

T細胞依存性抗原 keyhole limpet hemocyanin に対するラット抗体産生能の検討

後藤大樹 鎌田隆徳 中込寛子 前田康行

帝京科学大学生命環境学部生命科学科

Evaluation of antibody responses to a T-cell dependent antigen, keyhole limpet hemocyanin, in rats

Hiroki GOTOH Takanori KAMATA Hiroko NAKAGOMI Yasuyuki MAEDA

Department of Life & Sciences, Faculty of Life & Environmental Sciences, Teikyo University of Science, Yamanashi, Japan

Abstract

To establish T-cell dependent antibody response (TDAR) model, rats were administered keyhole limpet hemocyanin (KLH) and evaluated the KLH-specific IgM (primary response) and IgG (secondary response) antibody production. The IgM level of intravenous (IV) injection group was higher than those of intraperitoneal (IP) injection group. In IgG production, a large inter-individual variability was observed in IV group, but not so in IP group. The differences among rat strains in TDAR were investigated using two outbred (Slc:SD and RccHan:WIST) strain male rats and one inbred (F344/NSlc) strain male rats. The levels of IgM and IgG were observed in all strains to the same extent. An inter-individual variability in IgM and IgG production in inbred strain rats were smaller than those of two outbred strain rats, but two outbred strain rats showed the same inter-individual differences in IgM and IgG response.

Keywords : immunotoxicity, rat, TDAR, KLH, IgM, IgG, ELISA, primary and secondary response

1. はじめに

近年、医薬品を含む化学物質の生体免疫機能に及ぼす有害作用すなわち免疫毒性が注目されるようになり、平成18年には医薬品開発における免疫毒性試験に関するガイドライン¹⁾が厚生労働省により制定された。本ガイドラインでは、標準的毒性試験で免疫機能になんらかの影響を示唆する所見が認められた場合には、別途免疫機能に及ぼす影響を調べるための試験、すなわち免疫毒性試験を実施することが求められており、中でもT細胞依存性抗原に対する抗体反応(T-cell dependent antigen response: TDAR)は、樹状細胞、マクロファージ、T細胞およびB細胞ならびに様々なサイトカインといった多くの因子が関与した結果として発現することから、免疫毒性の指標として有用であるとされている²⁾。

医薬品の安全性を確認する非臨床試験では、実験動物としてげっ歯類および非げっ歯類を用いることが規定されており³⁾、げっ歯類としては通常、ラットを用いて標準的毒性試験が実施されている。一方、生体の免疫機能を研究する動物実験においては、対象動物としてマウスが主に使用され、ラットを対象とした免疫機能研究は少ない。したがって、ラットを用いたTDARについては十分な検討が行

われておらず、いまだその実験系が確立していないのが現状である。

近年、T細胞依存性抗原としてKeyhole Limpet Hemocyanin (KLH)を用いたラットTDAR試験が検討されるようになってきた^{4) 5) 6) 7)}。KLHは可溶性であるため調製が簡便であり、かつ安定であることから、TDAR研究に用いられるようになってきた抗原である。しかしながら、KLHを抗原としたこれまでのラットTDAR試験においては、得られた抗体価の個体差が大きく、化合物の潜在的免疫毒性の評価が困難な場合が多いことも指摘されている⁸⁾。ラットTDARで得られる抗体価に個体差が大きい理由は明らかではないが、通常KLHの投与で行われる尾静脈内(intravenously: IV)投与の技術的な難しさも要因の一つではないかと考えられる。そこで今回、IV投与に比して技術的により容易な腹腔内(intraperitoneally: IP)投与がTDAR試験において有用な投与方法となりうるかについてIV投与と比較検討した。また、標準的毒性試験では非近交系であるクローズドコロニー系ラットが用いられるため、標準的毒性試験に引き続いて実施されるTDAR試験においても同じ系統のラットが用いられる。しかしながら、クローズドコロニー系は近交系に比べて遺伝的な多様性が大き

く、TDAR 試験における抗体価のばらつきについては遺伝的な要因も考えられる。そこで今回、我々はラットの実験においては一般的に用いられるクローズドコロニー系である Sprague-Dawley (SD) ラットならびに Wistar (WI) ラットおよび長期にわたる実験に汎用される近交系 F344ラットの3系統ラットを用いて KLH に対する抗体反応を比較検討した。

