HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	抗体産生における大食細胞の役割：培養条件下における抗体産生細胞形成実験の観点から
Author(s)	奥山, 春枝; 森川, 和雄
Citation	結核の研究, 34, 18-22
Issue Date	1974-03
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/26829
Type	bulletin (article)
File Information	34_P18-22.pdf

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

抗体産生における大食細胞の役割

——培養条件下における抗体産生細胞形成実験の観点から——

奥山春枝　森川和雄

（北海道大学結核研究所病理部）

（昭和48年9月29日受付）

抗原刺激から抗体産生に至る機序を研究する方法は，生体を使う場合と，in vitro の系を使う場合の2つに大きく分けられるであろう。後者は，その間にかかわり合う細胞その他の各条件を明確に出来ることにより，前者においては避けられない未知の条件を少なくすることが出来るという利点により広く利用される実験方法である。1966年に Mishell and Dutton[1] が，脾細胞の浮游液培養で，抗体産生細胞の産生のための優れた方法を発表して以来，この方面の研究に急速な進展がみられた。同時に，この方法を利用した Mosier[2] の仕事で，抗体産生系にはリンパ球のみでなくガラス面に附着する性質を持つ細胞，adherent cell の必要性がみとめられ，リンパ球の subpopulation である T- 及び B-cell の他に大食細胞が第3の細胞として脚光をあびるに至った。この綜説では，in vitro の抗体産生機序を研究した仕事のうち，特に adherent cell の関与についての報告を主として，我々の研究結果をおりまぜてまとめたい。

1. 細胞浮游液培養法による抗体産生の試み

細胞を浮游状態で長期間生存させることは非常にむずかしく，従ってその中で抗原刺激に対する初感作抗体反応をおこさせることは更に困難であるとされていた。それでもなお in vitro の初感作による抗体反応への試みは続けられており，組織を小さな切片の形のままで培養して，抗原刺激を与えることにより産生された抗体を培養液中に証明する方法が用いられていた[3)~8)]。しかし，このような細胞集団の形の場では，その反応は臓器単位として考えなければならず，抗体反応の機序を細胞レベルで分析することは出来ない。ここでどうしても個々の細胞をばらばらに見ることの出来る浮游液培養法が必要となってくる。この目的にかなったのが，Mishell and Dutton[1),9)] の巧みな方法の出現であった。彼らは，マウスの脾細胞を浮游液とし，羊赤血球を抗原としてシャーレ内で培養した。その工夫された点は，培養液として Eagle MEM 液に non-essential amino acid, sod. pyruvate 及び fetal calf serum を補強したこと，更に培養条件として 10% CO_2, 7% O_2 に 83% の N_2 の混合ガスを通気したこと，更に常時 7 cycle/min. の低速で振盪しながら培養することにある。この混合ガスの通気は，我々の教室においては経費の点でとても使用出来ず，一般の CO_2 培養器で代用せざるをえないが，この際には，培養初めの培養液の pH を中性又は酸性側にかたむいた所におさえなければならないと最近の Click[10)] の論文は述べている。我々は通気ガス以外は大体 Mishell らの方法にのっとって実験をしているが，ただ 7 cycle/min. で動く rocker plate が手に入らないのが大きな障害となっている。細胞浮游液培養では，細胞同志が cluster を作ることが抗体産生細胞増殖のために必要であり[11)]，特に培養開始初期の少くとも48時間の間振盪を続けることが，リンパ球を活性化するのに必要であるといわれる[12)]。このような低速振盪の継続がシャーレ培養において細胞 cluster 形成のために重要であることが認められているように，我が国で実験するためには，rocker plate が手に入らないことがこの方法のあい路となっている。ところがこの振盪機の必要性を補う方法として，mercaptoethanol (MET) の使用が報告された。Click[10)] は，培養液中に 5×10^{-5} 乃至 10^{-4} mol の濃度に MET を添加すると，抗体産生細胞の数は約6倍に増加し，培養中の振盪も，又毎日の栄養の補給もいらないという。ただ，この MET がどのような機序で抗体産生を増強するのかはわかっていない。我々も Click 法に従い MET 添加の影響をしらべてみたが，10^{-5}M から 10^{-4}M の範囲で明らかな抗体産生細胞の増加がみられた。しかしその増加の割合は彼ら程に高くはなく約2倍程度の増加であった。問題は，Chen and Hirsch[13)] が培地内に MET が存在すると，抗体産生系に大食細胞の存在が必要ないことを示唆していることで，大食細胞の役割を研究しようとする場合には MET の使用は不適当である。

