リンホカイン産生に及ぼす血清中免疫抑制物質の影響

須甲松伸・斉藤博士・信太隆夫*

Effect of serum immunosuppressive substances on lymphokine production

Matsunobu Suko・Hiroshi Saito・Takao Shida*

遅延型過敏症の成立している動物に大量の抗原を投与すると一時的に遅延型皮内反応が低下する。この現象は遅延型過敏症の脱感作 (desensitization) として知られているが、この脱感作は大量に投与した抗原以外の抗原による遅延型皮内反応も低下していわゆる抗原非特異的なアネルギー (anergy) を示す。このことから実験的脱感作は各種のヒトの疾患、たとえばホジキン病、骨髄腫、サルコイドーシスや感染症にみられるツベルクリン反応の消失現象の実験モデルと考えられている。われわれは、この現象の機序を研究するなかで、脱感作後血清中にリンパ球のリンホカイン産生を抑制する物質とリンホカインの活性を阻害する物質を見いだした。リンホカインなかでもマクロファージ遊走阻因子 (MIF) は遅延型過敏症のメディエーターと考えられていることから、これら血清中の物質は脱感作現象に密接に関連していると考えられる。脱感作された動物は、体温が上昇し皮膚に発疹を生ずる¹⁾。これは大量抗原による全身的な遅延型過敏反応の炎症が起きているためと推測されている。従来炎症時には血中に増加する物質の存在することが知られ、急性相反応物質とよばれている。代表的なものは α_1 -antitrypsin (α_1 -AT), α_1 -acidglycoprotein (α_1 -AG), α_2 -macroglobulin (α_2 -MG) や creative protein (CRP) などである。これらの多くはリンパ球の増殖反応を抑制する活性のあることが報告されている²⁾。したがって脱感作に伴って出現するリンホカイン抑制物質とこれらの急性相反応物質との異同を調べることは重要と考えられるため、これらの物質がリンホカイン産生と活性に与える影響を検討した。

方 法

α_1 -AT, α_1 -AG, α_2 -MG と CRP は Sigma 社より入手した。動物は約 300 g のハートレー系雌モルモットを使用した。免疫は抗原に、dinitrophenylated key limpet hemocyanin (DNP-KLH) を用い完全フロイドアジュバントとともに動物の足底に 1 mg 注射した。

MIF 産生：免疫後 7 日目に動物のリンパ節を取り出し、RPMI 1640培養液中に 10^7 個/ml のリンパ節細胞浮遊液を調整した。このリンパ節浮遊液に 20 μ g/ml の DNP-KLH を加え 24 時間 37°C、5% CO₂ の状態で培養した。培養後、培養上清を回収してミリポアフィルターを通して滅菌し -20°C に凍結保存した。そして抗原を

図 1 kinetics of the body temperature after desensitization

加えないで培養した上清に同濃度の抗原を加えたものを対照培養上清とした。

MIF 産生に与える急性相反応物質の影響を調べるためには、抗原刺激および対照培養に抗原添加と同時に各種濃度の急性相反応物質を加えて培養した。

MIF 測定：モルモットに 20 ml の硫動パラフィン腹腔内注射した 4 日後、生食で腹腔内洗浄し滲出細胞を回収した。この腹腔内滲出細胞を用いた毛細管法により Sterilin 社製の migration plate 内でマクロファージ遊走阻止試験を行った。MIF の活性に与える急性相反応物質の影響を調べるためには、あらかじめ作製した MIF 活性のある培養上清と対照上清に各種濃度の急性相反応物質を加えて検討した。

MIF 活性は下記により算定した。20% 以上の抑制率を示す場合に MIF 陽性とした。

MIF 活性 (%)

$$= 100 - \frac{\text{抗原刺激上清中の腹腔細胞の遊走面積}}{\text{対照上清中の腹腔細胞の遊走面積}} \times 100$$

体温測定、モルモットの直腸温を経時的に体温計で測定した。

結 果

脱感作による体温の変動：DNP-KLH で免疫した 5 匹の動物に、免疫 7 日目に 1 mg の KLH を静脈内投与して脱感作を行って経時的に直腸温を測定すると、図 1 のごとく、体温は平均 38.9°C から脱感作後 2 時間で 39.9°C、6 時間後 40.1°C と上昇した。24 時間以後は軽度の発熱 39.3°C となった。

MIF 活性に与える各種の急性相反応物質の影響： α_1 -AT, α_1 -AG とともに 1 μ g/ml から 1,000 μ g/ml まで MIF の活性発現に影響を与えなかった。

また α_2 -MG と CRP はともに 1 μ g/ml から 100 μ g/ml の濃度で高濃度になるにつれて抑制傾向はみられたが有

* National Sagami Hospital and Research Center for Rheumatology Allergy 国立相模原病院臨床研究所

