

琉球大学学術リポジトリ

制癌剤投与マウスにおける液性免疫応答の基礎的検討

メタデータ	言語: 出版者: 琉球大学農学部 公開日: 2008-02-14 キーワード (Ja): マウス, 溶血斑形成細胞, ヒツジ赤血球凝集素価, 制癌剤 キーワード (En): mouse, plaque forming cell, HA titer, antitumor agent 作成者: 上地, 俊徳, Uechi, Shuntoku メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3632

制癌剤投与マウスにおける液性免疫応答の基礎的検討

上 地 俊 徳*

Shuntoku UECHE : Basal study on humoral immune responses in mice administrated with antitumor agents

キーワード：マウス, 溶血斑形成細胞, ヒツジ赤血球凝集素価, 制癌剤

Key words : mause, plaque forming cell, HA titer, antitumor agent

Summary

In the present study the effect on the anti-SRBC antibody response in normal mice or mice that administrated with antitumor agents, mitomycin C (MMC) or cyclophosphamide (CY), has been investigated. CY was given intraperitoneally for 4 days at a dose of 50 mg/kg b.w. and MMC was given intravenously for 4 days at a dose of 4 mg/b.w. After the administrations, spleen weight, anti-SRBC hemagglutination titer (HA) and plaque forming cell (PFC) assay were studied in these mice. Both CY and MMC, as expected, showed suppressive effects on spleen weight, HA titer in serum and PFC response in spleen.

結 言

免疫応答におけるT細胞やB細胞, マクロファージの役割を検討する実験を行なう場合, 抗体産生細胞数がどのくらい出現するか, あるいは流血中の抗体価がどのくらい上昇するかを測定することによって細胞レベルあるいは個体レベルでの免疫機能を知ることができる。

今から約40年前, Jerne¹⁾らがin vitroで抗体産生細胞を定量的に観察する手法PFC assay法を発表して以来, リンパ球の機能解析は飛躍的に進歩したと言われる。以後, この方法は改良が重ねられ多くの方法が開発されたが, 現在ではCunningham²⁾らの方法が一般的に用いられている。

今回, 正常マウスおよび制癌剤を投与したマウスそれぞれのT細胞依存性抗原SRBCに対する液性免疫応答能について, CunninghamらのPFC assay法およびHA 測定法により基礎的検討を行なったので, その成績を報告する。

*琉球大学農学部生物資源科学科

実験材料および実験方法

1. 供試動物

5週齢のICR系雄性マウス（日本チャールス・リバー，入荷時体重26-31g）を購入し，1～2週間の予備飼育後実験に使用した．飼育期間中，餌と水は自由摂取とした．飼育室の温度は $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ，湿度は $60 \pm 10\%$ に設定し，午前8時点灯，午後8時消灯とした．

2. 薬物および試薬

制癌剤としてマイトマイシン協和S（MMC；協和発酵工業）とサイクロフォスファミド（CY；Sigma）を用いた．補体としてモルモット血清（Hemo-lo guinea pig complement；Cedarlane）を用いた．このほかに2-mercaptoethanol（Sigma）， $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ （和光），Protein A（Sigma），R PMI-1640およびウサギ抗マウスIgG（ γ -chain specific；MBL）を用いた．

3. 実験方法

実験1．新鮮ヒツジ赤血球（SRBC；Sheep Red Blood Cell；デンカ生研）を生理食塩液で3回遠心洗浄（1000rpm，10分）した．沈渣に生理食塩液を加えて 1×10^8 SRBC/mlの細胞浮遊液を調製した．その0.2ml（ 2×10^8 SRBC）をマウスの尾静脈内に注射して感作した．Table.1のexperimental designに示したように，注射した日をDay 0とし，感作後2，3，4，5および6日後に採血し，4．に記載した方法により血中のanti-SRBC抗体価を測定し，5．に記載した方法により脾臓中のHemolytic plaque forming cell（PFC）を調べた．

実験2．実験1と同様にSRBC浮遊液を調製した．Table.2のexperimental designに示したように，マウスを 2×10^8 SRBC（i.v.）で感作し，それから5週間後に 1×10^7 SRBC（i.v.）で二次感作を行ない，二次感作した日から連続4日間MMC 4 mg/kg/day（i.v.）あるいはCY 50mg/kg/day（i.p.）を1日1回投与した．二次感作から4日後に実験1同様，血中のanti-SRBC抗体価と脾臓中のprotein A-PFC数を調べた．

