CCA の免疫学的研究

山本 格・大森 斉, 笹野 稔*

CCA:: An immunopharmacological profile CCA [N-(2-carboxyphenyl)-4-chloroanthranilic acid] at 50-100 $\mu\text{g/ml}$ markedly suppressed the PFC response when an optimal amount of antigen (SRBC) was present in the culture, while the drug did not suppress but enhanced the immune response in conditions where spleen cells were cultured with suboptimal amount of the antigen. On the other hand, the PFC response to DNP-Ficoll (a thymus-independent antigen) was not influenced by CCA. CCA, itself did not show mitogenic activity, but augmented the proliferative response caused by Con A. The proliferative response to a B-cell mitogen, LPS, however, was not affected by addition of 1-50 $\mu\text{g/ml}$ CCA. Oral administration of CCA (10 mg/kg) increased the primary PFC response to TNP-HGG or SRBC in normal mice, but suppressed it in NZB/WF₁. The secondary antibody response to SRBC, however, was slightly suppressed by repeated administration of CCA between the first and second immunization. Moreover, the artificially enhanced antibody response by the injection of colchicine was tend to be restored to the normal level by CCA administration. Thus, the present experiments and other findings suggested that CCA might be a compound having immunopharmacological profile as an immuno modulator sensitive to T-cell population. It would be expected that this drug can be applied not only to rheumatoid arthritis but also other immune diseases due to T-cell disfunctions.

Itaru Yamamoto • Hitoshi Ohmori • Minoru Sasano
Department of Medicinal Biochemistry, Faculty of
Pharmaceutical Sciences, Okayama University

CCA {N-(2-carboxyphenyl)-4-chloroanthranilic acid disodium salt} は、中外製薬で新しく開発され、抗リウマチ剤として臨床における有効性が報告されつつある化合物である¹⁾。しかし、その作用機作は、現在のところ明らかではない。一方、動物実験において、CCA は、ラットのアジュバント関節炎治療効果²⁾、自己免疫疾患を発症した NZB/WF₁ マウスに対する治療効果³⁾、および、正常マウスの抗体産生促進効果⁴⁾などが報告され、抗リウマチ作用のみならず、免疫異常に起因する疾患に対し、免疫調節剤として期待される化合物である。

今回、われわれは本化合物のマウスリンパ球に及ぼす作用について、*in vitro*, *in vivo* 両面から調べ、免疫調節剤としてのプロフィールが明らかとなったので報告する。

材料と方法

CCA は中外製薬から分与されたものを用いた。動物は、BALB/c (8~12 W), NZB/WF₁, (14~21 W) を用いた。FCS は GIBCO 社, RPMI 1640 培地は日水のものそれぞれを用いた。SRBC は西日本シープフェームから購入した。Con A は E.Y. Laboratories, LPS は

DIFCO から購入した。TNP-HGG, DNP-Ficoll は幅らの方法⁵⁾に準じ作製したものを用いた。Hemolytic plaque forming cells (PFC) は Jerne の方法⁶⁾で測定した。脾細胞の培養は Marbrook 法⁷⁾および Mishell-Dutton 法⁸⁾に準じて行った。³H-TdR の細胞への取り込み実験は Labo Science 社の Labo Mash を用いた。

CCA [N-(2-carboxyphenyl)-4-chloroanthranilic acid]

結 果

(1) 抗 SRBC PFC 産生に対する影響

われわれの用いた primary *in vitro* 抗 SRBC PFC 産生系、つまり Marbrook 法、および multi well plate 法においては、両法ともに抗原 SRBC の量を 5×10^6 個/culture 用いたときに最大の IgM PFC 応答が得られ、SRBC 量を 1/50 の 1×10^5 個/culture 個に減少させると、PFC 応答は、およそ 1/3 程度に減少する。この二つの条件下において、CCA の作用を検討した。CCA は 1~

* 岡山大学薬学部生物薬品製造学教室

図1 effect of CCA on anti-SRBC PFC response *in vitro* under different methods of murine lymphocyte culture

Appropriate numbers of spleen cells from BALB/c mice were cultured with 5×10^6 (●), 1×10^6 (□) or 1×10^5 (○) SRBC for 4 days in RPMI-1640 medium containing 10% FCS and 1×10^{-5} M 2-ME at 37°C under 5% CO_2 in air.

