

# 微生物学的環境が老化促進モデルマウス (SAM) の免疫機能の発達に及ぼす影響について

細川 友秀<sup>1)</sup>・弘田 雄揮<sup>1)</sup>・明田 知子<sup>1)</sup>・西村 泰光<sup>2)</sup>

## The Effects of Microbiological Environment on the Development of Immune Function in Senescence-Accelerated Mouse (SAM)

Tomohide HOSOKAWA<sup>1)</sup>, Yuki HIROTA<sup>1)</sup>, Tomoko AKETA<sup>1)</sup> and Yasumitsu NISHIMURA<sup>2)</sup>

**抄録:** 老化促進モデルマウス (SAM) の代表的な系統である SAMP1 系統のマウスは、若齢期から抗体産生反応とナチュラルキラー (NK) 活性が顕著に低い表現型を示すことが知られている。このような表現型は通常の conventional 飼育環境下で生育した個体で観察されてきた。実験動物の SPF (specific pathogen free) 化が進められる中で、SAM の各系統においても SPF 化が進められた。SPF 化は動物の生育環境のうち微生物学的環境を大きく変化させるため、SPF 化によって遺伝子型の発現が変化して表現型が変わる可能性があり、SAM 各系統の SPF 化に際してそれぞれの特徴的な表現型が維持されるかどうかを確認する必要がある。本研究では、SAMP1 系統マウスの示す低抗体産生反応の表現型が SPF 化によって変化するかどうかを調べた。羊赤血球 (SRBC) を抗原として使用し、*in vitro* と *in vivo* の両方の実験系で抗原特異的な抗体産生反応を conventional 飼育環境下で生育した SAMP1 マウスと SPF 環境下で生育した SAMP1 マウスの間で比較した。抗 SRBC 抗体産生の低反応性の確認のために、対応する飼育環境下で生育した C3H/He 系統マウスを比較対照とした。非免疫個体の脾臓細胞を SRBC で抗原刺激して誘発した *in vitro* の一次抗体産生反応は、SPF の SAMP1 マウスでも conventional な SAMP1 マウスと同様に飼育環境下の C3H/He マウスに較べて顕著に低かった。また、最適より二桁少ない量から準適量にかけて 3 通りの投与量の SRBC を尾静脈から注射して誘発した *in vivo* の一次抗体産生反応も、SPF の SAMP1 マウスと conventional な SAMP1 マウスともに対応する飼育環境下の C3H/He マウスに較べて有意に低かった。これらの結果は、conventional な環境から SPF 環境に微生物学的環境が変化しても、conventional な SAMP1 系統で見られた特徴的な免疫学的表現型が SPF 化された SAMP1 系統で失われずに維持されていることを示す。

**キーワード:** 微生物学的環境, SPF 動物, 抗体産生機能, 老化促進モデルマウス

### I. はじめに

免疫機構は脊椎動物に備わる生体防御機構であり、哺乳類で最も進化している。免疫機構は、個体の体内に侵入する微生物や微生物由来の分子、あるいは食物や食物由来の分子などさまざま

1) 京都教育大学 2) 川崎医科大学

まなものを非自己として自己から区別し攻撃・排除するために働く。また、免疫機構は体内に侵入する非自己の個々の違いを識別して記憶する（免疫学的記憶）能力を持つ。そのため免疫機構は、個体が生育する時の免疫機構成熟の過程で、個体を取り巻く微生物学的環境を含む免疫学的な環境の影響を受けてそれらの記憶を蓄積することができる。免疫学的記憶の蓄積は“免疫学的な学習”ともいうことができる。そのような“学習”の結果、遺伝的には全く同一の個体間であっても、生育環境が異なるならば両者が蓄積した記憶が異なり、免疫機能の詳細においてその個体独自の免疫機構が発達する。