2. 材料と方法

2.1 動物

Slc:SD (SD) ラット、Rcc:HanWIST (WI) ラット、F344/NSlc (F344) のいずれも雄6週齢を日本エスエルシー株式会社より入手した。動物はステンレス製金網ケージ (38×24×20cm) に収容した。収容密度は最大2匹/ケージとした。ケージに収容した動物を温度23℃±1.5℃、相対湿度55%±15%に設定された専用の動物室で飼育した。照明時間は午前7時から午後7時の12時間明暗サイクルとし、飼料はげっ歯類用飼料 MM-3 (オリエンタル酵母工

業) を、飲水は上野原市水道水をそれぞれ自由摂取させた。入荷後1週間にわたり検疫・馴化を行ったのち実験に供した。本実験は、帝京科学大学動物委員会に申請し承認を得て実施された (承認番号: 帝京科動第15C008号)。

2.2 試薬等

KLH は和光純薬工業株式会社より購入した。今回行ったすべての実験において同一ロットの KLH を使用した。ビオチン標識抗ラット IgM 抗体は Becton Dickinson 社から、ビオチン標識抗ラット IgG 抗体は MILLIPORE 社から、標識酵素 Avidin-Peroxidase と発色基質 2,2'-AZINO-BIS (3-ETHYLBENZTHIAZOLINE-6-SULFONIC ACID) DIAMMONIUM SALT (ABTS) は SIGMA-ALDRICH 社からそれぞれ購入した。

2.3 実験方法

2.3.1 実験デザイン

投与経路比較実験のデザインを図1に示した。

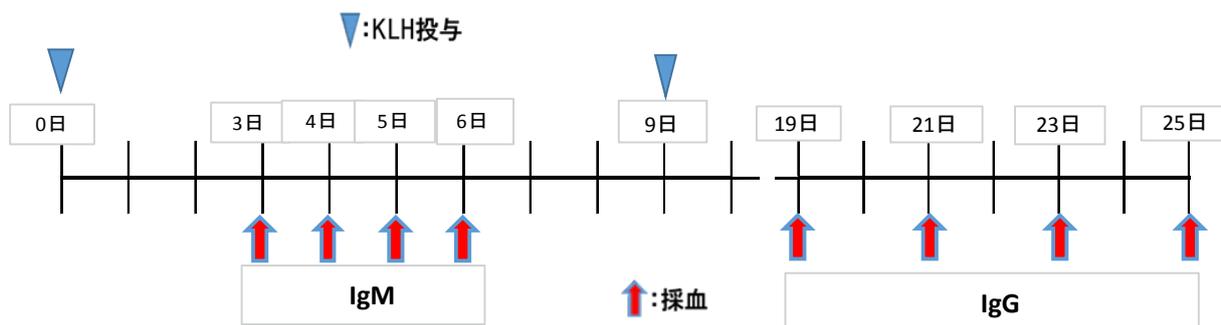


図1 抗原の投与経路比較実験デザイン

IV 投与群 (300 μg /0.3ml/匹、n = 7)、IP 投与群 (300 μg /0.6ml/匹、n = 8)

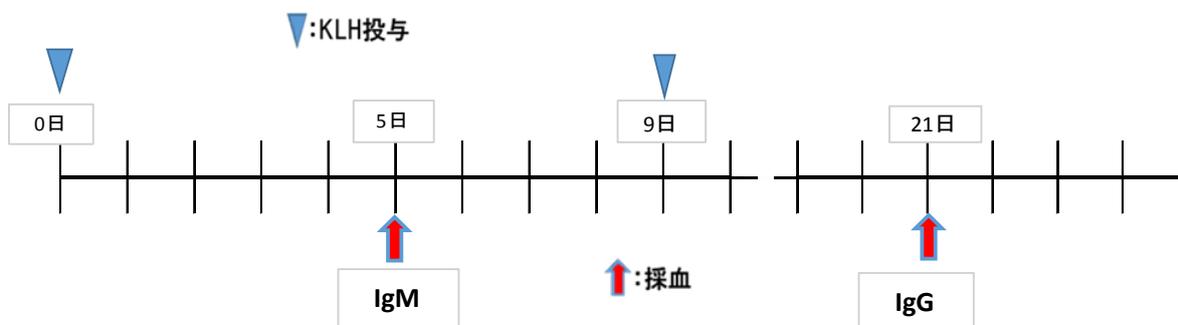


図2 抗体産生のラット系統別比較実験デザイン

SD (IV 投与群300 μg /0.3ml/匹、n = 6)、WI (IV 投与群300 μg /0.3ml/匹、n = 6)、F344 (IV 投与群300 μg /0.3ml/匹、n = 6)

