



Title	抗モルモット胸腺細胞血清の作製とその特異性
Author(s)	武田, 純子; TAKEDA, Junko; 奥山, 春枝 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 38, 71-74
Issue Date	1978-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26513
Type	departmental bulletin paper
File Information	38_P71-74.pdf



抗モルモット胸腺細胞血清の作製とその特異性

武田純子 奥山春枝 森川和雄

(北海道大学免疫科学研究所病理部門)

(昭和52年11月5日受付)

マウス^{1,2)}, ラット^{3,4)}, ヒト^{5~7)}のT細胞に対する抗血清は細胞の分類同定を目的として使用されている。一方、モルモットのT細胞と特異的に反応する抗血清の作製はすでに Shevach⁸⁾らによって報告されている。

我々も抗モルモット胸腺細胞血清をウサギに作製し、細胞毒性試験及びロゼット形成阻止試験によりその特異性を検討した。

実験材料と実験方法

1. 抗胸腺細胞血清の作製

抗胸腺細胞血清は清水らの方法に従って作製した。すなわち正常の Hartley 系モルモットの胸腺細胞 1×10^8 細胞を Hanks 1 ml に浮遊させ正常ウサギに1週間隔で3回腹腔内注射した。3回感作1週後に一部採血し細胞毒性により抗体価を測定した。十分な抗体価の得られなかった場合は更に1~2回同様に感作をくり返して抗体価を上げ最終感作後1週目に全採血をして抗血清を得た。この抗胸腺細胞血清は56°C, 30分間非働化し、実験に供するまで-20°Cに冷凍保存した。以上この未吸収の抗血清をAGTSと記載した。

2. 抗胸腺細胞血清の吸収^{8,13)}

正常の Hartley 系モルモットより赤血球, 肝細胞, 骨髄細胞を採取し Hanks で数回洗浄後吸収に供した。吸収はAGTSに細胞パックを0.2容加え室温30分間放置後, 1,500 rpmで遠心し上清を得た。この操作を赤血球で2回, 肝細胞で3回, 骨髄細胞で5回順次に実施した後10,000 rpmで30分間遠心した後上清を回収した。この吸収抗血清(以下 ab-AGTS という)を1 ml 宛に分注し使用時まで-20°Cに冷凍保存した。

3. 細胞毒性試験

前述のようにして作製した抗血清を, 10倍, 20倍, 40倍, 80倍, 160倍, 320倍に稀釈調製後, 補体として正常モルモット血清(1:3)¹⁴⁾を用い, 前報の方法^{14~16)}に従って細胞毒性活性を測定した。標的細胞は次のようにして作製した。

細胞浮遊液^{17,18)}: Hartley 系成熟モルモットをエーテル麻酔により殺し, 胸腺, リンパ節, 脾, 骨髄を採取し

た。各臓器を2%牛血清加 Eagle MEM (pH 7.4) 中で小さい組織塊に切断し, それらをステンレスメッシュ(100メッシュ)を通した後, Ficoll-Conray¹⁹⁾ 比重遠心法によって細胞を分離した。次いで上記 medium にて3回洗浄後, 牛血清を含まない Eagle MEM (pH 7.4) に再浮遊し各々 5×10^6 /ml に調製した。

4. E-ロゼット形成阻止試験

胸腺, リンパ節, 脾中のリンパ球を前述の方法に従い10%胎児牛血清加 Ergle MEM (pH 7.4) にて 1×10^7 /ml に調製した。各臓器の細胞浮遊液0.3 ml を20倍に稀釈した同量の ab-AGTS, NRS (正常ウサギ血清), PBS (pH 7.4) と共に4°C, 30分間静置した。その細胞を同上 medium にて3回洗浄したあと, Wilson and Coombs の方法²⁰⁾に従ってE-ロゼット形成試験を行った。すなわち ab-AGTS 処理した細胞浮遊液0.3 ml に新鮮なよく洗浄した1%ウサギ赤血球浮遊液0.3 ml を加え4°C, 1時間静置した。その後800 rpmで5分間遠心しそのまま室温にて25分間, 次いで4°Cにて1.5時間放置した。その後静かに振って再浮遊液とし, E-ロゼット形成細胞を測定した。この場合, ウサギ赤血球を2個以上付着しているリンパ球を陽性とし, 少なくとも200個以上のリンパ球を測定した。

成 績

1. 細胞毒性試験

胸腺細胞, 骨髄細胞に対する未吸収の抗血清 AGTS の細胞毒性試験を Fig. 1 に示した。胸腺細胞に対する細胞毒性は10倍, 20倍稀釈では100%を示し, 160倍でも89%を示した。骨髄細胞に対しては10倍稀釈液では20%近くを示し40倍稀釈液でも顕著な低下はみられなかった。

