traxanox の BALB/c マウスにおける免疫応答に対する作用

久留正生・寺澤道夫*

Effect of traxanox on immune response in BALB/c mice
Masao Hisadome・Michio Terasawa*

benzopyranopyridine 誘導体 traxanox は、C57 BL/6 および BALB/c マウスにおける *E. coli* の lipopolysaccharide に対する脾ブランク形成細胞 (HPFC) 産生を有意に亢進させることを報告した¹⁾。今回、筆者らは BALB/c マウスを用いて traxanox のヒツジ赤血球 (SRBC) による脾および胸腺ロゼット形成細胞 (RFC) の産生能に対する作用および免疫抑制時の免疫応答に対する作用を検討した。

材料と方法

(1) 実験動物

5～6 週齢の雌性 BALB/c マウス(日本チャールス・リバー供給)を用いた。

(2) 被検化合物および被検液の調製

traxanox, levamisole hydrochloride (Aldrich Chemical Co.), cyclophosphamide (Endoxan®) および carrageenan (Seakem 402) を用いた。cyclophosphamide および carrageenan は 0.15 M NaCl 溶液に溶解し、cyclophosphamide は SRBC で免疫する 1 日前および当日の 2 回経口投与し、carrageenan は免疫の 3 日前および 1 日前の 2 回腹腔内投与した。traxanox および levamisole は 0.5% methylcellulose に溶解し、被検液とした。carrageenan との併用実験では、被検液を免疫の 2 日前から免疫後 1 日目までの 4 日間連続経口投与した。そのほかの実験では、被検液を免疫直前および翌日の 2 回経口投与した。

(3) 免疫方法

SRBC (船橋農場) を 1,000 rpm で 10 分間遠心分離し、沈渣に遠心分離前と同量の生理食塩液を加え再浮遊させた。この操作を 3 回繰り返して SRBC を洗浄し、 5×10^8 個/ml の SRBC 浮遊液を調製した。得られた SRBC 0.1 ml をマウスの腹腔内に投与して免疫した。二次免疫は免疫後 21 日目に再度同一条件で行った。

(4) 脾 HPFC 産生能の測定

橋本らの方法²⁾により、SRBC で免疫後 4 日目のマ

ウス脾臓中の HPFC 数を測定した。

(5) 脾および胸腺 RFC 産生能の測定

Biozzi らの方法³⁾により調製し、4 個以上の SRBC と結合したリンパ球を RFC として測定した。

(6) 脾 RFC の分離

安保と熊谷の方法⁴⁾により、リンパ球比重分離液(マウス用、大塚アッセイ研究所)を用いて脾 RFC を分離した。分離後 0.83% NH_4Cl を含む 0.017 M トリス緩衝液 (pH 7.65) で脾リンパ球と結合している SRBC を溶血させた。これを 150×g で 10 分間 4°C で遠心分離し、沈渣に Hanks 溶液を加えて懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返して、脾リンパ球を調製した。

(7) 抗 Lyt 1.2 または抗 Lyt 2.2 抗血清および補体による脾 RFC の前処置

Shen らの方法⁵⁾により、上記抗血清およびウサギ補体 (Cedarlane Laboratories) を用いて脾 RFC を処置した。処置後、150×g で 10 分間遠心分離し、沈渣に Hanks 溶液を加えて懸濁した。この洗浄操作を 3 回繰り返して、生細胞数として 5×10^6 個/ml となるように Hanks 溶液に懸濁した。

(8) 細胞移入

SRBC で免疫したマウスの脾 RFC、または脾細胞を 37°C で 60 分間シャーレ内で incubate して得られた脾付着細胞 (SAC, 5×10^7 個/ml) を 0.1 ml/マウスの割合で、同系マウスに移入し SRBC で免疫した。

結果と考察

traxanox は 10 および 30 mg/kg で免疫後 4 日目の脾および胸腺 RFC 産生を有意に抑制した(表 1)。levamisole も 10 mg/kg で同様の作用を示した。SRBC で免疫後 4 日目の脾 RFC を同系マウスに移入すると、HPFC 産生は亢進した。traxanox (30 mg/kg) を投与したマウスの脾 RFC を移入すると、HPFC 産生は亢進せず、抗 Lyt 2.2 抗体および補体で処理した脾 RFC の移入では亢進した(図 1)。この場合、抗 Lyt 2.2 抗体および補体で処理した脾 RFC の viability は著明に低下した。したがって、本化合物は Lyt 2.2 positive cell (suppressor T cell) を誘導するものと考えられる。なお、表 1 で認められた traxanox 投与による脾 RFC 数の減少は、Lyt 1.2 positive cell (helper T cell) の

