

# 可溶性蛋白抗原による妊娠マウス免疫が仔マウスの特異的免疫応答へおよぼす影響について

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9074">http://hdl.handle.net/2297/9074</a>

## 可溶性蛋白抗原による妊娠マウス免疫が仔マウスの 特異的免疫応答へおよぼす影響について

金沢大学がん研究所病態生理部 (主任: 倉田自章教授)

金沢医科大学血清学教室 (指導: 西東利男教授)

三 浦 美 洋

(昭和58年3月31日受付)

妊娠動物の免疫がその仔動物の特異免疫反応におよぼす影響についての実験的研究には不十分な点があり、その機作にも不明な点が多い。著者はT細胞依存性の可溶性異種蛋白 (ovalbumin, OVA) を免疫原として maternal effect の検索を行った。まず、マウスで OVA に対し高い plaque forming cell (PFC) 値を得る実験条件を求めた。C 57 BL/10 マウスに約2週間隔で2回 (1次 20  $\mu$ g, 2次 200  $\mu$ g) OVA を Al(OH)<sub>3</sub>ゲルとして腹腔内注射し、4~5日後に測定すると高い PFC 値が得られた。なお、OVA 50 mg/ml と ethyldimethylaminopropyl carbodiimide 100 mg/ml を 6:1 の量比にして感作した羊血球を使用すると最も高い PFC 値が得られた。ついで、妊娠約10日目に OVA 20  $\mu$ g を Al(OH)<sub>3</sub>ゲルとして1回腹腔内注射した C 57 BL/10 マウスから生まれた仔マウスは、上述同様に OVA を投与した後の PFC 誘導が強く抑制されていることを明らかにした。その抑制因子は仔マウスの血清と脾細胞、とくに後者に存在したが、それらの活性は抑制を説明するには充分ではなかった。

**Key words** Immunology, Maternal effect, Plaque-forming cell, Prenatal sensitization, Tolerance

抗原刺激を受けた妊娠動物から生まれた仔動物の特異免疫応答を実験レベルで検索することは、免疫系の個体発生に関する知見を増すのみならず、妊娠母体の感染や、予防接種が新生児の特異免疫機能に及ぼす影響、即ち母子免疫問題の本質に関して基礎的な知識を与えるであろう。

妊娠中あるいは妊娠前の動物をウィルス、細菌、異種血球などで免疫した場合、その仔動物の特異免疫反応は非免疫妊娠動物由来の仔動物のそれとは異なることが以前から知られている<sup>1)~4)</sup>。その変化は、あるいは抑制として、あるいは促進として現われるが、それに関与する因子として抗原の化学、量、免疫時期、動物系統 (遺伝的背景) などがあげられる<sup>5)</sup>。しかし、この問題に関する実験的研究は比較的乏しく、また基礎的データの集積が望まれる段階である。

著者は可溶性で高純度で得られる異種蛋白 (T細胞依存性抗原) を免疫原として選び、高反応系の inbred マウスを使用して実験を行った。仔動物の免疫反応は plaque forming cell (以下 PFC と略) の測定により検索したが、この場合、仔動物に高い PFC 値を得るような実験系を確立することが先決問題となった。そこで著者は種々の検討を行い、高い PFC 感度を得るいくつかの条件を明らかにした。ついで、その至適条件下で maternofetal interaction についての実験を行い、二、三の知見を得た。

### 材料および方法

#### 1. 実験動物

Specific pathogen free で飼育した 12~15 週齢 (体重 25~30 g) の C 57 BL/10 マウス (以下 B 10 と略)

On the Effects of Immunization of Pregnant Mice with Soluble Protein Antigen on the Specific Immune Response of Their Offspring. **Yoshihiro Miura**, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, and Department of Serology, Kanazawa Medical University.

と C3H/He マウス (以下 C3H と略), および妊娠 B10 マウスとその仔マウスを使用した。

## 2. 抗原および免疫方法

抗原として chicken egg albumin (ovalbumin, Grade V, Sigma Chemical Co., 以下 OVA と略) および bovine  $\gamma$ -globulins (Chon fraction II, Sigma, 以下 BGG と略) を用いた。各抗原を生理的食塩水 (以下生食水と略) に溶解し, そのままあるいは水酸化アルミニウム (和光純薬, 以下 Alum と略) 10 mg/ml と等量混和したゲル, または Freund's complete adjuvant (生化学工業, 以下 FCA と略) と等量混和した乳濁液をマウス腹腔内に注射した。

