



Title	ウサギの抗ハプテン応答に及ぼす担体の影響について
Author(s)	佐々木, 孝之; SASAKI, Takayuki; 木村, 卓郎 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 36, 23-28
Issue Date	1976-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26499
Type	departmental bulletin paper
File Information	36_P23-28.pdf



ウサギの抗ハプテン応答に及ぼす担体の影響について

佐々木孝之 木村卓郎 大原 達 清水正秀

(北海道大学免疫科学研究所 血清学部門)

(昭和50年11月11日受付)

ハプテン・担体系の免疫応答において、抗ハプテン抗体の産生は担体の種類によって強く影響される。免疫学的常識に従えば、担体として用いられる蛋白が被免疫動物の種属と遠い関係の動物に由来するものほど、一般に抗原性は強い。この場合、抗体産生に当っては起源を異にする2種類のリンパ球を必要とする事が、Clamanら^{1),2)}を始めとする多くの研究によって明らかにされている。ハプテン・担体複合物に対しては、胸腺由来のT細胞が担体を認識し、そのヘルパー作用を介して骨髄由来のB細胞が抗ハプテン抗体を産生する^{3)~6)}。細胞レベルにおけるこのような免疫応答の研究は、ほとんどすべてがマウスを用いて行われたもので、ウサギを用いた研究は甚だ少ない。ウサギにおいては均一な成績を示すべき近交系の確立していない事が研究を遅らせている原因の1つであろうが、同時に、ウサギのリンパ組織についてはまだ不明の点が多いこともその理由として挙げられよう。ウサギについて精力的に研究を続けて来た Richter一派⁷⁾によると、抗原を認識する antigen-reactive cell (ARC) は、ウサギの場合マウスと臓器由来を異にする。すなわちマウスの ARC は胸腺由来の T 細胞であるのに反し、ウサギの ARC は胸腺由来でなく骨髄に由来するものである、と Richter らは言う。もしウサギの胸腺が機能的にマウスのそれと異ったものがあるとするならば、条件によっては上記の免疫学的常識と異った結果の出る可能性も考えられる。事実ウサギ胸腺の摘出は抗ハプテン応答をかえって増強する、というマウスと反対の結果も報告されている⁸⁾。この点を考慮に入れて、われわれは (i) 抗原性の強い異種 γ -グロブリン、(ii) 抗原性の弱い同種 γ -グロブリン、(iii) 抗原性を持たない自己 γ -グロブリン、並びに (iv) 胸腺非依存性抗原であるサルモネラの lipopolysaccharide (LPS) の四者にそれぞれハプテンを結合せしめた複合物をもってウサギを免疫した。これらに対する抗ハプテン抗体の現われ方とその性状とを比較したので、得たる成績をここに報告する。

実験方法

(i) 動物：白色 albino ウサギを使用。雌雄混合であ

るが、成績のばらつきを出来るだけ少なくする目的で、可能な限り γ -グロブリンの allotype を同じくするウサギをそろえて実験に供した。実験ウサギの大部分はアロタイプ $a^3 a^3 b^4 b^4$ を持つもので、一部これと異なるものはいずれも実験成績の各表に示した通りである。

(ii) 抗原：ハプテンとしては全実験に 2,4-dinitrophenol (DNP) を用い、担体としてはウシ γ -グロブリン (BGG)、被免疫ウサギとアロタイプを異にするウサギ γ -グロブリン (RGG)、自己の γ -グロブリン (auto GG)、LPS、のほか一部の実験には卵白アルブミン (OVA) を用いた。担体として用いた RGG はアロタイプ $a^1 a^2 b^4 b^4$ のウサギから得た血清に等量の飽和硫酸を加え、沈澱を PBS に溶解、0.015 M リン酸緩衝液で透析後 DEAE-cellulose カラムを通して精製したものである。被免疫ウサギとしてはアロタイプ $a^3 a^3 b^4 b^4$ のものを用いたので、この場合 a locus におけるアロタイプの違いが認識されることになる。DNP と担体の coupling はすべて Eisen の方法⁹⁾ によった。