動物を生育させた微生物学的環境によって実験動物や家畜は、無菌動物、ノトバイオート、SPF 動物（specific pathogen free animals）、ふつう動物（conventional animals）に分類できる。SPF 動物は特定の病原微生物に汚染されていない動物で、病原微生物汚染を防ぐために厳重なバリアシステムで飼育され、定期的な解剖検査、培養検査、血清検査、病理組織学的検査などによって SPF 状態が確認されている環境で生育させた動物である。そのため、免疫学の実験には SPF 動物を使用することが推奨され、現在は SPF 動物を使用した研究が主流になっている。

京都大学の竹田らによって開発された老化促進モデルマウス（SAM）は conventional animals としていくつかの系統が樹立されて、それぞれの系統は促進老化を共通の特徴とする学習・記憶障害、認知障害、老化アミロイド症、骨粗鬆症などの動物モデルとして盛んに研究されて多くの知見をもたらしている。SAM の各系統が示す特徴的な表現型は、各系統の遺伝子型が conventional な生育環境に応じて発現したものである。SPF 化は動物の生育環境のうち微生物学的環境を大きく変化させるため、SPF 化によって遺伝子型の発現が変化して表現型が変わることが考えられる。したがって各系統の SPF 化に際して、それぞれの特徴的な表現型が維持されるかどうかを確認する必要がある。

SAM 系統の中でも最も早く樹立された SAMP1 系統マウスは、conventional な環境で促進老化の表現型とともに、若齢期から抗体産生反応とナチュラルキラー（NK）活性が顕著に低い表現型を示すことが知られている<sup>1),2)</sup>。前述したように、免疫機能は個体の生育環境によって大きく影響されるため、SPF 化された SAMP1 系統マウス（以下、SAMP1-SPF）が conventional な SAMP1 系統マウス（以下、SAMP1-conv）と同様に抗体産生反応と NK 活性が若齢期から低いかどうか調べる必要があった。本研究では、羊赤血球を抗原として使用して抗原特異的な抗体産生反応を SAMP1-conv マウスと SAMP1-SPF マウスの間で比較した。

SAMP1-conv マウスは若齢期から脾臓細胞培養による *in vitro* 抗 SRBC 一次抗体産生反応が顕著に低い。しかしながら、最適抗原投与量の SRBC を SAMP1-conv マウスに注射して得られる *in vivo* 抗 SRBC 抗体産生反応は、一次反応と二次反応ともに対照系統マウスと差がなく、*in vitro* の実験系で見られるような抗体産生反応の低下は見られない<sup>3)</sup>。また、最適抗原投与量の SRBC を注射した SAMP1-conv マウスから脾臓細胞を得て、SRBC とともに培養して得られる *in vitro* 二次抗体産生反応も対照系統マウスの脾臓細胞の *in vitro* 二次抗体産生反応と差がなく、*in vitro* 一次抗体産生反応のような低下は見られない<sup>3)</sup>。以上の抗体産生反応の特徴から、SAMP1-conv マウスでは非最適条件から準最適条件において抗体産生機能の低下を観察することができると思われる。本研究の目的は、SAMP1-conv マウスが示す以上のような特徴が、微生物学的環境の変化により影響を受けるかどうか調べることである。

## II. 材料と方法

### 2.1 マウス

SPF 環境で生育した SAMP1 (SAMP1/SkuSlc) (SAMP1-SPF) と C3H/He (C3H/HeSlc) (以下, C3H-SPF) マウスは日本エスエルシー (浜松, 静岡) から供給され, 本学の conventional 動物飼育施設に収容し 1 週間以内に実験に供した。Conventional SAMP1 系統 (SAMP1/Kue) (SAMP1-conv) マウスは本学動物飼育施設で系統維持するものを使用した。また, conventional C3H/He (以下, C3H-conv) マウスは SPF の C3H/He マウスを日本エスエルシーから購入し, 本学の動物飼育施設で繁殖したものを使用した。実験に使用するマウスの月齢は 2 ~ 4 ヶ月齢とした。

### 2.2 抗原

羊保存血 (清水実験材料, 京都) を購入し, リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で洗浄して羊赤血球 (sheep red blood cell; SRBC) を得た。そして, *in vivo* と *in vitro* 両方の実験系で, 抗原に対する抗体産生反応が T ヘルパー細胞 (Th) に依存する抗原 (T 依存抗原) として使用した。

