サイクロスポリン A の実験的アレルギー性精巣炎 の effector phaseにおける抑制的効果

平峯千春・伊藤正裕・北条憲二*

Cyclosporin A inhibits experimental allergic orchitis (EAO) and cellular immune responses by acting at the effector phase of immunization in the guinea pig In our preceding report, it has been shown that cyclosporin A (CsA, 10 mg/kg/day) administration for 14 days (during the induction phase of immunity), starting on the day of immunization with testicular antigen(TA)-complete Freund's adjuvant (CFA), is effective in preventing experimental allergic orchitis (EAO), delayed skin reactivities to both TA and purified protein derivative of tuberculin (PPD), and antisperm antibody response in strain 13 guinea pigs when examined 2 weeks after immunization.

The present studies showed that even when CsA treatment (30 mg/kg/every other day, for 2 weeks) was started 2 weeks after immunization in the guinea pig, CsA was capable of largely inhibiting orchitoepididymitic lesions, delayed skin response and *in vitro* lymphocyte proliferative response to both TA and PPD. Antisperm antibody titers were similar in guinea pigs either treated or not treated with CsA. These results suggest that CsA is not effective in preventing helper T cells and B cells for antibody formation which were already developed, and that the suppressive effect of CsA may have a selectivity for certain T-cell subpopulations (including effector T cells relevant to delayed hypersensitivity).

In addition, CsA inhibited the local adoptive transfer of EAO with lymph node cells obtained from TA-CFA sensitized syngeneic animals, when examined 5 days after cell transfer, if recipients were dosed daily with CsA (10 or 30 mg/kg/day) for 5 days from the time of the cell transfer. These results suggest that CsA may inhibit the action of certain lymphocyte subsets already primed and would support the notion that CsA is also capable of inhibiting processes of the effector phase of immunity.

Chiharu Hiramane・Masahiro Ito・Kenji Hojo*

* Division of Immunology & Immunopathology, Department of Pathology,
Kagawa Medical School

key word : cyclosporin A, experimental allergic orchitis, immunosuppression

Borel らによって開発されたサイクロスポリン A (cyclosporin A, CsA) は、移植免疫の誘導期 (induction phase) の早期に作用して、同種移植片の拒絶反応を強力に阻止する免疫抑制剤として知られている。本研究は、自己免疫疾患のモデルである実験的アレルギー性精巣炎 (experimental allergic orchitis, EAO) の免疫学的制御^{1~3)}の一環として行われたものである。

筆者らは、すでに、モルモットにおける EAO の発症が、精巣抗原感作直後からの CsA の連日投与によって完全に阻止され、遅延型皮膚反応、抗精子抗体応答も完全に抑制されること、さらに CsA による EAO 発症阻止の機序には、ヘルパー/インデュース細胞の誘導阻止のみならず、同時に生じたサプレッサー細胞の免疫抑制活性が関与している可能性を、感作細胞養子移入

の系で証明し報告した⁴⁾。今回は、このような EAO 誘導期に対する CsA の阻止効果とは異なり、精巣抗原感作の効果期 (effector phase)、特に疾患成立期の動物に CsA の投与を行った場合の成績を報告する。さらに、EAO の局所受身伝達系、すなわちエフェクター細胞移入による精巣病変誘導に対する CsA の効果について検討した結果を述べる。

材料と方法

(1) 動物

近交系 strain 13 モルモット (♂, 500~550 g, 静岡県実験動物農業協同組合) を各実験群につき 4~8 匹ずつ使用した。

(2) 抗原

モルモットの精巣抗原 (TA) は、Hagopian, Eylar らの精子抗原精製方法に従い部分精製 (step 5) したもの⁵⁾

* 香川医科大学免疫病理学教室

を感作抗原，遅延型皮膚反応および *in vitro* assay のためのテスト抗原として用いた．また遅延型皮膚反応および *in vitro* assay のテスト抗原として精製ツベルクリン PPD (Parke-Davis, Detroit, Mich.) を用いた．

(3) EAO の誘導

TA (5 mg protein/ml of saline) と完全 Freund アシユバント (CFA: H₃₇Ra 4 mg/ml, Difco, Detroit, Mich.) との 1:1 混合乳剤 0.4 ml を 1 回注射した²⁾．

