

## マラリア感染にともなう免疫低下の研究

——ネズミマラリア感染マウスにおける  
*in vitro* での抗体産生の抑制 ——

渡部 久実 佐藤 良也  
高井 昭彦 大鶴 正満

新潟大学医学部医動物学教室

(昭和55年4月11日 受領)

### 緒 言

寄生虫の急性および慢性感染においては、宿主の免疫調節機構が変調をきたし、不特定多数の抗原や感染に対する体液性、あるいは細胞性の免疫能が低下する場合のことが知られている。このような免疫能低下の現象は、特にマラリア (McGregor and Barr, 1962; Salaman *et al.*, 1969; Barker, 1971; Greenwood *et al.*, 1971), トリパノソーマ (Goodwin *et al.*, 1972; Murray *et al.*, 1974; Albright *et al.*, 1977), トキソプラズマ (Huldt *et al.*, 1973; 鈴木ら, 1978) などの原虫感染において顕著に認められているほか、旋毛虫 (Faubert and Tanner, 1971; Faubert, 1976), 蛔虫幼虫 (Crandall and Crandall, 1976) の急性感染時においても報告されており、今後も各種の原虫や蠕虫感染で同様の免疫低下が報告されるものと思われる。このような免疫低下の現象は、生体のもつ複雑な免疫応答の調節機構と直接関連する興味深い問題を提起しているものと思われるが、同時に、寄生虫の示す多様な感染態度から、そこには寄生虫感染に特有な種々の要因の介在も示唆されている。しかし、その機構については今日なお種々論議され、しかも *in vivo* での検討は数多くされているものの、*in vitro* における細胞レベルでの詳細な検討は遅れている。

著者らは、マラリア原虫感染における免疫低下の現象を解析する目的で、ヒツジ赤血球を抗原として、*in vitro* における primary antibody response による検討を行なっている中で、得られた結果を報告する。

### 材料および方法

- 1) マラリア原虫  
使用されたネズミマラリア原虫 (*Plasmodium berghei* NK 65) は、群馬大学医学部寄生虫学教室より供与され、感染血液をマウス腹腔内に接種することにより継代維持しているものを用いた。
- 2) マウス  
BALB/c (日本チャールス・リバー, 8週~12週齢のものを用いた。また BALB/c の遺伝的背景をもつヌードマウス (nu/nu) およびヘテロマウス (nu/+) は本学病理学教室より供与された約6週~8週齢のものを使用した。
- 3) 原虫の接種  
原虫寄生マウスからヘパリンを用い心臓穿刺により血液を採取し、ただちに赤血球数および原虫寄生率を計測した。原虫寄生赤血球を  $5.0 \times 10^7$ /ml (一部少数感染群として  $5.0 \times 10^6$ /ml) になるように生理的食塩水で希釈調整し、その0.1ml を腹腔内に接種した。
- 4) Parasitemia の測定  
マウス尾静脈より採血した血液で薄層塗抹標本を作製し、通例のギムザ染色をほどこしたのち、約200個の赤血球を観察し、原虫寄生赤血球の比率 (%) として示した。
- 5) 抗原  
ヒツジ赤血球 (SRBC: 東芝化学) を Eagle の MEM 培養液で洗浄後、所定の赤血球濃度に調整して用いた。
- 6) *In vitro* における抗体産生  
*In vitro* での抗体産生能の測定は Fig. 1 に示した方法に従って行なつた。股動脈を切断し脱血させたマウ

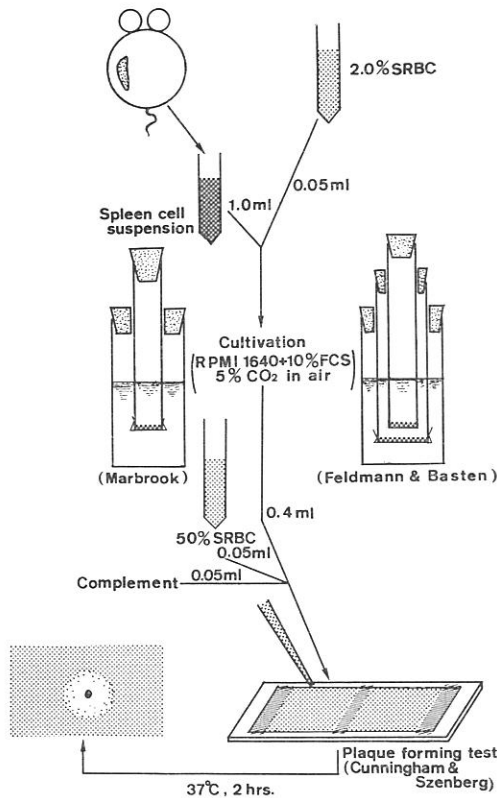


Fig. 1 Experimental procedures for the primary antibody response *in vitro*.