(iii) 免疫方法：各抗原 4 mg/ml に等量の complete Freund adjuvant (CFA) を混じ、その 1 ml を左右の足蹠に分けて注射した。抗体応答は免疫3週後に一部採血してこれを調べ、その後更に同様な注射を行って1週後 (初回免疫より通算30日) に二次応答を調べた。

(iv) 抗体価の測定：Stein and Ngu¹⁰⁾ の方法による補体結合反応と一部に間接赤血球凝集反応を行った。

(v) 抗体クラスの判定：2-mercaptoethanol (2ME) によって被検血清を処理し、2ME sensitive の抗体を IgM, resistant の抗体を IgG クラスと判定した。

実験成績

1. 異種、同種、自己 γ -グロブリンを担体とした場合におけるハプテン応答の比較

ウサギを3群に分ち、group I は DNP₄₄-BGG, group II は DNP₃₁-RGG, group III は自己の血清から精製した γ -グロブリンに DNP 結合せしめたものでそれぞれ免疫した。数字は担体1分子当りに結合したハプテン基の平均個数を示す。group III は各個体ごとに免疫原を作

表1 抗 DNP 抗体産生に及ぼす担体の影響

Group	Rabbit No.	Allotype	Immunogen	Origin of the Carrier Protein	Anti-DNP titer	
					Primary	Secondary
I	6	$a^3 a^3 b^4 b^4$	DNP ₄₄ -BG G	Xenogeneic	500	1100
	8	〃			1000	1800
	481	$a^1 a^3 b^4 b^4$			400	900
II	473	$a^3 a^3 b^4 b^4$	DNP ₃₁ -RGG	Allogenic	1400	1600
	474	〃			100	700
	475	〃			600	900
III	21	$a^3 a^3 b^4 b^4$	DNP ₅ -Auto GG	Autogeneic	100	400
	26	〃	DNP ₃₀ -Auto GG		50	300
	28	〃	DNP ₃₅ -Auto GG		100	400
	621	〃	DNP ₂₈ -Auto GG		0	N.D.
	622	〃	DNP ₂₈ -Auto GG		0	N.D.

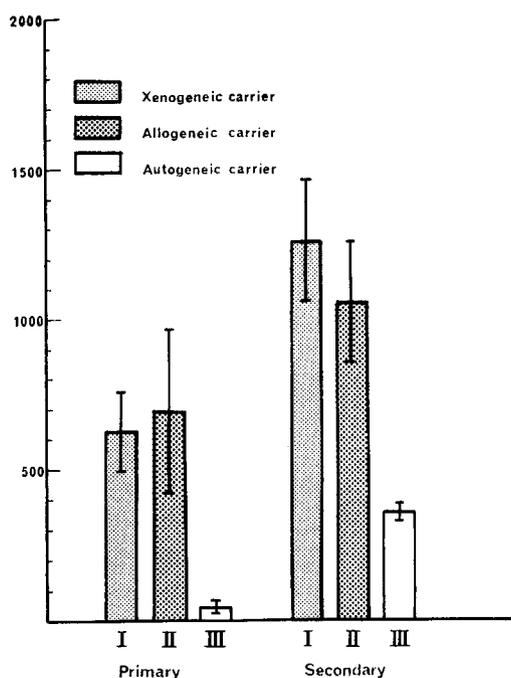


図1 抗 DNP 抗体価に及ぼす担体の影響

るので、ハプテン基の数をいろいろに変えてみた。それぞれの epitope density は表1に示した如くである。抗体価の測定は一次応答の3週目すなわち day 21 と二次応答の day 7 (一次免疫よりの通算 day 30) との2回行った。表1から明らかなように、ウサギにとって異種の BGG を担体とした場合に強い DNP 抗体応答を示したのは当然であるが、同種の RGG を担体とした group II