(4) EAO の局所受身伝達^{6,7)}

TA-CFA を 1 週おきに 2 回感作し，初回注射 2 週後に所属リンパ節を採取し，生食水に浮遊した 1×10^8 個のリンパ球を同系正常モルモットの精巣白膜下に注射した．5 日後に辜丸を摘出し，固定後各辜丸につき 6 横断面の切片を作製した．HE 染色後 Videoplan (Kontron, Munich) を用いて，各断面につき炎症性細胞浸潤域の面積を測定し，全面積に対する比を % 炎症域とした．さらに CsA 投与による炎症域の抑制の程度を次式に従い抑制率としてあらわした．抑制率 = $(1 - \text{CsA 投与群の \% 炎症域} / \text{溶媒のみの投与群の \% 炎症域}) \times 100$

(5) CsA の投与

CsA は，Sandoz 社 (Basel) の Dr. J.F. Borel より恵与された．

① 25 mg を 0.5 ml の 96% エタノールに溶解させ，0.2 ml の Tween 80 (polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate (和光純薬)) を添加後，生理食塩水を加えて全量 5 ml とした (最終 CsA 濃度 5 mg/ml)．

② 45 mg を 0.9 ml の 96% エタノールに溶解させ，0.36 ml の Tween 80 を添加後，生理食塩水で全量 6 ml とした (最終 CsA 濃度 7.5 mg/ml)．CsA は 10 mg/kg (①を用いる)，または 30 mg/kg (②を用いる) の割合に 1 日 1 回連日または隔日に腹腔内に投与した．

(6) 実験デザイン

① 実験 1: TA-CFA 感作 2 週後 (すでに EAO が発症している) から CsA 30 mg/kg を隔日に 7 回投与し，投与中止 2 日後に屠殺した．

② 実験 2: エフェクター細胞移入による EAO の局所受身伝達系において，エフェクター細胞の移入直後から CsA 10 mg/kg または 30 mg/kg を連日 5 日間腹腔内に投与し，投与中止の翌日に屠殺した．

③ 対照群として CsA を含まない溶媒 (96% エタノール + Tween 80 + 生理食塩水) のみの投与群を準備した．

(7) EAO の判定

HE 染色標本について，精巣炎，精巣上体炎，無精子症の度をそれぞれ 0, 1+, 2+, 3+ としてあらわした¹⁾．

(8) 遅延型皮膚テスト

動物屠殺の前日に TA (1 mg protein/ml) および PPD

図 1 EAO の効果期に及ぼす CsA の影響
— 基本的病変 —

strain 13 モルモットに TA-CFA 感作 2 週後から CsA (30 mg/kg/日) または溶媒のみを 1 日おきに 7 回投与し，最終投与の 2 日後に動物を屠殺した．

●: CsA 投与群，○: CsA 非投与 (溶媒のみ投与) 群 (精巣または精巣上体 1 個ずつで表示)

(100 μg/ml) を 0.1 ml ずつ動物の側腹部に皮内注射し，24 時間後に判定した．発赤を伴う硬結の短径，長径の平均値 (mm) で表示した．

(9) *in vitro* 抗原刺激リンパ球増殖性応答¹⁾

感作動物の所属リンパ節から遊出させたリンパ球を 3×10^6 viable cells/ml になるように，10% 非働化牛胎児血清 (FBS: Gibco, Gland Island N.Y.) を含む RPMI 1640 (阪大微研) に浮遊させ，Micro Test III plates (Falcon, Oxnard, Calif.) に 200 μl ずつ分注し，TA (100 μg protein/ml) または PPD (20 μg/ml) とともに 37°C 5% CO₂ 下で 4 日間培養した．培養終了 24 時間前に 0.5 μCi の ³H-thymidine (³H-TdR: Radiochemical Centre, Amersham, specific act. 5.0 Ci/mmol) を各 well に添加し，³H-TdR の取り込み値 (cpm) を測定した．抗原非添加群の値との比，stimulation index (SI) で表示した．

(10) 抗精子抗体価の測定¹⁾

倍数稀釈した非働化被検モルモット血清を塗沫精子と反応させ，horse radish peroxidase (HRP) 標識抗体 (HRP 標識抗モルモット IgG: Miles-Yeda, Rehovot) 間接法によって染色し抗体価を測定した．

結 果

(1) TA-CFA 感作の効果期に及ぼす CsA の影響

TA-CFA 1 回感作後 14 日 (この時点ですでに EAO の発症がみられる) から隔日に 7 回 CsA を含まない溶媒のみを腹腔内に注射し，感作 28 日後に屠殺した動物では，全例に精巣炎および無精子症がみられ，精巣上体 8 例中 4 例に精巣上体炎がみられた．TA-CFA 感作後 14 日から CsA 30 mg/kg/日 を隔日に 7 回投与した群では，精巣炎，精巣上体炎は強く抑制され，無精子症も