スより脾臓および頸部、腋窩部のリンパ節を摘出し、細胞を培養液中に遊離させた後、遠心洗浄を行ない細胞浮遊液とした。さらに、エリスロシンB液による生死判別試験で測定した生細胞数から、所定の細胞濃度に調整した。細胞培養液は、10%牛胎児血清 (FCS: Gibco) を含む PRMI 1640 培地 (Flow) を使用し、培養は CO<sub>2</sub> incubator により、37°C、5% CO<sub>2</sub> in air で行なつた。

Single chamber culture system: Marbrook (1967) による方法を用い、外筒には内径27mm、高さ55mm のガラス瓶を使用し、内筒には一端に透析膜をシリコンバンドで固定した内径10mm、高さ90mm のガラス管をシリコンフォームラバーで Fig. 1 のごとく組み立てたもので行なつた。内筒には 1.0~2.0×10<sup>7</sup>/ml に調整した脾あるいはリンパ節細胞浮遊液 1.0ml に 0.05ml の 2% SRBC を混合して入れ、外筒へは 10ml の培養液のみを入れて 4 日間の培養を行なつた。

Double chamber culture system: Feldmann and Basten (1972) による方法を用い、外筒に内径35mm、高さ75mm のガラス瓶を使用し、内筒には一端に透析膜を固定した内径18mm、高さ80mm のガラス管を、さらにその内側には、一端に nuclepore 膜 (ポアサイズ 1.0μm: 東洋濾紙) を MF セメントで接着させたアクリル管 (内径9mm、高さ90mm) を入れ、各々を上・下室とした二重構造の内筒を作製して行なつた (Fig. 1)。外筒には 20ml の培養液を入れ、SRBC を混合した細胞浮遊液 1.0ml は下室に、また、上室には様々な細胞浮遊液 0.5ml を入れた。本法では、上室に入れた細胞浮遊液からの液性因子が下室での抗体産生能におよぼす影響を検討し、培養は Marbrook 法と同様に 4 日間とした。細胞濃度、培養液量、および培養日数は、両法とも以前に報告した培養条件の検討結果 (佐藤ら, 1980) にもとづいた。

#### 7) プラーク形成法

Cunningham and Szenberg (1968) の直接法によるプラーク形成法でプラーク形成細胞 (PFC) 数を測定し、抗体産生能の指標とした (Fig. 1)。なお、PFC 数は培養後回収された生細胞数 10<sup>8</sup> あたりに換算して算出し、複数で行なつたそれらの培養からの平均値を求めて示した。

#### 8) 感染および非感染マウス血清

心臓穿刺により全採血を行ない、3匹以上のマウス血液をプールしたものから血清を分離した。血清は 56°C、30分間の非動化、および 3% SRBC で 4°C、12時間の吸収後、さらにメンブランフィルター (0.45μm) で濾過を行なつた。なお、使用時まで -20°C で凍結保存した。

#### 6) 培養上清の採取

正常および感染マウスの脾細胞 2.0×10<sup>7</sup> を、SRBC の添加なしに培養し、その培養上清を集めた。得られた上清は 2,000rpm、10分間の遠心後、使用時まで -20°C にて凍結保存をした。

### 実験成績

#### 1) *In vitro* での抗体産生の低下

今回、著者らの用いた実験系での免疫低下を、*in vitro* での primary antibody response で調べるために、5.0×10<sup>4</sup> の原虫を感染させたマウスの脾臓およびリンパ節細胞を経日的に採取し、Marbrook 法で培養後の PFC 数を調べた。Fig. 2 に示したごとく、parasitemia は感染 4 日以降急速に上昇し、6 日目には約 20%、8 日目には 36% となつた。これに対して、培養脾細胞の PFC 数

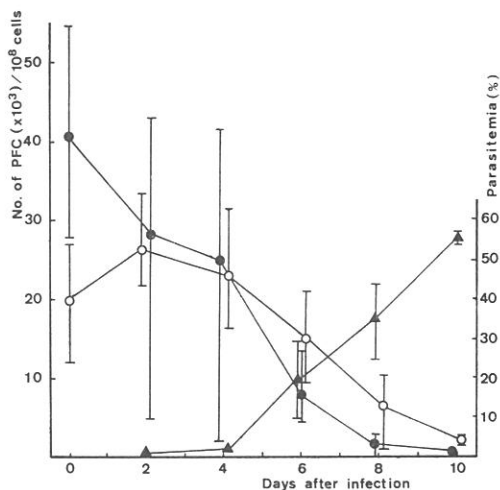


Fig. 2 Plaque forming cell (PFC) response to SRBC *in vitro* of spleen and lymph node cells obtained from BALB/c mice after intraperitoneal infection with  $5.0 \times 10^4$  *P. berghei*. ●, number of PFC of spleen cells; ○, number of PFC of lymph node cells; ▲, parasitemia. Each value represents the arithmetic mean of PFC of duplicate cultures and parasitemia of three mice. The vertical bars represent the range of their values.

は、感染2日目、4日目ですでにかなりの減少を示す個体がみられ、prarasitemiaが上昇しはじめる4日目に降には急激に減少して、6日目での平均値は正常個体群の $1/4$ 以下となった。他方、リンパ節細胞では4日目までPFC数の減少はみられないが、parasitemiaの上昇とともに明らかな低下を示し、8日目のPFC数は正常マウスの場合の約 $1/3$ となった。