### 2.3 培養液と緩衝液

実験に主に使用した培養液と緩衝液は以下の材料と方法により準備した。

#### 2.3.1 RPMI1640 完全培地

RPMI1640 粉末培地 (日水製薬, 東京) 5.1 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 121 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7% 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH 7.2 に調整し, 牛胎仔血清 (FCS, Thermo Trace, Melbourne, Australia) を 5%, L-グルタミンを 2 mM, 2-mercaptoethanol を  $5 \times 10^{-5}$  M の濃度にそれぞれ加えて RPMI1640 完全培地とした。

#### 2.3.2 イーグル MEM 培地

イーグル MEM 粉末培地 (日水製薬) 4.7 g を再蒸留水 500 ml に溶かし, 121 °C で 20 分間オートクレーブして常温まで冷却した後, 7% 炭酸水素ナトリウム水溶液を加えて pH 7.2 に調整した。

#### 2.3.3 リン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH7.2)

NaCl 8.0 g,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.2 g,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2.9 g, KCl 0.2 g を再蒸留水 1 リットルに溶かし, 121 °C で 20 分間オートクレーブした。

### 2.4 免疫法

PBS に懸濁して 3000 rpm, 5 min の遠心によって 3 回洗浄した SRBC を  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$ , または  $1.0 \times 10^8$  マウスの尾静脈に注射して, *in vivo* における抗体産生反応を誘発した。SRBC 注射の 4 日後, マウスから脾臓を取り出し, 個体ごとに脾臓細胞懸濁液を調製して各脾臓内に生成した抗 SRBC 抗体産生細胞数を測定して抗 SRBC 抗体産生反応を評価した。

また, 脾臓細胞培養による *in vitro* 抗 SRBC 一次抗体産生反応を評価するため, 非免疫マウ

スから脾臓を取り出し個体ごとに脾臓細胞懸濁液を調製して、次に示す方法で SRBC とともに培養して *in vitro* における免疫を行った。

## 2.5 脾臓細胞の培養

定法によってマウスの個体ごとに脾臓細胞をイーグル MEM 培地に懸濁して、1000 rpm, 10 min の遠心によって 3 回洗浄し、RPMI1640 完全培地に懸濁した。個体ごとの懸濁液から得た脾臓細胞  $5.0 \times 10^6$  と SRBC  $4.0 \times 10^6$  を RPMI 1640 完全培地に懸濁混合して、24-well 培養プレートの各 well に分注し各 well の培養液を 2 ml とした。また、SRBC を加えない各個体の脾臓細胞のみの培養を対照とした。培養は、5% CO<sub>2</sub> in air, 37 °C, 加湿条件下の CO<sub>2</sub> インキュベータで 4 日間インキュベートした。そして、4 日後に各培養 well における抗 SRBC 抗体産生細胞数を、次に示すカニンガムのプラーク法<sup>4)</sup>によって測定した。

## 2.6 抗 SRBC 抗体産生細胞数の測定

イーグル MEM 培養液で 15% (v/v) の濃度に調整した SRBC 懸濁液 50 µl と、あらかじめ SRBC で抗 SRBC 自然抗体を吸収した正常モルモット血清 50 µl を、適当に希釈した被験脾臓細胞懸濁液 100 µl に加えて混合し、カニンガムチャンバーに注入した。チャンバーを軟パラフィンで封じた後、37 °C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 2 時間インキュベートした。そして、チャンバー内に形成された溶血斑（プラーク）の数を抗 SRBC 抗体産生細胞数として実体顕微鏡下で計数した。

## 2.7 有意差検定

独立した 2 群の統計学的検定は Student's t-test に従い、任意のグループ間で  $P < 0.05$  のとき有意差ありと判定した。

# Ⅲ. 結果

脾臓細胞培養による *in vitro* 抗 SRBC 一次抗体産生反応を SAMP1-conv, SAMP1-SPF, C3H-conv, および C3H-SPF マウス間で比較した。さらに、準最適抗原投与量から最適抗原投与量まで SRBC 注射量を変化させて *in vivo* 抗 SRBC 一次抗体産生反応を、SAMP1-conv, SAMP1-SPF, C3H-conv, および C3H-SPF マウス間で比較した。

