で刺激した場合、前者に賦活作用を示し、後者に逆に軽度抑制作用を示した。Pokeweed mitogen (PWM) 誘導 Ig 産生系を用いた検討では、T 細胞分画、B 細胞分画のいずれか一方または両方

をプラトニンで処理すると、未処理に比し、Ig 分泌細胞は著しく減少したが、 ^3H -thymidine の取込みは変化しなかった。単クローン抗体によるT細胞サブセットの分析では、プラトニンにより OKT 8 陽性T細胞の比率が増加する傾向が認められた。以上のことから、B細胞はプラトニンにより直接的に抑制を受けたが、T細胞については、Fluorescent activated cell sorter (FACS) を用いたT細胞サブセットに関する成績から、ヘルパー、インデューサーT細胞を抑制するのではなく、むしろサプレッサー、キラーT細胞を賦活することによりIg産生を抑制するものと考えられた。

I. 緒言

プラトニン (Platonin (NK 19) (4, 4'-dimethyl-3, 3'-di-n-heptyl-8-[2-(4-methyl-3-n-heptylthiazole)]-2, 2'-di-carbocyanine diiodine) は trithiazole pentamethine cyanine 系感光色素の1つであり、マウスのT細胞を賦活、B細胞を抑制するとされている¹⁻³⁾。またヒトでは慢性関節リウマチや若年性関節リウマチなどに有効であると報告されている^{4,5)}。薬理作用として抗菌作用、創傷治癒促進作用、網内系造血臓器や内分泌腺賦活作用などを有することが知られている⁶⁾。しかし、ヒト免疫系に及ぼす作用やその作用機序については不明である。そこで、著者らはヒト末梢リンパ球を用いてプラトニンの免疫系に及ぼす作用につき検討した。

II. 対象および方法

1. 細胞分離

健康人 (10~32 歳) のヘパリン加末梢血から Ficoll-Isopaque を用いた比重遠心法により単核球 (PBL) を分離した。さらに一部の PBL を neuraminidase 処理ヒツジ赤血球によりロゼットを形成させた後、再び Ficoll-Isopaque を用いた比重遠心法およびナイロンウールカラム法によりT細胞分画 (T細胞) とB細胞分画 (B細胞) とに分離した。なお、T細胞の純度は94%以上、B細胞の純度は78%以上であり、それぞれの viability は95%以上であった。

2. プラトニン

日本感光色素研究所から購入したものを用いた。使用時、プラトニンをリン酸緩衝液 (PBS, pH 7.4) で溶かし、それぞれ 50, 5, 0.5, 0.05 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用した。

3. マイトゲン

Phytohemagglutinin-M (PHA-M, GIBCO. Lab, USA); Staphylococcus aureus Cowan I (Cowan I, Calbiochem-Behring Corp.); Pokeweed mitogen (PWM, GIBCO. Lab, USA) はいずれも蒸留水で溶かし使用した。

4. 培養条件

10 mM の N-2-hydroxyethylpiperazine-N-2-ethanesulfonic acid (HEPES), 2 mM の L-glutamine, 100 IU/ml の penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の streptomycin および 15 % 非働化胎児ウシ血清 (FCS) を含んだ RPMI 1640 溶液を培養液として使用した。細胞は $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度で培養液に浮遊させ、培養はマイクロプレート (A/S Nunc), あるいは培養チューブで 37°C 5% CO_2 を含んだ培養器内で下記のごとく一定期間行った。

5. リンパ球幼若化反応の測定

細胞 (PBL) 浮遊液をマイクロプレートに $2 \times 10^5/0.2$ ml/ウェルの割で入れ、PHA あるいは Cowan I 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の存在あるいは非存在下にそれぞれの濃度のプラトニンを加えた。3日間培養後、各ウェルに ^3H -thymidine (^3H -TdR, 5 Ci/mmol, Amersham UK) を 0.5 μCi 加え、4時間後にセルハーベスターで細胞を採集し、液体シンチレーションカウンターで細胞に取り込まれた ^3H の放射活性をカウントした。なお、測定は少なくとも triplicate で行った。

6. 免疫グロブリン (Ig) 分泌細胞の検出

著者ら^{7,8)}がすでに報告したプロテインA結合ヒツジ赤血球を用いたプラーク法により行った。すなわち、プロテイン A (Pharmacia) 0.5 mg/ml を $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ を用いてヒツジ赤血球に結合させ、25% の minimum essential medium (MEM) 溶液 (Microbiological Associates, Maryland) に浮遊させ標的細胞とした。

