B/WF₁ マウスのマクロファージの抗原認識機構
に及ぼす各種要因

五十嵐俊久・加藤 清・松永敬一郎・成田雅弘・長岡章平・木内充世・谷 賢治・大久保隆男*

Study of antigen presenting cells—Age-Dependent Loss of antigen presenting ability in New Zealand black and white (NZB × NZW) F₁ mice and the effect of indomethacin—

NZB×NZW F₁ hybrid (B/W F₁) mice have been extensively investigated as model animals for resembling human systemic lupus erythematosus. Some reports suggested, that the aging of B/W F₁ mice provided influences to the immune response and the function of macrophage in B/W F₁.

In the present investigation, we studied on antigen presenting ability of SACs (spleen adherent cells), epidermal cells, Kupffer cells, and alveolar macrophages from B/W F₁ mice in various ages. Aging of these mice decreased antigen presenting ability on SACs, epidermal cells, and alveolar macrophages, but not Kupffer cells. And the response of antigen presenting abilities in both B/W F₁ and B₆×DBA/2 F₁ hybrid (B/D F₁) mice were decreased when indomethacin administrated.

Toshihisa Igarashi • Kiyoshi Katoh • Keiichiro Matsunaga • Masahiro Narita • Shohei Nagaoka • Mitsuyo Kiuchi • Kenji Tani • Takao Okubo*

*The First Department of Internal Medicine, Yokohama City University School of Medicine

key words: antigen presenting ability, B/WF₁, macrophage, aging indomethacin

(NZB×NZW) F₁ mice (以下 B/W F₁ マウス) は、human systemic lupus erythematosus 類似のモデル動物として広く研究されてきた¹⁻³⁾。これらの研究は、臨床病態が出現する以前に多くの immunologic abnormalities があらわれる可能性を示した。この immunologic abnormalities のなかには、nucleic acid に対する過剰の抗体^{4,5)} や、その他の抗体の出現および suppressor T cells の欠如^{3,6)} なども含まれる。しかし、これらの知見の病因についての意義は確立されていない。さらに、B/W F₁ マウスの加齢が immune response とマクロファージの機能に影響するという報告⁹⁻¹¹⁾ がなされているが明白ではない。

そして、マクロファージは、抗原認識機構において重要な役割を果たしている。今回、筆者らは、hen egg lysozyme (HEL) を抗原として、B/W F₁ マウスの脾付着細胞 (SACs) ・表皮細胞・肝 Kupffer 細胞・肺胞内マクロファージの加齢による変化と、インドメタシン処理による変化を検討した。

材料と方法

(1) マウス

NZB は、Howie 由来、NZW は NIH 由来のマウスを用いて自家繁殖を行い、B/W F₁ hybrid を作成し実験に用いた。なお、対象としては、B₆、B/DF₁ のマウスを用いた。

(2) 細胞の調整

antigen presenting cell (APC) として、脾付着細胞 (SACs) ・表皮細胞・肝 Kupffer 細胞・肺胞内マクロファージを用いた。SACs は、Green らの方法により non-prim のマウスの脾細胞を plastic dish に付着させ、付着細胞を採取した。表皮細胞は、Steinmüller, Krco, 加藤¹²⁾らの方法を用いて non-prim のマウスの尾の表皮より採取した。肝 Kupffer 細胞は、片野らの方法により *in vivo* にヘパリン処理後、開腹環流し、ただちに肝を取りだし、破碎後、コラーゲナーゼで処理し、differential centrifugation にて細胞を集め、plastic dish に付着させた。肺胞内マクロファージは、マウスをネタンプトール麻酔後、頸部より皮膚を切開し、気管に tube 1.5cm 挿入し、1~1.5 cc PBS (Ca²⁺ free) で3回洗浄し、こより細胞を得た。

(3) antigen pulsing

上記方法にて得た各細胞群をそれぞれ 5 × 10⁶/ml に調整し、HEL 100 μg/ml とともに1時間 37°C incubate し、3回洗浄後、1,500 rad 照射し、1 × 10⁵/ml に調整したものを各種 APC 群とした。なお、いずれの APC 群も viability 90%以上であった。

(4) インドメタシン処理

調整した各細胞群に *in vitro* でインドメタシン final 10⁻⁴M を添加し、30分 37°C incubate し3回洗浄、その後、HEL 100 μg/ml とともに1時間 37°C incubate し、3回洗浄後、1,500 rad 照射し、1 × 10⁵/ml に調整したものをインドメタシン処理後の各種 APC 群とした。