表 1 effect of acute phase reactants on migration inhibition factor activity

dose ($\mu\text{g/ml}$)	migration inhibition activity (%)			
	α_1 -AT	α_1 -AG	α_2 -MG	CRP
0	43.7	64.1	45.8	54.1
1	39.1	55.0	42.3	36.6
10	31.4	52.8	32.9	43.6
100	46.3	54.0	32.2	33.7
1000	35.0	52.4	N D	N D

表 2 effect of acute phase reactants on migration inhibition factor production

dose ($\mu\text{g/ml}$)	migration inhibition activity (%)			
	α_1 -AT	α_1 -AG	α_2 -MG	CRP
0	44.1	46.9	44.1	44.1
1	45.5	30.7	52.3	37.6
10	38.1	51.5	47.9	42.2
100	36.4	49.5	5.4*	43.7
1000	4.5*	14.8*	N D	N D

* significant suppression

意な抑制ではなかった (表 1)。

MIF 産生に与える各種急性相反応物質の影響： α_1 -AT, α_1 -AG とともに 1,000 $\mu\text{g/ml}$ の濃度でリンパ球の MIF 産生を抑制した。 α_2 -MG は 100 $\mu\text{g/ml}$ で MIF 産生を抑制した。CRP は 1~100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で影響を示さなかった (表 2)。

考 察

Evey と De-Weck は動物を脱感作すると全身の皮膚の発疹が出現すると報告している³⁾。今回の実験で同時に発熱することも確かめられた。発熱と発赤は炎症の条件にあげられていることから脱感作は全身の炎症反応を伴った現象といえる。今回実際測定していないけれども脱感作に伴い血清中には急性相反応物質が出現あるいは増加していると考えられる。

α_1 -AT, α_1 -AG, α_2 -MG と CRP の急性相反応物質はリンパ球の mitogen に対する増殖反応、リンパ球混合反応、抗体産生、細胞障害作用を抑制することが報告されている^{2,3)}。しかし遅延型過敏症のメディエーターで

あるリンホカイン、特に MIF 産生の抑制については α_2 -MG の報告しかみられない⁴⁾。われわれの実験から α_1 -AT と α_1 -AG は 1,000 $\mu\text{g/ml}$, α_2 -MG は 100 $\mu\text{g/ml}$ で MIF 産生を抑制し、MIF の活性そのものには影響しないことが判明した。このことは前述した他の報告のリンパ球、特に T 細胞の機能を抑制するという結果に合致する。また CRP はリンパ球の T 細胞と結合し E ロゼット形成阻害とリンパ球混合反応を抑制するが、Con A に対する増殖反応は抑制しないと報告されている³⁾。今回の実験で、MIF 産生に影響しないことが明らかとなった。

われわれはすでに脱感作実験において、脱感作のあと 1~6 時間のあいだに MIF の活性を失活させる MIF blocking factor と 24~72 時間のあいだに MIF の産生を抑制する desensitization factor が出現することを報告した³⁾。それらの物理化学的性状は前者が分子量約 12,000 で 56°C 30 分の加熱に耐性を示した。後者は分子量は不均一であり 4 万~5 万数千と、数百に分かれたが、このうち低分子のものはインドメサシンを使用した実験からアラキドン酸代謝産物たとえばプロスタグランジン E が含まれていると考えられる。高分子のものについて急性相反応物質との性状を比較してみると、 α_1 -AT と α_1 -AG はともに分子量 4 万~5 万、 α_2 -MG は 72 万で CRP は 12 万であるので、高分子のものは α_1 -AT か α_1 -AG である可能性はある。しかし確定するには抗体を使用した吸収試験などを行う必要が残されている。MIF blocking factor については、今回調べた急性相反応物質はどれも MIF の活性を失活させなかったのでこれらの物質ではない可能性が高い。なお他の急性相反応物質に属する haptoglobin, ceruloplasmin や fibrinogen などの作用を検討することも必要であろう。

文 献

- 1) Turk, J.L.: *In* Delayed Hypersensitivity. North-Holland Publishing Amsterdam, 1967, p 107.
- 2) 漆崎一郎, 石谷邦彦: 血清中の免疫抑制因子. *Immunohematology* 2: 145, 1980.
- 3) Mortensen, R.F., Gewurz, H.: Effect of C-reactive protein on the lymphoid system. *J. Exp. Med.* 141: 821, 1975.
- 4) Davis, R.C., Cooperband, S.R., Mannick, J.A.: The effect of immunoregulatory α globulin (IRA) on antigen-mediate macrophage immobilization *in vitro*. *J. Immunol.* 106: 755, 1971.
- 5) Mizushima, A., Baba, T., et al.: Regulatory mechanisms of cutaneous delayed-type hypersensitivity cell. *Immunology* 81: 126, 1983.