4. 血清凝集素価（Hemagglutinin titer；HA価）の測定

マウスの腹大静脈から採血した後，3000rpm，10分遠心分離により血清を得，これについてmicroplate法によりHA価を測定した．96穴マイクロタイタープレート（V型）を用い， 56°C ，30分間非働化した血清をマイクロタイターダイリューターで0.025ml/wellとなるように0.15M Phosphate buffered saline（PBS，pH7.2）溶液で倍数希釈した後，マイクロタイタードロッパーで0.025ml（ 2×10^8 SRBC/ml）を加え，混和した．このプレートを 4°C 下で18時間静置し，凝集の有無を観察した．HA価のうち7S抗体価はWalzらの方法³⁾で測定した．すなわち，0.5Mの2-mercaptoethanol加生理的食塩液と等量の被検血清とを混和し，室温で30分間incubationした後，HA抗体価測定時と同様に凝集反応を行なって測定した．HA価は赤血球凝集を生じた血清の最高希釈倍数の逆数を2を底とする対数で示した．

5. 脾臓中の抗SRBC-PFCおよびProtein A-SRBC PFCの測定

脾臓をハサミで細切した後，ナイロン布を用いてsingle cell浮遊を調製した．トリパンブルー色素排除試験法による細胞生存率は95%以上であった．

Cunninghamらの方法により以下に示した方法で溶血斑形成細胞を測定した．また，Protein A-SRBCの調製はGronowiczらの方法⁴⁾に準じ，同様に溶血斑形成細胞を測定した．

Spleen cells (5×10^6)/ml in RPMI 1640 ... 0.4ml
 50% non-treated or protein A-treated SRBC in RPMI 1640 ... 0.05ml
 Complement in RPMI ... 0.05ml

- ①この混和液0.1mlをCunningham chamberの1枚のスライド（2～3室）に入れる。Chamber内が液で満たされない時の不足分は細胞を含まない同組成の液で補充する。
- ②パラフィンで両サイドを封入する。
- ③水平状態に保持して37°Cで数時間培養する。
- ④肉眼もしくは実体顕微鏡下でプラーク数（n）を数える。
- ⑤ 10^6 spleen cells当たりのplaque数（x）を計算式により求める。

なお、1枚のCunningham chamber内のプラーク数は50個前後が測定し易い。多過ぎるとプラーク同士の融合などが生じて、正確な算定が困難になる。試験によりduplicateあるいはtriplicateで実施する。

6. 統計学的処理

実験結果の統計学的有意差の検定はいずれもstudent's t-testにより行なった。

結果および考察

1. 正常マウスにおけるSRBC抗原特異的応答の経日的変化（実験1）

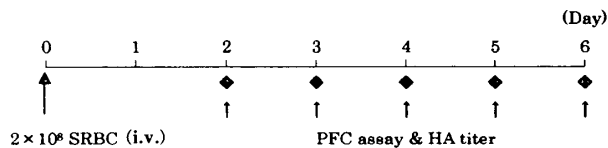
SRBC抗原注射後、脾臓におけるanti-SRBC PFC細胞の出現状況と血中の抗SRBC抗体価を日を追って調べ、表1の結果を得た。通常、抗体産生機構を細胞レベルで解析するには対象とするリンパ器官がその抗原刺激に対して充分反応していることが必要であり、感作経路と被検リンパ臓器、リンパ器官との関連性には十分な配慮が必要であるが、脾臓はその目的にかなった代表的臓器であることから、本実験では脾臓を対象臓器として用いた。抗原感作後2～6日間の脾重量は130～156gの間で推移し、抗原刺激に対応するような重量変動は見られなかったが、3日目に最低値、5日目に最大値を示し、その差は約15gであった。マウス1匹（脾臓）あたりの平均有核細胞数は6日目に 1.34×10^8 の最低値、5日目に 2.35×10^8 個の最大値を示した。 2×10^8 SRBCを静脈内投与して感作したマウスにおいて抗SRBC抗体は感作後2日目には検出されなかったが、3日目に4.0、4日目に6.0、5日目にはプラトーの6.3に達した。一方、脾臓中の抗SRBC-PFCは感作後2日目から少数ではあるが検出されるようになり、3日目に700、4日目には3,610の最大値に達した後、5日目には激減した。すなわち、SRBC抗原感作マウス

