2-mercaptoethanol のマウスリンパ球による *in vitro* 抗体産生促進機構

大森 斉・山本 格*

A mechanism of augmentation of in vitro antibody response by 2-mercaptoethanol in murine lymphocytes The mechanism of augmentation of antibody response *in vitro* by 2-mercaptoethanol (2 ME) was investigated. By employing cystine-free RPMI-1640 medium, it was demonstrated that cystine was absolutely required for eliciting the *in vitro* antibody response in murine lymphocytes. The augmentation by 2 ME was completely dependent on the presence of cystine. Maximal response was reached when cysteine or cystine (as half cystine) was added at 2.5 mM where 2ME did not further enhanced the response. The serial feeding of cysteine, but not of cystine, amplified its potentiating activity at lower concentrations (≤ 1 mM). The addition of 10^{-5} M 2 ME to the medium shifted the dose-response curve to lower concentrations by about one order of magnitude. It was found that 35 S-cystine was incorporated into lymphocytes one fifth more slowly than 35 S-cysteine. Cystine uptake was accelerated by about 2.5-fold in the presence of 10^{-5} M 2 ME. A close correlation was observed between dose-response profiles of 2 ME in augmenting the antibody response and the stimulation of cystine uptake. These data suggest that one of the roles of 2 ME in augmenting antibody response *in vitro* is to facilitate the uptake of cystine which is contained in RPMI-1640 medium and which is utilized less efficiently than cysteine.

Hitoshi Ohmori • Itaru Yamamoto

Department of Medicinal Biochemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences,
Okayama University

2-メルカプトエタノール (2 ME) が、抗体産生¹⁾や、細胞障害性 T 細胞の誘導²⁾などの *in vitro* のリンパ球反応を増強することはよく知られている。この化合物は、これらのリンパ球反応を効率よく行うための有用な添加物として広く用いられているにもかかわらず、その作用機作については統一的結論が得られていない。2 ME の *in vitro* 抗体産生促進は、2 ME によるウシ胎児血清 (FCS) 成分の活性化を介して起こるという報告がある³⁾。しかし、2 ME で活性化された FCS 成分の化学的性状については、なにもわかっていない。

最近、Hoffeldら⁴⁾は、2 ME の抗体産生増強における役割は、FCS に含まれる細胞毒性のある酸化型グルタチオン (GSSG) をその還元型 (GSH) に変換することであると報告している。

一方、筆者らは 2 ME をはじめ種々のチオール化合物の mitogen 活性と抗体産生促進能力を比較し、両者に相関性のあることを見いだした⁵⁾。この研究の過程で、GSH よりも高い還元電位を有し従って GSSG を還元できない cysteine を 5 mM 程度の高濃度加えれば、2 ME (10^{-5} M) と同程度の促進効果が得られることを見だし

た。さらに、cysteine の新鮮な溶液を 12hr ごとに逐時添加した場合は、最大の応答促進に必要な cysteine の濃度は 0.5 mM 程度にまで低下した。一方、cystine でも cysteine とほぼ同程度に抗体産生を促進することができたが、この場合は逐時添加の効果がまったく認められなかった。一方、リンパ球の培養条件では、cysteine は急速に cystine に酸化されてしまう⁶⁾ことを考慮すると、以上の結果は、リンパ球が cystine よりも cysteine を抗体産生促進のために効率よく利用することを示唆している。またリンパ球培養に用いる RPMI-1640 培地は、cysteine を cystine の形で含有している。

本論文において、筆者らは、マウスリンパ球による *in vitro* 抗体産生は培地中の cystine に完全に依存すること、および 2 ME は cystine のリンパ球への取り込み反応を促進することによって、抗体産生を増強することを示唆する結果を得たので報告する。

材料と方法

(1) 実験材料

BALB/c マウス (♀) は、6 週齢のものを日本チャールズリバーから購入し、10~15 週齢で使用した。試薬および培地は、つぎのところから入手した、

* 岡山大学薬学部生物薬品製造教室

图1 effect of serial addition of cysteine or cystine on the antibody response to SRBC *in vitro*

BALB/c spleen cells (8×10^6) were cultured with 2×10^6 SRBC in 2 ml of RPMI-1640 medium containing 10% FCS for 4 days in the presence of cysteine, cysteine or 2 ME.

(○) added once at the start, (●) added serially every 12 hr, (---) 2 ME 10^{-5} M.