一方，Mishell らと同じ頃に Marbrook[14)] が，内管と外管からなる培養瓶を考案し，内管内に細胞浮游液を入れて，透析膜を通して外管内の豊富な培養液と交流させることにより良い成績をえている。この方法は毎日の栄

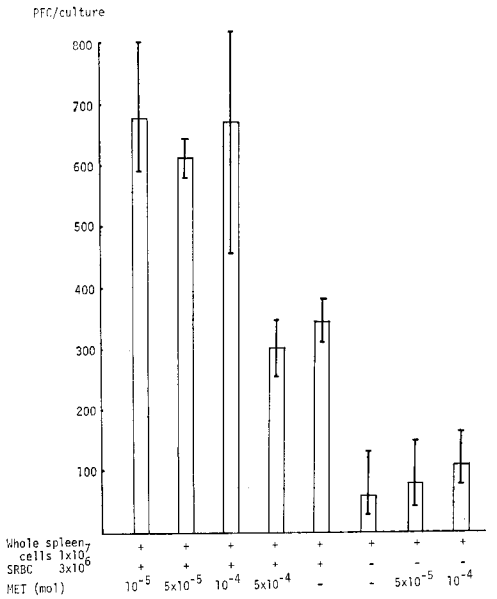

Fig. 1. PFC production in vitro—Effect of addition of 2-mercaptoethanol into the culture medium.

養液の添加も又振盪することもいらない便利な方法で，我が国でもこの方法を用いたいくつかの報告が出されている。Feldmann は Marbrook 法を改良し，内管を上室と下室に Nuclepore membrane によって2分し，それぞれに T-cell 又は B-cell を入れ，抗原と混合して培養，或いは adherent cell を入れて抗体産生機序に関与する細胞因子及び可溶性因子の分析を行なっている[15),16)]。

更に Mishell らの実験系が抗体反応の研究を大いに進めた優利な点は，抗原に羊赤血球のような異種血球を用いたことであろう。この血球抗原の使用により，抗体産生細胞の出現を容易に検出しうる plaque forming method が利用出来るからである。この方法は Jerne and Nordin[17)] により1963年に初めて発表され，その直接法は抗体反応初期に出現する19s抗体を産生する細胞を検出することが出来るので，短期間培養の抗体反応を測定するのには優利な方法である。その後 Ingraham and Bussard[18)], Cunningham and Szenberg[19)] らが更に鋭敏な方法を考案し，又 Mishell らもスライドグラス法を用いており，in vitro の実験をその判定の上からもより促進させたと考えられる。

2. 抗体産生における adherent cell の必要性

1967年 Mosier[2)] は，DBA/2 Jax mouse の脾細胞をプラスチックシャーレの壁面に附着する adherent cell と附着しない non-adherent cell に分け，それぞれを異種血球と共に培養しても抗体産生細胞 plaque forming cell (PFC) 産生はみられないが，両者を再び混合すると高い PFC 産生の恢復がみられることを報告し，マウス脾細胞が羊赤血球に対する抗体を産生するのには，大食細胞による貪食と，更に大食細胞とリンパ球の相互作用が必要であると結論し，抗体産生における大食細胞の重要性を強調した。更に彼らは[20)]，その際1個の adherent cell と2個の non-adherent cell が作用し合うことをみている。その後 Theis[21)] らも，兎又はマウスの脾細胞を同様に分画して，adherent cell を除くことにより約60% の PFC 産生の減少をみ，彼らも又大食細胞とリンパ球の相互作用の必要性をみとめた。この adherent cell は，脾細胞浮游液から分離したものばかりでなく，腹腔滲出液から分離したものも同様な働きがある (Hoffmann[22)], Gister and Dukor[23)])。即ち 10^7 個の脾細胞に 2×10^5 個の腹腔滲出液中の adherent cell (PEC) を加えて培養すると PFC 産生を増加するし，更に壁面に附着する細胞を除いて PFC 産生を低下させた脾細胞浮游液に PEC を添加することにより PFC 産生能力を恢復させることが示され，脾内の adherent cell と PEC が同様な働きを持つことがわかった。ただし PEC は 1 mℓ 当り 2×10^5 個が最適濃度で，これより大量の細胞数ではかえって PFC 産生がおさえられる。我々の成績を Table 1 に示したが，non-adherent cell に PEC を加えて培養した場合は全脾細胞の培養よりやや低い PFC 値であるが，PEC を加えない場合に比し明らかな PFC 産生の促進がみとめられる。又 adherent cell と non-adherent cell 間の相互作用は，それぞれ DBA/2J と CBA/J マウスからえた細胞間でも有効であることから，系統間の特異性を越えて働くものと思われる (Cosenza and Leserman, 1972)[24)]。

