

OT感作血球の免疫学的研究

第 14 報

抗体産生機構に関する研究（その1）

金沢大学結核研究所細菌免疫部（主任：柿下正道教授）

西 東 利 男
舛 谷 宏 雄

（受付：昭和34年3月11日）

緒 言

OT感作自家血球の抗体産生能に関する研究は1955年当教室の西東¹⁾、小林²⁾³⁾、登谷⁴⁾⁵⁾らにより着々進められてきたが、最近に至りこの研究分野に新しく⁵¹Crを導入し、正常ウサギについてOT感作血球の注射後の流血中における消長を詳細に追究する機会に恵まれた。その結果静脈内注射の場合にはOT感作血球と無感作血球の流血中からの消失経過の間にはそれ程著明な差は認められず、また皮下あるいは腹腔内注射の場合には流血中に検出される可能性ははなはだ低かった。このことはOT感作自家血球

を用いての免疫に際し、その静脈内注射によつては容易に抗体産生がみられるに反し、皮下あるいは腹腔内注射によつては抗体産生が著しく劣るといふ成績との関連性において、きわめて興味もあり、かつまた重要な問題であつて、OT感作自家血球免疫の機作に触れるところがあると考え次第である。よつてOT感作自家血球を上記3経路から注射した場合の流血中における消長を⁵¹Cr標識法によつて検討した今回の成績をここに摘記する。

実験材料および実験方法

実験材料

1. OT：ヒト型結核菌 H₃₇Rv 株の Sauton 培地 8 週培養の培養ろ液より型のごとく作製し 0.5% の割に Phenol を加えて氷室に保存してある教室慣用のものである。
2. ⁵¹Cr：Japan Radioisotope Association より供給される Na₂ ⁵¹Cr O₄ の生食水溶液である。
3. OT 感作血球浮遊液の作製：ACD を 1 ml 含む容器中にウサギ耳静脈から約 5 ml の血液を採取し、1 回 50 ml の生食水で 3 回遠心洗浄する。最後の血球沈査 1 ml を 10 倍希釈 OT 20 ml に混じ、時々振とうしながら 37°C の湯槽中に 2 時間置いた後、1 回約 50 ml の生食水で 3 回遠心洗浄し、最後の遠心沈査—OT

感作血球—1 ml を 9 ml の生食水に浮遊する。

4. ⁵¹Cr 標識血球浮遊液の作製：ACD を 1 ml 含む容器中にウサギの耳静脈から約 5 ml の血液を採取し、これに 20~40 μ c の Na₂ ⁵¹Cr O₄ 溶液を加えて、時々振とうしながら 37°C の湯槽中に 30 分保つた後、(3) と同様に洗う。最後の遠心沈査—⁵¹Cr 標識血球—1 ml に 9 ml の生食水を加えて 10% 浮遊液を作製する。
5. OT 感作 ⁵¹Cr 標識血球浮遊液の作製：10 倍希釈 OT 20 ml に ⁵¹Cr 標識血球 1 ml を加えて、時々振とうしながら 37°C の湯槽中に 2 時間置いた後、(3) と同様に洗う。最後の遠心沈査—OT 感作 ⁵¹Cr 標識血球—1 ml を 9 ml の生食水に浮遊する。
6. OT 感作血球および OT 感作 ⁵¹Cr 標識血球の溶

血液の作製：それぞれの遠心沈査 1 ml に蒸留水 10 ml を加えて溶血させて用いた。

7. Trypsin 処置 OT 感作血球浮遊液の作製：OT 1 ml に Trypsin 5 mg 添加，pH 6.5~7.0 とし 37°C に 60 分間保つた後，100°C 10 分加熱し，この 10 倍希釈液を用いて (3) に準じ 10% Trypsin 処置 OT 感作血球浮遊液を作製した。

8. Trypsin 処置血球浮遊液の作製：上述の洗浄自家血球の 10% 生食水浮遊液 10 ml に 1% Trypsin (Merk) 生食水溶液 1 ml を加え 37°C の湯槽に 60 分放置，その間 15 分ごとによく振る。次いで遠心しその沈査を (3) と同様に洗い最後の沈査—Trypsin 処置血