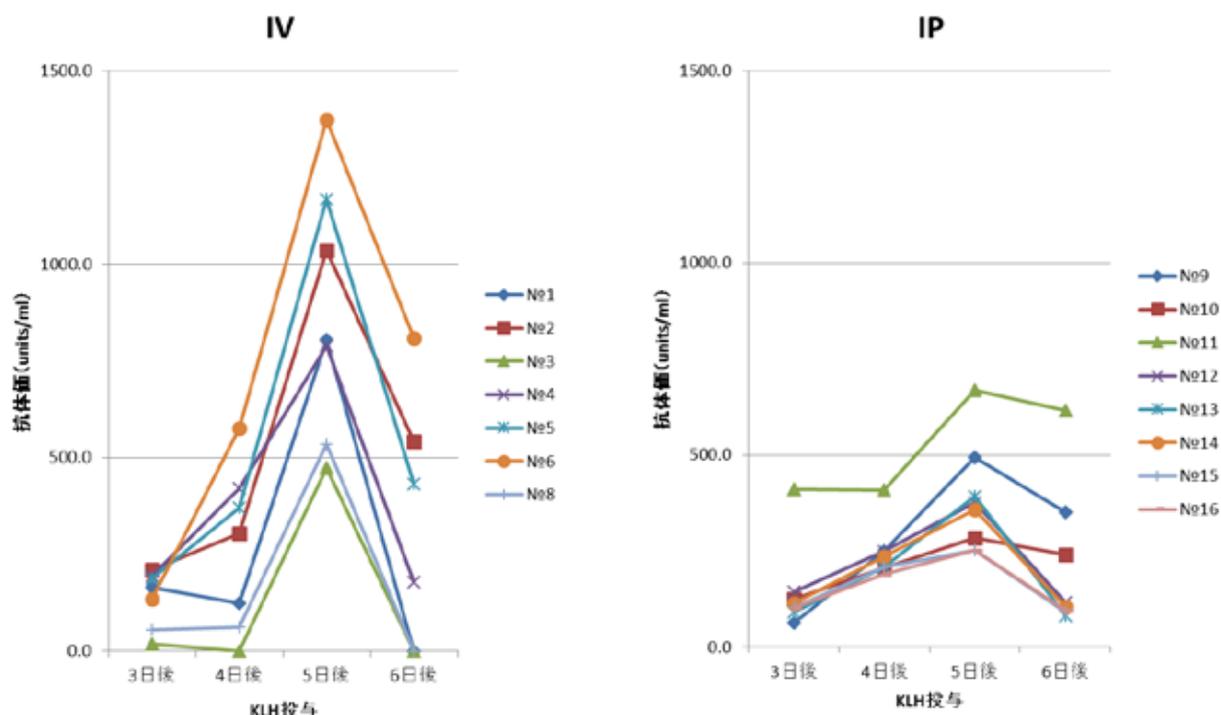


図3 静脈内および腹腔内投与における IgM 抗体産生
左：IV 投与、右：IP 投与

7週齢SD雄ラットに、KLH 300 μ gをIV投与群（7匹）では0.3ml/匹、IP投与群（8匹）では0.6ml/匹の容量で投与した。投与日を0日と起算し、投与3、4、5および6日後に尾静脈または鎖骨下静脈から採血を行った。1回あたりの採血量は0.5～0.8mLとした（以下同様）。採取した血液を3000rpm、20分間遠心分離して血漿を得、血漿中の抗KLH特異的IgM抗体価をELISAで測定した。1回目の投与から9日後に2回目のKLHを同様に投与した。1回目の投与から19、21、23、25日（各々2回目のKLH投与10、12、14、16日）後に尾静脈または鎖骨下静脈から採血を行った。採取した血液を同様に処理して血漿を得、血漿中の抗KLH特異的IgG抗体価をELISAで測定した。

