

原 著

BCG 生菌大量静注によつて誘導される suppressor adherent 細胞

II) その suppressor adherent 細胞の性質

加 藤 一 之

北海道大学免疫科学研究所細菌感染部門

受付 昭和 55 年 6 月 4 日

INDUCTION OF SUPPRESSOR ADHERENT CELLS BY INJECTING
HEAVY DOSE OF LIVE BCG

II. The Characterization of Suppressor Adherent Cells

Kazuyuki KATO*

(Received for publication June 4, 1980)

In the previous report, the present author showed that the suppression by live BCG-pretreatment on delayed-type hypersensitivity is possibly mediated with adherent macrophage-like cells, by the use of the macrophage migration inhibition test.

The present study was undertaken to characterize the adherent cells involved in this suppression.

The result were as follows:

- 1) The adherent cells from mice injected with live BCG at least 12 days before cell harvest showed the suppressive effect.
- 2) The suppressive effect of the adherent cells acted beyond the major histocompatibility (H-2) barrier; it was shown both in C3H/He and C57BL/6 mice.
- 3) The suppressive adherent cells were sensitive to methotrexate but not to cyclophosphamide.

I. 緒 言

前報¹⁾で BCG 細胞壁 (CW) でマウスを感作する 3 週間前に BCG 生菌を大量静注することによつて遅延型反応が著しく抑制される現象について, Migration Inhibition (MI) assay を用いて解析した結果, この抑制に plastic adherent な細胞が働いていることが推定された。そこで, この抑制細胞の性質を更に明らかにするため, 主に *in vitro* の系で追究した。

II. 材料と方法

1) 動物: 前報¹⁾に引続き C3H/HeMs (C3H) を主に用いた。一部の実験には静岡実験動物農業協同組合

から購入した C57BL/6(B6) を用いた。個々の実験はマウスの週齢, 性をそろえて行なつた。

2) 薬剤: Methotrexate (MTX) (日本レダリー社) と Cyclophosphamide (CY) (塩野義製薬) を使用した。

3) BCG 生菌, 抗原, MI 活性: 前報¹⁾と全く同様に行なつた。

III. 結 果

1. BCG 生菌静注後, 腹腔浸出細胞 (PEC) 中に MI 活性抑制細胞が出現するまでの時間的経過

BCG 生菌静注後, 何日経過すると PEC 中に MI 活性を抑制する細胞が出現するかを調べるために, C3H マウスに BCG 生菌静注 3, 12, 21 日後に採集した PEC

* From the Division of Bacterial Infection, Institute of Immunological Science, Hokkaido University, Kita-15, Nishi-7, Kita-ku, Sapporo 060 Japan.

(3 d-L-BCG-PEC, 12 d-L-BCG-PEC, 21 d-L-BCG-PEC) それぞれに, BCG CW 300 μ g で皮下感作し4週後に得られた PEC(CW-PEC) を等量混合して MI 活性を調べた。表1に示したように対照に無処置マウスの PEC(N-PEC) を加えたそれは83.7%と活性はみられた。一方, 3 d-L-BCG-PEC を加えた場合は71.7%と活性はみられたが, 12 d-L-BCG-PEC, 21 d-L-BCG-PEC をそれぞれ加えた際の MI 活性は112.1, 105.6%と消失した。このことから, BCG 生菌静注後, 遅くとも12日以降に抑制細胞が PEC 中に出現してくるものと考えられる。

2. CW-PEC と抑制細胞が互いに H-2 を異にする場合の抑制効果

BCG 生菌静注によつて PEC に出現する抑制細胞は H-2 barrier を越えて作用するか否かを検討するために C3H(H-2^k) マウスと H-2 を異にする B6(H-2^b) マウスを用いて実験を行なった。C3H マウスの CW-PEC に BCG 生菌静注3週後の C3H, および B6 マウスの PEC(L-BCG-PEC) をそれぞれ等量混合して MI 活性を調べた。結果は表2に示したように C3H マウス

の CW-PEC に B6 マウスの N-PEC を加えても69.2%と MI 活性はみられた。しかし, B6 マウスの L-BCG-PEC を加えた場合109.2%であり, C3H マウスの L-BCG-PEC を加えた場合と同様に MI 活性は消失した。また同様に B6 マウスの CW-PEC に C3H マウスの L-BCG-PEC を加えた際にも MI 活性の消失が観察された。この結果から, MI 活性抑制細胞は H-2 barrier を越えて働くものと考えられる。

3. MTX および CY の抑制細胞に対する効果

BCG 生菌前処置によつて BCG CW 感作による遅延型反応抑制が薬剤投与によつて解除できないか否かを検討した。薬剤には抗腫瘍剤として知られている MTX と CY を用いた。MTX は 15 mg/kg を BCG 生菌静注後, 11日目と16日目, すなわち BCG CW 感作前, 10日と5日に2回, C3H マウスの腹腔に投与した。また CY は 200 mg/kg を BCG 生菌静注後, 16日目, すなわち BCG CW 感作前, 5日に1回腹腔に投与した。いずれの場合も前報と同様, BCG CW 感作4週後に PPD 10 μ g/0.05 ml で足蹠反応を調べた。結果は図1に示したように, BCG 生菌前処置を施さない対照群において

Table 1. Time Course of Development of Inhibitory Effect of PEC from Live BCG-injected Mice on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized Mice

PEC from	Mixed with	MI activity
Mice ^{a)} immunized subcutaneously with 300 μ g of oil-treated BCG CW	N-PEC	83.7*%
	3 day-PEC ^{b)}	71.7*
	12 day-PEC ^{b)}	112.1
	21 day-PEC ^{b)}	105.6

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) PEC from mice intravenously injected with live BCG 3, 12, 21 days before cell harvest, respectively.