*横浜市立大学医学部第一内科学教室

○ SACS
□ Kupffer cells
● SACS non-Ag-pulsed

図1 dose effect of APCs on the response to HEL in B₆ mouse

○ SACS
□ Kupffer cells
● SACS non-Ag-pulsed

図2 antigen presenting ability of (NZB x NZW) F₁ mice (responder cells, 8 ws)

○ SACS
□ Kupffer cells
● SACS non-Ag-pulsed

図3 antigen presenting ability of (NZB x NZW) F₁ mice (responder cells, 24ws)

(5) APC の機能測定

responder cell は、B/W F₁ マウスの尾根部に HEL 40 μ g を Freund's complete adjuvant (FCA) とともに prim し、7日後所属リンパ節を取り、これを nylon wool column を pass させ、4 $\times 10^6$ /ml に調整したものとした。

抗原呈示能は、responder cell 4 $\times 10^5$ 個と各 APC 群 1 $\times 10^4$ 個を 37°C 5% CO₂ incubate し、3日目に 1 μ Ci ³H-thymidine (specific activity 1.9 Ci/mM) を加え、4日目で glass fiber filter paper strips に harvest し、³H の uptake を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

結果

B₆ マウスの SACS は、5 $\times 10^3$ /well にて抗原呈示能を有し、1 $\times 10^4$ /well にて plateau に達した。一方、肝 Kupffer 細胞は、SACS に比しかなり弱い、抗原呈示能を有していた (図1)。なお、表皮細胞は、SACS とほぼ同程度の高い抗原呈示能を示し、肺胞内マクロファージの抗原呈示能は比較的弱いものであった。

responder に8週齢の B/W F₁ マウスを用いて、8週齢、24週齢、36週齢の B/W F₁ マウスの各種 APC 群の抗原呈示能を比較したところ、24週齢で SACS および表皮細胞は著明に、肺胞内マクロファージは軽度、抗原呈示能の低下をみた。しかし、肝 Kupffer 細胞は加齢による抗原呈示能の変化をみなかった (図2)。

すでに、B/W F₁ マウスの T 細胞の異常は、さまざまに指摘されているので、responder の週齢を24週齢にかえて、同様に抗原呈示能を検討した (図3)。表皮細胞では、responder が8週齢の場合と同様に24週齢でも、

HEL sensitized 4 $\times 10^6$ lymph node T cells were cultured with HEL pulsed 1 $\times 10^4$ SACS (●), with no treated SACS (○) or with 100 μ g HEL (□). The cultures were pulsed ³H-thymidine for the 24hr. After 96hr, the cultures were harvested.

図4 antigen presenting ability of HEL pulsed SACS on T cell proliferation response in B/DF₁ (responder T cells, 8ws)

加齢とともに抗原呈示能が著明に低下していた。一方、SACS および肺胞内マクロファージは、表皮細胞に比し8週齢の抗原呈示能が低下していたが、24週齢、36週齢にて減少傾向がみられた。しかし、肝 Kupffer 細胞では、responder が8週齢の場合と同様に、24週齢でも、加齢による抗原呈示能の変化を認めなかった。

なお、responder に8週齢の B/D F₁ マウスを用いて、8週齢、24週齢、36週齢の B/D F₁ マウスの SACS の抗原呈示能を検討したが、加齢による抗原呈示能の変化を認めなかった (図4)。

つぎに、SACS の抗原呈示能に及ぼすインドメタシン

表 1 effects of indomethacin on antigen presenting ability of SACs

SACs origine (1×10^4 /well)	responder LN cells (4×10^5 /well)	CPM $\pm$ SEM	
		no treatment	indomethacin treated
B/D F ₁ ♀ 8W	♀ 8W	12400 $\pm$ 1200	9800 $\pm$ 1000
	♀ 24W	13700 $\pm$ 1700	9500 $\pm$ 1200
B/D F ₁ ♀ 24W	♀ 8W	13100 $\pm$ 1500	10000 $\pm$ 1300
	♀ 24W	12800 $\pm$ 1100	10500 $\pm$ 950
B/W F ₁ ♀ 8W	♀ 8W	14200 $\pm$ 1800	10700 $\pm$ 900
	♀ 24W	10700 $\pm$ 1200	8000 $\pm$ 800
B/W F ₁ ♀ 8W	♀ 8W	10500 $\pm$ 800	8500 $\pm$ 900
	♀ 24W	9100 $\pm$ 1000	7600 $\pm$ 900