## 2) 感染マウス脾細胞添加の影響

感染にともなう免疫低下が、抗体産生に關与する細胞の減少、あるいは何らかの機能低下によるものであるか否かを検討するために、正常あるいは感染マウス脾細胞  $1.0 \times 10^7$  をベースとして、これに様々なタイプの脾細胞を添加し、Marbrook法で培養した場合のPFC数を調べた。感染マウス脾細胞は、 $5.0 \times 10^6$  のマラリア原虫接種5日後で、parasitemiaが約40~50%を示したマウスより調整した。その結果をTable 1に示したが、正常マウス脾細胞に別な正常マウス脾細胞を加えた場合、培養する細胞数の増加につれてPFC数はやや減少する傾向を示すが、大きな変動はみられない。これに対して、正常マウス脾細胞に感染マウス脾細胞を添加した場合、 $1/5$  量の感染マウス脾細胞を混合しただけで、PFC数は対照とした正常マウス脾細胞を混合した場合のPFC数と比べて約80%の減少を示した。逆に、感染マウス脾細胞をベースとして、これに正常マウス脾細胞を加えた場合、 $1/2$  量の正常マウス脾細胞を加えてもPFC数の増加

Table 1 Effect of spleen cells infected mice on the PFC response to SRBC *in vitro* (Marbrook method)

Cultured cells <sup>a)</sup>		No. of PFC <sup>b)</sup> /10 <sup>6</sup> cells
Normal	$1.0 \times 10^7$	$35.6 \times 10^3$
Normal	$1.0 \times 10^7$ + Normal	$33.0 \times 10^3$
Normal	$1.0 \times 10^7$ + Normal	$29.5 \times 10^3$
Normal	$1.0 \times 10^7$ + Infected	$7.0 \times 10^3$
Normal	$1.0 \times 10^7$ + Infected	$1.9 \times 10^3$
Infected	$1.0 \times 10^7$	$1.3 \times 10^3$
Infected	$1.0 \times 10^7$ + Normal	$0.7 \times 10^3$
Infected	$1.0 \times 10^7$ + Normal	$1.0 \times 10^3$
Normal	$1.0 \times 10^7$ + Nude infected	$13.9 \times 10^3$
Normal	$1.0 \times 10^7$ + Nude infected	$6.0 \times 10^3$
Nude	$1.0 \times 10^7$	$0.8 \times 10^3$
Nude infected	$1.0 \times 10^7$	$0.9 \times 10^3$

a) Spleen cells were obtained from two nu/nu and five nu/+ mice.

Infected cells were from mice 5 days after infection.

b) Each value represents the arithmetic mean of duplicate cultures.

はほとんどみられなかった。他方、非感染の有毛マウス (nu/+) 脾細胞をベースとして、これに感染のヌードマウス脾細胞を添加した場合にも、PFC 数は減少を示し、 $1/5$ 量の細胞を加えた場合で対照の約半分に、 $1/2$ 量の細胞を加えた場合は約80%の低下を示し、再度の検討によつ

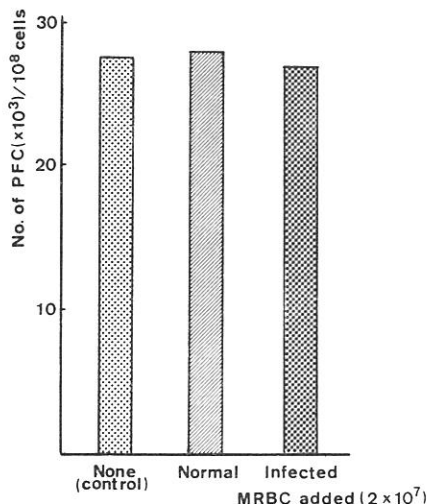


Fig. 3 Effect of mouse red blood cells (MRBC) from infected mice on the PFC response to SRBC *in vitro*.  $2.0 \times 10^7$  MRBC from three normal and infected mice were added to spleen cells from normal mice and cultured with SRBC. Each bar represents the arithmetic mean of duplicate cultures.

ても同様の結果を得た。しかし、感染しているヌードマウス脾細胞を加えることによつて示された PFC 数の減少は、感染している有毛マウス (nu/+) 脾細胞を同様に添加した場合の PFC 数の減少に比べて少なかった。ヌードマウス脾細胞は非感染個体のものであつても、SRBC に対してほとんど抗体産生を示さなかった。これらの結果から、感染マウス脾細胞によつて正常マウス脾細胞の抗体産生が著しく抑制され、この抑制は感染したヌードマウスからの脾細胞によつても起こることが示された。

### 3) 原虫寄生赤血球の影響

培養に用いた感染マウス脾細胞には、相当量の原虫寄生赤血球が混在しているため、このような原虫に由来する抗体産生の抑制の有無を検討した。感染マウス末梢血より赤血球を分離し、原虫寄生率が65%を示したこの赤血球  $2.0 \times 10^7$  を正常マウス脾細胞  $2.0 \times 10^7$  と混合し、Marbrook 法により培養を行なつた結果が Fig. 3 である。感染マウス赤血球を加えた場合の PFC 数は、同量の正常マウス赤血球を加えた場合、およびマウス赤血球を添加しない場合の PFC 数と変わらず、感染マウス脾細胞を添加することによつて示される抑制作用は、混在するマラリア原虫に由来するものでないことが示された。

### 4) 感染マウス血清添加の影響

Fig. 4 には、正常マウス脾細胞に感染マウスからの血清を添加し培養した場合の PFC 数の変動を示した。対照とした10% FCS 添加の場合の PFC 数が  $20.9 \times 10^3$  であつたのに対し、FCS の代わりに10%の非感染マウス血清を添加した場合の PFC 数は、有毛マウス (nu/+)