系統比較実験のデザインを図2に示した。7週齢のSD、WIおよびF344雄ラット（各6匹）に、KLH300 μ gを0.3ml/匹の容量でIV投与した。最初の投与日を0日と起算して、投与5日後に尾静脈または鎖骨下静脈から採血を行った後、9日後に再度同様にKLHをIV投与した。その後、投与21日後（2回目の投与12日後）に同様に採血を行った。採取した血液を3000rpm、20分間遠心分離を行って血漿を得、血漿中の抗KLH特異的IgM（投与5日後）あるいはIgG（投与21日後、2回目投与12日後）抗

体をELISAで測定した。

2.3.2 抗KLH特異的IgMおよびIgG抗体測定のためのELISA

投与に用いたロットと同じロットのKLHをプレコーティングした96穴マイクロプレートを用いてKLH ELISAを行った。

二次抗体としてビオチン標識抗ラットIgM抗体あるいはビオチン標識抗ラットIgG抗体を用いた。Avidin-Peroxidase標識後ABTSで発色させ405nmの波長で吸光度を測定した。

別途作製した標準血漿を同様の手順で反応させ、得られた吸光度から標準曲線を作成し回帰直線式を求めた。この回帰直線式を用いて、各サンプルの吸光度から抗体価を算出した。この時、標準血漿中の抗体価（IgM、IgGともに）を10,000 units/mLとみなし、各サンプルの抗体価はその相対的な濃度として表した。