## 3. 抗原感作血球の作製

1) 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (以下 ECDI と略) を用いる方法

Golub ら<sup>9)</sup>の方法によった。羊赤血球 (sheep red blood cell, 以下 SRBC と略) をリン酸緩衝化生食水 pH 7.2 (phosphate-buffered saline pH 7.2, 以下 PBS と略) で 3 回洗浄後, packed cell 1 容, PBS にとかした抗原溶液 (2~50 mg/ml) 6 容, PBS にとかした ECDI 溶液 (4~100 mg/ml) 1 容の割合に混合し, 氷冷しながら 60 分反応させた。その後 1% の fetal calf serum を含む PBS で 3 回洗浄し, 同液で 5% v/v 血球浮遊液を作製して使用した。この血球を ECDI 法感作血球と呼ぶ。

2) タンニン酸 (tannic acid, 以下 tann と略) を用いる方法

Boyden<sup>10)</sup>の方法によった。PBS で 2.5% SRBC 浮遊液を作製し, それに等量の 40,000 倍 tann 生食水溶液を加え, 室温 10 分放置し, PBS で洗浄後, 生食水で 2.5% v/v 血球浮遊液を作った。この浮遊液 1 容にリン酸緩衝化 (pH 6.2) 生食水 0.25 mg/ml とかした蛋白抗原液 4 容をまぜ, 室温 5 分反応後, 1% 家兎血清含生食水で 2 回洗浄, 同生食水で 2.5% v/v 浮遊液とした。この血球を tann 法感作血球と呼ぶ。

3) 塩化クロム ( $\text{CrCl}_3$ ) を用いる方法

Sweet ら<sup>11)</sup>の方法によった。SRBC を生食水で 3 回洗浄して得た packed cell 1 容に 0.04 M  $\text{CrCl}_3$  水溶液 (4°C 保存) の生食水による 20 倍稀釈液 1 容と蛋白抗原生食水液 (5 mg/ml) 1 容を加え, 室温で 15 分反応させた後, 1% fetal calf serum 含有生食水で 3 回洗浄し, 同溶液で 5% v/v 浮遊液とした。これを Cr 法感作血球と呼ぶ。

## 4. PFC 測定

マウス屠殺後, 直ちに脾臓を摘出し, 10% fetal calf serum 含有 RPMI-1640 (日水製薬) 中で細胞を分離

し, ナイロンメッシュ (孔径 50  $\mu$  Swiss Nybolt 社) を通した後, 遠心 (600  $\times$  g 10 分) と上記培養液による稀釈を 3 回くりかえして洗浄し,  $1 \sim 5 \times 10^7$  個/ml の脾細胞浮遊液 (以下 SPC と略) を作製した。この SPC と抗原感作血球浮遊液の各 0.1 ml を 43°C の寒天溶液 (Eagle minimum essential medium 中に寒天 0.6% W/V) 中で混和し, シャーレ (内径 60 mm) 内へ注入・固化した。5%  $\text{CO}_2$  下で 37°C 60 分培養後, 2 群にわけて 1 群には 2% ゼラチン含有  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  加 0.01 M ベロナール緩衝液 pH 7.2 で 15 倍稀釈したモルモット乾燥補体を寒天上に重層し, 30 分後に溶血斑を数えた (直接 PFC = IgM PFC)。他の 1 群には抗マウス IgG 抗血清を加え, 37°C 60 分反応させてから洗浄し, 前群同様に補体を加えて反応させ溶血斑を数えた (間接 PFC = IgM PFC + IgG PFC)。IgG PFC 値は間接 PFC 値から直接 PFC 値を差引き, 統計処理を行って得た<sup>9)~12)</sup>。

## 成 績

### 1. 可溶性抗原で高 PFC 値を得る方法の検討 (I)

B10 マウスに OVA または BGG を一匹一回 50  $\mu$ g, 1 次投与は FCA で乳化して投与し, 5 週後に 2 次投与を Alum ゲルとして行い, 4 日後に PFC 測定を行った (図 1)。ECDI 法感作血球を用いると PFC の検出率が最も高く, tann 法感作血球では検出される PFC 数は少なく, Cr 法感作血球を用いたのではほとんど PFC を検出できなかった。B10 マウスでは OVA 免疫の方が BGG 免疫より多くの PFC (間接 PFC) を誘導した。

C3H マウスでは同様な実験において PFC の誘導が B10 マウスより全般に弱かった (図 1)。ここでも ECDI 法感作血球が PFC 検出に最も有効であったが,

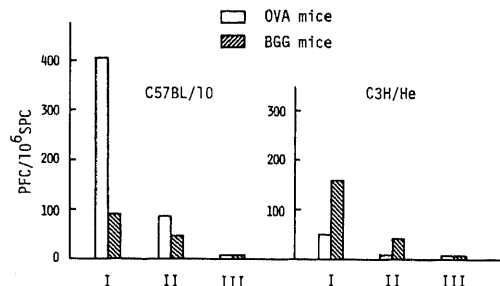


Fig. 1. Effects of sensitized erythrocytes on induction of the plaque-forming cell (PFC) response. The corresponding antigen was coupled to sheep erythrocytes with 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (ECDI) (I), tannic acid (II), or chromic chloride (III). OVA, ovalbumin; BGG, bovine  $\gamma$ -globulin; SPC, spleen cell.

