



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	月令3カ月のウサギにおける胸腺摘出の免疫学的効果について
Author(s)	佐々木, 孝之; SASAKI, Takayuki; 大原, 達 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 36, 29-33
Issue Date	1976-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26500
Type	departmental bulletin paper
File Information	36_P29-33.pdf



月令3カ月のウサギにおける胸腺摘出の 免疫学的効果について

佐々木孝之 大原 達 加藤由美子

(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)

1961年 Miller¹⁾ がマウスにおける胸腺摘出の免疫学的効果について報告して以来、長い間謎であった胸腺の機能と意義は、ようやくわれわれの前に明らかにされるに至った。すなわち新生児期にマウスから胸腺を摘除すると、末梢血リンパ球数が激減すると共に、抗体産生は著明に低下することを見だしたもので、この観察は今日隆盛を極めているいわゆるT細胞学(T-ology)の基礎を築いたものである。しかしながら、胸腺摘出の効果は動物の種属によって必ずしも同じではない。Millerが最初に報告したような neonatal thymectomy の効果はマウスのある系統や golden hamster では見られるけれども、イヌでは効果が全く認められないし、ウサギでもその効果は極めて少ないとされている²⁾。のみならずマウス以外の動物については、Miller と反対の成績さえ報告されており、例えば谷口³⁾ はウサギにおいて、Tada⁴⁾、⁵⁾ はラットにおいて、T細胞を枯渇せしめることによってそれぞれハプテンに対するIgG抗体、IgE抗体の産生が増強するのを見ている。著者らの1人佐々木⁶⁾ も、生後1カ月目に胸腺摘出手術を受けたウサギは、非摘出群に比し有意の差をもって抗ハプテン応答が高いことを観察した。

動物種属の差によるこのような相違が何に由来するものか明らかでないが、T細胞の持つ2つの働き、すなわちヘルパー作用と suppressor 作用の表現が、動物によって異なる可能性は一応考えてよかろう。この2つの作用が同じT細胞によって営まれるのか、あるいは異なった subpopulation のT細胞がこれを行うのか、については意見の分れるところであるが、両者の個体発生的ないし経時的な発現については、ある程度一致した報告がなされている。Droege⁷⁾ によると、ニワトリにおいて suppressor T cell は幼若ヒナ(0~2週)の持つ主要なT cell type であるのに対し、8カ月の成熟したニワトリのT細胞は suppressor 活性を全く持たないと言い、Mosier⁸⁾ はマウスにおいて、新生児の胸腺は suppressor 作用が強くと、この作用はマウスの週令が進むに

つれて減弱すると述べている。ウサギにおいて neonatal thymectomy により免疫応答が増強したのは、suppressor T cell が除かれた為と解釈するのが最も安易な道であろうが、上記ニワトリやマウスに analogy を求めるならば、この動物もより月令の進んだ遅い時期に胸腺摘出を行った場合には、上述の増強効果が見られないか、または減弱する可能性は当然考えられよう。佐々木⁶⁾ が以前に行った実験は1カ月令および2カ月令のウサギについてのものであったので、われわれは今回生後3カ月目のウサギを2群に分け、胸腺を摘除した群としない群について抗体産生を一次応答から三次応答まで85日間に亘って follow up すると共に、抗体のクラスに差が出るか否かについても調べた。更に一部の血清については間接赤血球凝集反応による抗体価と補体結合反応によるそれとの比較を行ったので、得たる成績を以下に報告する。

実験方法

(i) 動物 用いた動物は、出生日を同じくする白色 albino ウサギ合計9羽で、うち5羽は生後3カ月目に胸腺摘出を行い、残り4羽を対照とした。この際アロタイプの違いによって応答に差の出る可能性を排除するため、胸腺摘出群と対照群の間にアロタイプの偏りがないように配分した。群別と個々のウサギのアロタイプは表1に示す如くである。

(ii) 抗原 Eisen⁹⁾ の方法によって作ったウシ-Y-グロブリン(BGG)と2,4-dinitrophenol(DNP)との conjugate を免疫原として用いた。BGG 1分子当りに結合したDNP基の平均個数は19である。

