免疫調節剤の生体防御機構へ及ぼす影響

林 成光・安倍千之・塩川優一*, 野沢龍嗣・横田 健**, 上條清明***

Effects of immunomodulators on self-defence mechanisms
 Masaaki Hayashi • Chiyuki Abe • Yuichi Shiohara*,
 Ryushi T. Nozawa • Takeshi Yokota**, Kiyooki
 Kamijo***

生体は、常に微生物感染の危険にさらされているにもかかわらず、その防御力によってこれを阻止している。このような微生物感染に対する生体防御において、食細胞の果たしている役割は大きい。X線照射¹⁾, cyclophosphamide 投与²⁾などにより食細胞機能を抑制すると、重篤な感染が起こることが知られている。また、Nozawaらはマウス腹腔マクロファージの食菌活性の簡単な測定法を開発し、lipopolysaccharide, muramyl dipeptideがこの食菌活性を増強することを報告している³⁾。

一方、今日多くの免疫調節剤が開発され、自己免疫疾患、慢性関節リウマチなどの治療に効果をあげている。これら免疫調節剤は、免疫担当細胞に対し多くの作用を有し⁴⁾、免疫反応にさまざまな影響を与えることが知られている。さらに、食細胞機能に対してもなんらかの影響を与え、ひいては生体防御機構を修飾する可能性が考えられる。

そこでわれわれは、マウス腹腔内渗出細胞の食菌活性に対する数種の免疫調節剤の効果を検討した。

方 法

(1) 腹腔内渗出細胞 (PEC) の調製

BALB/c 系雌マウス (6 週齢) の腹腔内細胞を phosphate buffered saline を用いて洗いだし、これを RPMI-1640 medium (10% 加熱ウシ胎児血清および 60 $\mu\text{g/ml}$ kanamycin sulfate 含有) に 1×10^6 cells/ml の濃度で浮遊させ、これを PEC suspension とした。

(2) PEC の食菌活性の測定

0.10 ml の PEC suspension, 0.05 ml の 15% マウス血清, 0.01 ml の *Candida parapsilosis* 菌 2 倍連続希釈液, 0.05 ml の試験薬物溶液 96 穴を micro test plate に入れ、RPMI-1640 medium で全量 0.30 ml とした。これを CO₂ incubator 中で 37°C, 48 時間培養し、各 well 中の *Candida* 菌コロニーの有無を観察した。食菌活性は、コロニー形成が完全に阻止された点での初期添加生菌数を PEC の最大殺菌数 (MNMK; maximal number of microbes killed) として、これをもって表示した。なお、実験はすべて duplicate で行った。

表 1 effects of serum on the candidacidal activity of peritoneal exudate cells

	serum (%)	drugs	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	candidacidal activity	
				MNMK	increase (n-fold)
exp. 1	0			41.6	
	1.0			166.4	4
	2.5			166.4	4
	5.0			166.4	4
exp. 2	0			40.0	
		LPS	0.1	160.0	4
			1.0	160.0	4
			10.0	80.0	2
	2.5			160.0	
		LPS	0.1	640.0	4
exp. 3			1.0	640.0	4
			10.0	80.0	0.5
	0			40.0	
		SA 96	0.1	80.0	2
			1.0	40.0	1
			10.0	40.0	1
			100.0	40.0	1
	2.5			188.8	
		SA 96	0.1	377.6	2
			1.0	755.2	4
			10.0	755.2	4
			100.0	47.2	0.25

(3) 使用薬物

2-mercapto-2-methylpropanoyl-L-cystein (SA 96), D-penicillamine (D-Pc), traxanox (TRX), levamisole HCl (LMS), N-(2-carboxyphenyl)-4-chloroanthranilic acid (CCA), hydrocortisone (HC), *E. coli* lipopolysaccharide (LPS)

成 績

(1) PEC の食菌活性に及ぼす血清の効果

食細胞の貪食作用は、血清中のオプソニンにより促進されることは周知のことである⁵⁾。本実験においても、PEC の食菌活性は血清の添加により 4 倍の上昇を示した。さらに薬物の効果に対する血清の影響を検討すると、LPS は血清添加の有無にかかわらず 4 倍の活性上昇を引き起こしたが、免疫調節剤である SA 96 は血清添加によって初めて 4 倍の活性上昇が認められた。

これらのことより、血清の有無によって薬物の効果に差がでることが示された (表 1)。

(2) PEC の食菌活性に及ぼす薬物の効果

上記の成績より、薬物の効果は反応系への血清添加の有無によって変動することが示されたため、血清添加および無添加の両系で各薬物の効果を検討した。

血清添加の反応系を用いた場合、SA 96, CCA に LPS と同程度の食菌活性の上昇が認められ、HC は逆

* Department of Internal Medicine, Division of Rheumatology, Juntendo University, School of Medicine 順天堂大学医学部内科 (膠原病) 学教室