B 10 マウスの場合と異なり、BGG 免疫の方が OVA 免疫より PFC 値は大きかった。

最も PFC の検出率が良い ECDI 法感作血球について感作条件の検討を行った。抗原と ECDI の濃度を変えて作製した血球による PFC 検出率の変動をしらべた。OVA 免疫 B 10 マウスにおいて、OVA 50 mg/ml - ECDI 100 mg/ml で感作した血球を用いた場合に高い PFC 値を得たが、それ以外の組み合わせ (OVA 50 mg/ml - ECDI 20 mg/ml, OVA 50 mg/ml - ECDI 4 mg/ml, OVA 10 mg/ml - ECDI 100 mg/ml, OVA 2 mg/ml - ECDI 100 mg/ml) で感作した血球を用いるとほとんど PFC を検出できなかった (図 2)。BGG 免疫

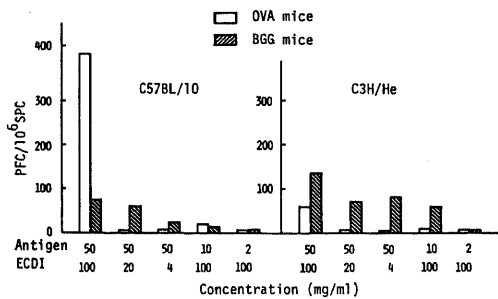


Fig. 2. Effect of antigen : ECDI ratio for preparing sensitized-erythrocytes on the PFC assay. Reaction mixture consists of 0.1 ml of packed sheep erythrocytes, 6 ml of the antigen solution and 1 ml of ECDI solution.

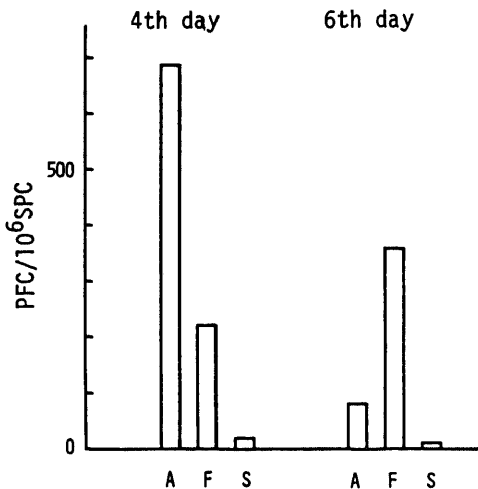


Fig. 3. Effects of adjuvants on induction of the PFC response in mice. C57BL/10 mice were immunized with 50  $\mu$ g of OVA in Al(OH)<sub>3</sub> (A), in Freund's complete adjuvant (F), or in saline (S). Two weeks later, all mice were boosted with 50  $\mu$ g of OVA. The PFC assay was performed on the 4th and 6th day after the 2nd injection.

B 10 マウスの場合には BGG 50 mg/ml - ECDI 100 mg/ml の組み合わせによる感作血球を用いると低値ながら PFC を検出できたが、それ以外の BGG-ECDI 濃度による感作血球では検出できる PFC 値は極めて低かった (図 2)。C 3 H マウスの場合でも OVA あるいは BGG 免疫において抗原 50 mg/ml - ECDI 100 mg/ml の組み合わせによる感作血球を用いると PFC 検出率は最も高かった (図 2)。このマウスでは OVA 免疫よりも BGG 免疫の方が PFC の誘導は高かったが、それも B 10 マウスを OVA で免疫した場合に比べて遙かに低値であった。以上の結果から、以後の実験はすべて OVA で免疫した B 10 マウスについて OVA 50 mg/ml - ECDI 100 mg/ml の組み合わせで作った ECDI 法感作血球を使用して PFC 測定を行うことにした。