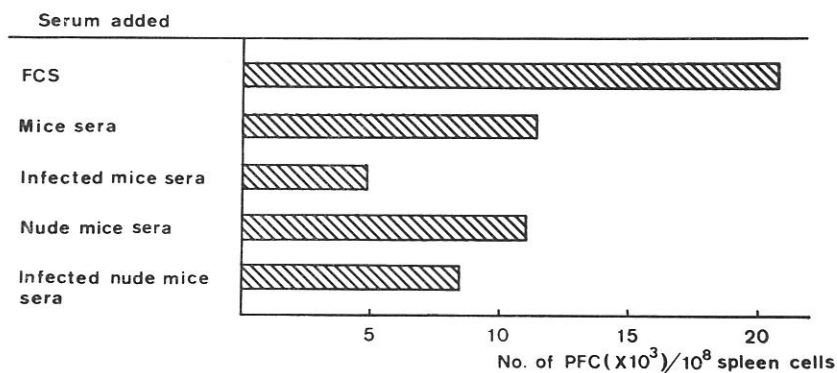


Fig. 4 Effect of mouse sera on the PFC response to SRBC *in vitro*. Mouse sera were obtained from four nude (nu/nu) and nu/+ mice with or without infection. Sera of infected mice were from mice 5 days after infection. Each serum was added to spleen cell suspensions prepared from four nu/+ mice at a concentration of 10% v/v. Each bar represents the arithmetic mean of duplicate cultures.

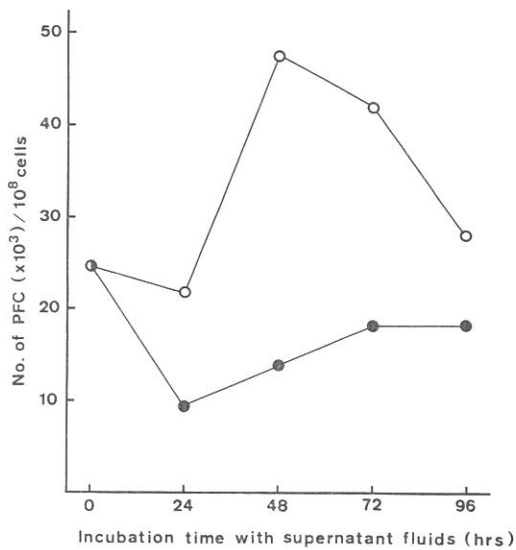


Fig. 5 Effect of supernatant from cultures of spleen cells from normal and infected mice on the PFC response to SRBC *in vitro*. Spleen cells from three normal mice and infected mice (5 days) were cultured and the supernatant were added to cultures of normal spleen cells with SRBC. Supernatant from cultures of spleen cells from normal mice O, or from infected mice ●, Each value represents the arithmetic mean of duplicate cultures.

の血清で $11.5 \times 10^3$ , スードマウスの血清で $11.1 \times 10^3$ となり、いずれも FCS 添加の場合の約半分に減少した。他方、感染5日後のマウス血清を添加した場合には、感染している有毛マウス (nu/+) 血清で $4.9 \times 10^3$ とさらに減少したが、感染しているスードマウス血清では $8.5 \times 10^3$ となり、非感染のマウス血清を添加した場合に比べてわずかな低下がみられたにすぎなかった。

##### 5) 液性抑制因子の関与

感染マウスからの脾細胞と同様に、血清も正常マウス脾細胞の PFC 反応を抑制することから、そこに何らかの液性因子の関与が想定される。そこで、これを検討するために、正常および感染5日後のマウス脾細胞を、各々24, 48, 72, 96時間培養し、採取した培養上清0.75 ml を正常マウス脾細胞浮遊液0.25ml に加えて培養した場合の PFC 数を調べた。結果は Fig. 5 に示したが、正常マウス脾細胞の48~72時間培養上清には PFC 反応を著しく促進する効果がみられた。これに対して、感染マウス脾細胞の培養上清にはこのような促進効果は認め

られず、24時間の培養上清ではかなりの抑制効果が認められた。

このような液性抑制因子の関与をさらに直接的に検討するために、Table 2 に示したごとく Feldmann and Basten 法により、上室に入れた感染あるいは正常マウス脾細胞が、nucleopore 膜で隔てた下室の正常マウス脾細胞の PFC 反応におよぼす影響を調べた。上・下室共に正常マウス脾細胞を入れた場合、下室の細胞数が $0.5 \times 10^7$ と少ない場合を除いて、PFC 数は $18.3 \times 10^3$ ,  $16.2 \times 10^3$ となり、対照として下室でのみ $2.0 \times 10^7$ の脾細胞を培養した場合の $19.7 \times 10^3$ に近い値であった。これに対し、上室に感染5日後のマウス脾細胞を入れた場合、PFC 数は16.1, 10.8,  $3.3 \times 10^3$ となり、下室の細胞数が $0.5 \times 10^7$ の場合を除けば、上室に正常マウス脾細胞を入れた時よりも各々12.0%, 33.3%の減少を示した。しかし、この PFC 数の減少は、正常および感染マウス脾細胞を直接に混合し、下室でのみ培養した場合の減少に比べるとかなり少なかった。

