

原 著

Rifampicin の免疫抑制作用について

第1報 遅延型アレルギー，マクロファージ，多核球の
enzyme activity に及ぼす影響

志摩 清・安藤 正幸・樋口 定信
福田 安嗣・徳臣 晴比古

熊本大学医学部徳臣内科

受付 昭和 49 年 8 月 9 日

EXPERIMENTAL STUDY ON IMMUNOSUPPRESSIVE EFFECTS
OF RIFAMPICIN

Kiyoshi SHIMA*, Masayuki ANDO, Sadanobu HIGUCHI,
Yasutsugu FUKUDA and Haruhiko TOKUOMI

(Received for publication August 9, 1974)

0.4 ml of an emulsion containing 25 mg of 2% phenolized BCG per milliliter was prepared with equal amount of steril saline and incomplete Freund adjuvant. 0.1 ml of its portions were injected into all four foot-pads of the guinea pigs. From the same day of the above immunization, Rifampicin (RFP) 100 mg/kg in propylenglycol (propy.) was injected into the muscle of guinea pigs daily for 16 days and the saline or propylenglycol alone was injected as the control. Tuberculin testing (old tuberculin diluted 1 : 10) was done 12 days and 16 days after immunization and the intensity of the reaction was expressed as a volume of the reaction by multiplying the reaction area with thickness. A volume of tuberculin reaction in the RFP, propy. and saline groups is $223.8 \pm 49.2 \text{ mm}^3$, $1,367.6 \pm 202.6 \text{ mm}^3$ and $1,428 \pm 197.6 \text{ mm}^3$, respectively, and suppressive effect on tuberculin reaction by RFP was observed obviously. (Table 1)

The influence of RFP on the enzyme activity of macrophage ($M\phi$) and white blood cells (WBC) in the peritoneal cavity of mice or guinea pigs was observed.

$M\phi$ were harvested from the peritoneal cavity of guinea pigs treated with RFP 100 mg/kg for 16 days, and from mice treated with RFP 165 mg/kg and 16.5 mg/kg daily for 10 days. $M\phi$ were smeared on the slide glass and were stained with β -galactosidase (β -gal.), lysosomal enzyme, histochemically, and also were counter-stained with hematoxylin. The activity of β -gal. was presented by the percentage of β -gal. positive $M\phi$. The results are as follows : i) RFP 100mg/kg to guinea pigs; the proportion of animals showing 1/4 positive activity of $M\phi$ in the RFP, propy. and saline groups is $14.3 \pm 1.9\%$, $31.7 \pm 1.0\%$, and $33.3 \pm 1.9\%$, and that showing 1/2 positive activity is $3.2 \pm 5.0\%$, $6.7 \pm 0.7\%$ and $7.2 \pm 1.1\%$, and over-all. Positive activity is $17.5 \pm 2.4\%$, $38.4 \pm 1.7\%$ and $40.5 \pm 3.0\%$, respectively (Table 3). ii) RFP 16.5 mg/kg and 165 mg/kg to mice: positive activity of $M\phi$ in RFP 165 mg/kg, 16.5 mg/kg and saline group is $60.0 \pm 0.6\%$, $66.0 \pm$

* From the Department of the 1st Internal Medicine, Kumamoto University Medical School, Kumamoto-shi 860 Japan.

3.2% and $72.2 \pm 4.1\%$, respectively. (Table 4)

As a result of the above experiments, the treatment of RFP 165 mg/kg revealed the suppressive effects on the lysosomal enzyme activity of $M\phi$ but in the case of RFP 16.5 mg/kg, the treatment of RFP was not effective.