## 3.1 *In vitro* 抗 SRBC 一次抗体産生反応の比較

SAMP1-conv, SAMP1-SPF, C3H-conv, および C3H-SPF 系統の 2 ヶ月齢, 3 ヶ月齢, 4 ヶ月齢のマウスから個体ごとに脾臓細胞を得て、SRBC とともに 4 日間培養し、各培養 well に出現した抗 SRBC IgM 抗体産生細胞数を測定した。結果を Fig. 1 に示す。

SRBC 抗原に対する抗体産生反応は SAMP1-SPF マウスの脾臓細胞と SAMP1-conv マウスの脾臓細胞との間に差がなく、両方とも対応する生育環境の C3H/He マウスの脾臓細胞に較べて顕著に低かった。SAMP1 マウス脾臓細胞の SRBC を加えた培養で生成した抗 SRBC 抗体産生

細胞の数は C3H/He マウス脾臓細胞の SRBC を加えない対照の培養で検出された抗 SRBC 抗体産生細胞数とほとんど変わらなかった。また、マウスの月齢を 2 ヶ月、3 ヶ月、4 ヶ月と変えても、SAMP1-conv と SAMP1-SPF マウスともに抗 SRBC 抗体産生反応に月齢による変化はなかった。

C3H/He マウスでは、2 ヶ月齢と 3 ヶ月齢の conventional 動物が SPF 動物に較べて抗 SRBC 抗体産生反応が低い傾向が見られたが、統計学的に有意な差ではなかった。そのような傾向は 4 ヶ月齢では全くなかった。

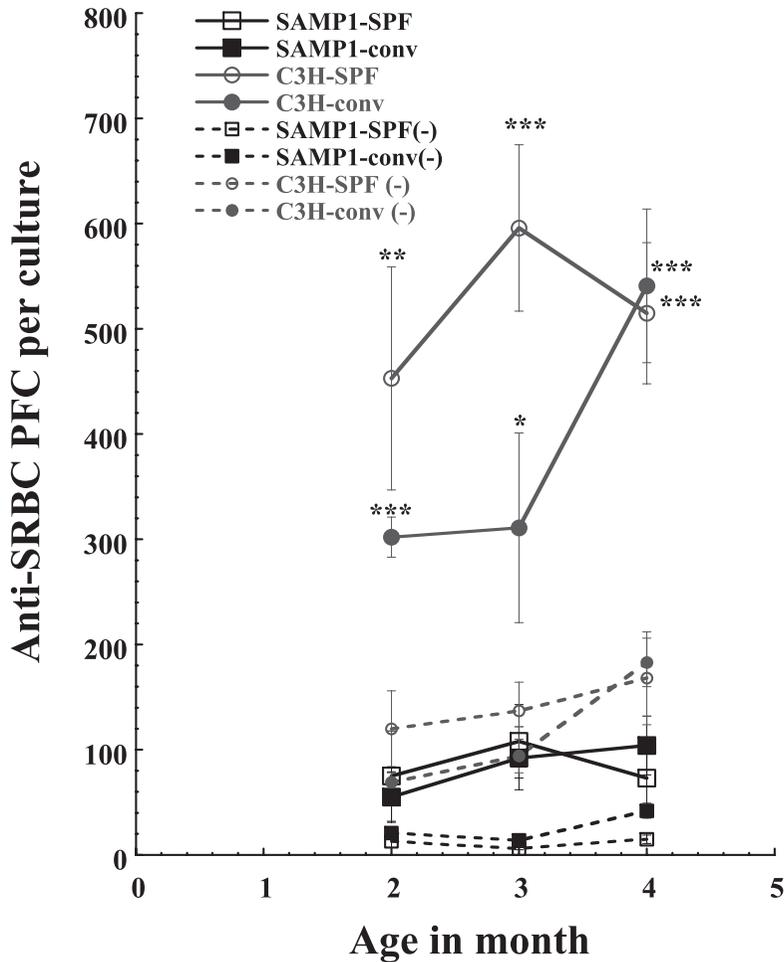


Fig. 1 SPF または conventional 環境で生育した SAMP1 および C3H/He 系統マウス脾臓細胞による in vitro 抗 SRBC 抗体産生反応