図2 EAOの効果期に及ぼすCsAの影響—TAまたはPPDに対する遅延型皮膚反応および *in vitro* リンパ球増殖性応答, 抗精子抗体価—
各4～5例の平均値±SD. * $P < 0.005$

精巣全10例中7例に阻止がみられた(図1)。これらの動物ではTAおよびPPDに対する遅延型皮膚反応, *in vitro* リンパ球増殖性応答ともに強く抑制されたが, 抗精子抗体応答の抑制はみられなかった(図2)。

(2) エフェクター細胞移入によるEAOの局所受身伝達に及ぼすCsAの影響

TA-CFA 2回感作2週後の動物から採取した感作リンパ節細胞(エフェクター細胞) 1×10^5 個を正常同系動物の精巣白膜下に注入し, 直後から5日間CsAを含まない溶媒のみを注射した群では, 全例に精巣炎の発症をみた(%炎症域であらわすと, 精巣10例の平均値±SD, $7.71 \pm 1.33\%$) が, 細胞移入と同時にCsAを10 mg/kgまたは30 mg/kg ずつ5日間連日投与した群では, 精巣炎の発症は強く抑制され, CsA投与量の多い群の抑制率のほうが大であった(それぞれ8例の平均抑制率±SD, $86.0 \pm 4.6\%$, $95.0 \pm 3.4\%$, $P < 0.005$)。

考察

先に筆者らは, TA-CFA感作直後からのCsA投与によってEAOの発症が完全に阻止されるとともに, TAおよびPPDに対する遅延型皮膚反応, 抗精子抗体応答が完全に抑制されることを報告した⁴⁾。この結果は, CsAが感作の誘導期に作用し, 細胞性免疫に関与するT細胞ならびに抗体産生のヘルパーT細胞の誘導阻止を通じてEAOの成立を阻害したものと考えられる。

本研究において筆者らは, すでにEAOを発症している感作14日後の動物にCsAの隔日2週間の投与を行った場合, 精巣炎, 精巣上体炎が強く抑制されるという結果を得た。このことは, CsAがTA-CFA感作後の免疫過程の効果期にある感作細胞に対しても抑制作用を示

すことを示唆している。感作4週後のTAとPPDに対する遅延型皮膚反応, TA刺激 *in vitro* リンパ球増殖性応答もまたいちじるしく抑制されていた。しかし, 誘導期に対するCsAの抑制効果とは異なり, 抗精子抗体の抑制はみられず, また無精子症の治療は不完全であった。この事実, CsAがいったん発動した抗精子抗体産生の抑制に対しては有効に作用しえないことを示している。おそらく, 抗精子抗体産生に関与するヘルパーT細胞は, いったん誘導された後では, 抗体産生B細胞と同様, 比較的CsAに抵抗性であるためと思われる。

EAOは, 自己免疫性の精細管および精路(精巣網, 精巣輸尿管, 精巣上体など)を中心とした炎症で, 炎症の進行とともに, または少し遅れて無精子症を必発する疾患である³⁾。このようなEAO病像の完全な表現は, 遅延型過敏症(DTH)性応答と体液性免疫応答との複合反応像として理解されている⁸⁾が, EAOの免疫学的調節に関する筆者らの一連の研究結果^{1,2,9)}からすると, 上記のいずれの単位病変もDTH性応答の発動なしには起こりえないものと推察される^{10,11)}。ただし, 無精子症は各病変のうち, もっとも抗体依存度の高い病変とみなされ, DTH反応により血液-精細管関門の破綻がいったん生じた後は, 比較的容易に血中抗精子抗体の透過を許すため, CsA投与中止後にもなお若干の精上皮障害が持続したものと考えられる。

CsAを感作の効果期に使用した報告は少ない。Nussenblattら¹²⁾は, ウシ網膜のS抗原とCFAとの感作によって作成するLewisラットの実験的自己免疫性ブドウ膜炎(experimental allergic uveitis, EAU)において, CsAが病変の治療効果を示したと述べている。また, 奥平ら¹³⁾は, 15週齢のMRL/lprマウスにCsA

を連日投与し、生存期間の延長と間質性肺炎の消退を報告している。いずれも筆者らの報告と同様、S抗原に対する抗体応答や抗 dsDNA 抗体応答は抑制を受けていない。受身伝達系を用いた筆者らの成績、すなわち疾患成立期の動物から得たエフェクター細胞の局所受身移入では、recipient に CsA を投与することによって、精巣病変の受身伝達はいちじるしく抑制された。この結果は、CsA が EAO のエフェクター細胞に対しても抑制効果を発揮しうること示唆している。Ryffel ら¹⁴⁾および Bolton ら¹⁵⁾は、実験的アレルギー性脳脊髄炎の受身伝達系において、また Mochizuki ら¹⁶⁾は、EAU の受身伝達系において同様の結果を報告している。