The influence of RFP on the peroxidase activity of WBC in guinea pigs was examined by NBT-test. NBT positive WBC is $21.0 \pm 1.0\%$ in the RFP group and $38.8 \pm 1.0\%$ in the saline group, and the treatment of RFP obviously reduced the peroxidase activity of WBC. (Table 5)

I. 緒 言

Rifampicin (RFP) の免疫抑制作用については従来いくつかの基礎的研究が報告されている¹⁾²⁾。Hartman³⁾は RFP の作用機序として、DNA-directed RNA polymerase を阻害することによって、細菌の増殖を抑制するといっており、当然 macrophage ($M\phi$) およびリンパ球等の immunocompetent cell に対しても影響を与えているものと想像される。そこでわれわれは RFP の cellular immunity に与える影響をツベルクリン反応 (ツ反応) で観察し、更に $M\phi$ 、多核球 (WBC) の lysosomal enzyme の活性に与える影響についても検討を行った。

II. 実験材料および実験方法

1) 実験動物: ハートレー系の♀モルモット体重 400 g, および d-d 系マウス♀体重 30 g を用いた。

2) 遅延型アレルギー観察方法

i) 免疫方法: Dajani⁴⁾の方法に準じた。すなわち 2% phenolized BCG を滅菌生理食塩水および incomplete Freund Adjuvants で emulsion 化し、BCG 菌が 25 mg/ml になるように調整し、foot pads の 4 カ所にそれぞれ 0.1 ml の注入を行った。(BCG は日本ビーシージー製造 K. K. の経皮用乾燥 BCG ワクチンを使用した)

ii) ツ反応: 免疫後 12 日, 16 日目に背部皮内に旧ツベルクリンを生理食塩水で 10 倍に希釈した 0.1 ml を注射し, 48 時間後に判定し, 体積で測定し mm^3 で表した。(ツベルクリン液として化学および血清療法研究所の動物用ツベルクリン Lot No. 29 を使用した)

3) RFP 投与方法: RFP は水に難溶性 (pH 7.5 で 0.28%) のため propylenglycol (propy.) に溶解させたのを用い, 連日大腿筋肉内に注射を行った。

4) $M\phi$ enzyme 活性の測定法: モルモットおよびマウスとも, エーテル麻酔下で生理食塩水それぞれ 15 ml (モルモット), 5 ml (マウス) にて腹腔を洗浄し, 遠沈 800 ppm 10 分間行い, 腹腔 $M\phi$ を集め, スライドガラスに塗抹した。この塗抹標本を 1.25% glutaraldehyde で固定し, lysosomal enzyme である β -galactosidase を組織化学的に染色を行い⁵⁾ヘマトキシリンで弁別し, 定型的 $M\phi$ 100 コを算定し, その染色の割合に応じて, 1/4+

1/2+, + の 4 段階に分け, 比率をもつて表した。

5) WBC-enzyme 活性の測定法: $M\phi$ と同様の方法で腹腔より採取し, peroxidase 活性を NBT テスト法により測定した⁶⁾。

III. 実験結果

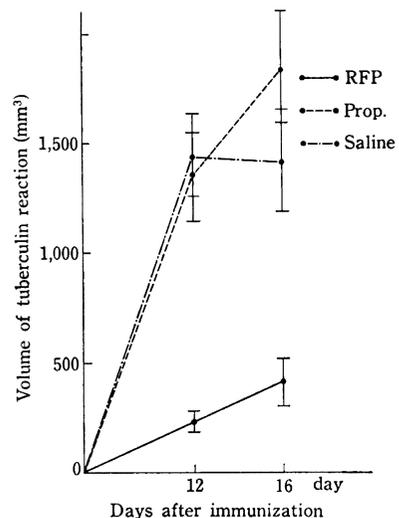
1) 遅延型アレルギーへの影響

10 mg でモルモット 10 匹に免疫し, 同時に RFP 100 mg/kg を連日 14 日間, 大腿筋肉内に注射を行い, 免疫後 12 日, 16 日目にツ反応をみた結果, 表 1 に示すごとく, 12 日目では RFP 群は平均 $223.8 \pm 49.2 mm^3$ で, 対照の propy. 群 $1,367.6 \pm 202.6 mm^3$, 生理食塩水群 $1,428.8 \pm 197.6 mm^3$ に比して明らかにツ反応の体積の低下が認められ, 16 日目も同様の成績であった (図 1)。なお

Table 1. Tuberculin Reaction (mm^3)

Treatment	No.	12 day	16 day
RFP	10	223.8 ± 49.2	402.3 ± 112.7
Propy.	10	$1,367.6 \pm 202.6$	$1,843.2 \pm 253.9$
Saline	5	$1,428.8 \pm 197.6$	$1,411.4 \pm 238.3$