各点と縦線は 6 匹 (2 ヶ月齢の C3H-SPF), または 4 匹 (2 ヶ月齢の C3H-SPF 以外) の雄マウスの平均値 ± 標準誤差を示す。実線と破線のグラフは、それぞれ、SRBC を加えた培養と加えない対照の培養における抗体産生細胞数を示す。四角と丸印は、それぞれ、SAMP1 と C3H/He を示し、白抜きと塗りつぶしは、それぞれ、SPF 動物と conventional 動物を示す。対応する生育環境どうして C3H/He と SAMP1 の反応を比較; \* : P<0.05, \*\* : P<0.01, \*\*\* : P<0.001

### 3.2 In vivo 抗 SRBC 一次抗体産生反応の比較

SAMP1-conv, SAMP1-SPF, C3H-conv, および C3H-SPF 系統の 2 ヶ月齢のマウスに, SRBC を  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$ , または  $1.0 \times 10^8$  尾静脈注射し, 4 日後に脾臓中に出現した抗 SRBC IgM 抗体産生細胞数を個体ごとに測定した。結果を Fig. 2 に示す。

SRBC 抗原に対する in vivo の抗体産生反応は, SRBC 投与量の  $1.0 \times 10^6$ ,  $1.0 \times 10^7$ , および  $1.0 \times 10^8$  のどれにおいても SAMP1-SPF マウスと SAMP1-conv マウスの間に差がなかった。C3H-SPF マウスと C3H-conv マウスの反応を比較しても, SAMP1 マウスの場合と同様に, SPF 動物群と conventional 動物群の間に全く差がなかった。したがって, SRBC の用量依存性反応を全体的に見ても, SPF 動物群と conventional 動物群の間には差はなかった。