(iii) 免疫スケジュール 胸腺摘出後2カ月、すなわち生後5カ月目のウサギに、DNP₁₉-BGG 2mg を complete Freund adjuvant と共に両足趾に接種した。免疫は day 0, day 29, day 57 の3回行い、二次免疫以後の adjuvant には incomplete のものを用いた。

(iv) 抗体価の測定 microtiter plate を用いた間接赤血球凝集反応(HA)によって anti-DNP の抗体価を求

表1 実験動物の群別とアロタイプ

Rabbit No.	Sex	Thymectoms	Allotype
33	♂	Yes	$a^1 a^3 b^4 b^4$
34	♀	Yes	$a^1 a^3 b^4 b^9$
35	♀	Yes	$a^1 a^3 b^4 b^9$
36	♂	Yes	$a^1 a^3 b^4 b^4$
37	♀	Yes	$a^1 a^3 b^4 b^4$
38	♀	No	$a^1 a^3 b^4 b^9$
39	♀	No	$a^1 a^3 b^4 b^9$
40	♀	No	$a^1 a^3 b^4 b^9$
41	♂	No	$a^1 a^3 b^4 b^4$

めた。用いた反応原は DNP₂₅-HSA を Boyden の方法により SRBC に結合せしめたものである。なお一部の血清については Stein and Ngu¹⁰⁾ の方法によって補体結合反応 (CFT) を行い、その力価を求めた。HA 価の測定は day 10, 14, 22, 29, 36 (2次 day 7), 42 (同 13), 50 (同 21), 64 (3次 day 7), 85 (同 28) の合計 9 回行った。

(v) 抗体クラス判定 測定された抗体が IgM クラ

スのものか IgG クラスのものかを判定するため、2-mercaptoethanol (2ME) によって血清を処理したあとの抗体価と処理前の力価とを比較した。すなわち microplate で凝集像を判定、記録した後これを攪拌し、dropper で 0.1 M の 2ME 0.025 ml を加えて翌日再び凝集像を観察した。IgM 抗体は 2ME によって不活化されるから、低下した力価が IgM の抗体価に相当する。

実験成績

1. 抗ハプテン応答における胸腺摘出 (3 カ月) 群と対照群の比較

DNP₁₉-BGG に対する primary, secondary, tertiary response を経時的に調べた結果を表 2 に、胸腺摘出群と対照群の各測定時における算術平均値を図 1 にそれぞれ示した。抗体価の平均は幾何平均値を求めるのが理論的に正しいが、いわゆる終価法によって求めた抗体価は最初の 1 桁の数字にやゝ真を置き得るのみで、2 桁目以下にさほどの意味はないから、近似的に大差のない算術平均値を求めたものである。

表2 胸腺摘出ウサギおよび対照ウサギにおける抗ハプテン抗体価の消長

ウサギ番号	一次応答				二次応答*			三次応答*		
	day 10	day 14	day 22	day 29	day 7	day 13	day 21	day 7	day 28	
胸腺摘出群	33	80 20**	80 40	320 320	640 320	1280 640	1280 640	2560 1280	1280 640	1280 640
	34	320 80	640 160	1280 640	1280 1280	2560 1280	2560 1280	2560 1280	5120 1280	2560 2560
	25	320 40	320 80	640 320	1280 640	1280 640	640 640	1280 640	1280 320	2560 1280
	36	320 80	640 80	2560 N.D.***	5120 2560	5120 1280	2560 1280	2560 2560	5120 1280	2560 2560
	37	160 20	320 80	1280 640	640 640	1280 640	1280 640	640 640	1280 640	2560 640
対照群	38	640 80	640 160	640 640	640 320	1280 640	640 320	1280 640	1280 640	2560 320
	39	160 20	160 40	1280 320	1280 640	5120 1280	2560 1280	2560 1280	5120 320	1280 320
	40	320 40	320 80	1280 640	1280 640	2560 2560	5120 2560	2560 1280	5120 1280	2560 640
	41	160 40	320 160	5120 2560	10240 2560	5120 2560	2560 1280	2560 1280	5120 N.D.	2560 1280