Table 1. Humoral immune response in normal ICR mice treated with SRBC

	Days after immunization with 2×10^8 SRBC				
	2	3	4	5	6
Spleen weight (g)	141.5±25.8	130.4±5.4	142.6±5.1	155.4±5.4	138.5±16.3
No. of nucleated cell ($\times 10^8$)/spleen	1.99±0.37	2.17±0.1	2.04±0.23	2.35±0.61	1.34±0.17
PFC/ 10^6 cell	10±10	700±70	3610±1630	0.61±250	50±480
Hemagglutination Titer (\log_2)	n.d.	4	6	6.3	6

n.d.: not detected

« Experimental design »



において、感作後2日目には脾臓に抗体産生細胞が検出され、4日目にはその数は最大値を示した。血中抗体は3日目から検出され、それから1~2日後には抗体価はプラトーに達した。このように脾PFC数の出現パターンと血中凝集素力価の上昇とは時系列的にほぼ平行していたが、プラトーに達した以降の動態には両者に違いが見られ、抗体産生細胞数が急速に減数したのに対し、抗体価の低下は緩やかであった。

血中の抗体レベルはその合成速度、すなわち抗体産生細胞の数によって支配される。ちなみに1個の形質細胞は毎秒1,000抗体分子(24時間では 10^8 個抗体分子=0.025ng)を分泌するとも言われ、合成速度でいうとIgGが33mg/kg/day, IgMは6.7mg/kg/dayという数値も報告されている⁵⁾。一般に抗体はIgクラスによっても異なるが、ヒトの場合はその半減期はIgGが約20日, IgMが10日と言われ⁶⁾、抗SRBC抗体価の緩やかな低下は免疫グロブリンの代謝理論に合致する。

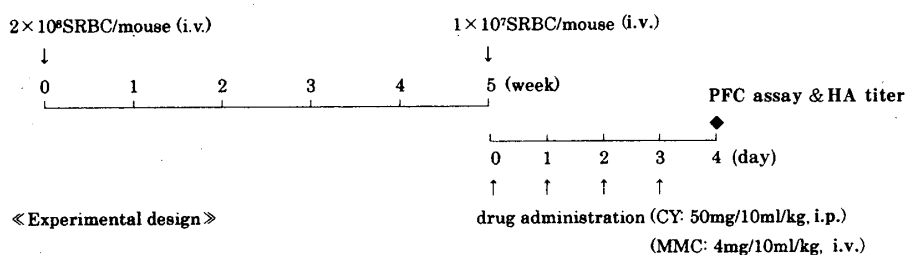
2. 制癌剤投与マウスにおける免疫応答 (実験2)

正常マウスに2種類の制癌剤を投与し、それぞれが液性免疫機能に及ぼす影響を調べ、その結果を表2に示した。CYは制癌剤であり、かつ臓器移植における拒絶反応抑制に使用される代表的な免疫抑制剤でもあり、抗生物質MMCは癌治療に用いられるこれまた代表的な抗癌剤である。作用機序の詳細は省略するとして、いずれもその作用は非特異的で、全体的な免疫機能を低下させることが知られている^{7, 8)}。今回の実験において、両薬物の投与によって脾臓重量はコントロール群に比べて有意に低下し、低下の度合はCY群よりもMMC群でより大きかった。CY, MMCはともに細胞周期に関係なく細胞の増殖を非特異的に障害するが、個体レベルの免疫応答機能を示すと考えられる血中抗体価(19S)はCY群で5.6を示し有意な低下であったが、MMC群では7.6を示し、コントロール群と差がなかった。CY投与によって損傷を受けるのは非T細胞領域、すなわちB細胞領域であるといわれ、このことは抗体産生抑制結果とよく一致する。一方の7S抗体価はMMCで3.0, CY群で4.6とコントロールの7.6に比べて有意に低下し、Protein A-PFC (IgG抗体産生細胞)の数も両薬物投与で大きく減少した。制癌剤を投与した2群ではProtein A-PFCの値が示すように、IgG抗体産生細胞の活性は殆ど失われており、血中の7S抗体価の有意な低下とProtein A-PFC数の減少とは理論的に一致している。多くの研究者により制癌剤CYおよびMMCの生体への投与は液性免疫機能の低下を招来することが明らかにされているが、著者もこれを確認することができた。免疫機能の検索に用いられるパラメーターには数多くの項目・方