##### 考 察

マラリアの感染にともなつて宿主の免疫能が著明に低下するという現象は、McGregor and Barr (1962) によつて、マラリア罹患児の破傷風トキソイドに対する抗体価が低いという事実から見出された。その後、Salaman *et al.* (1969) が *P. berghei yoelii* 感染の BALB/c マウスにおいて SRBC に対する抗体産生の低下がみられることを実験的に証明した。続いて、Barker (1971), Greenwood *et al.* (1971), Voller *et al.* (1972) も、同様の実験系をもちいて、SRBC, 加熱凝集ヒト免疫グロブリンや破傷風トキソイドに対する抗体産生の低下を報告している。他方、マウスを用いた実験では、 $\phi$ x-174 バクテリオファージ、ヒト血清アルブミンや Keyhole limpet haemocyanin に対する抗体産生は感染によつて低下せず (Barker, 1971; Greenwood *et al.*, 1971), マラリアに罹患した子供でも細胞性の免疫応答には対照群との間には差のみられないことが報告されている (Greenwood, 1974)。さらに、この免疫低下の様相は、使用するマウスやマラリア原虫の系統によつても一様でないことが指摘されている (Jayawardena *et al.*, 1975)。*P. yoelii* による慢性の感染では、皮膚移植片排除反応や遅延型過敏反応、さらに PHA に対する反応など、細胞性の免疫応答には非感染個体との間で差がみられないのに対し (Greenwood *et al.*, 1971), *P. berghei* による急性感染では、遅延型過敏反応も低下し、皮膚移植片の

Table 2 Effect of spleen cell factor from infected mice on the PFC response to SRBC *in vitro* (Feldmann and Basten method)

Cells cultured in : <sup>a)</sup>		No. of PFC <sup>b)</sup> /10 <sup>8</sup> cells in lower chamber	
Upper chamber	Lower chamber		
None	Normal	2.0×10 <sup>7</sup>	19.7×10 <sup>8</sup>
None	Infected	2.0×10 <sup>7</sup>	1.1×10 <sup>8</sup>
Normal	0.5×10 <sup>7</sup> Normal	1.5×10 <sup>7</sup>	18.3×10 <sup>8</sup>
Normal	1.0×10 <sup>7</sup> Normal	1.0×10 <sup>7</sup>	16.2×10 <sup>8</sup>
Normal	1.5×10 <sup>7</sup> Normal	0.5×10 <sup>7</sup>	4.2×10 <sup>8</sup>
Infected	0.5×10 <sup>7</sup> Normal	1.5×10 <sup>7</sup>	16.1×10 <sup>8</sup>
Infected	1.0×10 <sup>7</sup> Normal	1.0×10 <sup>7</sup>	10.8×10 <sup>8</sup>
Infected	1.5×10 <sup>7</sup> Normal	0.5×10 <sup>7</sup>	3.3×10 <sup>8</sup>
None	Infected + Normal	0.5×10 <sup>7</sup> 1.5×10 <sup>7</sup>	7.7×10 <sup>8</sup>
None	Infected + Normal	1.0×10 <sup>7</sup> 1.0×10 <sup>7</sup>	2.9×10 <sup>8</sup>
None	Infected + Normal	1.5×10 <sup>7</sup> 0.5×10 <sup>7</sup>	2.3×10 <sup>8</sup>

- a) Spleen cell suspensions from five normal or infected mice were cultured in upper or lower chambers separated by nuclepore membrane (pore size, 1.0 μm) as indicated. Infected cells were from mice 5 days after infection.
- b) The number of PFC in normal spleen cells cultured with SRBC in lower chamber were counted. Each value represents the arithmetic mean of duplicate cultures.

生着日数も長くなることが報告されている (Sengers *et al.*, 1971 ; Tanabe *et al.*, 1978).

このような免疫低下は、マラリア感染に限らず、トリパノソーマ (Eardley and Jayawardena, 1977), トキソプラズマ (Huldt *et al.*, 1973 ; 鈴木ら, 1978) などの原虫感染, 旋毛虫 (Faubert and Tanner, 1975), 蛔虫 (Crandall *et al.*, 1978) などの線虫幼虫の感染においても認められており, そのメカニズムとして多くの興味深い考察がなされている。しかし, これら寄生虫の示す特異な感染態度とも関連して, そこには複雑な要因の関与していることが考えられ, 不明な点が多い。

従来, このような免疫低下の解析は, そのほとんどが *in vivo* でなされており, 生体のもつ複雑な要素からその解析を困難なものにしていると思われる。近年, 生体の免疫応答を *in vitro* での抗体産生として捉える方法が確立され, 寄生虫感染における免疫低下の解析にも応用されはじめている (Faubert, 1976 ; Jones *et al.*, 1976 ; Warren and Weidanz, 1976 ; Brown *et al.*, 1977 ; Crandall *et al.*, 1978)。著者らも, *in vitro* での primary antibody response をマラリア原虫感染にともなう免疫低下の解析に応用することを試み, これま