においてもこれと遜色ない応答がみられ、抗体産生において I, II 群間に差は認められなかった。これに反し、自己の γ -グロブリンを担体とした III 群のハプテン応答は前二者に比し明らかに低く、一次応答における平均力価は I, II 群の 1/10 以下に過ぎない。しかしその力価は低いにもせよ、自己由来の蛋白を担体とした場合にもハプテン応答が起ることは、注目すべきことであろう。この場合担体自身は抗原性を持たないが、ハプテン基の導入によって担体が何らかの修飾を受け、その結果として起る conformational な変化を T 細胞が認識することにより、DNP 抗体産生のシグナルが B 細胞に与えられたものと考えられる。なお DNP の担体1分子あたりの個数が5個のものから30個までの間に、特別な応答の差は見られなかった。図1は group I, II, III の一次および二次応答における平均値を図示したものである。

2. 担体で予備免疫した場合の抗ハプテン応答と担体の関係

ウサギにおいては、強い抗原刺激が T 細胞に与えられた場合、かえって応答が抑制される可能性も考えられるので、Sarvas ら¹¹⁾の言ういわゆる semisecundary response における担体の影響を調べてみた。すなわち前項と同じ実験を行うに先立って、先ず担体で動物を前処置しておき、3週後に実験1と同じ抗原を注射してハプテン応答を調べた。対照としては予備免疫を行わないもののほかに、CFA で予備免疫した動物を用いた。なお自己の γ -グロブリンで予備免疫することは意味がないので、この操作は行っていない。結果は表2に示す如くである。表2において day 21 の力価測定後二次免疫を

表2 ハプテン応答に及ぼす担体予備免疫の影響

Rabbit No.	Allotype	Preimmunization*	Immunized with:	Anti-DNP titer**	
				day 21	Day 30***
574	$a^3 a^3 b^4 b^4$	BGG	DNP ₄₄ -BGG	0	0
575	"			0	0
579	$a^3 a^3 b^9 b^9$			0	0
580	"			0	0
576	$a^3 a^3 b^4 b^4$	None		50	0
578	"			50	0
584	$a^3 a^3 b^9 b^9$			350	1100
585	"			100	0
476	$a^3 a^3 b^4 b^4$	BGG	DNP ₃₁ -RGG	0	Dead
478	"			50	200
486	"			800	Dead
487	"			50	200
489	"			300	800
480	$a^3 a^3 b^4 b^4$	CFA		0	200
488	"			100	300
473	$a^3 a^3 b^4 b^4$	None		100	700
474	"			600	900
475	"			1400	1600

* ハプテン・担体系による免疫の3週前に担体のみを足蹠に注射

** 補体結合反応による力価

*** Day 21 の力価測定後二次免疫を行ったので、Day 30 の力価は二次応答

表3 胸腺非依存性担体 LPS の抗体クラスに及ぼす影響

Rabbit No.	Ag	2 ME treatment	1° response			2° response	
			Day 10	Day 21	Day 35	Day 7	Day 14
15	DNP ₁ -LPS 2 mg (in CFA)	-*	20	40	20	20	40
		+**	0	0	0	0	0
-		40	160	80	80	120	
+		0	0	0	20	20	
354		-	640	160	160	320	160
		+	0	0	0	40	40
20	DNP ₃ -OVA 2 mg (CFA)	-	80	80	320	320	320
		+	0	0	120	320	320
449		-	<20	<20	160	320	320
		+	0	0	160	320	320

* - : 2ME 処理を行わない血清

** + : 2ME 処理血清

行ったので、Day 30 の力価は二次応答である。

異種の担体である BGG をもって予め処置されたウサギは、前処置を受けない動物に比し明らかにハプテン応答が抑制される。同種の担体 RGG で予め免疫された場合も、対照に比し反応は低い傾向を示したが、抑制の程度は BGG の場合ほど顕著ではなかった。CFA で前処置した場合は例数が少ないため断定的なことは言えないが、無処置対照に比し応答は弱いようである。この成績が真ならば、CFA によって non-specific な刺激を受けた T 細胞が、反応抑制的に働いたと考えるべきであろう。