(A) Marbrook's method: 1×10^7 spleen cells culture

(B) Modified Mishell-Dutton's method: 0.6×10^7 spleen cells culture

図2 effect of CCA on anti-SRBC PFC response in BALB/c and NZB/W F₁ mice *in vitro*
 1×10^7 Spleen cells (from BALB/c or NZB/W F₁ mice) were cultured under the standard condition with 5×10^6 SRBC in the presence of varying concentrations of CCA.

100 μg/ml の濃度範囲で SRBC が十分存在し、最大の PFC が得られる場合には、これを減少させ、逆に少量の SRBC の存在下で免疫応答を低下させた状態では PFC 数を増加させた。以上の結果は培養法をかえても同様で

あった(図1)。

(2) NZB/WF₁ マウスと正常動物による *in vitro* 抗体産生に対する CCA の効果の比較

抗 SRBC PFC 応答に対する CCA の効果について NZB/WF₁ マウスと BALB/c マウスの脾リンパ球を用いて SRBC に対する *in vitro* 抗体産生に対する効果の比較を行った。図2に示すように NZB/WF₁ マウスの脾リンパ球に対しては CCA は 1 μg/ml という BALB/c リンパ球に対しては無影響な低濃度においても明らかに抑制効果を示した。

(3) CCA の添加時期の影響

Marbrook 法において、CCA の免疫応答抑制効果のみられる条件、すなわち、脾細胞 1×10^7 個/culture、抗原 SRBC 5×10^6 個/culture、2-ME 1×10^{-5} M、および CCA 100 μg/ml の条件を用いて、CCA の抑制作用と CCA の培養系への添加 timing との関連について検討した。

先にも述べたように、CCA を培養開始と同時に添加すると、PFC 数は約 1/2 に減少する。この作用は、培養開始24時間後に添加しても同様であった。しかし、それ以後に添加したのでは十分な抑制効果は認められなかった(図3)。

(4) T cell 非依存性抗原に対する影響

これまで T cell 依存性の particle 抗原である SRBC

図3 effect of addition time of CCA on anti-SRBC PFC response *in vitro*

Spleen cells (1×10^7) from BALB/c mice were cultured with 5×10^6 SRBC according to Marbrook's method for 4 days with the addition of CCA (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) at the indicated time.

図4 effect of CCA on the proliferative response of mouse spleen cells to Con A or LPS
Spleen cells (1×10^5) from BALB/c mice were cultured with the indicated amount of mitogens in the presence of varying concentrations of CCA for 2 days. Then, cells were pulsed with ^3H -TdR (0.5 $\mu\text{Ci}/\text{well}$) for 18 hr.

を用いて実験を行ってきたが、つぎに、T cell 非依存性の抗原である DNP-Ficoll に対する PFC 応答に及ぼす CCA の作用を検討した。DNP-Ficoll においては 10~100ng/ml の範囲ではほぼ最大の抗 TNP-PFC 応答が得られた。表に示すように、DNP-Ficoll に対する抗 TNP-PFC 応答は、CCA 添加によりほとんど影響を受けなかった (表1)。

(5) リンパ球幼若化反応に対する影響

Con A (T cell mitogen), LPS (B cell mitogen) の

表1 effect of CCA on the PFC response of murine lymphocyte to DNP-Ficoll, a T-independent antigen *in vitro*

CCA ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PFC/culture $\pm$ SD	
	anti-TNP	anti-SRBC
0	1,940 $\pm$ 116	1,160 $\pm$ 60
10	1,800 $\pm$ 147	1,250 $\pm$ 250
100	1,910 $\pm$ 269	560 $\pm$ 80

spleen cells (0.6×10^7) from BALB/c mice were cultured with 20 ng/ml DNP-Ficoll or 5×10^6 SRBC by the modification of the method of Mishell-Dutton using multi-well plates.