CsA は、サプレッサーT細胞に対して抑制的に作用するという報告¹⁷⁻¹⁹⁾もいくつかみられるが、他方、サプレッサーT細胞は CsA の作用を受けないかあるいは免がれるとする報告²⁰⁻²²⁾や、CsA によって抗原特異的サプレッサー細胞が誘導されるという報告²³⁻²⁶⁾も多く、現在のところ一致をみていない。先述の、EAO 感作の誘導期に及ぼす CsA の抑制効果の研究⁴⁾において得られた注目すべき事実は、この EAO 発症の顕著な抑制機序がエフェクター細胞活性の誘導阻止だけでなく、サプレッサー細胞活性（おそらく抗原特異的な）の付加的效果に基づく可能性を、TA-CFA 感作+CsA 投与モルモットからのリンパ節細胞の養子移入の実験系を用いて *in vivo* で証明した点である。今回の報告に用いた実験系においても、EAO の効果期に CsA を投与した動物のリンパ節T細胞を、正常の同系動物に移入後 TA-CFA 感作を行った preliminary の実験で、EAO 発症の抑制が観察されており、効果期における CsA 投与によるサプレッサー細胞の生成または sparing を示唆する成績と考えている（未発表）。

以上述べたように、CsA のT細胞に対する免疫抑制効果は、T細胞のある種の機能的サブセットごとに異なっていることが本薬剤の大きな特徴であり、本剤が免疫系の仕組みを探る有効なプローブとして基礎免疫学者の興味をそそる点である。しかし、リンパ系細胞の各サブセットに対する CsA の詳細な作用機構は、現在なお不明の点が多く、本研究で問題となった効果期に対する CsA の *in vivo* 抑制効果は、さらに *in vitro* で細胞間相互作用の観点を踏まえた、クローンレベルでの十分な検討がなされねばならない。

結 論

CsA は、TA-CFA 感作の誘導期のみならず、効果期に対しても抑制作用を示し、すでに EAO 病変の成立期にある動物に投与したとき、精巣炎、精巣上体炎を治癒に導き、精巣抗原に対する遅延型皮膚反応、*in vitro* リンパ球増殖性応答の発現を強く抑制した。しかし、

CsA による無精子症の抑制は不完全であり、また抗精子抗体応答の抑制はみられなかった。さらに、CsA はエフェクター細胞移入による EAO の局所受身伝達を抑制したので、このような EAO の効果期における抑制効果が、CsA によるエフェクター細胞への直接的な障害作用に基づく可能性が示唆された。

本研究は第6回日本炎症学会において報告した。ご協力いただいた下山育美氏、長谷洋美氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Hojo, K., Hiramane, C.: Suppression of experimental allergic orchitis and cellular immune response in the guinea pig by pretreatment with testis antigen in incomplete Freund's adjuvant. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 69: 40-49, 1982.
- 2) Hiramane, C., Hojo, K.: Adoptive transfer of suppression of experimental allergic orchitis with lymphoid cells from antigen-pretreated guinea pigs. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 30: 202-213, 1984.
- 3) 北条憲二, 平峯千春: Reproductive Immunology [基礎] 自己免疫性睾丸炎および精子免疫、免疫と疾患 8: 153-162, 1984.
- 4) Hojo, K., Hiramane, C.: *In vivo* effects of cyclosporin A: Abrogation of the induction of experimental allergic orchitis and sparing of the generation of suppressor cells. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* 78: 63-70, 1985.
- 5) Hojo, K., Hiramane, C., Ishitaki, M.: Lymphocyte proliferative response *in vitro* and its cellular dependency in guinea-pigs with experimental allergic orchitis. *J. Reprod. Fert.* 59: 113-123, 1980.
- 6) Hiramane, C., Hojo, K.: Requirement of B lymphocytes in local adoptive transfer of experimental allergic orchitis (EAO) by lymph node cells. *Am. J. Reprod. Immunol.* 6: 85-91, 1984.
- 7) 平峯千春, 北条憲二: 実験的アレルギー性睾丸炎の local transfer. 日本疾患モデル動物研究会記録 1: 70-70, 1985.
- 8) Tung K.S.K., Alexander, N.J.: The Testis. Autoimmune reactions in the testis. ed. by Johnson A.D. and Gomes W.R., Academic Press, NY, 1977, p 491-516.
- 9) 北条憲二, 平峯千春: サイクロスポリンA (CsA) の *in vivo* 効果: CsA 投与中止後の実験的精巣炎 (EAO) 阻止効果の終結と免疫系の回復。アレルギー 34: 717-717, 1985.
- 10) 北条憲二, 平峯千春: 免疫学的精巣障害。第6回日本炎症学会プログラム予稿集, 1985, p 76-77.
- 11) 北条憲二: 実験的アレルギー性睾丸炎の免疫学的調節。Minophagen Medical Review 30: 1-21, 1985.
- 12) Nussenblatt, R.B., Rodrigues, M.M., Wacker,