## 2. 可溶性抗原で高 PFC 値を得る方法の検討 (II)

OVA 50  $\mu$ g を生食水、あるいは Alum, FCA とともに腹腔内注射した B 10 マウスの 4, 6, 9 日目の脾を摘出して PFC を測定したがいずれも陰性であった。そこで、上記注射群の 2 週目に OVA 50  $\mu$ g を Alum とともに再注射し、その 4 日および 6 日後に PFC を測定した (図 3)。Alum を加えて 1 次免疫したマウスは 2 次免疫後 4 日目に多数の PFC を示したが、6 日目では著しく減少した。1 次免疫を FCA を加えて行ったマウスは 2 次免疫後 4 日目の PFC は少ないが、6 日目にはかなりの増加を示した。OVA を生食水溶液のまま adjuvant なして 1 次免疫に使用した場合はその量を 0.2, 2.0, 20, 200, 2,000  $\mu$ g と変えても 2 次免疫後に PFC の発生は認められなかった。

OVA の投与量をすべて 50  $\mu$ g とし、1 次・2 次免疫とも Alum を加えて行い、その間隔を変えて 2 次免疫 4 日後の PFC を測定した (図 4)。間隔 16 日の場合に高い PFC 値が得られたが、間隔 20 日、10 日では少く、

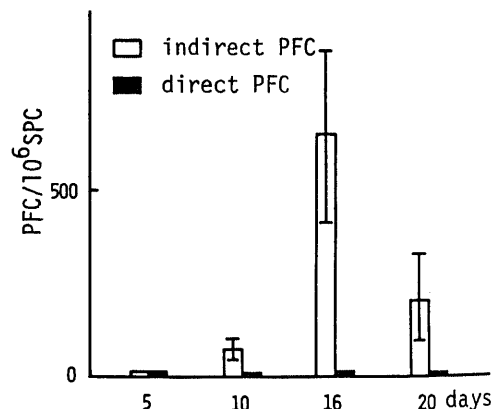


Fig. 4. Effect of interval between the 1st and 2nd injection on the PFC response.

5日では陰性であった。

免疫抗原量とPFC誘導の関係を調べた。OVAの1次投与量を0.2, 2.0, 20, 200, 2,000  $\mu\text{g}$ と変え、2次免疫量をすべて20  $\mu\text{g}$ とし、いずれもAlumを加えて行い、投与間隔を2週として2次投与4日後のPFCを測定した(図5)。1次投与量2  $\mu\text{g}$ でPFCが認められたが、20  $\mu\text{g}$ では著しく増加し、200  $\mu\text{g}$ ではやや低下、2,000  $\mu\text{g}$ では2  $\mu\text{g}$ と同程度であった。1次投与量をすべて20  $\mu\text{g}$ とし2次投与量を0.2, 2.0, 20, 200, 2,000  $\mu\text{g}$ とすると図6のように2次投与量が200  $\mu\text{g}$ の時に最高値が得られた。なお、以上のPFCはいずれも間接PFCで、直接PFCはいずれもほとんど陰性であった。

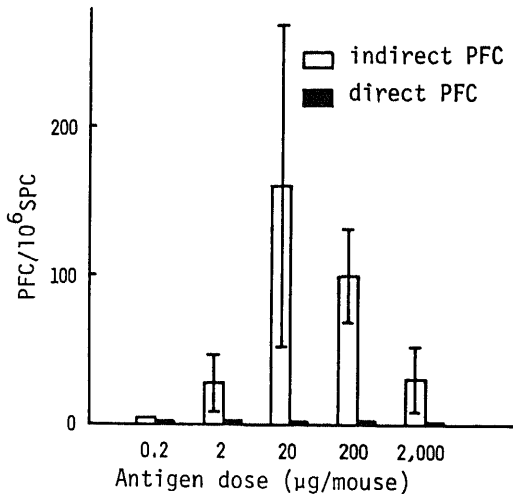


Fig. 5. Effect of antigen dose in the 1st injection on induction of the PFC response.

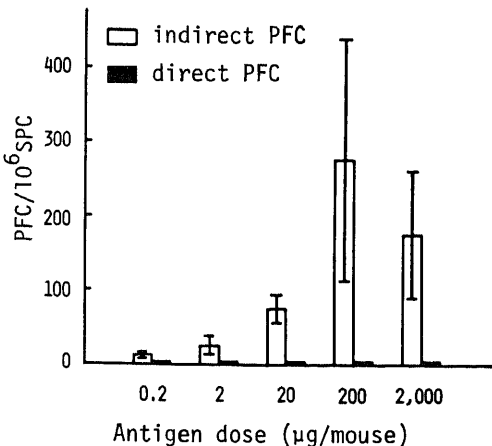


Fig. 6. Effect of antigen dose in the 2nd injection on induction of the PFC response.