で種々の実験条件の検討や予備的実験成績から, その有用性を指摘した (佐藤ら, 1980)。

今回の検討でも, 感染にともなう著明な免疫能の低下は, parasitemia の上昇とともに脾臓, リンパ節において認められた。しかし, リンパ節での低下は脾臓に比べてやや遅れて起こり, 脾臓では感染後 2 ~ 4 日目ですでにかなりの免疫低下を示す個体がみられたのに対し, リンパ節では 4 日目以降, parasitemia の上昇と一致して低下がみられた。同様の結果は, Tanabe *et al.* (1977) の *in vivo* での検討においても報告されている。他方, *P. yoelii* を CBA 系マウスに感染させ, *in vitro* で検討した結果では, 脾臓での PFC 反応は, 感染後一時的に約 2 倍に増加し, 続いて急激な低下のみられることが報告されている (Brown *et al.*, 1977)。しかし, 今回の著者らの成績では, このような一時的な PFC 反応の増加はみられなかった。CBA マウスにおける *P. yoelii* 感染の場合, parasitemia はピーク時でも 6% 程度までしか上昇しておらず, その後減少するという慢性的な感染経過をとるのに対し, 今回, 著者らの用いた *P. berghei* では parasitemia は 10 日目で 55% にも達し, その後はほとんどのマウスが死亡する急性感染であることか

ら、このような感染経過の差が宿主の免疫低下の動態に何らかの影響を与えていることが考えられる。

マラリア感染では、宿主の免疫系統が何らかの機能低下をきたすことが従来より指摘されており、感染マウスを SRBC で免疫し、その腹腔マクロファージを正常マウスに移入して脾臓での PFC 数を測定してみると、その値は免疫された正常マウスマクロファージが移入された場合の1/3程度しかないこと (Loose *et al.*, 1972), また、感染マウスから分離されたマクロファージと正常マウスからのリンパ球を組み合わせて培養した場合の *in vitro* での PFC 反応は著しく低いが、その逆の組み合わせでは PFC 数の低下がみられないこと (Warren and Weidanz, 1976; Brown *et al.*, 1977), さらに抗原処理の段階でマクロファージの関与を必要としない DNP 抗原に対する抗体産生は感染によつて低下しないこと (Brown *et al.*, 1977) など、マクロファージの抗原処理能の低下を指摘する報告が多くみられる (Greenwood *et al.*, 1971; Loose *et al.*, 1972; Weidanz and Rank, 1975; Tanabe *et al.*, 1977). また、感染マウスやラットでは胸腺、リンパ節、脾臓などでの T 細胞と B 細胞の数の減少も報告されている (Krettli and Nussenzweig, 1974; Gravely *et al.*, 1976). これに対し、Moran *et al.* (1973) は、感染マウス脾臓の組織学的検討から、感染にともなつて著しいリンパ球の増殖がみられ、これがその後の二次的抗原刺激に対して正常に反応し得ない状態をもたらしている可能性を指摘し、さらに、この脾腫や高グロブリン血症などの症状から polyclonal B cell activation の起こることが示唆されている (Greenwood, 1974; Freeman and Parish, 1978). トリパノソーマ症の場合、この polyclonal B cell activation が抗胸腺抗体などの自己抗体産生を含めて宿主の免疫能低下の原因となつていることが指摘されている (Kobayakawa *et al.*, 1979). しかし、今回著者らの得た成績においては、正常マウス脾細胞の PFC 反応が、これに少量の感染マウス脾細胞や血清を添加することによつて著しく抑制され、逆に感染マウス脾細胞に多量の正常マウス脾細胞を加えても PFC 反応の増加はおこらないことが示された。このことは、感染マウスにおいて、マクロファージを含めた抗体産生に関与する細胞がその数の減少や機能低下をきたしているというよりも、抗体産生系の細胞に作用して抗体産生を抑制するような何らかの物質が存在していることを示している。かかる抑制作用の存在は、あらかじめウサギ赤血球で免疫され、高力価を維持している Swiss 系マウスに *P. berghei* を感染させると、

抗体価は急速に低下するという Sengers *et al.* (1971) の報告からも示唆されている。しかし、この抑制作用は、旋毛虫感染時の免疫低下で指摘されているように、宿主の抗体産生系を障害するような虫体由来の抑制作用でないことは、原虫の寄生している赤血球を多量に混合しても脾細胞の PFC 反応は低下を示さなかつたことから明らかである。

これに対し、脾細胞の PFC 反応は、感染マウスからの血清や脾細胞の培養上清によつても抑制され、そこに何らかの液性因子の関与が示唆された。このことは Feldmann and Basten 法でも直接的に証明され、脾細胞の PFC 反応は nucleopore 膜を隔てて同時に培養した感染マウス脾細胞によつても抑制された。しかし、この場合の抑制は、脾細胞を直接混合した場合に示される抑制に比べてかなり弱かつた。これは、液性の抑制因子が細胞を直接混合した場合ほど効果的に作用しなかつたためと思われるが、同時に、細胞間で直接発揮される抑制作用の存在も否定できない。

通常、かかる抑制作用には抑制性 T 細胞の関与が考えられるが、最近、マクロファージに由来する抑制因子の存在も報告されている (Waldman and Gottlieb, 1973; Calderon *et al.*, 1974). 今回の成績では、有毛マウスに比べて弱かつたものの、感染した胸腺欠如マウスの脾細胞によつてもかなりの抑制効果が示された。このことから、抑制性 T 細胞の関与が感染にともなう免疫低下の主要な原因とは考えられない。抑制性 T 細胞の関与を含めた、それ以外の抑制作用も働きあつて、マラリア原虫感染にともなう免疫低下の現象がおこることが考えられる。このような抑制作用の本態、さらには、これがマクロファージによる抗原処理から始まる抗体産生の過程のいずれの段階に働くかが、今後の興味深い問題と思われる。