一方放射線抵抗性の細胞，Gorezynoski ら[25)] のいう A (accessory) cell が，マウス脾細胞の羊赤血球に対する免疫反応惹起に in vitro 及び in vivo 共に必要であり，又 in vitro での直接の細胞浮游液照射に生き残った細胞が PFC 産生を増強することがみられており (Tan and Gordon, 1971)[26)]，大食細胞が X 線照射に対し比較的強い抵抗性があることと考え合わせて，Mosier のいう adherent cell との関連で興味がもたれる。

この様な adherent cell は，正常動物からの細胞でも或いは，羊赤血球であらかじめ免疫された動物からの細胞であっても non-adherent cell の羊赤血球に対する PFC 産生を促進する能力は同じである。又両細胞の放射線照射に対する抗抵性も同程度にみられる[27)]。すなわ

Table 1. PFC production in vitro—Effect of addition of the macrophage from normal peritoneal exudate

Spleen cells 1×10^7		Whole		Non-adherent		
PEC	2×10^5	−	−	+	−	−
SRBC	3×10^6	+	−	+	+	−
Experiment	1	1,256	211	575	171	87
	2	1,102	197	1,019	313	258
	3	1,063	157	1,158	386	117
	4	842	189	686	178	193
	5	713	113	575	357	146
	6	495	41	575	275	63
Means		911.8 ±281.1	151.3 ±64.4	764.7 ±258.8	280.0 ±90.1	144.0 ±72.0

PEC: Adherent cells from normal peritoneal exudate.
SRBC: Sheep red blood cells.

ち，この adherent cell は免疫反応を惹起するのには必要であるけれども，免疫操作によって増殖したり或いは機能に変化をおこしたりしないことを示している。そしてその作用する時間は in vitro の初感作例でみると初めの2時間の間におこる。すなわち，反応の inductive phase に adherent cell が必要であることがみとめられている[24]。

以上，主に異種血球に対する反応の際の adherent cell の必要性をのべたが，Sjöberg ら[28] は羊血清に対する免疫反応に，又 Aaskov ら[29] は pneumococcal polysaccharide type III に対する反応にも adherent cell が関与するとのべている。しかし一方，polymerized flagellin (POL) のように同じ単位の繰返しからなる特有な構造をもつ抗原物質では adherent cell を必要としないことが報告されている[30]。このことを基として Feldmann[16] が抗体産生機序についての仮説をのべているので後にふれる。

3. Adherent cell 培養上清による PFC 産生の刺激

抗体産生の場における adherent cell の重要性は前述したが，adherent cell と non-adherent cell 間の作用には細胞同志の接着が必要かどうかということが問題となる。1964年に Schoenberg ら[31] は免疫兎からえた細胞を電顕的に観察して，大食細胞とそれをとり囲んだリンパ球との間に細胞質の結合があることをみて，前者から後者への細胞質内容の移行があることを示唆した。しかし in vitro の実験では，このような直接的な内容物の移行が必ずしも必要とは思われない報告が出されている。Shortman ら[32] は，PEC を羊赤血球と共に21時間培養した遠心上清が，大食細胞を含まないリンパ球の反応を惹起させることが出来るといっている。更に，あらかじめ PEC のみを培養し，その上清で羊赤血球を処理した遠心上清もまた non-adherent cell の PEC 産生を惹起せしめた。この事から，大食細胞から出たある factor が羊赤血球に働いて非沈降性の抗原物質を遊離させ，この物質が大食細胞を含まないリンパ球を刺激して反応をおこさせたと考えた。彼らはその様な大食細胞から遊離される factor (s) はおそらくは単純な lytic enzyme であろうと言っている。同様な意見は Gister and Dubor によっても出されている[33]。我々の仕事でも，抗原処理大食細胞の上清が PEC 及び抗原の存在なしで培養 non-adherent cell からの PFC への分化をおこさせている。その活性は，PEC を in vitro で抗原刺激後3時間のような早期のものでも，20時間培養上清と同程度の効果がみられた。この上清には後にもふれるように，Ouchterlony 法で検出できる羊赤血球の特異的な抗原物質が含まれているが，20時間上清に比し3時間上清内の抗原量が1/10程度に低いことから，3時間上清には抗原物質以外の非特異的に抗体産生細胞の増殖を促進する物質が多く含まれている可能性が推測される。同様な成績が Hartman[34] によってものべられている。Hoffmann and Dutton[35] は，抗原を入れない PEC の培養上清を羊赤血球加 non-adherent cell の培養に加えると PFC 産生を高めることをみた。この上清の活性は57°C 30分の加熱では不活化されず，22 μ pore filter