表2 effect of CCA administration on Primary PFC response to TNP-HGG in mice

treatment	anti-TNP PFC /spleen ($\times 10^{-3}$)	anti-TNP PFC /10 ⁶ spleen cells
Control	29.0 $\pm$ 3.3	257 $\pm$ 37
CCA 10 mg/kg	66.8 $\pm$ 19.8	556 $\pm$ 141
CCA 50 mg/kg	34.4 $\pm$ 3.6	288 $\pm$ 33

four BALB/c mice per group were used.

おのおの高濃度および低濃度存在下における正常マウス脾細胞内への ^3H -TdR の取り込みに及ぼす CCA の影響について検討した。CCA は 1~10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲で Con A 刺激による ^3H -TdR の取り込みに対しては促進作用を示し、LPS 刺激に対しては影響を与えなかった (図4)。

(6) 正常マウスの *in vivo* 抗体産生に対する CCA 投与の影響

つぎに *in vivo* おける抗体産生に対する CCA の影響について検討した。正常 BALB/c マウスに可溶性の T cell 依存性抗原である TNP-HGG 100 μg を腹腔に免疫後、4 日目にみられる抗 TNP 一次抗体産生を調べたところ、CCA 10mg/kg を免疫2日前より7日間投与したマウスにおいては PFC 応答が約2倍促進されていた (表2)。50 mg/kg ではこの作用はほとんどみられなかった。結果には示さないが、SRBC を抗原として用いた場合にも同様の結果を得た。また SRBC に対する *in vivo* における二次抗体産生は CCA を一次感作と二次感作の間3週間毎日投与することにより、一次応答の場合とは逆に軽度抑制された。

(7) colchicine 処置マウスの *in vivo* 一次抗体産生に対する CCA 投与の影響

表 3 effect of CCA administration on the colchicine-induced enhancement of primary PFC response to TNP-HGG in mice

treatment	anti-TNP PFC /spleen ($\times 10^{-3}$)	anti-TNP PFC / 10^6 spleen cells	anti-TNP PFC /spleen ($\times 10^{-3}$)	anti-TNP PFC / 10^6 spleen cells
	exp 1		exp 2	
control	12.5 $\pm$ 1.2	154 $\pm$ 14	25.6 $\pm$ 2.2	239 $\pm$ 55
colchicine	32.6 $\pm$ 3.2	438 $\pm$ 52	68.6 $\pm$ 1.2	619 $\pm$ 103
colchicine+CCA 10 mg/kg	16.1 $\pm$ 2.5	164 $\pm$ 18	33.5 $\pm$ 201	270 $\pm$ 20
colchicine+CCA 50 mg/kg	19.9 $\pm$ 6.7	289 $\pm$ 66	30.8 $\pm$ 8.0	261 $\pm$ 52

four BALB/c mice per group were used.

マウスに抗原とともに colchicine を投与すると suppressor T cell の誘導が阻害されるために抗体産生が上昇することが報告されている^{9,10)}。TNP-HGGを抗原としたわれわれの実験条件においても表3に示すように colchicine 投与により、抗 TNP-PFC が約3倍増加した。このような上昇した応答は CCA 10 mg/kg または 50 mg/kg を抗原感作の2日前より7日間投与することにより無処置の対照群の示す応答に近い値まで低下した。

このような異常に亢進した応答に対する抑制作用は遺伝的に抗体産生亢進の病態を示す NZB/WF₁ においても認められた。すなわち、データは示さないが正常 BALB/c および NZB/WF₁ に10日間 CCA 50 mg/kg を投与後それらの脾リンパ球を *in vivo* で培養し、SRBC に対する抗体産生を調べると BALB/c では CCA 投与群において PFC 数の増加が NZB/WF₁ においては逆に CCA 投与により抑制傾向が認められた。

考 察

水島¹¹⁾は、各週齢の C3H/He マウスに少量の SRBC 抗原を注射し、4日後の脾細胞 PFC 数を測定する系において動物の週齢とともにその PFC 数が減少することを明らかにすると同時に、免疫調節剤の一つであるレバミゾールを抗原と同時に投与すると週齢とともに低下した免疫応答が回復することを認めた。しかし、5～6週齢のマウスでは免疫強化作用は認められず、むしろ抑制作用があらわれると報告している。このようないわゆる免疫調節剤作用は本研究において示した(図1) *in vitro* の脾細胞培養系の抗 SRBC PFC 応答に対する CCA の効果においても認めることができた。すなわち、SRBC 抗原量が不十分で、したがって免疫応答の低い条件下で