## 結 語

マラリア原虫感染にともなう免疫低下を解析する目的で、ネズミマラリア (*Plasmodium berghei* NK65) を使い、ヒツジ赤血球に対するマウスの primary antibody response を *in vitro* で調べた。

1) 感染マウスからの脾細胞およびリンパ節細胞をヒツジ赤血球と共に培養することにより検出された PFC 数は、正常マウスの脾細胞を培養した場合に比べて著しく少なく、PFC 数の減少は parasitemia の上昇に対応して著明となつた。

2) 正常マウス脾細胞の PFC 反応は、これに感染マウスからの脾細胞や血清を添加して培養した場合にも著

しく抑制され、また、感染した胸腺欠如マウス脾細胞によってもかなり抑制された。しかし、原虫寄生赤血球を添加した場合には抑制されなかった。

3) 正常マウス脾細胞の PFC 反応は、感染マウス脾細胞の培養上清や nuclepore 膜で隔てられた感染マウス脾細胞によっても抑制され、そこに液性因子が関与していることが示唆された。

4) 以上の結果より、*P. berghei* 感染マウスの免疫低下では、抗体産生に関与する細胞が減少または機能低下をきたしているというよりも、これらの働きを抑制するような作用が存在しているものと考えられた。この抑制作用には抑制性 T 細胞の働きだけでは説明されない、他の抑制作用も存在していることが示唆された。

#### 文 献

- 1) Albright, J. F., Albright, J. W. and Dusanic, D. G. (1977): Trypanosome-induced splenomegaly and suppression of mouse spleen cell response to antigen and mitogens. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 21, 21-31.
- 2) Barker, L. R. (1971): Experimental malaria: Effects upon the immune response to different antigens. *J. Infect. Dis.*, 123, 99-101.
- 3) Brown, I. N., Watson, S. R. and Sljivić, V. S. (1977): Antibody response *in vitro* of spleen cells from *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Infect. Immun.*, 16, 456-460.
- 4) Calderon, J., Williams, R. T. and Unanue, E. R. (1974): An inhibitor of cell proliferation released by cultures of macrophages. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 71, 4273-4277.
- 5) Crandall, C. A. and Crandall, R. B. (1976): *Ascaris suum*: Immunosuppression in mice during acute infection. *Exp. Parasit.*, 40, 363-372.
- 6) Crandall, R. B., Crandall, C. A. and Jones, J. F. (1978): Analysis of immunosuppression during early acute infection of mice with *Ascaris suum*. *Clin. Exp. Immunol.*, 33, 30-37.
- 7) Cunningham, A. J. and Szenberg, A. (1968): Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody-forming cells. *Immunol.*, 14, 599-600.
- 8) Eardley, D. D. and Jayawardena, A. N. (1977): Suppressor cells in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *J. Immunol.*, 119, 1029-1033.
- 9) Faubert, G. and Tanner, C. E. (1971): *Trichinella spiralis*: Inhibition of sheep hemagglutinins in mice. *Exp. Parasit.*, 30, 120-123.
- 10) Faubert, G. M. and Tanner, C. E. (1975): Leucoagglutination and cytotoxicity of the serum of infected mice and extracts of *Trichinella spiralis* larvae and the capacity of infected mouse sera to prolong skin allografts. *Immunol.*, 28, 1041-1050.
- 11) Faubert, G. M. (1976): Depression of the plaque-forming cells to sheep red blood cells by the new-born larvae of *Trichinella spiralis*. *Immunol.*, 30, 485-489.
- 12) Feldmann, M. and Basten, A. (1972): Cell interactions in the immune response *in vitro*. III. Specific collaboration across a cell impermeable membrane. *J. Exp. Med.*, 136, 49-67.
- 13) Freeman, R. R. and Parish, C. R. (1978): Polyclonal B-cell activation during rodent malarial infections. *Clin. Exp. Immunol.*, 32: 41-45.
- 14) Gravely, S. M., Hamburger, J. and Kreier, J. P. (1976): T and B-cell population changes in young and in adult rats infected with *Plasmodium berghei*. *Infect. Immun.*, 14, 178-183.
- 15) Greenwood, B. M., Playfair, J. H. L. and Torrigiani, G. (1971): Immunosuppression in murine malaria. I. General characteristics. *Clin. Exp. Immunol.*, 8, 467-478.
- 16) Greenwood, B. M. (1974): Possible role of a B-cell mitogen in hypergammaglobulinemia in malaria and trypanosomiasis. *Lancet*, 1, 435-436.
- 17) Greenwood, B. M. (1974): Parasites in the immunized host: mechanisms of survival. *Ciba Foundation Symposium 25 (new series)*, Associated Scientific Publishers, Amsterdam, London and New York, 137 pp.
- 18) Goodwin, L. G., Green, D. G., Guy, M. W. and Voller, A. (1972): Immunosuppression during trypanosomiasis. *Br. J. Exp. Pathol.*, 53, 40-43.
- 19) Huldt, G., Gard, S. and Olovson, S. G. (1973): Effect of *Toxoplasma gondii* on the thymus. *Nature*, 244, 301-303.
- 20) Jayawardena, A. N., Targett, G. A. T., Leuchars, E., Garter, R. L., Doenhoff, M. J. and Davies, A. J. S. (1975): T-cell activation in murine malaria, *Nature*, 258, 149-151.
- 21) Jones, J. F., Crandall, C. A. and Crandall, R. B. (1976): T-dependent suppression of the primary antibody response to sheep ery-