### 3. 可溶性抗原による妊娠マウス免疫と仔マウスの免疫応答

妊娠約10日のB10マウスにOVA 20  $\mu\text{g}$ の生食水溶液を腹腔内に注射し、その仔マウス3~5匹に生後6週および8週目にそれぞれ20  $\mu\text{g}$ と200  $\mu\text{g}$ のOVAをAlumとともに腹腔内注射し、4日および6日後のPFCを測定した。対照群には非免疫妊娠マウス由来の仔マウスを使用した。結果は、4日後では $45 \pm 12$ , 6日後では $17 \pm 4$  PFC/ $10^6$ PFCであり、対照マウスのそれぞれ $91 \pm 26$ ,  $28 \pm 8$  PFC/ $10^6$ SPCと比較すると50~60%であった。

妊娠マウスの免疫をadjuvantを加えて行くと、その異常刺激によって流産のおこる危険性がある。実際、著者もOVAにFCAを加えて免疫した妊娠マウスがすべて流産することを認めた。そこで起炎性の少ないAlumを使用し、OVA 20  $\mu\text{g}$ を1回妊娠約10日目のB10マウスに投与した。10匹中8匹が正常に出産したのでその仔マウスに生後6週と8週目にそれぞれOVA 20  $\mu\text{g}$ および200  $\mu\text{g}$ をAlumとともに腹腔内注射して4日と6日後のPFCを測定した(図7)。4日目のPFCは対照群のその30%以下であった。

抗原量とmaternal effectの関係をしらべた。妊娠約10日目のB10マウスにそれぞれ0.2, 2.0, 20, 200, 2,000  $\mu\text{g}$ のOVAをAlumとともに投与し、生まれた仔マウスに生後6週と8週目にそれぞれ20  $\mu\text{g}$ と200  $\mu\text{g}$ のOVAを投与し、3, 5, 7日後のPFCを測定した(図8)。対照群のPFC値の最も高い5日目においてOVA 20  $\mu\text{g}$ で免疫した妊娠マウスの仔マウスに最も強い抑制が見られ、対照群のその約4%であった。

OVA 20  $\mu\text{g}$ をAlumとともに投与した妊娠マウス由来の仔マウスから生後6週目のSPCと血清を採取

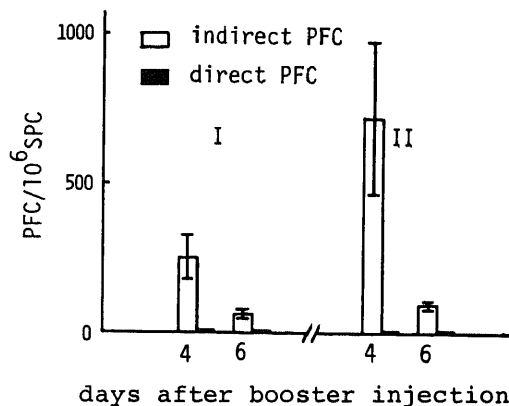


Fig. 7. The PFC response of offspring obtained from immunized (I) or non-immunized (II) females.

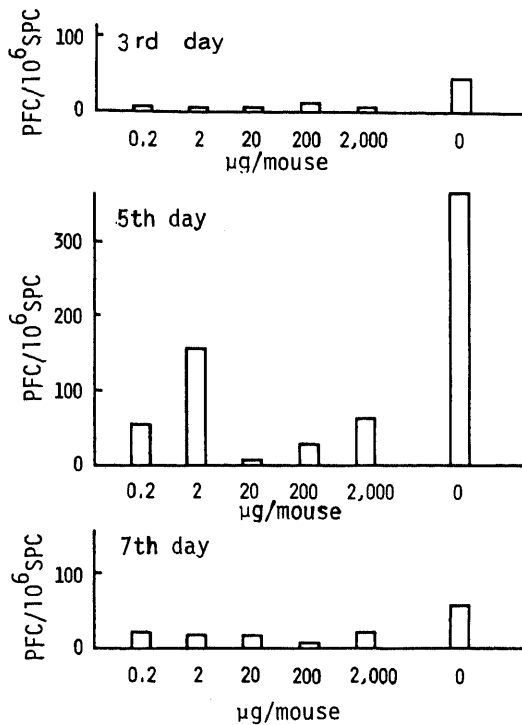


Fig. 8. Effect of various doses of antigen on induction of the PFC response in maternally immunized offspring.