球—を 10% の割に生食水に浮遊する。

9. OT 感作 Trypsin 処置血球浮遊液の作製：(8) の Trypsin 処置血球から (3) に準じ OT 感作 Trypsin 処置血球浮遊液を作製する。

反 応 術 式

1. OT 感作血球凝集反応および溶血反応はすべて西東ら¹⁾の術式によつた。

2. ⁵¹Cr 検出のための血液の採取は ⁵¹Cr 注射後 10 分，30 分，6 時間，1，3，5 および 7 日目に行い，その放射能は Scintillation Counter により型のごとく測定した。

実 験 成 績

A. 抗体産生能に関する実験

I 注射経路別にみた OT 感作自家血球の抗体産生状況。

第 1 表に OT 感作血球浮遊液 5 ml ずつを静脈内，皮下および腹腔内にそれぞれ 3 日間隔で 5 回注射されたウサギの血清による OT 感作血球凝集反応および溶血反応の成績を例示した。この表から明らかなように抗体産生は静脈内に注射した場合最も強く腹腔内および皮下注射ではほとんど証明されなかつた。

II OT 感作血球，同溶血液および OT 単独をそれぞれ静脈内に注射した場合の抗体産生状況。

第 2 表に OT 感作血球浮遊液 5 ml，同溶血液 5 ml および 10 倍希釈 OT 2 ml をそれぞれ 3 日間隔で 5 回静脈に注射されたウサギの血清による OT 感作血球凝集反応および溶血反応の成績を例示した。こゝで注目されるのは OT 感作血球自体に比しその溶血液あるいは OT 単独では抗体産生がはなはだしく劣ることである。

III Trypsin 処置 OT 感作血球および OT 感作 Trypsin 処置血球を静脈内に注射した場合の抗体産生状況。

第 3 表にそれぞれの血球浮遊液を 3 日間隔で 5 回静脈内に注射されたウサギの血清による OT 感作血球凝集反応および溶血反応を例示し

た。これによると，OT 感作血球と Trypsin 処置 OT 感作血球の間には抗体産生能においてほとんど差が認められないにもかかわらず，OT 感作 Trypsin 処置血球の抗体産生能は上記両者に比し明らかにかなり低いことが実証された。

B. 注射血球の追跡実験

I OT 感作 ⁵¹Cr 標識自家血球注射後の ⁵¹Cr の流血中における消長

第 4 表に OT 感作 ⁵¹Cr 標識自家血球を正常ウサギの耳静脈内，皮下および腹腔内にそれぞれ注射した後，10 分，30 分，6 時間，1，3，5，および 7 日目に耳静脈から採取した血液 1 ml について放射能 (カウント) を測定したものを例示した。表内の () 内は注射全カウントに対して採取血液 1 ml 中に最も多く認められた時のカウントを千分比で表わしたものであり，() 内は注射 10 分後の血液 1 ml のカウントを 100% とし各採取時の血液 1 ml のカウントを百分比で示したものである。すなわち

i) 静脈内に注射されたウサギ No. 302 および No. 303 ではそれぞれ注射 10 分後血液 1 ml 中のカウントは全注射 カウントの 5.97 および 7.63% でこの 10 分後のカウントを 100% とすると 30 分後 94 および 95%，6 時間後 87 および 83%，1 日後 81 および 73%，3 日後 75 および 68%，5 日後 46 および 51% で 7 日後でも

38 および 45 % を示した。

ii) 皮下に注射されたウサギ No. 275 および No. 276 では注射 10 分後は検出されず 3 日後最高でこの時の血液 1 ml 中のカウントの全注射カウントに対する比率はいずれも 0.14% で静脈注射時に比しきわめて低く、7 日後はほとんど無視される程度となつた。

iii) 腹腔内に注射されたウサギ No. 271 および No. 279 では注射 10 分後は皮下注射時と同様検出されないが、6 時間後最高となり此の時の採取血 1 ml 中の全注射カウントに対する比率はそれぞれ 1.06 および 1.49 % で静脈注射時と皮下注射時の中間に位置し以後漸次減少するが 7 日後でも無視されるまでには至らなかつた。