Table 2. Changes in humoral immune response in ICR mice treated with Cyclophosphamide or Mitomycin C

	Dose	Spleen weight	anti-SRBC titer(log ₂)		Protein A-PFC
	(mg/kg)	(mg)	19S ¹⁾	7S ²⁾	(IgG-producing cell/10 ⁶ spleen cell)
Control	0	131.3±23.4	7.8±0.8	7.6±0.5	1820
Cyclophosphamide	50	79.0±13.0 *	5.6±1.1 *	3.0±0.2 *	<100
Mitomycin C	4	49.0± 3.6 *	7.6±1.1	4.6±0.3 *	<100

Date are shown as M±S.D. *p<0.05 ¹⁾total antibody ²⁾2-mercaptoethanol resistant antibody



法等があり、目的によって使い分けることが必要だが、SRBCの多寡、CYあるいはMMCの投与量、投与期間、測定時期等の違いによってもPFC応答の高さ、血中抗体価などの免疫応答能は異なってくる。今回用いた実験方法で制癌剤投与時の液性免疫機能の変動を細胞レベルおよび個体レベルで適正に捉えることができたので、今後免疫賦活物質やBRM (Biological Response Modifier) 活性を有する物質のスクリーニングなどに本法を活用していきたい。

要 約

ICR系雄性マウスをヒツジ赤血球 (Sheep Red Blood Cell : SRBC) で感作し、脾細胞中の溶血斑形成細胞 (Hemolytic Plaque Forming Cell : PFC) および血中の抗SRBC凝集素価 (Hemagglutination Titer : HA価) の推移を経日的に測定した。また、SRBCで一次刺激し、5週間後に同抗原で二次刺激を行い、二次刺激した日からマイトマイシンC (Mitomycin C : MMC) 4 mg/kgあるいはサイクロフォスファミド (Cyclophosphamide : CY) 50mg/kgを4日間連日投与したマウスについて、血中の抗SRBC抗体価および脾Protein A-PFCに及ぼす影響を調べた。

正常マウス脾臓中のSRBCに対する抗体産生細胞は抗原感作後2日目には出現し、4日目にはその数はプラトーに達した。抗体産生細胞数の増加に平行するように、血中の抗SRBC凝集素価も対数的に上昇し、感作後4～5日でpeak titerに達した。制癌剤を投与したマウスにおいては、脾臓重量がCY投与でコントロールの60%に、MMC投与で同じく37%に低下し、HA価はCY投与で19S抗体価と7S抗体価の両方が、MMC投与では7S抗体価だけが有意に低下した。脾IgG抗体産生細胞数はCY投与でも、またMMC投与でも低下した。すなわち、CYおよびMMCの両制癌剤は正常マウスの液性免疫機能をそれぞれ低下させることが確認できた。

文 献

1. Jerne, N. K. and Nordin, A. A. : Plaque formation in agar by single antibody-producing cells. *Science*, **140**: 405, 1963.
2. Cunningham, A. J. and Szenberg, A. : Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunology*, **14**: 599-600, 1968.
3. Walz, D. T., DiMartino, M. J. and Misher, A.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **178**: 223, 1971.
4. Gronowicz, E. Coutinho, A, Melcher, F. : A plaque assay for all cells secreting Ig of a given type or class. *Eur. J. Immunol.*, **6**: 588, 1976.
5. 免疫の科学・第1巻, 文永堂 (東京), pp124, 1977.
6. 免疫学イラストレイテッド (原書第5版) 多田富雄 監訳, 南江堂, pp73, 2000.
7. Winkelstein, A. : Effect of immunosuppressive drugs on T and B lymphocytes in guinea pigs. *Blood*. **50** : 81-91. 1977.
8. Turk, J. L. and Parker, D. : Effect of cyclophosphamide on immunological control mechanisms. *Immunological Rev.* **65** : 99-113, 1982.