* Research Laboratories, Yoshitomi Pharmaceutical Industries Ltd. 吉富製薬(株)中央研究所

表 1 effect of traxanox on immune response to SRBC in BALB/c mice

compound	dose (mg/kg) (po × 2)	HPFC	spleen-RFC	thymus-RFC
		10 ⁴ /spleen	10 ⁵ /spleen	10 ⁴ /thymus
control	0	18.9 ± 1.1 (100)	27.7 ± 2.8 (100)	3.85 ± 0.68 (100)
traxanox	3	15.8 ± 1.5 (84)	27.5 ± 3.7 (99)	3.33 ± 0.94 (86)
traxanox	10	14.2 ± 2.0 (75)	14.8 ± 2.2** (53)	1.63 ± 0.39** (42)
traxanox	30	15.2 ± 1.4 (80)	12.5 ± 2.1** (45)	1.60 ± 0.83** (42)
control	0	7.6 ± 0.5 (100)	24.4 ± 2.6 (100)	7.70 ± 1.08 (100)
levamisole	10	10.8 ± 1.0 (114)	9.1 ± 1.9** (37)	4.07 ± 0.99** (53)

** P < 0.01 (vs control)

N = 6

図 1 effect of transferred spleen-RFC pretreated with traxanox on HPFC production to SRBC

産生抑制によるものと推定される。また、二次免疫したマウスの脾および胸腺 RFC 産生は著明に亢進し、一次免疫時に投与した traxanox (3 および 30 mg/kg) は HPFC, 脾および胸腺 RFC 産生を抑制した。したがって、本化合物のこの抑制作用は免疫担当細胞によって記憶されているものと考えられる。

cyclophosphamide (20 mg/kg) は前投与でマウス脾および胸腺 RFC 産生を有意に抑制し、7S 抗体価も有意に減少させた。traxanox は 30 mg/kg で胸腺 RFC 産生能の低下および 7S 抗体価の減少を有意に回復させた。また carrageenan (0.03 mg) は HPFC, 脾および胸腺 RFC 産生を有意に抑制した。マクロファージの機能を障害するとされている carrageenan⁶⁾ は T 細胞依存性抗原に対する免疫応答を抑制することが報告^{6,7)} されており、本実験成績からも HPFC, 脾および胸腺 RFC 産生を抑制することが確認された。traxanox は 3 mg/kg 以上の用量で脾および胸腺 RFC 産生能の低下を、また 10 mg/kg⁻以上の用量で HPFC 産生能の低下を有意に

回復させた。本化合物は carrageenan による免疫応答能の低下を回復させることから、その作用はマクロファージを介して発現される可能性が示唆される。

carrageenan 未処置マウスの SAC を同系マウスに移入すると HPFC 産生は亢進するが、carrageenan 前処置により SRBC 貪食能の低下したマウス SAC を移入しても HPFC 産生は変わらない。この知見は carrageenan による SAC の貪食能の低下が免疫応答能の低下を引き起こすことを示唆している。この SAC に traxanox (30 μM) を添加すると、SAC の SRBC 貪食能は回復し、この細胞の移入により HPFC 産生も回復した。したがって、traxanox は少なくとも SAC に作用して免疫応答を回復させるものと推定される。

以上の知見から、traxanox は免疫応答をその反応の程度により増強または抑制する作用を有するものと推定される。

文 献

- 1) Goto, K., Hisadome, M., Terasawa, M., Kadobe, Y., Abe, C., Shiokawa, Y.: Japan J. Pharmacol. 33: 189, 1983.
- 2) 橋本嘉幸, 大島紘子: 免疫実験操作法 A (右田俊介編). 日本免疫学会発行, 金沢, 1975, p 491.
- 3) Biozzi, G., Stiffel, C., Monton, D., Liacopoulos-Briot, M., Decreusefond, C., Bouthillier, Y.: Ann. Inst. Pasteur. 110(7)(Supp. 3), 1966.
- 4) 安保 敏, 熊谷勝男: 免疫実験操作法 VII (右田俊介編). 日本免疫学会発行, 金沢, 1977, p 1877.
- 5) Shen, F-W., Boyse, E.A., Cantor, H.: Immunogenetics 2: 591, 1975.
- 6) Rumjanek, V.M., Watson, S.R., Šljivić, V.S.: Immunology 33: 423, 1977.
- 7) Ishizaka, S., Otani, S., Morisawa, S.: J. Immunol. 118: 1213, 1977.