Table 2. PFC production in vitro—Effect of the culture supernatant from antigen stimulated peritoneal macrophages

Spleen cells 1×10^7		Whole		Non-adherent				
PEC or supernate		−	−	PEC	−	−	Spn-3 hr	Spn-20 hr
SRBC	3×10^7	+	−	+	+	−	−	−
Experiment	1	660	128	583	102	46	388	461
	2	1,581	182	1,300	275	100	577	634
	3	634	44	513	119	55	390	588
	4	978	98	1,300	315	91	400	350
Means		963.3 ±440.5	113.0 ±59.3	924.0 ±434.7	202.8 ±109.5	73.0 ±26.5	438.8 ±92.3	508.3 ±148.3

PEC: Macrophages from normal peritoneal exudate.
Supernate or Spn: Supernate at 3 or 20 hours after incubation of 4×10^6 cells of PEC with 3×10^7 SRBC.
SRBC: Sheep red blood cells.

を通過出来る。又凍結融解をしても活性は落ちない。更にこの活性は羊赤血球によって部分的に吸収することが出来るし，又上清で処理した血球は大食細胞やその培養上清がなくても non-adherent cell の反応を惹起出来る。即ち，non-adherent cell を刺激して PFC 産生を増強させることの出来る抗原処理大食細胞培養上清の能力の発現には，大食細胞から活性物質が先ず遊離して，それが血球に直接働くものであるらしい。

さて，この上清にある活性物質はどのようなものであろうか？ 古く，Fishman の T_2 phage を用いた実験で，PEC から遊離した RNA が抗体反応を刺激することが報告されて以来[36)~38)]，抗原を摂取した大食細胞の RNA が重要視され，その RNA 分画に決定基を持った抗原分屑が含まれていることがわかり[39)~41)]，この抗原 RNA 複合体が抗体反応惹起に働くといわれた。大食細胞に摂取された抗原物質の大部分は消化分解されて消失するが，そのごく一部が細胞表面に残っていてそれが抗原性を発揮し，しかも，大食細胞に結合した形の抗原は遊離の形で存在する抗原よりもはるかに抗原活性が高い[42)~44)]。たしかに抗原処理大食細胞上清には Ouchterlony 法で検出できる抗原物質がみられる。この上清内にみられる抗原量と同じ程度の羊赤血球からえた可溶性抗原で刺激した場合の PFC 産生数よりも培養上清の方が高い値がえられる。この点から考えると，上清中には抗原物質の他に，この働きを増強する他の因子も含まれていると思われる。これらは或いは抗原活性の高い RNA との複合体の形をとっているのかもしれない。

4. おわりに

リンパ球が異種血球に反応して抗体産生をする過程で，大食細胞が重要な役割をすることを in vitro 系を用いた報告を主としてのべたが，大食細胞に与えられた古典的な役割である異物の処理，固型物質の消化分解の他に，抗原物質の活性の増強という働きが加わってきた。更に抗体産生の場においても直接重要なかかわり合いを持っていることがわかって来た。しかしその機序はまだはっきりしていない。すでに述べたように[13)]，培養液への MET の添加は大食細胞の必要性を代償することが出来る。又 E. coli の lipopolysaccharide (LPS) が T-cell 及び adherent cell を含まない脾細胞の抗体反応を恢復させうることが認められており[45)]，LPS が B-cell を直接刺激して分化増殖させることが示唆されている。このような MET 或いは LPS の未知の作用機序の中に，adherent cell の作用機序と共通するものがあると考えられ，この方面からの研究も adherent cell の作用を解明する有効な手だてとなるであろう。Feldmann は[15)] 胸腺依存性抗原である羊赤血球，ロバ赤血球，DNP-KLH, DNP-Fowl rG 及び胸腺非依存性抗原である DNP-POL を駆使して抗体産生機序についての1つの仮説をたてた。すなわち，大食細胞による抗原の消化分解の他に，抗原刺激をうけた T-cell から遊離された mediator (Ig-T) を B-cell に有効に仲介する重要な役割をこの大食細胞に与えている。この仮説が正しいかどうかは今後の研究にまたれる所で，専ら T-cell, B-cell の作用に向けられている最近の目が，今後再び大食細胞へも注ぎなおされることであろう。