吸収した抗血清 ab-AGTS の胸腺細胞, リンパ節細胞, 骨髄細胞, 脾細胞に対する細胞毒性を Fig. 2 に示した。ab-AGTS は, 80倍稀釈までは胸腺細胞に対して高い細胞毒性を示し160倍から低下した。リンパ節細胞, 脾細胞に対しては20倍稀釈まで50%以上の細胞毒性を示した。骨髄細胞に対しては低い値を示し, 40倍稀

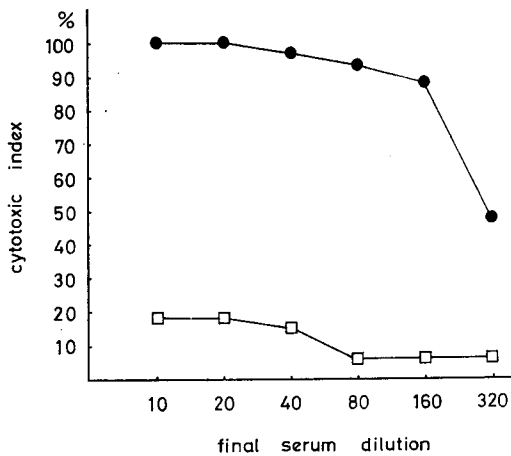


Fig. 1. Cytotoxic activity of unabsorbed rabbit anti-guinea pig thymus cell serum against thymus cells (●) and bone marrow cells (□) of normal guinea pigs.

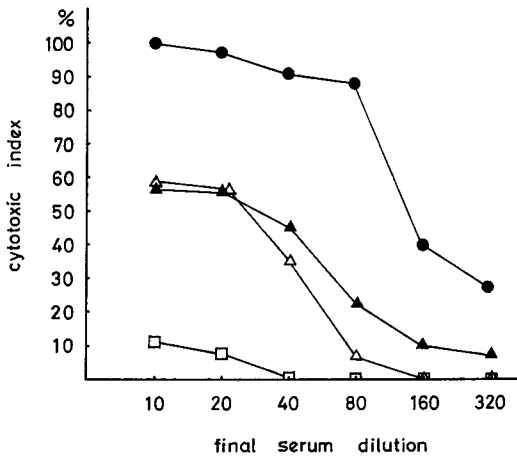


Fig. 2. Cytotoxic activity of absorbed anti-guinea pig thymus cell serum against lymphoid cells of different lymphoid organs, thymus cells (●), bone marrow cells (□), spleen cells (△) and lymph node cells (▲).

積では細胞毒性を全く示さなかった。Fig. 2 より、ab-AGTS の 20 倍が適当と考えられるのでこの濃度を用いて以下の実験を行った。

2. 抗胸腺血清による E-ロゼット形成阻止

ab-AGTS の E-ロゼット形成に対する影響を Table 1 に示した。NRS で前処置した場合は胸腺細胞中の 84%、リンパ節細胞中の 40%、脾細胞中の 33% が E-ロゼット形成を示した。しかし、ab-AGTS の 20 倍稀釈液で前処置すると胸腺細胞、リンパ節細胞、及び脾細胞とウサギ赤血球とのロゼット形成が殆んど阻止された。

Table 1. Influence of the absorbed anti-guinea pig thymus cell serum on E-rosette forming cells of the thymus, lymph node and spleen

Cell source	Number of rosette forming cells per 100 lymphocytes after incubation with		
	PBS	NRS* (1:20)	ab-AGTS (1:20)
Thymus	71	84	1
Lymph node	39	40	2
Spleen	16	33	2

* NRS=Normal rabbit serum

考 案

モルモット T 細胞を同定する方法には E-ロゼット形成試験の他に細胞毒性試験あるいは膜蛍光法による抗 T 細胞血清との反応性の検討などがある。

Stevach²¹⁾らは、モルモット胸腺細胞を CFA と共にウサギに免疫して抗胸腺細胞血清を作製し、L₂ C lymphoma での数回の吸収により T 細胞に特異的な抗血清を得た。更に、Stadecker²²⁾らは同様の方法で抗胸腺細胞血清を作製した。しかし彼らの作製した抗血清は残余の T 細胞以外に対する抗体の除去が完全に出来ないために良い結果が得られなかった。

我々も数匹のウサギを用いてモルモット胸腺細胞に対する抗血清の作製を試みた。

未吸収の抗胸腺細胞血清は骨髄細胞に対しても 20% 近くの数値を示し、稀釈率を上げて無視できない値であった。しかし、正常モルモットの赤血球、肝細胞、脾細胞及び骨髄細胞での数回にわたる吸収により骨髄細胞に対する細胞毒性は殆んどみられなくなった。吸収の不十分な抗血清では骨髄細胞に対してかなりの細胞毒性を示した(ここには載せていない)。このことは、Godfrey²³⁾らが報告したように、抗血清は吸収細胞での吸収回数が多いほど特異性が高くなるという結果と一致している。