2.3.3 KLH ELISAのための標準血漿作製

KLHに対する抗体価をELISAによって求める際に使用する標準血漿を、以下の操作によって作製した。

KLHの100 μ g/匹を雌SDラット（20週齢）に3

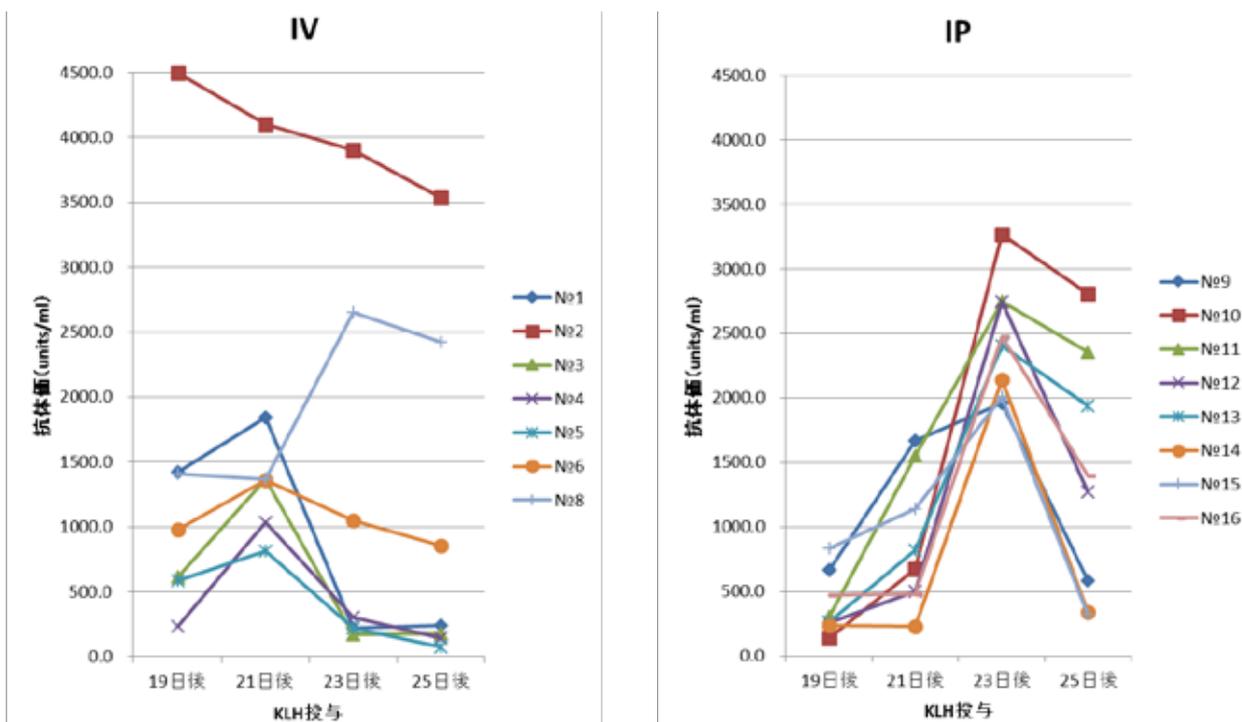


図4 静脈内および腹腔内投与における IgG 抗体産生
左：IV 投与、右：IP 投与

週間ごとに3回腹腔内投与し、最終投与から1週間後に採血して得られた血漿を標準血漿として用いた。

なお、今回の結果については、使用した動物数が少ないことから統計解析は行わなかった。

3. 結果

3.1 IV 投与および IP 投与における抗体産生

3.1.1 KLH 特異的 IgM 抗体 (一次反応、図3)

IV 投与、IP 投与のすべての個体において、KLH 特異的 IgM 抗体の出現が確認された。IV 投与ではいずれの個体においても KLH 投与5日後に明瞭なピークがみられ、その時の平均値および標準偏差は 882.5 ± 329.6 units/ml であった。IP 投与においても IV 投与と同様、すべての個体において投与5日後にピークがみられ、その時の平均値および標準偏差は 384.5 ± 141.5 units/ml であり、IV 投与に比べて抗体価は低かった。一方、ピーク時の変動係数 (CV 値) は、IV 投与が37.3%、IP 投与が36.8%とほとんど同等であった。

3.1.2 KLH 特異的 IgG 抗体 (二次反応、図4)

IV 投与、IP 投与のすべての個体において、KLH 特異的 IgG 抗体の出現が確認された。IV 投与では IgG の出現パターンおよび抗体価に大きなばらつきがみられた。7例中5例では抗体反応のピークが KLH1回目投与21日後 (2回目投与12日後) であったのに対し、1例は投与23日後 (2回目投与14日後)、別の1例は当該測定期間中にはピークがみられなかった。5例でみられた投与21日後を IgG 出現のピークとみなすと、抗体価の平均値と標準偏差は 1698.2 ± 1107.6 units/ml であった。一方、IP 投与では8例すべての個体において IgG 出現のピークは KLH の1回目投与23日後であり、抗体価においても IV 投与でみられたような大きなばらつきはなかった。ピーク時の抗体価の平均値と標準偏差は 2469.1 ± 441.9 units/ml であり、IV 投与の抗体価を上回った。KLH 投与21日後 (IV 投与) と23日後 (IP 投与) の CV 値はそれぞれ65.2% および17.9% であり、IP 投与の方が明らかな低値を示した。