* それぞれ抗原の二次、三次注射を行った日を day 0 とした

** 下段の数字は 2ME 処理後の力価を示す

*** N.D.: not done.

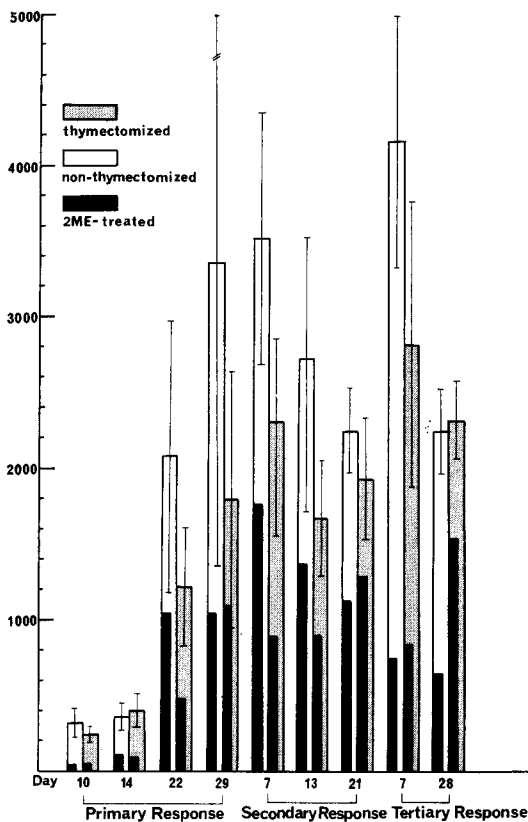


図1 胸腺摘出群と非摘出群における anti-DNP 抗体価の経時的比較

表2による個々の値をみても、図1の平均値をみても、胸腺を摘出した群と摘出しない対照群との間に、抗ハプテン応答における差はみられない。ただ2, 3の測定時期において、胸腺摘出群の応答がやや低い傾向を示したが、この差は推計学的に有意でなかった。すなわち生後3カ月を経ると、ウサギの胸腺摘除は抗体産生にほとんど影響を与えないものと思われる。また、アロタイプ $a^1a^3b^4b^4$ と $a^1a^3b^4b^9$ の間には、少なくとも本実験に用いた抗原に関する限り、応答に差を認めなかった。2ME処理の影響を受けやすいのは初期の血清で、後期の血清が比較的影響を受けにくい傾向を示したのは従来の報告と一致するが、若干の例外も認められた。この事は、従来報告されていたよりも IgM 抗体産生は長く続くことを示していると言えよう。ただしその量は、数字の示すほど多いものかどうか疑わしい。HA の IgM 検出感度は、IgG の数十倍ないし数百倍強い¹¹⁾からである。

2. HA および CFT による力価の比較

実験ウサギ全9羽の保存血清から任意の時期のもの2種 (day 22 と day 85) を択んで CFT を行い、50% 溶血

表3 HA 力価と CFT 力価の比較

Rabbit Number	Day 22		Day 85	
	HA	CFT	HA	CFT
33	320	660	1280	1110
34	1280	2250	2560	2340
35	640	620	2560	1230
36	2560	2460	2560	1950
37	1280	1560	2560	1140
38	640	1110	2560	1200
39	1280	1170	1280	1110
40	1280	1090	2560	1320
41	5120	3750	2560	2500

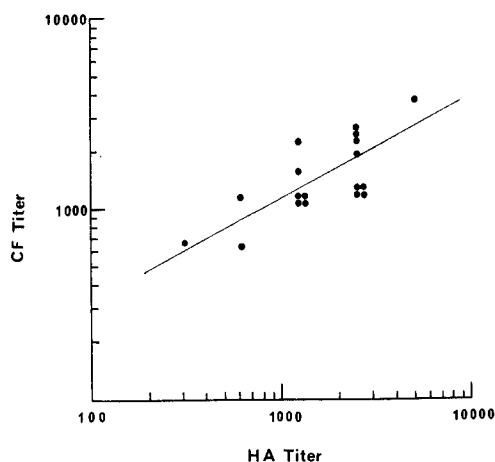


図2 HA 力価と CFT 力価の相関関係

を指標として抗体価を測定した。その力価と HA 価を比較したのが表3、両者の相関関係を plot したのが図2である。全サンプル18の血清について両力価の相関係数を求めると、 $r=0.777$ で、危険率 $\alpha=0.05$ においてこの値は有意の相関を示した。