图2 effect of cysteine or cystine concentrations on the antibody response to SRBC *in vitro* in the presence or absence of 2 ME

BALB/c spleen cells (6×10^6) were cultured with 2×10^6 SRBC in Cys⁻RPMI-1640 medium in the presence of the indicated amount of cysteine or cystine for 4 days. When cysteine was added every 12 hr, the concentrations indicate the total amount of cysteine added after the final addition.

(○) cystine, (Δ) cystine, (●) cystine plus 2 ME (10^{-5} M), (▲) cystine added every 12 hr.

图3 effect of 2 ME on the rate of cystine uptake by murine lymphocytes

RBC-depleted spleen cells (6×10^6) were incubated at 37°C for the time indicated in 1 ml of cystine-free RPMI-1640 medium which was supplemented with 10% FCS and 0.1 mM ^{35}S -half cystine or ^{35}S -cysteine ($0.5 \mu\text{Ci}$).

(○) ^{35}S -cystine, (●) ^{35}S -cystine plus 2 ME (10^{-5} M), (Δ) ^{35}S -cystine (in the presence of 0.2 mM DTT).

图4 dose-response profiles of 2 ME in the enhancement of the antibody response *in vitro* and cystine uptake in murine lymphocytes

A: Effect of 2 ME on the antibody response to SRBC *in vitro*. BALB/c spleen cells (8×10^6) were cultured with 2×10^6 SRBC in the presence of 2 ME for 4 days.

B: Effect of 2 ME on cystine uptake. RBC-depleted spleen cells (6×10^6) were incubated with 0.37mM ^{35}S -half cystine ($2 \mu\text{Ci}$) for 60 min.

表 1 cysteine requirement of murine lymphocytes for eliciting primary antibody response to SRBC *in vitro*

culture medium	2 ME (10 ⁻⁵ M)	anti-SRBC PFC /culture
complete medium	—	1160 ± 135
complete medium	+	3787 ± 143
- GSH	+	3533 ± 53
- cystine	+	<30
- cystine, - GSH	+	<30

BALB c spleen cells (6 × 10⁶) were cultured with SRBC in ml GSH - and cystine-free RPMI medium containing FCS for days. When complete medium was employed, ml cystine and ml GSH were supplemented to the basal medium.

ウシ胎児血清 (FCS) (GIBCO), RPMI-1640 培地 (日水製薬), ³⁵S-L-cystine (RCC Amersham), L-cysteine hydrochloride, および 2 ME (東京化成), L-cystine hydrochloride (石津製薬).

cystine や GSH を含まない RPMI-1640 培地は, Moore らの組成に従って調製した⁷⁾.

(2) リンパ球の培養

マウス脾リンパ球 (8 × 10⁶個) を 2 × 10⁶ 個のヒツジ赤血球 (SRBC) とともに, 10% FCS を含む 2 ml の RPMI-1640 培地中で, 5% CO₂ 下 37°C にて 4 日間培養した. 培養容器として 24 穴の Nunc カルチャープレートを用いた. すべての培養は, duplicate か triplicate で行った. プラーク形成細胞 (PFC) 数は, Jerne の方法⁹⁾により計数した. cystine-free RPMI-1640 培地で培養するときは, 6 × 10⁶個の脾細胞を 2 × 10⁶個の SRBC とともに 1 ml の培地 (10% FCS 含有) を用いて培養した. この場合, cysteine や cystine の混入を防ぐために, 脾細胞は培養開始前にハンクス液で 2 度洗浄して用いた.

(3) マウスリンパ球への cystine の取り込み

脾細胞から Tris-NH₄Cl 処理¹⁰⁾により赤血球 (RBC) を除去したものをリンパ球標品として用いた. RBC (-) 脾細胞 (4-6 × 10⁶) を 1 ml の 10% FCS を添加した cystine-free RPMI-1640 培地中で 0.1 mM の ³⁵S-cystine (0.5 μCi) とともに保温した. 1 hr 以内の反応は, 培地に 20 mM HEPES を加えて pH 7.2 とし空気中で行った. 一方, 長時間取り込み反応を行う場合には, HEPES を加えず, 5% CO₂ 下で保温した. cysteine の取り込みを調べるときは 1 mM の cysteine を 5 μCi/ml の ³⁵S-cystine と混合し, 2 mM の DTT により 30 分還元したものを ³⁵S-cystine 標品として用いた. すべての反応は, duplicate で行った. 反応は, 4 ml の氷冷したリン

酸緩衝生理食塩水 (PBS) の添加により停止させ, 1,500 × g 2 分間遠心後, もう一度 4 ml の PBS で細胞を洗浄し取り込まれた放射能を測定した.