3. 胸腺非依存性担体 LPS の抗体クラスに及ぼす影響

胸腺非依存性抗原 LPS を担体とした場合の DNP 応答と、胸腺依存性抗原 OVA を担体とした場合のそれと

表 4 LPS, OVA を担体とした抗ハプテン抗体画分の力価

Rab. No.	Ag	Fraction	Day 10	Day 20	Day 30
524	DNP ₂₄ -LPS 6.6 mg (without CFA)	WS*	0	16	16
		I**	N. D.	16	16
		II***	N. D.	0	0
525		WS	64	64	32
		I	N. D.	32	32
		II	N. D.	0	0
527		WS	32	128	64
		I	N. D.	64	32
		II	N. D.	0	0
528	WS	16	16	8	
	I	N. D.	8	16	
	II	N. D.	0	0	
530	DNP ₁₀ -OA 5.0 mg (without CFA)	WS	4	4	—
		I	N. D.	2	N. D.
		II	N. D.	1	N. D.
536		WS	4	4	—
		I	N. D.	2	N. D.
		II	N. D.	1	N. D.
540		WS	8	4	—
		I	N. D.	2	N. D.
		II	N. D.	2	N. D.

* WS: Wholeserum ** I: IgM fraction

*** II: IgG fraction

を比較し、抗体の発現およびその性状(免疫グロブリンのクラス)に差が現われるか否かを調べた。表3は DNP₁-LPS と DNP₃-OVA をそれぞれ CFA と共に 2mg ずつウサギ足臍に接種した場合の結果を経時的に示したものである。表から明らかな如く、LPS を担体とした場合と OVA を担体とした場合において、抗体の 2ME に対する態度には明らかな差が認められた。すなわち DNP-OVA 免疫ウサギは免疫の初期を除き、全経過を通じて DNP 抗体の大部分が 2ME 抵抗性であったのに対し、DNP-LPS で免疫されたウサギのそれは、初期はもちろんのこと二次免疫の後期においてもなお 2ME に感受性を示した。担体の相違はこのように抗体のクラスに影響を与え、LPS を担体とした場合のハプテン抗体は、IgM クラスのもののみならず出て来る。

CFA の抗体クラスに及ぼす影響を除去するために、次にわれわれは DNP₂₄-LPS および DNP₁₀-OVA をもって adjuvant なしにウサギを免疫し、得たる抗血清を Sephadex G200 によって、IgM (fraction I) と IgG (fraction II) に分画した後、全血清および各分画についてそれぞれ抗体価の測定を行った。表4に示す如く、DNP₂₄-LPS 免疫血清は IgM 画分のみ抗体活性が認められ、IgG 画分はすべて陰性であった。DNP₁₀-OVA の場合は adjuvant を用いなかったため全体的に反応が微弱で、確定的なことは言われない。

考 察

T 細胞は、B 細胞を抗体産生細胞へと分化せしめる helper cell であると共に、suppressor cell でもあるという新しい知見が加えられるに及んで、いわゆる T-ology は Gershon¹²⁾ のいう第3期 golden age を迎えた。T 細胞の免疫抑制作用についてはマウスを用いて夥しい研究がなされているのに反し、ウサギに関してはまだ謎の部分が多すぎる。著者らの1人佐々木の観察した hapten-carrier 系に対する胸腺摘出ウサギの反応増強もその例である。ウサギは胸腺が良く発達した動物である事から、強過ぎる抗原刺激は免疫抑制的に働くのではないかという前提のもとに、担体として抗原性の弱いものの方が抑制を受け難く、従ってより強いハプテン応答が得られるのではないかと期待したのであるが、結果は必ずしもその通りではなかった。しかし異種の担体より強くはなかったにせよ、同種の担体がこれと匹敵する応答を示したことは、免疫応答においてマウスとウサギの間に異ったものがあることを感ぜしめる。自己由来の担体を用いてもハプテン応答をみることは、特に異とするに足らない。このような Conjugate に対しハプテ