PBL を培養液に $1 \times 10^6/\text{ml}$ の濃度に浮遊させ、Cowan I 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ あるいは PWM 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 存在下に各濃度のプラトニンを添加して7日間培養した後、MEM で1回洗浄し、1 ml の MEM に浮遊させた。ついでプロテイン A 結合ヒツジ赤血球浮遊液 0.05 ml, PBL 浮遊液 0.1 ml, 抗ヒト Ig 血清 0.025 ml (医学生物研究所) およびモルモット補体 0.025 ml (極東製薬) を混合し、その 0.1 ml を Cunningham チャンバー内に入れ、パラフィンで封じ、 37°C で6~12時間インキュベートし、肉眼でプラーク形成細胞 (PFC) 数を算定した。なお、抗ヒト Ig

Effect of Platonin on human peripheral blood lymphocytes without mitogen stimulation

図 1

血清として、抗ヒト γ 鎖血清、抗ヒト μ 鎖血清、抗ヒト α 鎖血清を使用した時に出現する PFC を、それぞれ IgG, IgM, IgA 分泌細胞とした。PFC 数はウェルあたりで示したが、一部の成績は対照群の PFC 数に対する実験群の PFC 数を百分率で示した。

$$(\% \text{ PFC} = \frac{\text{実験群の PFC 数}}{\text{対照群の PFC 数}} \times 100)$$

7. T, B 細胞の組み合わせによる Ig 分泌細胞の検出

T 細胞, B 細胞を培養液で $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、これらの細胞のいずれか一方または両方をプラトニン (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) で 37°C 5% CO_2 培養器内で 24 時間インキュベートした。その後それぞれの細胞を PBS (pH 7.4) で 3 回洗浄し、再び $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。細胞の viability は約 72~86% であった。これらの T 細胞, B 細胞をそれぞれ 0.1 ml ずつマイクロプレートの各ウェルに入れ、PWM (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 存在下で培養を開始し、培養 3 日後、前述と同様に ^3H -TdR の摂取率を測定し、7 日後に PFC の測定を行った。

8. 単クローン抗体による T 細胞サブセットの分析

PBL を培養液で $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し、各濃度のプラトニンおよび 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の PHA を加え、培養チューブにて 37°C 5% CO_2 培養器で 3 日間培養後、PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、再度 PBS で $1 \times 10^6/\text{ml}$ に調整した。これらの PBL 浮遊液を 100 μl , FITC 結合単クローン抗体 (OKT 3, OKT 4, OKT 8, OKT 11, オース・ダイアグノスティック・システムズ) を 10 μl ずつ各チューブに入れ、十分かくはんした後、 4°C 30 分インキュベートし、

Effect of Platonin on PBL stimulated with PHA or Cowan I

図 2

Exp. 1

cell source	Mitogen	% PFC		
		IgG	IgM	IgA
PBL	Cowan I	(-)	100	100
		0.05	~80	~80
		0.5	~80	~80
		5	~10	~10
		50	~10	~10
	PWM	(-)	100	100
		0.05	~80	~80
		0.5	~80	~80
		5	~10	~10
		50	~10	~10

Effect of Platonin on plaque forming cells stimulated with Cowan I or PWM

図 3

PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、Fluorescent activated cell sorter (FACS, Ortho. USA) で分析した。

III. 成績

1. プラトニンによる PBL の幼若化反応

図 1 に示されるように、健康人 PBL はプラトニンにより幼若化反応を示した。すなわち、0.05, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の添加で ^3H -TdR の摂取率は極大値を示した。

2. マイトゲンによる PBL の幼若化反応に及ぼすプラトニンの影響

健康人 PBL の PHA による幼若化反応はプラトニンにより増強したが、Cowan I による幼若化反応はプラトニンにより軽度抑制された (図 2)。

3. PBL の Cowan I あるいは PWM 誘導 Ig 産生に及ぼすプラトニンの影響

図 3, 4 に示されるように、PBL の Cowan I あるいは

PWM による Ig 産生はプラトニンの濃度に依存して抑制された。

4. PWM 誘導 Ig 産生系を用いた T, B 細胞の組み合わせによる検討

T 細胞, B 細胞のいずれか一方または両方をプラトニンで処理した後, 組み合わせて培養すると, 各群の ^3H -TdR の摂取率は変化しなかったが, Ig 分泌細胞の検出では, T 細胞, B 細胞のいずれか一方または両方をプラトニンで処理すると, 未処理に比し, Ig 分泌細胞は著しく減少した (図 5)。

5. T 細胞サブセットの FACS による分析

プラトニンはヒト T 細胞に対しては賦活的に作用する

ものの T 細胞サブセットに影響を与えるかどうかについて, プラトニン処理による T 細胞サブセットの変動を FACS により分析したところ, 図 6 に示されるように, OKT 8 細胞の比率が増加する傾向が認められた。