* 0.001 < p < 0.01

Table 2. Inhibitory Effect of PEC from Live BCG-injected Mice on MI Activity of PEC from BCG CW-immunized Mice between H-2 different Mice

PEC from BCG CW sensitized mice ^{a)}	Mixed with PEC from	MI activity
C3H/He Ms (C3H)	Non-treated C3H	70.2*%
	Live BCG-injected C3H ^{b)}	105.1
	Non-treated B6	69.2*
	Live BCG-injected B6 ^{b)}	109.2
C57BL/6 (B6)	Non-treated B6	74.0*
	Live BCG-injected B6 ^{b)}	106.0
	Non-treated C3H	64.4*
	Live BCG-injected C3H ^{b)}	110.4

a) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

b) These mice were injected intravenously with 10⁶ live BCG 3 weeks before cell harvest.

* 0.05 > p > 0.02

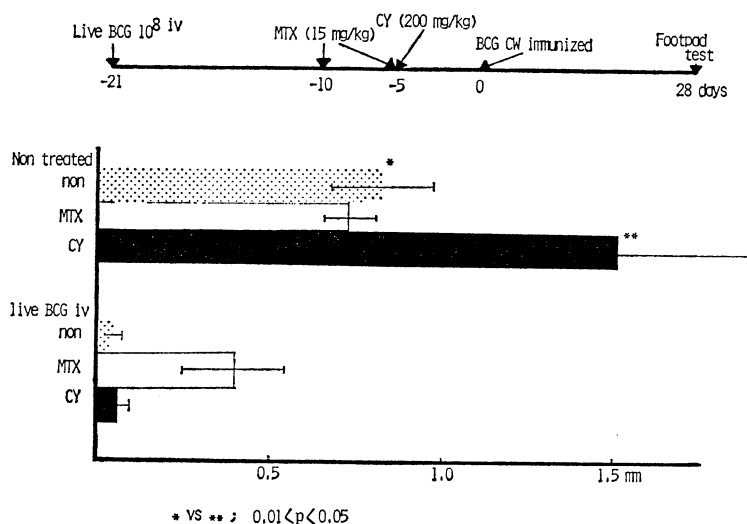


Fig. 1. C3H mice were iv injected with live BCG 3 weeks before immunization with BCG CW. They were divided into three groups, one group were ip injected with 15 mg/kg of methotrexate 11 and 16 days later, another were ip injected with 200 mg/kg of cyclophosphamide 16 days later, the others were untreated as control.

Table 3. Effect of Methotrexate (MTX)^{a)} on Suppressor Cells in PEC from Mice Injected with Live BCG

PEC from	Mixed with	MI activity
Mice ^{b)} immunized subcutaneously with 300 μ g of oil-treated BCG cell walls	PEC from normal mice	81.8%*
	PEC from MTX-injected normal mice	67.7***
	PEC from live BCG-injected mice ^{c)}	101.4
	PEC from live BCG- and MTX-injected mice	79.4**
	PEC from live BCG-injected mice and PEC from live BCG- and MTX-injected mice	103.1

a) MTX injection was done 5 and 10 days before cell harvest.

b) These mice were immunized 4 weeks before cell harvest.

c) These mice were injected iv with 10^8 live BCG 3 weeks before cell harvest.

* $0.02 < p < 0.05$

** $0.01 < p < 0.02$

*** $0.001 < p < 0.01$

は、MTX の投与は足蹠反応に何ら影響を及ぼさなかった。一方、CY の投与は有意に反応を増強させた。

BCG 生菌前処置群においては、MTX の投与によって対照群の足蹠反応の約60%近くまで抑制の解除がみられた。しかし、CY の投与では、この抑制解除はみられなかった。

次に MTX の投与による部分的な足蹠反応の抑制解除を MI assay を用いて検討した。L-BCG-PEC を採集する5日と10日前に MTX 15 mg/kg を2回、C3H マウスの腹腔に投与した。この採集した PEC を CW-PEC に等量加えて MI 活性を調べた。その結果、表3に示すように、この MI 活性は 79.4% で活性がみられた。MTX を投与して得た L-BCG-PEC と MTX を投与しないで得た L-BCG-PEC、更に CW-PEC をそ

れぞれ等量混合して MI 活性を調べてみると103.1%と活性は消失していた。以上の *in vitro* の成績は先に述べた足蹠反応の成績を裏付けるものであろう。