ン抗体産生の起ることは、既に先人^{13)~15)}の報告しているところである。

担体によってウサギを予備免疫した場合のハプテン応答は、マウスにおいて carrier effect と呼ばれているものと異った成績を示した。マウスにおいて、in vitro で培養された正常脾細胞は、単に hapten-carrier conjugate を加えただけでは通常 primary の抗ハプテン応答を起さないが¹⁶⁾、予め carrier 免疫された動物の脾細胞は十分なハプテン応答を示す¹⁷⁾。これは carrier effect の1つの表われである。一方 Sarvas ら¹¹⁾は、生体が抗原分子のある determinant に対しては既に曝されているが他の determinant に対しては初めての反応である場合、後者に対する応答を semisecondary response と呼んだ。semisecondary response は多くの場合 primary response より強いとされているが、われわれの場合はその逆であった。その原因としては、動物種属の相違も考慮に入れなければならないであろうが、preimmunization の量が結果を大きく左右すると思われる。この点について、上記 Sarvas ら¹¹⁾の行った実験は示唆に富んでいる。彼らはニワトリを NIP-BSA で免疫するに当たって、予め 200 μ g の BSA で priming を行っておくと anti-NIP response は強く抑えられるが、0.2 μ g の量では逆に NIP 応答が著明に増強するのをみた。後者の場合は priming による carrier-specific T helper cell の増殖がハプテン応答を増強せしめたのであり、前者 200 μ g の場合は高力価の BSA 抗体産生がハプテン応答を抑えたものと解釈される。これを一般化して言えば、carrier priming において helper effect が dominant な場合にはハプテン応答が増強し、humoral response が dominant な場合は応答が抑制される。ウサギの場合もこれと同じ説明が適当であるかどうかは分らないが、われわれと同様な成績は既に谷口ら¹⁸⁾によって報告されている。彼らはヘルパー作用と抑制作用を量的な差と考え、suboptimal の T 細胞は helper として働き、supraoptimal な数のそれは suppressor として働くと述べ、上述の現象を T 細胞の多寡によって説明している。いずれの解釈が正しいか、または両者とも正しいのか、今後検討を要する問題であろう。

担体の種類は、また産生する抗体のクラスに影響を与える。LPS は胸腺非依存性抗原であり、同時に IgM response のみしか起さない抗原であるが¹⁹⁾、このような抗原を担体とした場合のハプテン抗体も、そのクラスは IgM に属するものであった。LPS はよく知られた B cell mitogen であるから、T 細胞を介さずに直接 B 細胞に働き得る。胸腺依存性抗原を担体とする一般の

hapten-carrier 系の応答において、抗ハプテン抗体産生には T-B 協同作用を必須条件とするのに対し、T 細胞の協同なしに生じたハプテン抗体が IgM であることは、胸腺の発達しない下等動物の抗体が専ら IgM クラスのものである事と考え併せ興味深い。抗体には何故いろいろなクラスがあるのか、IgM から IgG への shift が起るメカニズムは何か、など免疫学上の重要問題についてまだ何も分っていないが、胸腺ないし T 細胞の分化と機能に関するより深い研究に、この問題を解く鍵が在りそうである。

なお hapten-carrier 系の応答においては、担体1分子あたりのハプテン基の数が産生する抗体の量、クラスおよび affinity に影響を与えるという報告を多数見受ける^{20)~26)}。これらの研究はほとんどマウスについて行われたものであるが、ウサギにおいてこの点を別の機会に検討したいと考えている。

結 論

1. ウサギの抗ハプテン抗体産生に及ぼす担体の影響を調べるため、異種、同種および自己の γ -グロブリンを DNP に結合した hapten-carrier 系で動物を免疫したが、抗原性の弱い同種 γ -グロブリンを担体とした場合のハプテン抗体産生は、異種のそれを担体とした場合と殆んど同程度であった。
2. 抗ハプテン応答は自己の γ -グロブリンを担体とした場合にも成立する。ただしその力価は同種、異種のグロブリンを担体とした場合に比し、明らかに低い。
3. hapten-carrier 系で免疫するに先立ち、予め carrier 単独で予備免疫を行うと、ハプテン応答は著明に低下する。特にこの効果は、異種グロブリンによる予備免疫の場合顕著であった。
4. 胸腺非依存性抗原 LPS を担体とした場合に出現する DNP 抗体は、専ら IgM クラスに属するものであった。
5. ウサギの胸腺ないし T 細胞の働きにおいて、マウスのそれと相違する点につき、若干の考察を行った。

引用文献

- 1) Claman, H. N., Chaperon, E. A. and Triplett, R. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **122**, 1167, 1966.
- 2) Claman, H. N., Chaperon, E. A. and Triplett, R. F.: J. Immunol., **97**, 828, 1966.
- 3) Mitchison, N. A.: Eur. J. Immunol., **1**, 18, 1971.
- 4) Mitchison, N. A.: Eur. J. Immunol., **1**, 68, 1971.
- 5) Raff, M. C.: Nature, **226**, 1257, 1970.