吸収した抗血清 (ab-AGTS) の 20 倍稀釈液は補体の存在下で胸腺細胞の 95% 以上、リンパ節細胞の 59.8%、脾細胞の 57.6% に対して細胞毒性を示した。なお ab-AGTS は、胸腺細胞、骨髄細胞に対しては安定した細胞毒性を示したのに比較し、リンパ節細胞、脾細胞に対してはかなりばらついた数値を示した。Stadecker²²⁾ら、Godfrey²³⁾らは、リンパ節細胞に対しては、それぞれ、55~61%、44~64%、また脾細胞に対してはそれぞれ 32~35%、29~15% の細胞毒性を示したという。我々

の数値と比較するとリンパ節細胞については一致がみられたが、脾細胞ではかなり低い値を示している。これらの違いはモルモットの個体差によるかあるいは実験条件の差異によると考えられる。更に抗血清の抗体価は免疫するウサギのもつ自然抗体にも影響をうける²³⁾ という報告をも考え合わせ今後検討するつもりである。

ヒトのT細胞マーカーとしてヒツジ赤血球とのロゼット形成²⁴⁻²⁶⁾ が知られているが、モルモットT細胞とウサギ赤血球とのロゼット形成について最初に Brain, Gordon and Willetts²⁷⁾ らによって、次いで Wilson and Coombs²⁸⁾, Stadecker, Bishop and Wortis²²⁾ 及び Radaszkiewicz and Denk²⁹⁾ らによって報告された。彼らはこのE-ロゼット形成をモルモットT細胞マーカーとして用いることができると報告した。

そこで我々は作製した抗胸腺細胞血清がT細胞表面抗原と特異的に反応するかどうかを検討するためにモルモット胸腺細胞、リンパ節細胞、脾細胞を予め抗血清で処理してロゼット形成阻止試験を行った。

このようなE-ロゼット阻止試験は、抗胸腺細胞血清を *in vitro* で分析するための最も標準的な方法とされている。

Table 1 から見られるように、対照群として NRS で予め処理した場合は、胸腺細胞の84%、リンパ節細胞の40%、脾細胞の33%がE-ロゼットを形成したのに反し、抗胸腺細胞血清で前処理した場合は、胸腺細胞、リンパ節細胞、脾細胞中のT細胞によるE-ロゼット形成をほぼ完全に阻止した。これらの結果は Schepers³⁰⁾ らの結果と一致した。

Fig. 2 と Table 1 から NRS で処理したE-ロゼット形成細胞のT細胞の割合に多少の差が見られている事実についてであるが、Gattinger³¹⁾ らは、T細胞表面上のE-受容体と抗胸腺細胞血清と反応する表面抗原との間の立体関係についてT細胞表面において彼らの見た表面抗原とE-受容体は異なる膜成分であるということ、また抗胸腺細胞血清中には、各々に対する2種の抗体が存在し、特にE-受容体に対する抗体の濃度が低いために細胞毒性試験による成績よりも、E-ロゼット形成細胞の割合が低く表現されたと報告している。我々が行った細胞毒性試験とNRS前処理群のE-ロゼット形成試験にみられる前述の差異も彼らの考えによれば説明が可能であろう。

以上我々の作製した抗胸腺細胞血清は、細胞毒性試験及びE-ロゼット阻止試験の結果より、モルモットT細胞に特異的なものと考えられるが、今後更に検討を加えたい。

結 論

Hartley系モルモットの胸腺細胞に対する抗血清をウサギに作製した。これに正常モルモット赤血球、肝細胞、骨髄細胞を加えて吸収すると胸腺細胞に対し80倍稀釈まで高い細胞毒性を示した。