3.2 抗体産生のラット系統比較

3.2.1 KLH 特異的 IgM 抗体 (一次反応、図5)

3系統いずれにおいても、すべての個体で KLH 特異的 IgM 抗体の出現が確認された。SD ラットと

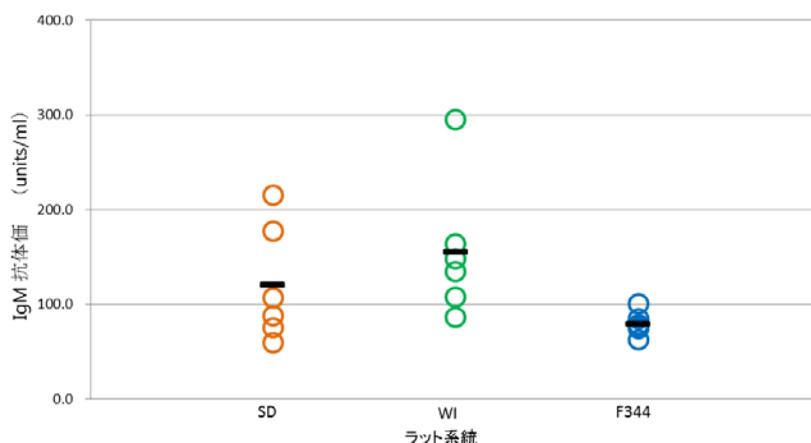


図5 系統別 IgM 抗体産生
各系統のバーは平均値を示す

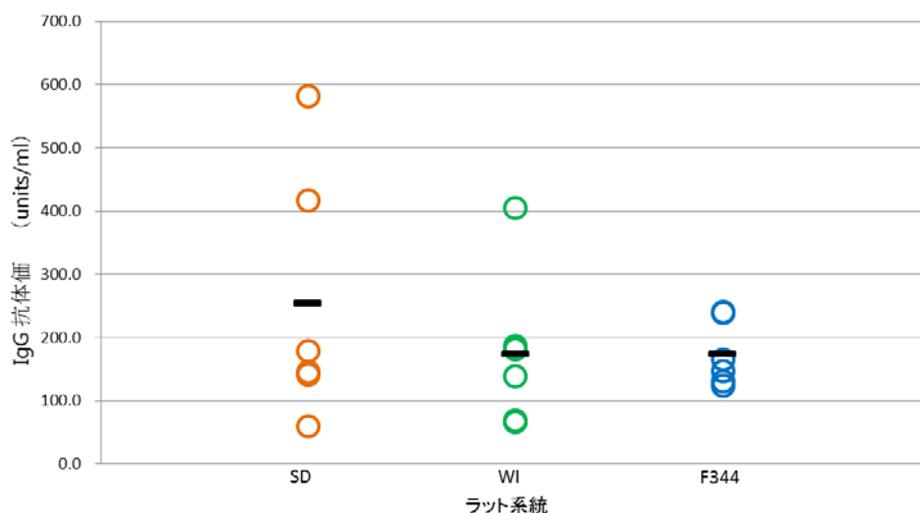


図6 系統別 IgG 抗体産生
各系統のバーは平均値を示す

WI ラットにおいては、いずれも F344 ラットよりも抗体価のばらつきが大きかったが、その程度は SD ラットが CV 値47.2%、WI ラットが CV 値47.4% とほぼ同等であった。これに対し近交系 F344 ラットの CV 値は15.8% であり、クローズドコロニー系に比べて明らかにばらつきが小さかった。抗体価の平均値は、SD ラットが119.9 units/ml、WI ラットが155.4 units/ml に対して、F344 ラットは79.11 units/ml であり、クローズドコロニー系が近交系に比べてやや高値を示した。

3.2.2 KLH 特異的 IgG 抗体 (二次反応、図6)

3 系統いずれにおいても、すべての個体で KLH 特異的 IgG 抗体の出現が確認された。SD ラットと

WI ラットにおいては、いずれも F344 ラットよりも抗体価のばらつきが大きかったが、SD ラットの CV 値は79.5%、WI ラットの CV 値は71.4% とほぼ同等であった。これに対し、近交系 F344 ラットの CV 値は30.2% であり、クローズドコロニー系に対して明らかにばらつきが小さかった。抗体価では、SD ラットの平均値が253.1 units/ml、WI ラットの平均値が173.8 units/ml、F344 系は173.5 units/ml と、3 系統でほぼ同等の値を示した。

4. 考 察

KLH を抗原としたラット TDAR 試験においては、得られた抗体価のばらつきが大きく、化合物の潜在的免疫毒性の評価が困難な場合が多いことが

指摘されている⁸⁾。抗体価のばらつきの原因については明らかではないが、IV 投与は技術的に難易度が高いことから、時として適切な抗原量の投与がなされない個体が存在し、結果として抗体価にばらつきが生じる可能性も考えられる。IP 投与は従来から IV 投与に代わる投与方法として用いられ、技術的には IV 投与に比べてはるかに容易であることから、TDAR 試験においても KLH の投与で通常行われる IV 投与に代わって IP 投与が適用できないか検討した。その結果、IP 投与でも KLH 特異的 IgM 抗体の出現が全例でみられ、そのピークは IV 投与と同じであった。抗体価では IP 投与は IV 投与の約1/3と低かったが、ばらつきの程度は変わらなかった。Gore ら⁴⁾ は、SD ラットを用いて IV、皮下投与および footpad 投与の3経路で KLH を投与した時、IV 投与がもっとも高い IgM 抗体価を示したとしており、我々の今回の結果でもみられるように、IV 投与は一次反応における IgM 抗体産生を最も強く誘導すると思われるが、二次反応としての IgG 抗体においては、出現パターンや抗体価のレベルに一次反応とは異なった様相が見られた。すなわち、IV 投与では IgG 出現ピークが他の個体と異なっている個体あるいはピークが明瞭でない個体が見られるなど、出現のパターンに個体差が大きく、さらに抗体価にも大きなばらつきがみられた。それに対し IP 投与では、IgG 出現のピークが全例揃っており、かつ抗体価は IV 投与より高くしかもばらつきが IV 投与にくらべて明らかに小さかった。