は CCA はこの反応を上昇させ、逆に抗原量が十分で最高の免疫応答を示す条件下では、これを強く抑制し、さらにその中間の条件下で培養したリンパ球の反応に対しては無影響であった。

ただし、*in vitro* でリンパ球を培養するとき通常その免疫応答を上昇させるために 2-ME (2-mercaptoethanol) を添加するが、この添加量を減少させ反応を低下させた場合には CCA はこの応答を促進させる効果はなかった。免疫抑制剤といわれる化合物の場合にはどのような条件下でも抑制が認められることが知られているゆえに、CCA が免疫調節剤としての働きを有するきわめてユニークな化合物といえるであろう。

つぎに正常マウスである BALB/c と遺伝的免疫異常を示す NZB/WF₁ マウスの脾リンパ球の抗 SRBC PFC 応答に対する CCA の効果を比較したところ免疫応答の亢進している NZB/WF₁ マウスの脾リンパ球に対して CCA は正常リンパ球に対しては無影響な比較的低濃度でこの応答を抑制した。この知見は CCA がいわゆる免疫調節剤として作用している第2の証拠としてあげることができよう。SRBC は T cell 依存性の particle 抗原であるが T cell 非依存性の soluble 抗原の一つである DNP-Ficoll を用いた場合は、表1に示したように 100 μg/ml という高濃度の CCA によってもならん抑制作用がみられなかった。またわれわれは予備実験ではあるが TNP-HGG のとき soluble な T cell 依存性抗原を用いた場合の CCA の影響を調べたところ、SRBC の場合にくらべて軽度 PFC 応答を抑制することをみだしている。SRBC 抗原で明確に認められる抑制作用が、その抗原の特殊性によるかどうか明らかではないが、現在のところ CCA の作用が、B cell よりむしろ T cell にあると考えられ、この点についてはさらに詳細に解析

するつもりである。Ohsugi ら³⁾は、CCA の諸種の作用が胸腺由来の細胞を介して発現していることを示唆しているが、われわれのデータもこれを支持するものである。大量の LPS により惹起される polyclonal な、抗体産生を抗 SRBC および抗 TNP PFC として測定した場合、この反応は CCA 添加によってまったく抑制されなかったことから、CCA は B cell 群にはほとんど作用しないと考えられる。このことは mitogen によるリンパ球の幼若化反応に対する CCA の影響を調べた実験によっても支持された。すなわち、CCA はそれ自身 mitosis 作用を示さないが、Con A 刺激による ³H-TdR の取り込みを 1~10 µg/ml の濃度において有意に促進した。一方、LPS による反応に対しては同様の濃度で無影響であった。

CCA の *in vivo* における免疫薬理学的作用については、Ohsugi ら²⁻⁴⁾によりラットのアジュバント関節炎予防効果²⁾、NZB/WF₁ マウスの腎炎予防効果³⁾ 正常マウスにおける抗 SRBC 抗体産生促進作用⁴⁾などが報告されている。データには示さなかったが、CCA は SRBC に対する遅延型アレルギー反応を軽度促進することを認めた。また、表 2 に示したように正常動物において SRBC や TNP-HGG に対する PFC 応答が CCA 投与により促進されることをみだした。一方、NZB/WF₁ マウスを用いて同様の実験を行なった場合には、CCA は抑制効果を示した。また正常動物の SRBC に対する二次抗体産生に対しては、これを抑制する傾向を示した。免疫亢進状態に対しては、CCA が抑制的に働き正常な免疫応答は逆に促進するという CCA の、いわゆる免疫調節的作用は、*in vivo* においても観察された。colchicine を動物に投与すると suppressor T cell (Ts) を障害する結果、TNP-HGG などに対する PFC 応答が上昇することが知られている^{9,10)}。CCA がこれらの反応を阻害することから、Ts cell の誘導あるいは活性化に本薬剤が関与している可能性が示された。