表 2 effects of indomethacin on antigen presenting ability of epidermal cells

epidermal cells origine (1×10^4 /well)	responder LN cells (4×10^5 /well)	CPM $\pm$ SEM	
		no treatment	indomethacin treated
B/D F ₁ ♀ 8W	♀ 8W	13200 $\pm$ 1700	10400 $\pm$ 1000
	♀ 24W	14000 $\pm$ 1500	10500 $\pm$ 1200
B/D F ₁ ♀ 24W	♀ 8W	13400 $\pm$ 1600	9800 $\pm$ 1100
	♀ 24W	13800 $\pm$ 1200	9900 $\pm$ 900
B/W F ₁ ♀ 8W	♀ 8W	15100 $\pm$ 1500	11400 $\pm$ 900
	♀ 24W	14800 $\pm$ 1700	11100 $\pm$ 800
B/W F ₁ ♀ 24W	♀ 8W	9500 $\pm$ 900	7900 $\pm$ 1000
	♀ 24W	9600 $\pm$ 1000	8200 $\pm$ 900

の影響を検討したところ、B/D F₁ マウスにおいても、B/W F₁ マウスにおいても、SACsの週齢および responder の週齢に関係なく、インドメタシン処理後の抗原呈示能は、no treatment の抗原呈示能と比し、明らかに低下していた(表1)。

また、表皮細胞の抗原呈示に及ぼすインドメタシンの影響をみると、SACsと同様にB/D F₁ マウス、B/W F₁ マウスとも、表皮細胞の週齢および responder の週齢に関係なく、インドメタシン処理により抗原呈示能の低下が認められた(表2)。なお、同様の結果が肝 Kupffer 細胞と肺胞内マクロファージにおいても認められた。

考 按

自己免疫疾患モデルマウスにおいて、加齢に伴う自己抗体の産生は広く知られているが、マクロファージの加齢に伴う機能の変化については詳細な検討は少ない。

今回、筆者らは、B/W F₁ マウスの SACs・表皮細胞・肺胞内マクロファージでは加齢とともに HEL に対する抗原呈示能が低下するが、肝 Kupffer 細胞では加齢による影響を認めないという結果、および B/D F₁ マウスでは APC の種類にかかわらず加齢による変化を認めないという結果を得た。

すでに、B/W F₁ マウスのマクロファージについて、Kassan¹³⁾らは、5～6週齢では、latex beads の phagocytosis の機能は、他の strain のマウスと同等の機能で

あるとしており、Morgan¹⁴⁾は、*in vivo* assay による PVP (polyvinylpyrrolidone) clearance において加齢とともに機能低下を起こしていると報告している。

今回の筆者らの実験では、24週齢の SACs・表皮細胞・肺胞内マクロファージの抗原呈示能の減弱をみたが、このことは Morgan らの報告と同様の結果であった。なお、筆者らの実験で、肝 Kupffer 細胞では加齢による抗原呈示能の変化をみなかったが、これは Walker¹⁵⁾ らが報告しているように、臓器内マクロファージの機能の差異が存在するためと考えられる。

また、McCombs¹⁶⁾ は、SRBC-PFC 系では、B/W F₁ の脾細胞は他の strain の脾細胞よりも影響が弱いとし、B/W F₁ の脾のマクロファージの抗原呈示能が減弱すると示唆している。さらに、Makinodan¹⁷⁾ は、正常マウスの加齢に伴うマクロファージの機能はほとんど変わらないか、やや亢進するとしているが、今回の筆者の結果とあわせると、B/W F₁ マウスの加齢に伴う変化には、autoimmune が関与している可能性が示唆される。

加齢に伴うマクロファージの抗原呈示能の変化の原因として考えられるものは、第1に、immune complex がマクロファージ膜面上の Fc receptor を mask している可能性がある。第2に、多量の immune complex を処理したため、マクロファージの処理能力の capacity が限界となっている可能性がある。第3に、従来の報告にあるように、IL-2 だけでなく、IL-1 の産生も低下しているといわれているので、マクロファージそのものの機能障害も充分考慮する必要があることが示唆された。