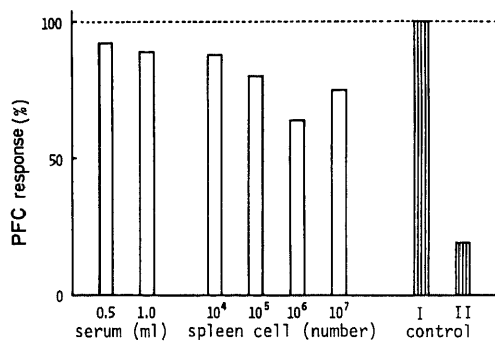


Fig. 9. Effect of sera and spleen cells of the offspring from immunized females on induction of the PFC response in unrelated mice. Control: (I) PFC of offspring from non-immunized females, (II) PFC of offspring from immunized females.

した。OVA 20  $\mu\text{g}$  を Alum とともに注射して 2 週目の B 10 マウスの血中に上記 SPC または血清を移入し、その 2 日後に OVA 200  $\mu\text{g}$  を Alum とともに追加投与して 5 日後の PFC を測定した。SPC の移入量は  $10^4$ ,  $10^5$ ,  $10^6$ ,  $10^7$  個、血清の移入量は 1.0 ml および 0.5

ml とした。対照として OVA 20  $\mu\text{g}$  を Alum とともに投与した妊娠マウスと非免疫妊娠マウスの各仔マウスに OVA 20  $\mu\text{g}$ , 2 週後に OVA 200  $\mu\text{g}$  をそれぞれ Alum とともに投与して 5 日目の PFC を測定した。対照群における免疫妊娠マウス由来仔マウスの PFC 値は非免疫妊娠マウス由来仔マウスのその 19.4% であったのに対し、SPC 移入マウスの PFC 値は最も抑制されたものでも非移入マウス PFC 値の 64.4% であり、血清移入マウスの PFC 値は非移入マウスのそのほぼ 90% であった (図 9)。

### 考 察

妊娠母体の免疫が子の免疫応答に影響を示すことは古くから臨床医学的にも動物実験レベルでも知られている。この現象は臨床応用の面からも重要な意義のある問題ではあるが、多数の因子がからみあって関与する現象であるため実験レベルで clear cut な成績を得がたいし、機作についても不明な点が多い。

種々の可溶性抗原を新生児に投与すると比較的容易に免疫学的寛容が成立することが、Burnet & Fenner (1949)<sup>13)</sup>以来良く知られるようになり、新生児免疫系の未成熟に基く現象と理解されてきている。もしそうならば、免疫系がより未熟である胎児に抗原が接触すれば一層容易に寛容が成立してもよい筈である。Shinka ら<sup>14)</sup>はマウス (C3H) を使用して実験を行い、妊娠 14~15 日またはそれ以後の母マウスをヒト・ $\gamma$ -グロブリン (非凝集) で免疫することにより、仔マウスに同抗原に対する安定な寛容が誘導されることを認めた。そのような critical stage の前に免疫された妊娠マウスの子では部分的 (一過性) 寛容が誘導される。異種赤血球で妊娠マウス (B 10) や妊娠ラット (hooded Listar rat) を妊娠 14 日以前に免疫した実験でも仔動物に部分的寛容の成立が細胞レベルで認められる<sup>3,14)</sup>。SRBC や馬血球の溶血液血清のような免疫原性の低い抗原を妊娠 3~5 日のマウス (BALB/c) に投与した場合でも同様に仔動物の同血球に対する免疫応答の抑制が見られている<sup>15)</sup>。

しかし、妊娠前に免疫を行った動物を交配させて生まれた仔動物の場合は、結果が上記とは異なってくる。マウス (C3H) を SRBC で免疫後に交配させて生まれた仔の免疫応答は対照と比べて変化はなく、その血清や SPC にも免疫応答に影響する活性がない<sup>16)</sup>。同様な現象は抗原を合成ポリペプチドとし、ラット (ACI) を使用した場合にも認められている<sup>17)</sup>。しかし、メチル化牛血清アルブミンを加えて凝集させた、合成ポリペプチドや加熱変性牛胸腺デオキシリボ核酸のような抗原を使用して行った同様な実験では仔動物の免疫応答の

増強が認められる<sup>18)</sup>、ニトロフェノール化 BGG のようなハプテン-蛋白で免疫されたマウス (CBA/J) を交配させて生まれた仔マウスの場合には軽度の抑制が見られている<sup>19)</sup>。

これらの成績を総括すると、胎児の免疫系が一定の発育を遂げた後に母経由の抗原情報を受けると寛容が完成するが、より未発育な状態で受けると部分的寛容になり、受胎以前に免疫された母動物から生まれた仔の免疫応答は、変化がなかったり、部分的寛容、あるいは増強が起こったりし、その違いは免疫原の性質に依存するということになるのであろう。