中野と大沢¹²⁾は、NZB/WF₁ マウスを用いて Con A による Ts cell の誘導が CCA により促進されることを ³H-TdR の取り込み実験から示しているが、われわれの成績もこれと一致するものである。

安倍らは、諸種の方法（アザチオプリンやシクロホスファミドなどの投与）で免疫機能を低下させたマウスにおける PFC 応答が CCA 投与により上昇回復されたと報告している^{13,14)}。

以上のごとき CCA のいわゆる免疫調節作用が *in vivo* および *in vitro* の実験を通じて免疫応答の kinetics の変化を観察しているにすぎないのではないかと推測は否定しえないが、この点についてはさらに詳細に検討の予定である。

CCA は現在慢性関節リウマチ RA に対して臨床効果

が試験されている段階である²⁾。基礎研究の結果から、CCA は Ts cell の活性化などを介して RA の病像形成の重要な因子の一つである immune complex の産生を抑制する可能性が指摘できる。従来の免疫治療剤とは異質のメカニズムで RA を治療可能な薬物として CCA の将来が期待できる。

要 約

in vitro でマウス脾細胞を十分量の抗原 SRBC の存在のもとに培養し、4 日目の抗 SRBC PFC を観察する系において CCA 50~100 µg/ml を添加すると、これを強く抑制することが判明した。逆に不十分量の抗原を用いた場合には PFC の生成を促進した。一方、T cell 非依存性の抗原である DNP-Ficoll に対する PFC 応答に対しては、まったく影響を与えなかった。CCA にはそれ自身 mitogen としての活性はないが、T cell mitogen である Con A の幼若化反応を促進した。しかし、B cell mitogen である LPS の作用に対しては促進作用はみられなかった。マウスを用いた *in vivo* の実験では CCA 10 mg/kg 経口投与により正常動物の抗 SRBC PFC および TNP-HGG 抗原に対する抗 TNP-PFC を増加させたが、NZB/W F₁ マウスの抗 SRBC PFC 応答は抑制した。

また、正常動物の secondary response の抗 SRBC IgG PFC 応答に対しては、これを軽度抑制した。さらに colchicine を処理し、suppressor 機能を抑制し、人工的に免疫応答を亢進させた動物に CCA を投与するとその応答亢進状態がもとのレベルに回復した。

以上、CCA は動物実験において、免疫増強および免疫抑制の両作用を有し、抗リウマチ剤としてのみならず、免疫異常特に T cell 異常に起因する免疫疾患に対し、免疫調節剤としての有効性が期待できるものと思われる。

文 献

- 1) 安倍千之、藤 治信、塩川優一：リウマチ 19: 554-555, 1979.
- 2) Ohsugi, Y. et al.: J. Pharm. Pharmac. 29: 636-637, 1977.
- 3) Ohsugi, Y. et al.: J. Pharm. Pharmac. 30: 126-128, 1978.
- 4) Ohsugi, Y. et al.: Chem. Pharmac. Bull. 25: 2143-2145, 1977.
- 5) 幅 誠一、浜岡利之：免疫実験操作法 B. 日本免疫学会編（金沢），1971, p 1129-1133.
- 6) Jerne, N.K., Nordin, A.A.: Science 140: 405, 1963.
- 7) Marbrook, J.: Lancet 2: 1279, 1967.
- 8) Mishell, R.I., Dutton, R.W.: J. Exp. Med. 126: 423-442, 1967.

- 9) Shek, P.N. Coons, A.H.: J. Exp. Med. 147: 1213-1227, 1977.
- 10) Shek, P.N. et al.: J. Exp. Med. 147: 1228-1235, 1977.
- 11) 水島 裕: リウマチ, 20: 57-62, 1980.
- 12) 中野利昭, 大沢利昭: 日本薬学会第99年会講演要旨集. 日本薬学会編 (東京). 1979, p 458.
- 13) 安倍千之: リウマチ 18: 381-387, 1978.
- 14) 塩川優一: 臨床免疫 12: 104-109, 1980.