なお、第2の結果として、マクロファージをインドメタシン処理後、抗原を puls した場合、B/D F₁ マウス、B/W F₁ マウスともに抗原呈示能は低下した。これは、従来諸家の報告とほぼ同様の結果であったが、抗原呈示能低下の機序としては、インドメタシンが cyclooxygenase を阻害することにより、Ia の表出を抑制する点や、Fc receptor を介する phagocytosis を抑制する点などが指摘されている。

まとめ

① B/W F₁ マウスの脾付着細胞、表皮細胞、肺胞内マクロファージの抗原呈示能は、加齢に伴い低下した。しかし、肝 Kupffer 細胞では変化を認めなかった。

② B/D F₁ マウスにおいても、B/W F₁ マウスにおいても、antigen presenting cells の週齢および responder cells の週齢に関係なく、インドメタシン処理により抗原呈示能の低下が認められた。

文 献

- 1) Howie, J.N., Helyer, B.J.: The immunology and pathology of NZB mice. Adv. Immunol.

- 9: 215-219, 1968.
- 2) Talal, N., Steinberg, A.D.: The pathogenesis of autoimmunity in New Zealand Black mice. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 64: 79-103, 1974.
 - 3) Dixon, F.G., Feldman, J.D., Vasquez, J.J.: Experimental glomerulonephritis. The pathogenesis of a laboratory model resembling the spectrum of human glomerulonephritis. *J. Exp. Med.* 113: 889-897, 1961.
 - 4) Sawada, S., Talal, N.: Characteristics of in vitro production of antibodies to DNA in normal and autoimmune mouse. *J. Immunol.* 122: 2309-2313, 1979.
 - 5) Papoian, R., Pillarisetty, R., Talal, N.: Immunological regulation of spontaneous antibodies to DNA and RNA. II. Sequential switch from IgM to IgG in NZB/NZW F₁ mice. *Immunology* 32: 75-81, 1977.
 - 6) Leventhal, B.G., Talal, N.: Response of NZB and NZB/NZW spleen cells to mitogenic agents. *J. Immunol.* 104: 918-923, 1970.
 - 7) Krakauer, R.S., Strober, W., Waldmann, T.A.: Loss of suppressor T cells in the pathogenesis of the autoimmunity of the NZB/NZW mice. *Arthritis Rheum.* 21: suppl 185-189, 1978.
 - 8) Allison, A.C., Denman, A.M., Barnes, R.D.: Cooperating and controlling functions of thymus-derived lymphocytes in relation to autoimmunity. *Lancet* 2: 135-140, 1971.
 - 9) Chused, T.A., Steinberg, A.D., Parker, L.M.: Enhanced antibody response of mice to polyinosinic-polycytidylic acid by antithymocyte serum and its age dependent loss of NZB/NZW mice. *J. Immunol.* 111: 52-57, 1973.
 - 10) Ranney, D.F., Steinberg, A.D.: Differences in the age dependent release of a low molecular weight suppressor (LMWS) and stimulators by normal and NZB/W lymphoid organs. *J. Immunol.* 117: 1219-1225, 1976.
 - 11) Cohen, P.L.: Functional absence of a B cell subpopulation in aging New Zealand mice. *Clin. exp. Immunol.* 40: 365-372, 1980.
 - 12) 加藤 清: マウスの尾を用いた表皮細胞の採取法. *免疫実験操作法* 9: 2685-2690, 1980.
 - 13) Kassan, S.S., Chused, M.W.: Impairment of primary *in vitro* response of New Zealand mouse spleen cells to a thymic dependent antigen. *Cell Immunol.* 30: 135-146, 1977.
 - 14) Morgan, A.G., Steward, M.W.: Macrophage clearance function and immune complex disease in New Zealand Black/White F₁ hybrid mice. *Clin. exp. Immunol.* 26: 133-136, 1976.
 - 15) Walker, W.S.: Macrophage functional heterogeneity. *Adv. Exp. Med. Biol.* 155: 435-443, 1982.
 - 16) McCombs, C., Hom, J., Talal, N., Mishell, R. I.: Functional deficiency of splenic adherent cells in New Zealand Black mice. *J. Immunol.* 115: 1695-1699, 1975.
 - 17) Makinodan, T., Kay, M.M.: Age influence on the immune system. *Adv. Immunol.* 29: 287-330, 1980.