Harris ら⁹⁾ は、KLH が KLH1 と KLH2 の2つのサブユニットからなり、それぞれが decamer を形成する複雑な構造を有していると報告している。Kawai ら⁷⁾ は、IV 投与ではそのような分子が直接全身循環系に入ることによって主な抗体産生のある脾臓の反応が誘導されるため IV 投与においては高い抗体反応が見られると述べている。KLH がそのような複雑な分子構造を有するために、生体側の抗原を認識する機構に個体差が生じ、結果として抗体反応のばらつきとして現れているのかもしれない。

Plitnick ら⁵⁾ は KLH を IV および IP 投与し、IP 投与は IV 投与に比べてばらつきが少ないと報告している。今回の我々の結果においても、IgM では IV 投与と IP 投与でばらつきはほとんど同じであり、IgG では IP 投与の方が IV 投与に比べてばらつきがかなり小さく、かつ IP 投与が IV 投与よりも高い抗体価を示したことから、KLH の投与経路と

して IP は IV よりも優れていることが示唆された。KLH が複雑な分子構造のまま直接全身循環系に入る場合と、腹腔を経由した後に全身循環系に入る場合とでは KLH の分子態様が変化し、結果として IV 投与と IP 投与での抗体反応の違いとなって現れているのかもしれない。

森ら¹¹⁾ は、KLH の IV 投与による TDAR 試験において低反応性個体の出現を報告しているが、KLH 投与技術の巧拙が低反応性個体の出現など抗体価のばらつきに関係している可能性も考えられる。今回の我々の結果から、ラット TDAR 試験において、KLH の投与方法として IP 投与を用いることにより、技術的な問題をクリアできるとともに、IV 投与よりも個体差が少なくしかも高い抗体価が期待できることから、KLH の IP 投与は IV 投与に代わり得る投与方法であると言える。

次に、TDAR 試験において、抗体価のばらつきの要因として指摘されているラットの系統差について検討した。使用した系統のすべてのラットで、KLH 特異的 IgM 抗体と IgG 抗体の陽性反応がみられ、かつ IgM、IgG ともに抗体価において系統間で大きな違いはみられなかったことから、抗体反応そのものに系統間で大きな違いはないと思われた。しかし近交系の F344 ラットは、非近交系の SD および WI ラットよりも一次抗体反応、二次抗体反応ともに抗体価のばらつきが明らかに小さかった。近交系ラットが TDAR 試験においてばらつきが少ないことについては遺伝的均一性から予想されたことであり、実際にこれまでもいくつか報告^{6) 12)} されている。したがって、近交系ラットの使用により、TDAR 試験の感度を向上させられる可能性が示唆される。実際に F344 ラットを用いて TDAR 試験を行った報告も見られる¹⁰⁾。TDAR 試験において近交系ラットを使用することに関しては、前記免疫毒性試験法ガイドライン¹⁾ でも可能であるとされている。しかしながら、免疫学的に不均一なヒトへの外挿性や標準的毒性試験での系統選択との整合性を考慮すると、非近交系ラットを使用する方が妥当であるとも考えられる。上記ガイドラインでも、近交系ラットの使用に際しては標準的毒性試験で使用了系統と関連付けることができる十分な暴露データがあれば近交系の使用も可能という前提条件付きである。さらには EMEA のガイドライン¹³⁾ では医薬品開発の初期段階から免疫毒性試験を実施することが求められており、その場合、標準的毒性試験と並行して免疫毒性試験を行う必要がある。