** Department of Bacteriology, Juntendo University, School of Medicine 順天堂大学医学部細菌学教室

*** Department of Tissue Culture, Juntendo University, School of Medicine 順天堂大学医学部組織培養学教室

表2 effects of serum on the candidacidal activity of various immunomodulators

drugs	conc. ($\mu\text{g/ml}$)	increase of candidacidal activity	
		serum (0 %)	serum (2.5 %)
SA 96	0.1	2	2
	1.0	1	4
	10.0	1	4
	100.0	1	0.25
D-Pc	1.0	1	1
	10.0	2	2
	100.0	1	1
	10.0	1	1
TRX	0.1	1	1
	1.0	1	1
	10.0	0.5	0.5
LMS	1.0	1	1
	10.0	1	1
	100.0	0.5	0.5
CCA	1.0	1	2
	10.0	2	2
	100.0	2	4
HC	0.1	0.5	0.25
	1.0	0.25	0.25
	10.0	0.25	0.125
LPS	0.1	4	4
	1.0	4	4
	10.0	2	0.5

にこれを低下させた。また、これらの作用は薬物濃度が高くなると抑制に転じ、作用に至適濃度範囲があることがうかがえた。

一方、血清無添加の場合には、LPSを除いてほかの薬物の効果は非常に弱く、種々の薬物の効力判定には血清添加の反応系を用いたほうがよいことが観察された(表2)。

(3) 薬物投与マウスより得られた PEC の食菌活性

マウスに各薬物を経口または腹腔内投与し、このマウスより得られた PEC の食菌活性を測定した。このさい使用した薬物の用量は、ヒツジ赤血球に対する一次免疫応答能にもっとも強く影響を与えた用量である。表3に示すように、SA 96、D-Pc は control の8倍、LMS は4倍、LPS は32倍の活性上昇が認められ、これらの薬物が *in vivo* においても PEC の食菌活性を上昇させていることが明らかとなった。

考案

生体防御機構における食細胞の重要性はよく知られているが、従来の食菌能の測定方法⁷⁾は多くの時間と労力を必要とした。しかし最近 Nozawa らは、*Candida* 菌を用いる簡単な食菌活性測定法を開発した³⁾。そこでわれわれは、この方法を基に近年注目を浴びている免疫調節剤の食菌活性に対する影響を検討した。

PEC の食菌活性は、実験系への血清の添加によって上昇した。さらに免疫調節剤の効果もより明瞭に現れ、薬物の効力判定には血清添加の系を使用したほうがよいことが示された。これは、血清中の正常オプソニンにより *Candida* 菌が貪食されやすい状態になったため⁶⁾に引き起こされたものと思われるが、詳細については不明である。

表3 candidacidal activity of peritoneal exudate cells from the mice treated with various immunomodulators

treatment	candidacidal activity	
	MNMK	increase (n-fold)
control (mg/kg) (days)	136.0	
SA 96 25 po for 2	1,088.0	8
D-Pc 50 po for 2	1,088.0	8
LMS 25 po for 2	544.0	4
CCA 50 po for 2	136.0	1
TRX 30 po for 2	136.0	1
HC 50 po for 2	272.0	2
LPS 1.5 ip	4,352.0	32

LPS was administered at day 0 and candidacidal activity was assayed at day 2, and other drugs were administered two times at day 0 and day 1 and the assay was performed at day 4.

今回実験に使用した免疫調節剤のうち D-Pc、LMS、CCA は *in vitro* または *in vivo* において、さらに SA 96 はその両系において PEC の食菌活性を増強することが明らかとなった。食細胞の生体防御機構における重要性を考え併せるとき、これらの免疫調節剤が種々の感染に対する生体防御能に増強的に作用する事実を示したことになる。この実験成績は薬物の臨床応用拡大の可能性とともに、免疫調節剤の作用機序を考えるうえで非常に興味ある事実である。

文 献

- 1) Gordec, R.S., Simpson, P.J.: Relationships of X irradiation to the enhancement of *Candida albicans* infections. J. Bacteriol. 94: 6-12, 1967.
- 2) Sharbaough, R.J., Groban, J.B.: Effect of cyclophosphamide on experimental *Staphylococcus* infection in the rat. Nature 224: 809-810, 1969.
- 3) Nozaw, R.T., Sekiguchi, R., Yokota, T.: Stimulation by conditioned edium of L-929 fibroblasts, *E. coli* lipopolysaccharide, and muramyl dipeptide of candidacidal activity of mouse macrophages. Cell Immun. 53: 116-124, 1980.
- 4) 山本 格: 新しい免疫調節剤の免疫薬理. 感染症 11: 213-220, 1981.
- 5) 安倍千之, 塩川優一: 各型疫疫反応と免疫調節剤. 炎症 1: 416-418, 1981.
- 6) 坂岡 博, 菊地浩吉: 感染症と免疫. 医科免疫学, 菊地浩吉編, 南江堂, 東京, 1980, p 239-272.
- 7) Furth, R.V., Zwet, T.L., Leijh, P.C. J.: Chapter 32 *in vitro* determination of phagocytosis and intracellular killing by polymorphonuclear and mononuclear phagocytes. Handbook of Experimental Immunology, ed. by Weir, D.W., Blackwell Scientific Publication, London, 1978, p 32. 1-32. 19.