IV. 考 察

プラトニンは慢性関節リウマチや若年性関節リウマチなどの治療に有効であると報告されている^{4,5)}。またマウスでは T 細胞を賦活, B 細胞を抑制するとされている¹⁻³⁾。本研究はヒト末梢リンパ球に及ぼすプラトニンの作用やその免疫薬理学的機序を明らかにする目的からヒト PBL, T 細胞, B 細胞を用いて検討した。

プラトニンは PBL の幼若化に対して 0.05, 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で明らかな反応を示したが, T 細胞マイトゲン (PHA), B 細胞マイトゲン (Cowan I) で刺激した場合, 前者に賦活作用を示し, 後者に逆に軽度抑制作用を示した。PWM 誘導 Ig 産生系を用いた成績では, プラトニンは Ig 産生を抑制した。このうち B 細胞はプラトニンにより直接的に抑制を受けたが, T 細胞については, FACS を用いた T 細胞サブセットに及ぼす成績から, ヘルパー, インデューサー T 細胞を抑制するのではなく, むしろサプレッサー, キラー T 細胞を賦活することにより Ig 産生を抑制するものと考えられた。Strelkauskas ら^{9,10)}は慢性関節リウマチの病態に T 細胞特に Ts 細胞 (サプレッサー T 細胞) の機能障害を指摘している。したがって, プラトニンの抗リウマチ剤として働く機序の 1 つにサプレッサー T 細胞を賦活して, その作用を発揮していく可能性が考えられた。

Exp. 2

Effect of Platonin on plaque forming cells stimulated with Cowan I or PWM

図 4

Effect of Platonin on proliferation (incorporation of ^3H -TdR) and differentiation (detection of plaque forming cells) of T cells and B cells in co-culture system with pokeweed mitogen.

T : T cells Tp : T cells treated with platonin for 1 day.
B : B cells Bp : B cells treated with platonin for 1 day.

図 5

図 6

免疫疾患の場合T細胞の機能がいろいろな原因で障害され、T細胞の働きが弱くなったため、B細胞の活性が亢進していくとも考えられている^{11,12)}。その点で免疫治

療剤としてのプラトニンは障害されたT細胞の機能を回復し、亢進されたB細胞の機能を抑え、いわゆる免疫調整剤として働くものと考えられた。

文 献

- 1) 山本 格・内藤万紀：免疫調節剤としての Platonin (NK 19) の評価 (I) マウス脾細胞 PFC 応答及び ^3H -TdR 取込みに関する研究。感光色素, 88 : 31~39, 1981.
- 2) 山本 格・大熊重則・辻 淳一・松浦栄次：免疫調節剤としての Platonin (NK 19) の評価 (II) *In vivo* 抗体応答ならびにアジュバント関節炎に対する作用。感光色素, 89 : 26~34, 1984.
- 3) 山本 格・中山妙子：Platonin と Lumin のリンパ球幼若化反応ならびに *in vitro* 抗体応答に対する作用の比較。感光色素, 88 : 57~58, 1981.
- 4) 波多野元久・山田多啓男・吉田 哲・竹内直文・野呂貞子・渡辺一彦：神経痛、関節リウマチ等に対する感光色素プラトニン (Platonin) の使用経験。感光色素, 84 : 4~8, 1975.
- 5) 小野博正・篠田練司・耿 排 力・清水信雄・近藤直実・折居忠夫：若年性関節リウマチに対するプラトニンの効果。岐阜医紀要, 印刷中.
- 6) プラトニン文献集, 株式会社 日本感光色素研究所, 岡山, 1976, pp. 15~32.
- 7) 近藤直実・折居忠夫・植竹久雄：Pokeweed mitogen 誘導免疫グロブリン産生系におけるヒト同種 T-B 細胞間の適格性の存在とその解析。アレルギー, 30 : 281~288, 1981.
- 8) Kondo, N., Uetake, H. : Effect of human T cell culture supernatants on polyclonal immunoglobulin secretion of lymphoblastoid cell lines transformed by Epstein-Barr virus. Ann. Rep. Inst. Virus. Res. Kyoto Univ., 22 : 29~34, 1979.
- 9) Strelkauskas, A.J., Schaaf, V., Wilson, B.S., Chess, L., Schlossman, S.F. : Isolation and characterization of naturally occurring subclasses of human peripheral blood T cells with regulatory functions. J. Immunol., 120 : 1278~1282, 1978.
- 10) Strelkauskas, A.J., Chelley, R.T., Madowell, J., Borel, Y., Schlossman, S.F. : Direct evidence for loss of human suppressor cells, during active autoimmune disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 75 : 5150~5154, 1978.
- 11) 坂根 剛：IV. 免疫学の医学への応用 3 全身性エリテマトーデスにおける T 細胞機能。代謝 16 (臨時増刊号) : 1943~1953, 1979.
- 12) 吉本 敬：特集自己免疫発症機序—最近の考え方—T 細胞の異常。臨床免疫 12 : 265~269, 1980.