- throcytes in mice infected with *Trichinella spiralis*. Cell. Immunol., 27, 102-110.
- 22) Kobayakawa, T., Louis, J., Izui, S. and Lambert, P. H. (1979) : Autoimmune response to DNA, red blood cells, and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis. J. Immunol., 122, 296-301.
- 23) Krettli, A. U. and Nussenzweig, R. (1947) : Depletion of T and B lymphocytes during malarial infections. Cell. Immunol., 13, 440-446.
- 24) Loose, L. D., Cook, J. A. and Di Luzio, N. R. (1972) : Malarial immunosuppression—a macrophage mediated defect. Pro. Helminthol. Soc. Wash., 39, 484-491.
- 25) Marbrook, J. (1967) : Primary immune response in cultures of spleen cells. Lancet, 2, 1279-1281.
- 26) McGregor, I. A. and Barr, M. (1962) : Antibody response to tetanus toxoid inoculation in malarious and nonmalarious Gambian children. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 56, 364-367.
- 27) Moran, C. J., De Rivera, V. S. and Turk, J. L. (1973) : The immunological significance of histological changes in the spleen and liver in mouse malaria. Clin. Exp. Immunol., 13, 467-478.
- 28) Murray, P. K., Jennings, F. W., Murray, M. and Urquhart, G. M. (1974) : The nature of immunosuppression in *Trypanosoma brucei* infections in mice. II. The role of the T and B lymphocytes. Immunol., 27, 825-840.
- 29) Salaman, M. H., Wedderburn, N. and Bruce-Chwatt, L. J. (1969) : The immunodepressive effect of a murine plasmodium and its interaction with murine oncogenic viruses. J. Gen. Microbiol., 59, 383-391.
- 30) 佐藤良也・渡部久実・高井昭彦・大鶴正満(1980) : マラリア感染にともなう免疫低下—*in vitro*での primary antibody response による解析—. 新潟医学会誌, 94, 16-27.
- 31) Sengers, R. C. A., Jerusalem, C. R. and Doesburg, W. H. (1971) : Murine malaria. IV. Disturbed immunological responsiveness during *Plasmodium berghei* infection. Exp. Parasit., 30, 41-53.
- 32) 鈴木康弘・渡辺直熙・小林昭夫 (1978) : *Toxoplasma* 感染による宿主抗体産生系の非特異的抑制 (II). 寄生虫誌, 27(増), 31.
- 33) Tanabe, K., Waki, S., Takada, S. and Suzuki, M. (1977) : *Plasmodium berghei* : Suppressed response of antibody-forming cells in infected mice. Exp. Parasit., 43, 143-152.
- 34) Tanabe, K., Takada, S. and Suzuki, M. (1978) : Regional depression of delayed hypersensitivity to sheep erythrocytes in mice infected with *Plasmodium berghei* (NK 65). J. Parasit., 64, 367-368.
- 35) Voller, A., Gall, D. and Manawadu, B. R. (1972) : Depression of the antibody response to tetanus toxoid in mice infected with malaria parasites. Z. Tropenmed. Parasit., 23, 152-155.
- 36) Waldman, S. R. and Gottlieb, A. A. (1973) : Macrophage regulation of DNA synthesis in lymphoid cells : Effects of a soluble factor from macrophages. Cell. Immunol., 9, 142-156.
- 37) Warren, H. S. and Weidanz, W. P. (1976) : Malarial immunodepression *in vitro* : adherent spleen cells are functionally defective as accessory cells in the response to horse erythrocytes. Eur. J. Immunol., 6, 816-819.
- 38) Weidanz, W. P. and Rank, R. G. (1975) : Regional immunosuppression induced by *Plasmodium berghei yoelii* infection in mice. Infect. Immun., 11, 211-212.

**Abstract**

STUDIES ON THE IMMUNOSUPPRESSION IN MALARIA INFECTION  
—DEPRESSION OF ANTIBODY RESPONSE *IN VITRO* IN  
MICE INFECTED WITH RODENT MALARIA—

HISAMI WATANABE, YOSHIYA SATO, AKIHIKO TAKAI  
AND MASAMITSU OTSURU

(*Department of Medical Zoology, Niigata University*  
*School of Medicine, Niigata, Japan*)

The primary antibody response to sheep erythrocytes in mice infected with *Plasmodium berghei* was studied *in vitro* and the results presented are as follows.

1) Spleen cells and lymph node cells from infected mice cultured with sheep erythrocytes developed considerably fewer plaque forming cells than those of normal cells, showing that the depression of antibody response in infected mice occurred with the increase of parasitemia.

2) Spleen cells and sera from infected mice actively suppressed the *in vitro* response of normal cells, and such suppression was also revealed by spleen cells from infected athymic nude mice. The addition of parasites in mouse erythrocytes to cultures, however, did not reduce the number of plaque forming cells.

3) The *in vitro* response was also suppressed by supernatant fluids from cultures of spleen cells of infected mice and by spleen cells across a cell impermeable membrane, suggesting that humoral factor(s) takes part in the active suppression.

4) From these results, it was considered that the active suppression to the antibody response occurred in infected mice and that they may be mediated by complex factors, including suppressor T cells, rather than the decrease in the number or dysfunction of cells participating to the antibody production.