リンパ節細胞、脾細胞に対しては20倍稀釈で約60%、骨髄細胞には10%以下の細胞毒性を示した。

次に胸腺細胞、リンパ節細胞、脾細胞を予めこの抗血清で処理するとこれらの有するE-ロゼット形成能をほぼ完全に阻止した。

以上から、我々の実験系において、この吸収抗血清は特異的にモルモットT細胞表面抗原と反応したと考えられる。

参 考 文 献

- 1) Raff, M. C. and Owen, J. J. T.: *J. Immunol.*, **1**, 27, 1971.
- 2) Aoki, T., Hammerling, V. E., Boyse, E. A. and Old, L. J.: *J. Exp. Med.*, **130**, 979, 1976.
- 3) Colley, D. G., Malakian, A. and Waksman, B. H.: *J. Immunol.*, **104**, 585, 1970.
- 4) R. Arndt, H. G. Thiele, Rosemarie Stark, H. U. Wottge, and W. Müller-Ruchholtz: *Eur. J. Immunol.*, **7**, 131, 1977.
- 5) H. Zola: *Transplantation* **23**, 3, 222, 1977.
- 6) Woody, J. N., Ahmed, A., Knudsen, R. C., Strong, D. M. and Sell, K. W.: *J. Clin. Invest.*, **55**, 956, 1975.
- 7) Koshiba, H., Ishii, Y., Yamanaka, N. and Kikuchi, K.: *J. Immunol.*, **118**, 2, 1977.
- 8) Shevach, E., Green, I. Ellman, L., and Mailland, J.: *Nature (New Biol.)*, **235**, 19, 1972.
- 9) 清水史郎・小中義照: 免疫実験操作法, VI, 1821, 1977.
- 10) Hutchison, I. V., Zola, H., and Batichelor, J. R.: *Transplantation*, **22**, 273, 1976.
- 11) Wick, G., Ahmad, R. and Stacher, A.: *Postgrad., Med. J.* **52** (Supplement 5), 20, 1976.
- 12) Brochier, J., Abon-Hamed, Y. A., Gueko, J. P. and Revillard, J. P.: *Immunology.*, **31**, 749, 1976.
- 13) Fradelize, D. P., Chou, C. T., Cinader, B. and Dubiski, S.: *Cell. Immunol.*, **7**, 484, 1973.
- 14) Richter, M., Colas de la Noue, H. and Koperstych, S.: *Immunology.*, **23**, 655, 1972.
- 15) 武田純子・奥山春枝・森川和雄: 北大免研紀要, **37**, 26, 1977.

- 16) Aiute, F. and H. Wigzell: *Clin. exp. Immunol.*, **13**, 171, 1973.
- 17) Singhal, S. K. and Richter, M. J.: *Exp. Med.*, **128**, 1099, 1968.
- 18) Böyum, A.: *Scand. J. Clin. Lab. Invest.*, **21**, 9, 1968.
- 19) 辻 公美: 免疫実験操作法, I, 265, 1971.
- 20) Wilson, A. B. and Coombs, R. R. A.: *Int. Arch. Allergy* **44**, 544, 1973.
- 21) Shevach, E. I., Jaffe E. S. and Green, I.: *Transplant. Rev.*, **16**, 3, 1973.
- 22) Stadecker, M. J., Bishop, G. and Wortis, H. H.: *J. Immunol.*, **111**, 1834, 1973.
- 23) Godfrey, H. P., Geczy, A. F., Gell, P. G. H. and Rubin, B.: *J. Immunol Med.*, **9**, 211, 1976.
- 24) Coombs, R. R. A., Gurner, B. W., Wilson, A. B., Holm, G. and Lindgren, B.: *Int. Arch. Allergy*, **39**, 658, 1970.
- 25) Lay, W. H., Mendes, N. F., Bianco, C. and Nussenzweig, V.: *Nature (London)*, **230**, 531, 1971.
- 26) Jondal, M., Holm, G. and Wigzell, H.: *J. Exp. Med.*, **136**, 207, 1972.
- 27) Brain, P., Gordon, J. and Willetts, W. A.: *Clin. exp. Immunol.*, **6**, 681, 1970.
- 28) Wilson, A. B. and Coombs, R. R. A.: *Int. Arch. Allergy*, **44**, 544, 1973.
- 29) Radaszkiewicz, T. and Denk, H.: *Cell. Immunol*, **16**, 374, 1975.
- 30) Scheper, R. J. Baak, P. A., Hiisivara, S. and Veldhuizen, R. W.: *Immunology*, **29**, 909, 1975.
- 31) Gatteringer, C. and Wick, G.: *Immunology*, **32**, 199, 1977.

Preparation of Specific Antisera against Guinea Pig Thymus Cells

Junko TAKEDA, Harue OKUYAMA
and Kazuo MORIKAWA

Rabbits were weekly immunized subcutaneously with guinea pig thymus cells. The antisera obtained from the rabbits were absorbed with normal guinea pig red cells, liver cells and bone marrow cells.

The absorbed antisera showed cytotoxicity against thymus cells even in high dilution. In lymph node cell and spleen cell suspensions the cytotoxicity of the antisera (20-fold dilution) was about 60% and in bone marrow cell suspension it was 9%.

When thymus cells, lymph node cells and spleen cells of normal guinea pigs were treated with the antisera, their E-rosette forming capacity disappeared almost completely.

From these results the antisera against thymus cells seem to have specifically reacted to the T cell surface antigen of guinea pigs.