結 果

市販の FCS の大部分の lot では, 2 ME を培地に添加しないと SRBC に対して低い抗体応答しか得られなかった. しかし, 10⁻⁵M の 2 ME を培地に添加すると, 応答は著明に増強された (図 1).

cysteine を培養開始時に添加すると, 抗体応答は増強され, 5 mM 程度で 2 ME と同等の増強効果が認められた. cysteine の新鮮な溶液を 8 回にわけて, 12 hr ごとに逐時添加した場合は, その促進効果がさらに増強され, 0.5 mM ~ 1 mM で最大の促進効果が得られた (図 1 A). 抗体応答は cysteine のかわりにその酸化型である cystine を用いた場合もほぼ同等に促進されたが逐時添加による効果の増強はまったく見られなかった (図 1 B). 2 ME や cyst(e)ine による抗体応答の促進は, これらの化合物により 10~20% しかリンパ球の生存率が増加しなかったことから非特異的な生存率の改善のみによっては説明できないと思われる. つぎに cysteine が抗体応答を増強する場合, それが栄養因子として必要なのか, たんに SH 化合物として関与しているのかについて検討するために, cystine および GSH-free RPMI-1640 培地を調製し *in vitro* 抗体応答の cystine 要求性について調べた. 表 1 に示すように抗体応答は, cystine がなければまったく起こらなかった.

元来, 低濃度 (1 μg/ml) しか含まれていない GSH を除いても応答はほとんど影響を受けなかったもので, 以後の実験では常に GSH を加えた培地を用いた. 培地に cystine を添加しなければまったく応答が起こらなかったことから, FCS や RBC から培地に持ち込まれる cyst(e)ine や GSH は無視できると思われる.

図 2 は, SRBC に対する抗体応答における cystine または cysteine の dose-response 曲線を示す. 抗体応答は 0.5 mM 以下の half cystine では低かったが 2.5 mM 用いるとほぼ最大に達した. 一方, cystine の dose-response 曲線は 2 ME (10⁻⁵M) が共存すると約 1 オーダー程度低濃度側へ移行した. 換言すれば, 2 ME は cystine が 0 のときも, 2.5 mM のときも, 応答を促進しないが, 不十分量の cystine (0.05~0.5 mM) 存在下でのみ応答を著明に促進した. cysteine は, cystine よりやや効果が大きい傾向にあったが, ほぼ同様な dose-response で抗体応答を誘起した. しかし, cysteine を 8 回にわけて逐時添加した場合は, cysteine の dose-response 曲線は低濃度側へ移行し, 2 ME 存在下での cystine の曲線とほぼ一致した. データは示さないが, 同様な結果は胸腺非依存性抗原である DNP-Ficoll に対する抗体応

答の系でも得られた。通常、RPMI-1640培地は0.4mM程度の half-cystine を含有しており、これは最大の応答を得るには不分量であることが図2の結果から示唆された。

以上のデータおよび培地中では、cystine は容易に cystine に酸化される事実を考慮すると、抗体産生は cystine によっても増強されるが、cystine のほうがリンパ球によってより効率的に利用されること、および cystine のリンパ球による利用が2MEにより促進されている可能性のあることが示唆された。

そこで、 ^{35}S -cystineを用いて、そのリンパ球への取り込みが2MEにより促進されるかどうかについて検討した。図3Aに示すように、cystine は cystine よりも5~6倍速くリンパ球へ取り込まれた。さらに 10^{-5}M の2MEが共存すれば、cystine の取り込みは約2.5倍加速された。2MEによる cystine の取り込み促進効果は反応時間を24hrまで延長しても持続的に認められた。

つぎに *in vitro* 抗体産生および ^{35}S -cystineの取り込みに対する2MEの促進効果の dose-response を比較した。図4に示すように両者により一致がみられ、2MEの抗体応答増強効果において cystine の取り込みを促進することが重要であることが示唆された。

考 察

RPMI-1640培地は cystine を cystine の形で含有している⁷⁾。筆者らは、Toohey の報告⁶⁾にあるように、1mM の cystine を培地に加えても1hr以内に cystine に酸化されてしまうことを確かめた。したがって通常の培養条件では、cystine を与えても cystine としてリンパ球へ供給されると考えるべきであろう。Eagle らは¹⁰⁾ほとんどすべての動物細胞株が cystathionase 経路を欠くために、その増殖に cyst(e)ine を要求することを報告している。筆者らの cystine-free RPMI-1640 培地を用いた実験より、cyst(e)ine がマウスリンパ球による抗体産生において、必須の栄養因子であることが明確に示された(表1, 図2)。