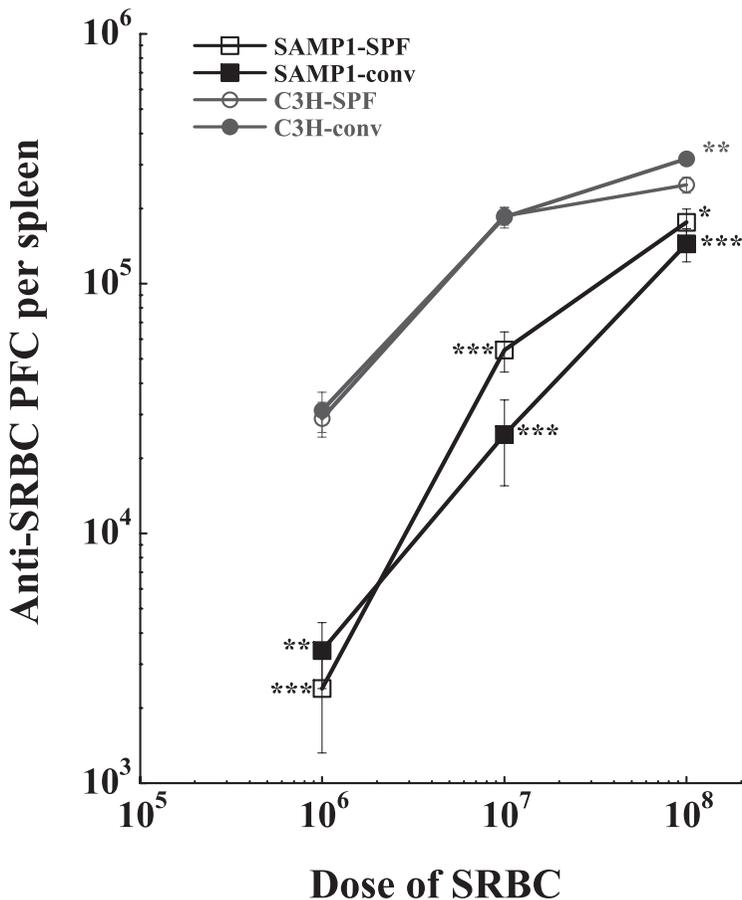


Fig. 2 SPF または conventional 環境で生育した SAMP1 および C3H/He 系統マウスによる用量依存性抗 SRBC 抗体産生反応

各点と縦線は, 横軸に示す数の SRBC を尾静脈注射された 2 ヶ月齢の雄マウス 4 匹の脾臓あたりの抗 SRBC IgM 抗体産生細胞数の平均値  $\pm$  標準誤差を示す。四角と丸印は, それぞれ, SAMP1 と C3H/He を示し, 白抜きと塗りつぶしは, それぞれ, SPF 動物と conventional 動物を示す。対応する生育環境どうして C3H/He と SAMP1 の反応を比較: \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$

SAMP1 マウスと C3H/He マウスを比較すると、SRBC 投与量が少ないと SAMP1 マウスの低抗体産生反応が顕著に見られた。SRBC 投与量が増加するにつれて、どちらの系統マウスも投与量に比例して用量依存的に脾臓の抗体産生細胞数が増加したが、 $1.0 \times 10^8$  の SRBC 投与に対しては C3H/He マウスの反応はプラトーに達する傾向が見られた。対照的に SAMP1 系統マウスの反応は  $1.0 \times 10^8$  の SRBC 投与に対しても直線的に増加する傾向を示し、C3H/He 系統マウスの反応に接近した。それでも両系統の抗体産生反応の差は統計学的に有意であった。

#### IV. 考察

SAMP1 系統マウスの示す低抗体産生反応の表現型が SPF 化によって変化するか否かを調べるため、SRBC を抗原として使用し、*in vitro* と *in vivo* の両方の実験系で抗 SRBC 抗体産生反応を conventional 飼育環境下で生育した SAMP1-conv マウスと SPF 環境下で生育した SAMP1-SPF マウスの間で比較した。脾臓細胞による抗 SRBC 一次抗体産生反応は、SAMP1-SPF マウスでも SAMP1-conv マウスと同様に C3H/He マウスの脾臓細胞の反応に較べて顕著に低かった。また、非最適投与量から準最適投与量の SRBC を尾静脈から注射して誘発した *in vivo* の一次抗体産生反応も、SAMP1-SPF マウスと SAMP1-conv マウスともに対応する飼育環境下の C3H/He マウスに較べて有意に低かった。以上の結果は、SAMP1 系統マウスが示す特徴的な免疫学的表現型のうち、少なくとも低抗体産生反応の表現型が SPF 環境で生育した SAMP1 系統マウスでも変わらず発現することを示す。

しかしながら、上に記載した結果は SAMP1 系統の示す低抗体産生反応の表現型が微生物学的環境に影響されて発現するという可能性を否定するとは限らない。従来からの conventional 飼育環境から特定の病原微生物を排除したバリアー内の SPF 飼育環境が格段に清浄な微生物学的環境であることは否定できないが、SPF 飼育環境といえども多様な微生物が存在していて個体が生育する時の免疫機構成熟の過程に conventional 飼育環境と同様な影響を与える可能性が残っている。

免疫機構の自然免疫系機能と適応免疫系機能を橋渡しして免疫反応を大きく調節するマクロファージは、全身の末梢組織に広く分布し多様な表現型と機能を示す<sup>5)</sup>。たとえば、マクロファージの機能は、炎症と抗炎症、免疫反応促進と免疫反応抑制、細胞性免疫促進性と体液性免疫促進性、組織傷害と組織再構築、腫瘍傷害と腫瘍支持のように相対抗する組み合わせがあると考えられる。どの組合せのどちらの機能をマクロファージが発揮するかは、マクロファージが存在する各組織の微少環境の変化に伴い柔軟に変化することによるという可能性が指摘されている<sup>6), 7), 8)</sup>。また、マクロファージは微生物などの侵入に際し、それらを捕捉・貪食し、殺菌・消化して適応免疫系のリンパ球に抗原提示して適応免疫反応を起動する。