Fig. 1. Effect of RFP on Tuberculin Reaction



propy. 群は生理食塩水群と差は認めず, propy. のツ反応への影響は無視しうるものとする。また表2に示すごとく体重の変動については RFP, propy., 生理食塩水群との間に差が認められなかった。以上の結果から, RFP は BCG に対するツ反応を抑制させる効果のあることが認められた。

Table 2. Changes in Body Weight (g)

Treatment	No.	0 day	12 day	16 day
RFP	10	410	345	336
Propy.	10	411	355	339
Saline	5	448	340	330

2) Mφ enzyme 活性に及ぼす影響

i) RFP 100 mg/kg 投与 (モルモット) の場合: RFP 連日投与16日目に, エーテル麻酔下で腹腔 Mφ を採取し, その β-galactosidase (β-gal.) 活性をみた結果, 表3のごとく β-gal. 活性, 1/4+ 陽性を示すものでは, RFP 群 14.3±1.9%, propy. 群 31.7%, 生食群 33.3±1.9% で propy. 生食群との間に差はなく, RFP 群では明らかに低値を示し, β-gal. 1/2+陽性でも, RFP 群 3.2±0.5% と propy. 群 6.7±0.7%, 生食 7.2±1.1% に比

Table 3. β-galactosidase Activity of Peritoneal Macrophages in Guinea Pigs

Treatment	No. of g.p.	Activity of β-gal. (%)			
		-	1/4+	1/2+	+
RFP	4	82.5±2.2	14.3±1.9	3.2±0.5	0
			17.5±2.4		
Propy.	7	61.6±1.6	31.7±1.0	6.7±0.7	0
			38.4±1.7		
Saline	4	59.5±2.2	33.3±1.9	7.2±1.1	0
			40.5±3.0		

し明らかな低値を示していた。これを β-gal. 陽性を示す Mφ について比較すると RFP 群 17.5±2.4%, propy. 群 38.4±1.7%, 生食群 40.5±3.0% である。

ii) RFP 16.5mg/kg および 165 mg/kg 投与 (マウス) の場合: マウスに RFP を連日大腿筋肉内に注射し, 10日目にエーテル麻酔下で腹腔 Mφ を採取し, β-gal. 活性をみたところ, 表4のごとく β-gal. 活性が 1/4+ 陽性については, RFP 群と対照の生食群の間に差はない。1/2+陽性では RFP 165 mg/kg 群は対照に比し低下を示し, +陽性でも RFP 165 mg/kg のみ低下が認められた。これを β-gal. 陽性を示す群を併せて比較すると対照 72.2±4.1% で RFP 16.5 mg/kg 群 66.0±3.2% と差は認められず, RFP 165 mg/kg 群でのみ 60.0±0.6% と明らかに低下が認められた。以上, モルモットでの RFP 100 mg/kg およびマウスでの RFP 165 mg/kg の場合に, Mφ の enzyme 活性の低下作用が認められ, マウスでの RFP 16.5 mg/kg 投与の場合は, その低下作用は認められなかった (図2)。

3) WBC の peroxidase 活性に与える影響について

RFP 100 mg/kg をモルモットの大腿筋肉内に連日注射し, 16日目に腹腔の WBC を採取し, NBT テストにより, WBC の peroxidase 活性をみた結果, 表5のごとく NBT テスト陽性を示す WBC は, 対照群 38.8±1.0% に比し, RFP 群 21.0±1.0% と明らかに, 低下作用が認められた。

IV. 考 案

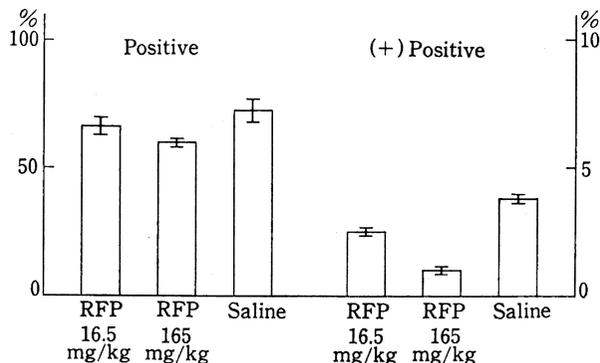
われわれの実験でモルモットに RFP を 100 mg/kg 投与した場合, 明らかに BCG に対する遅延型アレルギー