- W.B., Cevario, S.J., Salinas-Carmona, M.C., Gery, I.: Cyclosporin A. Inhibition of experimental autoimmune uveitis in lewis rats. *J. Clin. Invest.* 67: 1228-1231, 1981.
- 13) 奥平博一, 寺田英司, 荻田忠厚, 志賀淳治, 宮本昭正: 自己免疫病マウス MRL/lpr における間質性肺炎とそのサイクロスポリンAによる治療. *Medical Immunology* 9: 71-74, 1985.
 - 14) Ryffel, B., Feurer, C., Heuberger, B., Borel, J.F.: Immunosuppressive effect of cyclosporin A in two lymphocyte transfer models in rats: Comparison of *in vivo* and *in vitro* treatment. *Immunobiol.* 163: 470-483, 1982.
 - 15) Bolton, C., Allsopp, G., Cuzner, M.L.: The effect of cyclosporin A on the adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in the Lewis rat. *Clin. exp. Immunol.* 47: 127-132, 1982.
 - 16) Mochizuki, M., Nussenblatt, R.B., Kuwabara, T., Gery, I.: Effects of cyclosporine on the efferent limb of the immune response. *Transplant. Proc.* 15: 2364-2366, 1983.
 - 17) Tosato, G., Pike, S.E., Koski, I.R., Blaese, R.M.: Selective inhibition of immunoregulatory cell functions by cyclosporin A. *J. Immunol.* 128: 1986-1991, 1982.
 - 18) Palacios, R.: Cyclosporin A inhibits the proliferative response and the generation of helper, suppressor and cytotoxic T-cell functions in the autologous mixed lymphocyte reaction. *Cell Immunol.* 61: 453-462, 1981.
 - 19) Thomson, A.W., Moon, D.K., Inoue, Y., Geczy, C.L., Nelson, D.S.: Modification of delayed-type hypersensitivity reactions to ovalbumin in cyclosporin A-treated guinea-pigs. *Immunology* 48: 301-308, 1983.
 - 20) Leapman, S.B., Filo, R.S., Smith, E.J., Smith, P.G.: *In vitro* effects of cyclosporin A on lymphocyte subpopulations. I Suppressor cell sparing by cyclosporin A. *Transplantation* 30: 404-408, 1980.
 - 21) Reis, G.A.D., Shevach, E.M.: Effect of cyclosporin A on T cell function *in vitro*. the mechanism of suppression of T cell proliferation depends on the nature of the T cell stimulus as well as the differentiation state of the responding T cell. *J. Immunol.* 129: 2360-2367, 1982.
 - 22) Hutchinson, I.F., Shadur, C.A., Duarte, J.S.A., Storm, T.B., Tilney, N.L.: Cyclosporin A spares selectively lymphocytes with donor-specific suppressor characteristics. *Transplantation* 32: 210-216, 1981.
 - 23) Bordes-Aznar, J., Kupiec-Weglinski, J.W., Duarte, A. J.S., Milford, E.L., Storm, T.B., Tilney, N.L.: Function and migration of suppressor lymphocytes from cyclosporin-treated heart graft recipients. *Transplantation* 35: 185-190, 1983.
 - 24) Mohagheghpour, N., Benike, C.J., Kansas, G., Bieber, C., Engleman, E.G.: Activation of antigen-specific suppressor T cells in the presence of cyclosporin requires interactions between T cells of inducer and suppressor lineage. *J. Clin. Invest.* 72: 2092-2100, 1983.
 - 25) Hall, B.M., Jelbart, M.E., Dorsch, S.E.: Suppressor T cells in rats with prolonged cardiac allograft survival after treatment with cyclosporine. *Transplantation* 37: 595-600, 1984.
 - 26) Kupiec-Weglinski, J.W., Lear, P.A., Heidecke, C.D., Tilney N.L.: Modification of function and migration patterns of thymocyte populations by cyclosporine after organ transplantation in rats. *Transplantation* 37: 631-633, 1984.