以上のことを基に、次のような作業仮説を考えることができる。個体の生育過程で微生物学的環境の影響を受けて SAMP1 系統のマウスのマクロファージ機能が細胞性免疫促進性に傾くならば、SAMP1 系統のマウスは低抗体産生反応の表現型を示すことになる。SAMP1 系統の示す低抗体産生反応の表現型は遺伝支配を受けていることが示されている<sup>9)</sup>。それゆえ、ここで扱う SAMP1 系統マウスの免疫学的表現型は、単にある特定の飼育環境によってのみ観察され

るような見かけ上の表現型ではない。上記の作業仮説が正しいならば、SAMP1 系統マウスの低抗体産生反応は SAMP1 系統がもつ遺伝子型に規定されて、conventional 飼育環境と SPF 飼育環境に共通する微生物学的環境に応じて発現すると予想できる。上記の作業仮説とそれに基づく予想を確認する一つの方法は、SAMP1 系統マウスの無菌動物を作製してその抗体産生反応を調べることである。

## V. 結論

・ SPF 環境下で生育した SAMP1 系統マウスは、脾臓細胞培養による抗 SRBC 一次抗体産生反応と個体レベルの抗 SRBC 一次抗体産生反応ともに、従来の conventional 環境下で生育した SAMP1 系統マウスと同様の低反応性を示した。したがって、SAMP1 系統マウスが示す特徴的な免疫学的表現型のうち、少なくとも低抗体産生反応の表現型は SPF 環境で生育した SAMP1 系統マウスでも変わらず発現する。

・ 上記の点に関する限り、SPF 化 SAMP1 系統マウスは従来通りの特徴的な免疫学的表現型をもつモデル動物として使用できると考えられる。しかしながら、低 NK 活性や同種移植抗原に対する正常レベルのキラー T 細胞生成反応などのその他の主要な免疫学的特徴について順次調べて、それらの結果に基づき最終的な結論を得る必要がある。

## 文献

- 1) Hosokawa, T., Hosono, M., Higuchi, K., Aoike, A., Kawai, K. and Takeda, T. Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. I. Age-associated early decline in immune activities of cultured spleen cells. *Immunology*, 62: 419-423, 1987.
- 2) Hosokawa, T., Hosono, M., Hanada, K., Aoike, A., Kawai, K. and Takeda, T. Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. II. Selectively impaired T-helper cell activity in in vitro antibody response. *Immunology*, 62: 425-429, 1987.
- 3) Hosokawa, T., Hosono, M., Hanada, K., Toichi, E., Aoike, A. and Takeda, T. Age-associated early decline in immune activities in the senescence accelerated mouse (SAM): Impaired T-helper cell activity in in vitro primary and secondary antibody response. *In: The SAM model of Senescence* (Ed. by Takeda, T.) (Elsevier Science B.V., Amsterdam) pp. 163-166, 1994.
- 4) Cunningham, A.J. and Szenberg, A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunology*, 14: 599-600, 1968.
- 5) 細川友秀. 免疫系老化と神経系による調節について. *基礎老化研究*, 31: 1-6, 2007.
- 6) Stout, R.D. and Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.*, 76: 509-513, 2004.
- 7) Stout, R.D. and Suttles, J. Immunosenescence and macrophage functional plasticity: dysregulation of macrophage function by age-associated microenvironmental changes. *Immunol. Rev.*, 205: 60-71, 2005.
- 8) Monje, M.L., Toda, H. and Palmer, T.D. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*, 302:1760-1765, 2003.

- 9) Hanada, K., Hosono, M., Hosokawa, T., Chen, W.-E., Tsuboyama, T. and Takeda, T. Immune responses in newly developed short-lived SAM mice. III. Genetic control of defective helper T-cell activity in *in vitro* primary antibody response. *Immunology*, 68: 540-546, 1989.