IV. 考 案

大量の BCG 生菌を静注処置されたマウスでは、その後の BCG CW 感作による遅延型の足蹠反応が抑制される。この現象を MI assay を用いて解析した結果、この抑制に T 細胞、B 細胞に属さない plastic に adherent な細胞、おそらく macrophage に属する細胞が免疫調節細胞として働いていることを前報¹⁾で明らかにした。この抑制細胞の性質はまだ不明な点が多く、本報では更に幾つかの性質について調べた。前報では BCG 生菌静注後21日目の PEC を用いて解析を行なつてきたが、こ

の抑制細胞は BCG 生菌静注何日後に腹腔に出現するかを検討した。BCG 生菌静注後、3, 12, 21日の PEC を採集して調べた結果、3日目の PEC には抑制活性はみられず、12日目の PEC に抑制活性がみられたことから、遅くとも12日以降に抑制細胞が腹腔に出現してくるものと推定される。このような検討は G.R. Klimpel ら²⁾にもよつてなされている。すなわち、彼らは、大量の BCG 生菌の腹腔投与を受けたマウスの脾臓の macrophage が cytotoxic T 細胞の活性を抑制するという実験系で、BCG 生菌投与後、5日目あたりから脾臓中にこの抑制活性をもつた細胞が出現しはじめ、20日前後で最高となり、90日を経てもなお、その抑制活性を保持していることを報告している。更に著者は互いに H-2 が異なつた C3H(H-2^k) と B6(H-2^b) マウスを用いて、この抑制細胞は H-2 barrier を越えて働くことを明らかにした。この事実についても先の G.R. Klimpel ら²⁾によつて cytotoxic T 細胞の実験系で、その活性の抑制が H-2 barrier を越えることが確かめられている。このように、著者が BCG 生菌静注で見出した MI 活性抑制細胞と G.R. Klimpel ら²⁾によつて報告されている BCG 生菌を腹腔に投与して脾臓から得た cytotoxic T 細胞の活性を抑制する macrophage 様の細胞は非常に類似点が多い。著者は BCG 生菌静注マウスの脾細胞の macrophage が CW-PEC の MI 活性を抑制するか否かを検討したが、PEC の遊走能と脾細胞のそれが極度に異なるため、その証明はできなかつた。

次に著者は大量の BCG 生菌前処置によつて起こる足蹠反応の抑制を薬剤を用いて解除できないか否かを検討した。BCG 生菌前処置を施さない群において CY の投与は足蹠反応を増強させた。この事実、A. Mitsuoka ら³⁾によつて明らかにされているように CY に対して suppressor T 細胞が感受性を有することから、suppressor T 細胞が障害され、その結果、足蹠反応が増強したものと推察される。しかし、BCG 生菌前処置による足蹠反応抑制は CY 投与によつて影響されなかつた。この事実から BCG 生菌投与によつて誘導された plastic adherent な抑制細胞は CY に感受性を有さないと考えられる。また BCG 生菌前処置による足蹠反応抑制に MTX を投与することによつて抑制に部分的な解除が起こつた。このことは、plastic adherent な抑制細胞が

MTX に感受性を有すると考えられる。これを MI assay を用いた *in vitro* の検討でも MTX の投与によつて L-BCG-PEC では MI 活性に対し抑制効果を消失していた。これに類似した報告として S. Orbach-Arbouys ら⁴⁾の報告がある。すなわち、BCG 生菌を大量静注されたマウスの脾細胞の PHA に対する反応の低下が、MTX の処置によつて回復するという。しかし、彼らの報告では抑制細胞と MTX の関係は定かでない。前報¹⁾でも述べたが、著者がマウスで見出したこの抑制細胞と類似すると思われる suppressor macrophage がヒトのある種の疾患で見出されており、今後、MTX との関係が追究されていくものと考えられる。

V. 結 語

BCG 生菌を大量静注されたマウスの腹腔に MI 活性を抑制する plastic adherent な抑制細胞が出現する。この細胞の性質を主に MI assay を用いて検討を行ない次の結果を得た。

- 1) BCG 生菌静注後、遅くとも12日以降に抑制細胞が出現する。
- 2) 抑制細胞は H-2 の異なつたマウスの MI 活性も抑制することから、H-2 barrier を越えて働くと考えられる。
- 3) MTX の投与を受けたマウスでは抑制活性が消失することから、抑制細胞は MTX に感受性を有すると思われる。

謝 辞

稿を終るにあたり、ご指導とご校閲を賜りました有馬純教授、山本健一教授に深謝致します。また、実験にご協力をいただきました大里光子、立花キヨ諸氏に厚くお礼を申し上げます。実験に使用した MTX, CY は日本レダリー社、塩野義製薬から供与を受けました。両社に感謝いたします。

文 献

- 1) 加藤一之: 結核, 55: 401, 1980.
- 2) Klimpel, G.R. and Henny, C.S.: J. Immunol., 120: 563, 1978.
- 3) Mitsuoka, A. et al.: Nature, 262: 77, 1976.
- 4) Orbach-Arbouys, S. and Castes, M.: Immunol., 36: 265, 1979.