II OT 感作 ^{51}Cr 標識自家血球溶血液注射後の ^{51}Cr の流血中における消長

第 5 表に溶血液を正常ウサギの耳静脈内、皮下および腹腔内にそれぞれ注射した後、既に述べたように定時に耳静脈より採取した血液 1 ml についてカウントを測定したものを例示した。百分比および千分比については I の場合と同様である。これによると

i) 静脈内に注射されたウサギ No. 282 および No. 291 ではそれぞれ注射 10 分後の血液 1 ml 中のカウントは全注射カウントの 6.43 および 5.59 % で、このカウントを 100% とすると 30 分後 66 および 67 %、6 時間後 10 および 12 %、1 日後 3 および 4 %、3 日後いずれも 1 % で 5 日以後は検出されなかつた。

ii) 皮下注射されたウサギ No. 285 および No. 286 では、注射 10 分後は検出されず、6 時間後最高であるがこの時の採取血液 1 ml 中のカウントの全注射カウントに対する比率はそれぞれ 0.14 および 0.13 % で、静脈注射時に比しき

わめて低く、1 日以後はほとんど無視される程度となつた。

iii) 腹腔内に注射されたウサギ No. 283 および No. 284 では注射 10 分後から既に検出され、その後も皮下注射時に比し検出率はやゝ高い。最高は皮下注射時同様 6 時間後であつてこの時の採取血液 1 ml 中のカウントの全注射カウントに対する比率はともに 0.23 % であつた。

III Trypsin 処置 ^{51}Cr 標識自家血球静脈内注射後の ^{51}Cr の流血中における消長

第 6 表に Trypsin 処置 ^{51}Cr 標識血球とその対照として加熱不活化した Trypsin で同様操作を行つた ^{51}Cr 標識血球をそれぞれ正常ウサギの耳静脈内に注射した後、定時に採取した血液 1 ml についてカウントを測定したものを例示した。この表から明らかなように ^{51}Cr の流血中における消長は OT 感作 ^{51}Cr 標識自家血球静脈内注射の場合に比べ対照ではほとんど差が認められなかつたが Trypsin 処置 ^{51}Cr 標識血球注射の場合は全く異なつた。すなわち

i) 対照のウサギ No. 121, No. 122 では注射 10 分後の採取血液 1 ml 中のカウントの全注射カウントに対する比率はそれぞれ 6.94 および 5.8 % で、これを 100 % とした以後の百分率は I の OT 感作 ^{51}Cr 標識血球静脈内注射の場合とおよそ一致している。これに反し

ii) Trypsin 処置血球注射のウサギ No. 121 および No. 122 では、注射 10 分後の採取血液 1 ml 中のカウントの全注射カウントに対する比率はそれぞれ 5.64 および 4.96 % で対照に比しやゝ低いのみであるが、これを 100 % とした以後の経過をみると 30 分後では 66 および 67 %、6 時間後では 27 および 26 %、1 日後では 2 および 3 % で 3 日以後は全く検出されなかつた。

考案ならびにむすび

OT 感作血球による抗体産生はその静脈内注射の場合にはなほ高く、皮下注射でははるかに

劣ることは小林³⁾により既に指摘されておるが、こゝでは更に腹腔内注射を加味して検討し

た結果これを確認するとともに腹腔内注射では皮下注射時より抗体産生がやゝよいことを知った。その原因を追究するため ^{51}Cr 標識をほどこした血球をOTで感作して上記3経路からそれぞれ正常ウサギに注射し ^{51}Cr の流血中における消長を観察した。

さて静脈内に注射されたOT感作 ^{51}Cr 標識血球の流血中における残存度に関しては西東ら⁶⁾が既に報告しており、今回の成績もほとんどこれと一致した。しかしこれと皮下あるいは腹腔内に注射された場合とでは流血中での ^{51}Cr の検出率にきわめて著しい差があつて特に皮下注射では低かつた。こゝで注目されるのは皮下あるいは腹腔内に注射されたOT感作 ^{51}Cr 標識血球がそのまゝ流血中に現われる可能性はきわめて低いと全く無視されるものでもないようにみられたことである。このことはあらかじめOT感作 ^{51}Cr 標識血球を溶血しておいて静脈内、皮下あるいは腹腔内に注射した時の ^{51}Cr の流血中における消長(Table 5.)とOT感作 ^{51}Cr 標識血球注射時のそれと比較することによつて推定されることである。