Table 5. NBT Test in Guinea Pigs of Peritoneal WBC

Treatment	No. of g.p.	Percentage of positive NBT
RFP 100 mg/kg	5	21.0±1.0
Saline	5	38.8±1.0

Table 4. Mφ β-galactosidase Activity

		No.	β-gal. activity (%)			
			-	1/4 +	1/2 +	+
RFP	16.5mg/kg	8	34.0±3.2	51.2±1.9	12.2±1.4	2.5±0.6
				66.0±3.2		
	165mg/kg	8	40.0±0.6	49.7±0.9	9.3±0.9	1.0±0.6
				60.0±0.6		
Saline		8	27.8±4.3	51.0±4.2	15.4±2.7	3.8±0.6
				72.2±4.1		

Fig. 2. M ϕ β -galactosidase Activity (%)

の抑制効果が認められた。一方, Dajani⁴⁾ は同じくモルモットでわれわれの使用した 1/5 の RFP の量 20 mg/kg で, 抑制効果を認めており, これは人の常用量に近い量である。泉⁸⁾ は肺結核患者で RFP 投与によりリンパ球, 更に T cell の減少を報告している。

さてツ反応という遅延型アレルギーの成立機序はまだ明確にはわかっていないが, おそらくリンパ球と M ϕ の相互作用によつて成立すると考えられる⁹⁾。Paunescu¹⁾ は RFP に対する感受性は M ϕ , ある種のリンパ球などにおいてははなはだしいことを推測しており, 事実 Nilsson²⁾ は人のリンパ球において PPD に対する blastoformation が RFP 10 μ g/ml で抑制され PHA に対しては治療量の同量の 1 μ g/ml でも抑制されたと報告している。

すなわち RFP はリンパ球, 主として T cell に対して抑制的に働いていることを示している。一方, われわれの実験で, M ϕ の lysosomal enzyme activity を低下させる作用を認めていることから考えて, RFP は T cell, M ϕ に直接的に障害を与え, 遅延型アレルギーを抑制していることが推測される。マウスの M ϕ enzyme 活性に与える RFP の影響は人の常用量に近い量 16.5 mg/kg では, その低下作用は認められなかった。この実験でもわかるように明らかに dose response が存在していることから, 更に dosis を変えて詳細に検討し, 人の常用量で, 免疫抑制作用がどの程度に認められるか調べる必要があると考えている。

以上のごとく RFP は cellular immunity に影響を与えていることは確かかのようにあるが, 一方, 露口⁷⁾,

Dajani⁴⁾ らは humoral immunity をも抑制すると報告しており, RFP は細胞性・液性免疫の両面に抑制時に作用する薬剤であると考えられ, いずれに主として作用するか今後の問題と思われる。

V. 結 語

1. BCG 免疫モルモットに RFP 100 mg/kg 16 日間投与したところ, ツ反応による遅延型アレルギーの低下が認められた。

2. M ϕ の lysosomal enzyme である β -gal. の低下が, RFP 100mg/kg (モルモット) および 165 mg/kg (マウス) で認められたが, 16.5 mg/kg (マウス) では認められなかった。

3. WBC の peroxidase 活性は RFP 100 mg/kg (モルモット) で明らかに低下作用が認められた。

文 献

- 1) Paunescu, E.: Nature, 228 : 1188, 1970.
- 2) Nilsson, B.S.: Lancet, 14 : 374, 1971.
- 3) Hartmann, G. et al.: Biochim. Biophys. Acta, 145 : 843, 1967.
- 4) Dajani, B. M. et al.: Antimicro. Agents and Chemother., 3 : 451, 1973.
- 5) Shima, K. et al.: Amer. J. Path., 67 : 161, 1972.
- 6) Park, B.H.: Lancet 7 : 532, 1968.
- 7) 露口泉夫: 医学のあゆみ, 87 : 575, 1973.
- 8) 泉孝英: 結核, 49 : 44, 1974.
- 9) 志摩清: 結核, 48 : 521, 1973.