したがってリンパ球が抗体産生細胞へ分化、増殖するためには、cystine を効率的に細胞へ供給することが重要であると考えられる。図2に示したように、cystine の新鮮な溶液を逐時添加するか、cystine に2MEを共存させた場合に、抗体応答はもっとも効率的に惹起された。ヒトの末梢血リンパ球においても報告されているように¹¹⁾、マウスリンパ球は cystine を cystine の少なくとも1/5の速度でしか取り込むことができなかった。しかし cystine の取り込み速度は 10^{-5}M の2ME存在下で約2.5倍加速された。2MEによる cystine 取り込みの促進は、脾リンパ球のT細胞画分およびB細胞画分で同等に認められた(未発表データ)。2.5~5mMの高濃

度の half cystine を加えれば、2MEにより増強された応答と同程度の応答を得ることができる。この条件下では、細胞内に2ME存在下に匹敵する量の cystine が取り込まれることを確認した。これらの結果は、*in vitro* 抗体産生の促進における2MEの役割の一つとして、それ自身ではリンパ球へ取り込まれにくい cystine のリンパ球への取り込みを促進することがきわめて重要であることを示唆した。

2MEによる cystine の取り込み促進は2MEがたんに cystine を還元し、取り込み速度の大きい cystine を生成するためだけではないと考えられる。すなわち、cystine と2MEを混合すると、最初の数時間には cysteine および cystine と2MEの mixed disulfide の両方が生成しているのが観察された。しかし、それ以後は cysteine は cystine に再酸化され、mixed disulfide が唯一の生成物となった。このような条件下でも、2MEによる取り込み促進効果は依然として観察されたので、mixed disulfide 自身もリンパ球へ取り込まれやすいことが想定された。事実 mixed disulfide は、cystine とほぼ匹敵する速度でリンパ球に取り込まれ、cystine よりもはるかに効力よく抗体応答を惹起できることを確かめた(投稿準備中)。

cystine の取り込み促進効果のみが、2MEの抗体応答促進における唯一の機作ではないであろう。ヒト繊維芽細胞を cystin-free 培地に移すと細胞内のGSH濃度が急速に低下し死滅するがこれは2MEや他の抗酸化剤によって保護されることが知られている¹²⁾。筆者らはリンパ球を同様な条件に移すと、やはり急速に死滅しはじめるが、これは抗体産生促進活性の高いSH化合物によって効果的に保護されることを認めている(投稿準備中)。したがって、このようなリンパ球の生存率増加の効果も抗体産生増強の一つの因子となっているであろう。

2MEによる抗体応答促進効果は、FCS成分の活性化を介して発現するという報告がある³⁾。しかし、最近筆者らは、この問題を再検討した結果、2MEによるFCSの活性化現象は見かけ上のものであり、FCS成分に disulfide 結合した2MEに由来するものであることを明らかにした。また、このような結合型の2MEも free の2MEと同様究極的には cystine の取込み促進という共通の機構によって抗体産生を増強するであろうという証拠も得ている(投稿準備中)。

筆者らの今回の実験から、リンパ球を通常の RPMI-1640 培地で培養する場合は、cystine が制限栄養因子となっていることが示された。したがって、cystine のリンパ球への取り込みに影響を与えるすべての因子が *in vitro* 抗体応答を変動させる可能性のあることに注意すべきであろう。

文 献

- 1) Click, R.E., et al.: Cell. Immunol. 3: 264-276, 1972.
- 2) Harris, J.M., et al.: J. Immunol. 116: 1071-1077, 1976.
- 3) Opitz, H.G., et al.: J. Exp. Med. 145: 1029-1038, 1977.
- 4) Hoffeld, J.T., Oppenheim, J.M.: Eur. J. Immunol. 10: 391-395, 1980.
- 5) Ohmori, H., Yamamoto, I.: Immunopharmacol. 3:333-345, 1981.
- 6) Toohey, J.I.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72: 73-77, 1975.
- 7) Moore, G.E., et al.: J.A.M.A. 199: 519-524, 1967.
- 8) Jerne, N.K., Nordin, A.A.: Science 140: 405, 1963.
- 9) Mishell, B.B.: Selected methods in cellular immunology (eds. Mishell, B.B. and Shiigi, S.M.) Freeman and Company, San Francisco, 1980, p 3-27.
- 10) Eagle, H. et al.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 56: 156-163, 1966.
- 11) Schneider, J.A., et al.: Pediat. Res. 2: 441-450, 1968.
- 12) De Brabander, M. et al.: Int. J. Immunopharmacol. 1: 93-100, 1979.