- 6) Feldmann, M.: Eur. J. Immunol., **2**, 130, 1972.
- 7) Abdou, N. I. and Richter, M.: Adv. Immunol., **12**, p. 240, 1970.
- 8) 谷口 克, 多田富雄: 第2回日本免疫学会総会記録. p. 231, 1972.
- 9) Eisen, H. N.: J. Immunol., **73**, 296, 1954.
- 10) Stein, G. J. and Ngu, D. V.: J. Immunol. **65**(1), 17, 1950.
- 11) Sarvas, H., Mäkelä, O., Toivanen, P. and Toivanen, A.: Scand. J. Immunol. **3**(4), 455, 1974.
- 12) Gershon, R. K.: In "Contemporary Topics in Immunology" Vol. 3 (Ed. Cooper, M. D. et al.), 1, 1974, Plenum Press.
- 13) Rubin, B.: Eur. J. Immunol. **3**(1), 26, 1973.
- 14) Yamashita, U., Takami, T. and Kitagawa, M.: Cell. Immunol. **18**(2), 396, 1975.
- 15) Walters, C. S., Moorhead, J. W. and Claman, H. N.: J. Exp. Med., **136**(3), 546, 1972.
- 16) Feldmann, M.: J. Exp. Med., **135**(4), 735, 1972.
- 17) Kunin, S., Shearer, G. M., Globerson, A. and Feldmann, M.: Cell. Immunol. **5**, 288, 1972.
- 18) 谷口 克, 多田富雄: 第3回日本免疫学会総会記録. p. 300, 1973.
- 19) Rowley, D. and Turner, K. J.: Immunology, **7**, 394, 1964.
- 20) Mäkelä, O.: Transpl. Rev., **4**, 3, 1970.
- 21) Aird, J.: Immunology, **20**, 617, 1971.
- 22) Kontiainen, S.: Int. Arch. Allergy Appl. Immunol., **41**, 729, 1971.
- 23) Rubin, B.: Eur. J. Immunol. **2**, 5, 1972.
- 24) Rubin, B.: Eur. J. Immunol. **3**, 26, 1973.
- 25) Larralde, C. and Janof, P.: Immunochemistry, **9**, 1209, 1972.
- 26) Klaus, G. G. B. and Cross, A. M.: Cell. Immunol. **14**(2), 226, 1974.

Effects of Carrier Protein on the Anti-Hapten Response in Rabbits

Takayuki SASAKI, Takuro KIMURA, Tohru OHARA
and Masahide SHIMIZU

Effects on rabbit anti-hapten response of carrier proteins were investigated by the use of various hapten-carrier conjugates of DNP and proteins differing in their origin: that is, the conjugates of DNP and (i) xenogeneic, (ii) allogenic, as well as (iii) autogeneic γ -globulins. Following results were obtained.

1) The anti-hapten response in rabbits against hapten-carrier conjugate using allogeneic γ -globulin as carrier which has weaker antigenicity than the xenogeneic one were almost in the same range of strength as against hapten-xenogeneic γ -globulin complex.

2) Anti-hapten response was observed against hapten-carrier conjugates even when the origin of carriers was autologous, but the response was much weaker than the case where the carriers were of xenogeneic or allogeneic origin.

3) Anti-hapten response was markedly reduced if the animals were previously immunized with carrier protein before the above-described hapten-carrier immunization. The effect was most remarkable when animals were pre-treated with xenogeneic γ -globulin.

4) Anti-DNP antibody stimulated by DNP conjugated with thymus-independent antigen LPS was of predominantly IgM class.

5) Discussions were made of some points which suggest the existence of some functional difference between rabbit and mouse thymocytes or T cells.