考 察

T および B リンパ球に関する研究は、これまでマウスを中心にニワトリ、ラットなどを用いて活潑に進められて来たが、ウサギについての研究はこれらに較べかなり遅れた状態にある。しかもウサギのリンパ組織は、同じ齧歯類でありながら、マウスのそれと性状や機能においてかなり異なったものがあるように思われる。ウサギについて系統的な研究を続けている Richter 一派¹²⁾によると、マウスの T 細胞に相当する細胞は、ウサギにおいては胸腺に由来するものでなく、骨髓に由来する細胞で

あり、抗体産生細胞ないしその前駆細胞の由来は不明であると言う。後者に関しては *sacculus rotundus*, *appendix*, *Peyer's patches* 等いわゆる SAPP organ や扁桃などにその起原を求めようとする説が出されているものの、いまだいずれも定説には至っていない。ウサギが他の実験動物に比し特異な点は、虫垂のリンパ組織が異常に発達していることで、この動物のリンパ組織中では最も大きいものの1つであり、他に虫垂の良く発達した動物としてはヒトおよび類人猿を挙げ得るだけである¹³⁾。この点ウサギはヒトのモデル動物として適した動物と言えよう。また若いウサギの胸腺は良く発達していることが知られている。これがマウスの胸腺と同じ働きを持つものか否かは別として、マウスにとって胸腺依存性抗原である *hapten-carrier* 系に対し、ウサギでは新生児胸腺摘出が抑制的に働かないばかりか、むしろ応答を増強するような結果が得られている事は既に述べた。しかし生後3カ月目に胸腺摘出を行った今回の実験では、このような増強効果が認められなかったと同時に、抑制作用もまた認められなかった。すなわち生後3カ月を経ると、胸腺の有無はウサギの場合免疫応答にさしたる影響を持たない。現象面だけから見ると、*thymectomy* を行う以前の3カ月間に胸腺を出て末梢に *migrate* した T 細胞のうち、抗原接種時の5カ月まで生き残った細胞は、もはや抑制作用を持たないように思われる。ただしこれが質的のものか量的なものかは一概に決められない。この成績から言える事は、ウサギにおいて、胸腺の存在は生後早い時期においてのみ免疫抑制的に働き、3カ月になるとこの作用は見られなくなる、という事である。

前述の如く幼若ウサギの胸腺は良く発達しているの、これが“too much help”となって免疫抑制に働くというマウスでの考え方^{14)~16)}をこれにあてはめることも出来るが、現在では、X線感受性の相違や遺伝的制御の相違などから、*suppressor* と *helper* を異った type の細胞とする考えが、より多くの支持を受けているように思われる。しかしながら、マウスの T 細胞に相当するものがウサギにおいては、骨髄由来であるという前記 Richter らの説が正しいとするならば、ウサギ胸腺の意義については更に検討を要することになる。

胸腺依存性抗原に対するマウスの応答において、胸腺摘出により著明な反応低下を来すのは IgG 応答に限られ、一般に IgM 応答はさほど影響を受けないとされている^{17)~21)}。今回の実験はマウスと意義の異なるかも知れないウサギの胸腺摘出であり、しかも *neonatal* の *thymectomy* ではなかったけれども、一応胸腺の有無が

抗体のクラスに影響を与えるか否かについて調べてみた。その結果、対照との間に免疫グロブリン・クラスの差を見だし得なかったが、この成績はわれわれの予期したところである。*young adult thymectomy* そのものが免疫応答に影響を与えなかったのであるから、抗体クラスに差を示さなかったのも当然であろう。

上述の如き成績が血清学的 assay の違いによって異なるものになるかどうかを確かめる一助として、間接赤血球凝集反応の力価と、補体結合反応の力価とを比較してみた。古く教室の池端ら²²⁾は結核血清について、沈降反応と補体結合反応は性格が異なること、両反応に与かる抗体はその消長においても、力価においても無関係であることを報告しているの、われわれは HA 価と CFT 価の間にもある程度の喰い違いを予想していたのであるが、図2の如く両者の間には正の相関が認められた。池端らとの研究の間に CFT は共通しているが、他の一方が異っているの、沈降反応と HA は性格の異なるものか否かが次の問題となろう。この点は別の機会に追究してみたいと考えている。