これらのことから、TDAR 試験においては非近交系ラットの使用は不可避と考えられる。実際に、非近交系であるSD ラットを用いて数種類の免疫抑制剤の効果をTDAR 試験で調べ、明瞭な抗体産生抑制が認められることから、非近交系ラットを用いても化合物の免疫抑制能を検出することが示されている^{4) 6)}。今回の我々の結果において、非近交系ラットと近交系ラットのいずれにおいても一次反応、二次反応ともに明らかな抗体反応がみられ、またその抗体価のレベルはほぼ同等であった。また、2つの非近交系ラットを比較すると、CV値で表されるそのばらつきの程度がほとんど同じであることから、この2つの非近交系ラット間ではKLHに対する抗体反応に大きな違いはないと考えられた。したがって、TDAR 試験において、使用するラットの系統は標準的毒性試験で使用した非近交系ラットと同じ系統のラットを用い、その際に、その非近交系ラットの免疫学的特性、例えばTDARにおけるばらつきの程度等を十分に把握したうえで免疫毒性試験を実施することで、信頼性の高いデータを得ることができるものと考えられる。

結論として、KLHによるラット抗体産生において、非近交系であるクローズドコロニー系ラットで一次抗体反応、二次抗体反応のいずれも十分な抗体産生がみられ、さらにKLHをIP投与すると出現する特異的IgMおよびIgG抗体の個体差がIV投与よりも小さいという結果が得られたことから、本方法はラットTDAR 試験において有用であることが示唆された。

5. 引用文献

- 1) 厚生労働省：医薬品の免疫毒性試験に関するガイドラインについて：薬食審査発第0418001号，2006.
- 2) 中村和市：免疫毒性試験、*日薬理誌*、131: 215-219, 2008.
- 3) 厚生労働省：医薬品の製造(輸入)承認申請に必要な毒性試験のガイドラインについて：薬審一第二四号,1988.
- 4) E. R. Gore, J. Gower, E. Kurali, J. L. Sui, J. Bynum, D. Ennulat and D. J. Herzyk: Primary antibody response to keyhole limpet hemocyanin in rat as a model for immunotoxicity evaluation. *Toxicology*, 197: 23-35, 2004.
- 5) L. M. Plitnick and D. Herzyk: T-Dependent Antibody Response to Keyhole Limpet Hemocyanin in Rodents. In: R. R. Dietert (ed.), *Immunotoxicity Testing: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 598, Humana Press, a part of Springer Science+Business Media, LCC, 2010, pp.159-171.
- 6) R. Kawai, S. Ito, T. Aida, H. Hattori, T. Kimura, T. Furukawa, K. Mori, A. Sanbuissho and T. Kawada: Evaluation of primary and secondary responses to aT-cell-dependent antigen, keyhole limpet hemocyanin, in rats, *J. Immunotoxicol.*, 10(1), 40-48, 2013.
- 7) R. Kawai, T. Aida, H. Hattori, T. Furukawa, K. Mori, W. Takasaki, N. Takahashi and T. Kawada: Evaluation of canine T-cell dependent antibody response to the primary and secondary immunization with keyhole limpet hemocyanin. *J. Toxicol. Sci.*, 38(4): 571-579, 2013.
- 8) 大石巧, 杉本潤一郎, 岡室彰, 安藤亮, 藤澤賢一, 宝里英和, 安田佑弥, 望月雅裕, 後藤玄: 抗体産生などバラつきの大きい免疫毒性データの評価事例, *第22回免疫毒性学会学術年会講演要旨集*, p68, 2015.
- 9) J. R. Harris and J. Markl: Keyhole limpet hemocyanin (KLH): a biomedical review. *Micron*. 30: 597-623, 1999.
- 10) H. W. Smith, C. J. Winstead, K. K. Stank, B. W. Halstead and D. Wierda: A predictive F344 rat immunotoxicology model: cellular parameters combined with humoral response to NP-C γ G and KLH. *Toxicology*, 194: 129-145, 2003.
- 11) 森加奈子, 岩知道貴子, 青木正美, 山崎秀樹, 高見健治, 永井博文: 検討事例2: 武田におけるKLH-TDAR 試験法について, *第16回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集*: pp.44-45, 2009
- 12) 河井良太, 伊藤志保, 服部浩之, 間哲生, 古川忠司, 三分一所厚司: 検討事例1: ラットを用いたkeyhole limpet hemocyaninを用いるT cell dependent antibody responseの系統差に関する検討, *第16回日本免疫毒性学会学術大会講演要旨集*: pp.42-43, 2009.
- 13) EMEA: Note for guidance on repeated dose toxicity. CPMP/SWP/1042/99. 2000.