文　献

1) Mishell, R. I., and Dutton, R. W.: Science, **153**, 1004, 1966.
2) Mosier, D. E.: Science, **158**, 1573, 1967.
3) Adler, F. L., Fishman, M., and Dray, S.: J. Immunol., **97**, 554, 1966.
4) Globerson, A., and Auerbach, R.: Science, **149**, 991, 1965.
5) Globerson, A., and Auerbach, R.: J. Exp. Med., **124**, 1001, 1966.
6) Sanders, G. C., and King, D. W.: Science, **151**, 1390, 1966.
7) Tao, J. W., and Uhr, J. W.: Science, **151**, 1096, 1966.
8) Globerson, R. H.: J. Immunol., **106**, 842, 1971.
9) Mishell, R. I., and Dutton, R. W.: J. Exp. Med., **126**, 423, 1967.
10) Click, R. E., Benck, L., and Alter, B. J.: Cell. Immunol., **3**, 264, 1972.
11) Mosier, D. E.: J. Exp. Med., **129**, 351, 1969.
12) Pierce, C. W., and Benacerraf, B.: Science, **166**, 1002, 1972.
13) Chen, C., and Hirsch, G.: J. Exp. Med., **186**, 604, 1972.
14) Marbrook, J.: Lancet, 1279, 1967.
15) Feldmann, M., and Basten, A.: J. Exp. Med., **136**, 49, 1972.
16) Feldmann, M.: J. Exp. Med., **136**, 737, 1972.
17) Jerne, N. K., and Nordin, A. A.: Sience, **140**, 405, 1963.
18) Ingraham, J. S., and Bussard, A.: J. Exp. Med., **119**, 667, 1964.
19) Cunningham, A. J., and Szenberg, A.: Immunol., **14**, 599, 1968.
20) Mosier, D. E., and Coppleson, L. W.: Proc. N. A. S., **61**, 542, 1968.
21) Theis, G. A., and Thorbeck, G. J.: J. Exp. Med., **131**, 970, 1970.
22) Hoffmann, H.: Immunol., **18**, 791, 1970.
23) Gister, R. H., and Dukor, P.: Cell. Immunol., **4**, 341, 1972.
24) Cosenza, H., and Leserman, L. D.: J. Immunol., **108**, 418, 1972.
25) Gorezynoski, R. M., Miller, R. G., and Phillips, R. A.: J. Exp. Med., **134**, 1201, 1971.
26) Tan, T., and Gordon, J.: J. Exp. Med., **133**, 520, 1971.
27) Cosenza, H., Leserman, L. D., and Rowley, D. A.: J. Immunol., **107**, 414, 1971.
28) Sjöberg, O., Andersson, J., and Möller, G.: Eur. J. Immunol., **2**, 123, 1972.
29) Aaskov, J. G., and Halliday, W. J.: Cell. Immunol., **2**, 335, 1971.
30) Shortman, K., Diener, E., Russell, P., and Armstrong, W. D.: J. Exp. Med., **131**, 461, 1970.
31) Schoenberg, M. D., Mumaw, V. R., Moore, R. D., and Weisberger, A. S.: Science, **143**, 964, 1964.
32) Shortman, K., and Palmer, J.: Cell. Immunol., **2**, 399, 1971.
33) Calkins, C. E., and Golub, E. S.: Cell. Immunol., **5**, 579, 1972.
34) Hartmann, K. U.: The Role of Lymphocyte and Macrophages in the Immunological Response (1971), p. 22, edited by D. C. Dumond, Springer-Verlag.
35) Hoffman, M., and Dutton, R. W.: Science, **172**, 1047, 1971.
36) Fishman, M.: J. Exp. Med., **114**, 837, 1961.
37) Fishman, M., and Adler, F. L.: J. Exp. Med., **117**, 595, 1963.
38) Fischman, M., Van Rood, J. J., and Adler, J. L.: Molecular and Cellular Basis of Antibody Formation (1965), p. 491, edited by J. Sterzl and co-workers, Academic Press.
39) Friedman, H. P., Stavitsky, A. B., and Solomon, J. M.: Science, **149**, 1106, 1965.
40) Askonas, B. A., and Rhodes, J. M.: Nature, **205**, 470, 1965.
41) Roelants, G. E., and Goodman, J. W.: J. Exp. Med., **130**, 557, 1969.
42) Unanue, E. R., and Askonas, B. A.: J. Exp. Med., **127**, 915, 1968.
43) Unanue, E. R., and Cerottini, J. C.: Nature, **222**, 1193, 1969.
44) Mitchison, N. A.: Immunol, **16**, 1, 1969.
45) Sjöberg, O., Anderson, J., and Möller, G.: Eur. J. Immunol., **2**, 326, 1972.