すなわちOT感作 ^{51}Cr 標識血球が皮下あるいは腹腔内ですべて溶血すると仮定すると注射5日後からは流血中での ^{51}Cr の検出が不可能となつてもよいのであつて、なお引き続き検出され

るのはわずかながらOT感作 ^{51}Cr 標識血球が流血中に存在するからと思われるのである。しかしその程度が皮下注射ではきわめて低く、腹腔内注射ではやゝそれよりまさり静脈内注射では当然最も大である点と抗体産生状態との間に一連の関係があるのではないかと考える。

かくのごとく、OT感作血球では、そのまゝの状態でも長く流血中にあつて、たえず抗体産生細胞を刺激する必要があるもので、その溶血液またはOT感作血球そのまゝでも注射経路によつては溶血されてOTを放出し、OT単独と同様な効果しか發揮できないような場合は抗体産生能が低いと推断しても大過ないと思われる。

最後にOT感作Trypsin処置血球はMiddlebrook-Dubos反応において反応原性がOT感作血球よりすぐれていることは周知のところであるが静脈内に注射しても抗体産生能が低いことから、その原因としてTrypsin処置血球は流血中からすみやかに消失することが予想されたがTable 6に示されるごとくこの予想はまさに適中し注射後早期に溶血して流血中から除去されることが実証された。

これを要するにOT感作血球注射による抗体産生の機序について重要な示唆を与えると考えられる成績が ^{51}Cr 標識法を応用して得られたのでこゝにその要点を記載した。

文

- 1) Saito, T. et al. : Jap. J. Tuberc., 3 (3-4), 75, 1955.
- 2) 小林博 : 金大結研年報, 14 (中), 177, 1956.
- 3) 小林博 : 金大結研年報, 14 (中), 187, 1956.
- 4) 登谷栄作 : 金

献

- 大結研年報, 16 (上), 31, 1958.
- 5) 登谷栄作 : 金大結研年報, 16 (中), 195, 1958.
- 6) Saito, T. et al. : Jap. J. Tuberc., 6 (2), 47, 1958.

Table 1. Hemagglutination and hemolysis tests of OT-sensitized red cells by the sera of rabbits immunized with OT-sensitized red cells

Rabbit	Injection of OT-sensitized red cells by	Hemagglutination test								Hemolysis test in the presence of a complement							
		Dilution of serum								Dilution of serum							
		1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1,280	1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1,280
No. 381	Intravenous route	3	3'	2	1	1'	1'	0	0	##	##	##	##	+	+	±	-
No. 383		3	3	2	2	1	1	1'	0	##	##	##	##	##	+	+	±
No. 271	Subcutaneous route	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
No. 272		0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
No. 273	Intraperitoneal route	1	0	0	0	0	0	0	0	±	-	-	-	-	-	-	-
No. 274		1'	0	0	0	0	0	0	0	±	-	-	-	-	-	-	-

Table 2. Hemagglutination and hemolysis tests of OT-sensitized red cells by the sera of rabbits immunized with OT, hemolysate of OT-sensitized red cells or OT-sensitized red cells

Rabbit	Intravenous injection of	Hemagglutination test								Hemolysis test in the presence of a complement							
		Dilution of serum								Dilution of serum							
		1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1,280	1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1,280
No. 131	OT	2	1	1'	0	0	0	0	0	±	-	-	-	-	-	-	-
No. 146		1	1	1'	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
No. 36	Hemolysate of OT-sensitized red cells	1	1'	0	0	0	0	0	0	+	±	-	-	-	-	-	-
No. 37		2	1'	0	0	0	0	0	0	+	±	-	-	-	-	-	-
No. 381	OT-sensitized red cells	3	3'	2	1	1	1'	0	0	##	##	##	##	+	+	±	-
No. 383		3	3	2	2	1	1	1'	0	##	##	##	##	##	+	+	+

Table 3. Hemagglutination and hemolysis tests of OT-sensitized red cells by the sera of rabbits immunized with OT-sensitized trypsinized red cells, OT(trypsinized)-sensitized red cells or OT-sensitized red cells