著者は従来知られていない、OVA (T 細胞依存性の可溶性抗原) を抗原として選び、マウス (B 10) を使用して妊娠約 10 日目に免疫を行い、仔マウスの免疫応答を細胞レベルでしらべた。この場合、定量性のあるデータを得るためには対照群に高い PFC 値が得られるような実験条件の設定が必須なので、高反応マウスの選択、免疫条件と PFC 検出条件の検討を行って至適条件を見だし、その条件下で仔マウスに部分的寛容の成立することを明らかにした。その成立に関与する因子としての活性は血清と SPC、とくに後者に認められたが、それらの活性を合わせても抑制を充分説明できるほどではなかった。

仔動物の免疫応答に対する maternal effect の機作には母から仔への抗原情報の移行、たとえば抗体、抗原抗体複合物、免疫 RNA、免疫細胞などの移行を考えねばならないが、中でも抗原、とくに凝集抗原の移行が重視される<sup>16)</sup>。著者の場合も抗原の経胎盤移行が重要な因子であることは否定できない。OVA のような可溶性抗原でも adjuvant を加えることにより母体内における抗原分解が遅延して胎児への抗原移行期間が長期化し、また adjuvant により胎盤の抗原透過性が昂進して移行量が増し、胎児に suppressor T cell の誘導が起って寛容成立の背景になるものと考えられるが、そのような機作や免疫 RNA などを利用した寛容解除方法<sup>20)</sup>についての検索は今後の課題である。

## 結 論

可溶性蛋白抗原 (OVA, BGG) に対するマウスの免疫応答を PFC assay によって観察する方法の基礎的研究を行い、高い PFC 値を得る条件を見いだしたのち、妊娠マウス免疫がその仔マウスの免疫応答におよぼす影響を明らかにした。結果は以下の如くである。

1. PFC の測定には抗原 50 mg/ml-ECDI 100 mg/ml の濃度で感作した SRBC を使用すると PFC の検出率が高く、tann 法、Cr 法の感作血球を使用するより優れている。

2. B 10 マウスに OVA 20  $\mu$ g, 2 週において OVA 200  $\mu$ g をいずれも Alum とともに注射し、その 4~5 日後に間接 PFC を測定すると、高い免疫応答が認められる。

3. 妊娠約 10 日目の B 10 マウスに OVA 20  $\mu$ g を Alum とともに 1 回投与し、生まれた仔マウスの生後 6 週目に OVA を 20  $\mu$ g, 8 週目に OVA 200  $\mu$ g を Alum とともに注射して 4~5 日後の間接 PFC を測定すると、非免疫妊娠マウス由来仔マウスの場合に比し明らかな抑制 (部分的寛容の成立) が認められる。

4. 抑制を起こす因子は仔マウスの SPC および血清、とくに前者に存在するが、それらの活性のみでは上記の抑制を充分説明できない。

稿を終えるにあたり、御校閲を戴いた金沢大学がん研・病態生理倉田自章教授、御指導を戴いた金沢医科大学血清学教室西東利男教授、御指導・御協力戴いた同教室山口宣夫助教をはじめ教室員各位に深く感謝致します。

## 文 献

- 1) Nossal, G. J. V.: The immunological response of foetal mice to influenza virus. *Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci.*, **35**, 549-557 (1957).
- 2) Halliday, R.: Effect of passive immunization against *Brucella abortus* agglutinins in young rats. *J. Path. Bact.*, **96**, 137-148 (1968).
- 3) Solomon, J. B., Riddell, G. S. & Whyte, D. F.: Specific immunosuppressive delay of the plaque-forming response by trace amounts of antibody of maternal origin in young rats injected with mouse or sheep erythrocytes. *Immunology*, **22**, 219-226 (1972).
- 4) 山口宣夫・原あけみ・清水昌寿・渡辺由子・三浦美洋・西東利男: 妊娠マウス免疫の仔マウス免疫応答への影響. I. 仔マウスの免疫寛容と移行抗体. *金医大誌*, **6**, 234-240 (1981).
- 5) Cramer, D. V., Kunz, H. W. & Gill, T. J. III.: Immunologic sensitization prior to birth. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **120**, 431-439 (1974).
- 6) Golub, E. C., Mishell, R. I., Weigle, W. O. & Dutton R. W.: A modification of the hemolytic plaque assay for use with protein antigens. *J. Immunol.*, **100**, 133-137 (1968).
- 7) Boyden, S. V.: The adsorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by anti-protein sera. *J. Exp. Med.*, **93**, 107-120 (1951).
- 8) Sweet, G. H. & Welborn, F. L.: Use of

chromic chloride as the coupling agent in a modified plaque assay cells producing anti-protein antibody. *J. Immunol.*, **106**, 1407-1410 (1971).