結 論

月令3カ月のウサギから胸腺を外科的に摘出し、2カ月後に DNP-BGG を接種してハプテン応答を調べ、次の成績を得た。

1. 生後3カ月を経ると、胸腺の有無はハプテン応答に何ら影響を与えない。さきわれわれの教室では生後1カ月の *thymectomy* によりハプテン応答が明らかに増強するのを見ていたが、かゝる効果はその後急速に失われるものと思われる。
2. 月令3カ月のウサギの *thymectomy* は、抗体のクラスにも影響を与えない。
3. 胸腺摘出ウサギのハプテン応答において、間接赤血球反応による力価と補体結合反応による力価は、正の相関を示した。

引用文献

- 1) Miller, J. F. A. P.: *Lancet*, **2**, 748, 1961.
- 2) Burnet, M.: In "Self and Not-Self" (*Cellular Immunology Book One*). p. 64, Melbourne University Press, Australia, 1969.
- 3) 谷口 克・多田富雄: 第2回日本免疫学会総会記録. p. 231, 1972.
- 4) Okumura, K. and Tada, T.: *J. Immunol.*, **107**, 1682, 1971; *ibid.*, **106**, 1019, 1971.
- 5) Tada, T., Okumura, K. and Taniguchi, M.: *J. Immunol.*, **108**, 1535, 1972.

- 6) 佐々木孝之：未発表。
- 7) Droege, W.: In "The Immune System; Genes, Receptors, Signals" (E. E. Sercarz, A. R. Williamson and C. F. Fox, eds), p. 431, Acad. Press, New York, 1974.
- 8) Mosier, D. E. and Johnson, B. M.: *J. Exp. Med.*, **141**(1), 216, 1975.
- 9) Eisen, H. N., Belman, S. and Carsten, M. E.: *J. Immunol.*, **72**, 296, 1954.
- 10) Stein, G. J. and Ngu, D. V.: *J. Immunol.*, **65**(1), 17, 1950.
- 11) 大原 達・木村卓郎：結核の研究. **27-28**, 35, 1968.
- 12) Abdou, N. I. and Richter, M.: *Adv. Immunol.*, Vol. 12, p. 240, 1970.
- 13) 花岡正男：現代生物科学. **13**, 89, 1975, 岩波書店.
- 14) Feldmann, M. and Nossal, G. J. V.: *Transpl. Rev.* **13**, 3, 1972.
- 15) Feldmann, M.: *Nature, New Biol.*, **242**, 82, 1973.
- 16) Huchet, R. and Feldmann, M.: *Eur. J. Immunol.*, **4**, 768, 1974.
- 17) Taylor, R. B. and Wortis, H. H.: *Nature*, **220**, 927, 1968.
- 18) Haskill, J. S., Marbrook, J. and Elliott, B. E.: *Nature*, **233**, 237, 1971.
- 19) Dressor, D. W.: *Eur. J. Immunol.*, **2**, 50, 1972.
- 20) Hess, M. W.: *Experimental Thymectomy*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg and New York, 1968.
- 21) Pantelouris, E. M. and Flisch, P. A.: *Immunol.* **22**, 159, 1972.
- 22) 池端 隆・沼田達夫・石山司浪・平野五郎：結核の研究. **9**, 38, 1958.

Anti-Hapten Antibody Response in Rabbits Thymectomized 3 Months after Birth

Takayuki SASAKI, Tohru OHARA
and Yumiko KATO

1) Rabbits thymectomized at their age of 3 months old were immunized with DNP-BGG two months after surgical operation, but the thymectomy in this stage has little or no effect on the anti-hapten response, in contrast with our previous experiment showing that the thymectomy one month after birth has resulted in marked enhancement of the response. Thus, the enhancing effect of thymectomy on antibody response observed in earlier stage of life seemed to decrease rapidly by 3 months after birth.

2) Positive relationship was observed between the antibody titers assayed by passive hemagglutination and those titrated by complementfixation test.