Rabbit	Intravenous injection of	Hemagglutination test								Hemolysis test in the presence of a complement							
		Dilution of serum								Dilution of serum							
		1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1,280	1: 10	1: 20	1: 40	1: 80	1: 160	1: 320	1: 640	1: 1,280
No. 51	OT-sensitized trypsinized red cells	2	2	1'	0	0	0	0	0	##	##	##	±	-	-	-	-
No. 53		2	1'	0	0	0	0	0	0	##	+	±	±	-	-	-	-
No. 15	Red cells sensitized with trypsinized OT	3	2	2	2	1'	1'	0	0	##	##	##	##	##	+	-	-
No. 16		3	2	2	2	1	1'	1'	0	##	##	##	##	##	+	±	-
No. 381	OT-sensitized red cells	3	3'	2	1	1	1'	0	0	##	##	##	##	+	+	±	-
No. 383		3	3	2	2	1	1	1'	0	##	##	##	##	##	+	+	±

Table 4. Counts per ml of the blood withdrawn after the injection of OT-sensitized ^{51}Cr -labeled recipient's own red cells

Rabbit	Total counts in injected OT-sensitized red cells	Injected by	Counts per ml of the blood withdrawn after injection						
			10 m.	30 m.	6 hs.	1 day	3 days	5 days	7 days
No. 302	440,160	Intravenous route	2,600 (5.97) (100)	2,436 (94)	2,276 (87)	2,111 (81)	1,943 (75)	1,195 (46)	985 (38)
No. 303	270,270		1,862 (7.63) (100)	1,761 (95)	1,548 (83)	1,360 (73)	1,258 (68)	944 (51)	837 (45)
No. 275	372,430	Subcutaneous route	0	12	20	33	51 (0.14)	20	4
No. 276	340,130		0	7	14	27	47 (0.14)	16	4
No. 271	359,040	Intraperitoneal route	0	59	535 (1.06)	405	255	176	132
No. 279	216,000		0	25	228 (1.49)	174	118	75	50

() : the amount of ^{51}Cr (in counts/ml of blood) in a sample taken 10 minutes after the injection of OT-sensitized ^{51}Cr -labeled red cells, expressed in thousandths of the amount of ^{51}Cr injected to each animal

() : the amount of ^{51}Cr (in counts/ml of blood) in a sample taken at the stated time, expressed as the percentage of the amount of ^{51}Cr in the sample taken 10 minutes after the injection of labeled red cells to each animal

Table 5. Counts per ml of the blood after the injection of hemolysate of OT-sensitized ⁵¹Cr-labeled recipient's own red cells

Rabbit	Total counts in injected hemolysate of OT-sensitized red cells	Injected by	Counts per ml of the blood withdrawn after injection						
			10 m.	30 m.	6 hs.	1 day	3 days	5 days	7 days
No. 282	221,800	Intravenous route	1,426 (6.43) (100)	949 (66)	147 (10)	45 (3)	12 (1)	0	0
No. 291	245,440		1,373 (5.59) (100)	926 (67)	163 (12)	52 (4)	12 (1)	0	0
No. 285	163,750	Subcutaneous route	0	9	23 (0.14)	2	2	0	0
No. 286	155,660		0	5	20 (0.13)	2	1	0	0
No. 283	320,590	Intraperitoneal route	15	37	75 (0.23)	60	16	10	0
No. 284	309,540		9	30	74 (0.23)	51	11	8	0

Table 6. Counts per ml of the blood after the injection of trypsinized ⁵¹Cr-labeled recipient's own red cells or of ⁵¹Cr-labeled recipient's own red cells treated with inactivated trypsin

Rabbit	Injection of	Total counts in injected red cells	Counts per ml of the blood withdrawn after injection						
			10 m.	30 m.	6 hs.	1 day	3 days	5 days	7 days
No. 124	Trypsinized red cells	101,204	571 (5.64) (100)	377 (66)	156 (27)	10 (2)	0	0	0
No. 126		33,884	168 (4.96) (100)	111 (67)	43 (26)	5 (3)	0	0	0
No. 121	Red cells treated with inactivated trypsin	51,153	355 (6.94) (100)	337 (95)	315 (88)	300 (84)	166 (43)	153 (43)	148 (41)
No. 122		96,392	561 (5.82) (100)	527 (94)	448 (79)	441 (78)	229 (40)	209 (37)	196 (34)