9) **Jerne, N. H., Nordin, A. A. & Henry, C.** : The agar plaque technic for recognizing antibody producing cells, p109-125. *In* B. Amos & H. Kaprowski (ed.), *Cell-bound antibodies*, The Wistar Inst. Press, Philadelphia, 1963.

10) **Rittenberg, M. B. & Pratt, K. L.** : Antitrinitrophenyl (TNP) plaque assay. Primary response of BALB/c mice to soluble and particulate immunogen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **132**, 575-581 (1969).

11) **Walsh, P., Maurer, P. & Egman, M.** : Detection of immune response against synthetic polymers of amino acids employing the plaque-forming cell system. I. Reaction with sheep erythrocytes coated with polymer. *J. Immunol.*, **98**, 344-350 (1967).

12) **Kapp, J. A. & Ingraham, J. S.** : Anti-protein plaque-forming cells detected with high efficiency by the use of red blood cells coupled to bovine serum globulin through bis-diazo-benzidine. *J. Immunol.*, **104**, 1039-1042 (1970).

13) **Burnet, F. M. & Fenner, F.** : *Production of antibodies*, 2d., ed., p1, Macmillan, New York, 1949.

14) **Shinka, S., Dohi, Y., Komatsu, Y., Natara-jan, R. & Amano, T.** : Immunological unresponsiveness in mice. I. Immunological unresponsiveness induced in embryonic mice by maternofetal transfer of human  $\gamma$ -globulin. *Biken J.*, **17**, 59-72 (1974).

15) **Auerbach, R. & Clark, S.** : Immunological tolerance: Transmission from mother to offspring. *Science*, **189**, 811-812 (1974).

16) **Ono, Y., Sasaki, T. & Ishida, N.** : Regulation of clonal development of immune responding cells by antibody of maternal origin. *Science*, **250**, 593-594 (1974).

17) **Davis, B. K. & Gills, T. J. III.** : Decreased antibody response in the offspring of immunized high responder rats. *J. Immunol.*, **115**, 1166-1168 (1975).

18) **Gills, T. J. III., Kunz, H. W. & Bernard, C. F.** : Maternal-fetal interaction and immunological memory. *Science*, **172**, 1346-1348 (1971).

19) **Kindred, B. & Roelants, G. E.** : Restricted clonal response to DNP in adult offspring of immunized mice: A maternal effect., *J. Immunol.*, **113**, 445-448 (1974).

20) 山口宣夫・原あけみ・清水昌寿・三浦美洋・渡辺由子・西東利男：妊娠マウス免疫の仔マウス免疫応答への影響Ⅲ。免疫寛容マウスにおける免疫RNAの授受。金医大誌，7，12-16 (1982)。

**On the Effects of Immunization of Pregnant Mice with Soluble Protein Antigen on the Specific Immune Response of Their Offspring** Yoshihiro Miura, Department of Pathophysiology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 and Department of Serology, Kanazawa Medical University, Uchinada, 920-02 - *J. Juzen Med. Soc.*, **92**, 452-459 (1983)

**Key words:** Immunology, Maternal effect, Plaque-forming cell, Prenatal sensitization, Tolerance.

#### Abstract

Relatively little has been known as to how the immunization of pregnant mothers with heterologous, soluble protein influences their offspring. Comparative studies were made on the offspring of C57BL/10 mice with or without maternal immunization; chicken ovalbumin (OVA) was used as a T-cell dependent, soluble protein antigen. The optimal experimental condition was first sought with adult C57BL/10 and C3H/He mice to get the highest value of plaque-forming cell (PFC) response to OVA or bovine  $\gamma$ -globulin. The high value was obtained from the C57BL/10 mice which had been intraperitoneally injected with OVA in a form of Al(OH)<sub>3</sub> gel twice at a 2-week interval (the first with 20  $\mu$ g and the second with 200 $\mu$ g) and were sacrificed 4-5 days after the second injection. The highest value could be obtained when PFC assay was



carried out with sheep erythrocytes which had been treated with OVA (50 mg/ml) and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide HCl (100 mg/ml) in a mixture of 6:1. According to the obtained data, the pregnant C57BL/10 mice were immunized once with OVA in saline or Al(OH)<sub>3</sub> roughly on the 10th day of gestation. The specific immune response of their offspring was examined by PFC assay after 2 successive injections of OVA in Al(OH)<sub>3</sub> in the same manner described above. Their anti-OVA response was found to be inhibited in terms of the number of OVA-specific PFC. Transfer experiments indicated that the inhibitory factors exist in the serum and spleen cells, particularly in the latter, of the offspring. However, the activity of the factors appeared to be insufficient to explain all the inhibitory phenomena observed.