



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	免疫寛容誘導における胸腺内注射法の有用性
Author(s)	大原, 達; OHARA, Tohru; 清水, 正秀 他
Citation	北海道大学免疫科学研究所紀要, 39, 48-51
Issue Date	1979-03
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26524">https://hdl.handle.net/2115/26524</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	39_P48-51.pdf



# 免疫寛容誘導における胸腺内注射法の有用性

大原 達 清水正秀 柿沼光明

木村卓郎 岡田昌彦

(北海道大学免疫科学研究所血清学部門)

(昭和53年11月20日受付)

個体に免疫寛容状態(トレランス)が成立するためには、これを誘導する抗原側と、受け入れる生体側に、いろいろな条件が存在しなければならない。後者について言えば、Burnet<sup>1)</sup>はその歴史的な報告において、自己と非自己の識別機構がまだ未熟な胎生期に foreign protein が注射されると、個体はこの抗原に対して不応性となり、以後この抗原は自己のものと同様に取り扱われるようになると考えた。Billingham ら<sup>2)</sup>は、新生児期のマウスに異系の脾細胞を注射することによって、これに対する特異的なトレランスを成立せしめ、Burnet の考えを実験的な立場から肯定している。すなわち、免疫寛容が起るのは、個体の認識系(recognition system)であるリンパ組織が、成熟する以前に異種蛋白と接触することによって、recognition system の“fooling”をきたすためと考えられる。その後の研究により、免疫寛容の成立は必ずしも胎生期または新生児期に限るものでないことが分ったけれども、抗原投与の条件が一定ならば、個体の年齢が若いほど寛容を起しやすきことは事実である。然りとすれば、もし抗原が直接胸腺内に与えられるならば、他のルートから与えられた場合に較べ寛容の成立が遙かに容易であろうと考えるのは、当然のなりゆきと言ってよからう。個体のリンパ組織のうちで胸腺は最も未分化であり、ことに胸腺皮質のリンパ球は免疫学的にほとんど inert な状態にあると考えられているからである。われわれは、ヒト血清アルブミン(HSA)のウサギ胸腺内注射(以下 iT 注射)によってこの動物を容易に寛容状態にし得ることを観察し、次いで iT 注射の効果はウサギに限るものでなく、マウスにおいても同様にみられることを示すと共に、後者について、免疫寛容誘導に対する iT 注射と静脈内注射(iv 注射)の効率を比較した。

## 実験材料並びに方法

(i) 抗原(tolerogen): チャレンジ抗原および tolerogen として用いた HSA は市販のもので、ICN Pharmaceuticals Inc (USA) の製品を使った。

(ii) 動物: 実験に供した動物はウサギおよびマウスで、前者は生後1カ月、体重2kg内外の白色アルビノ家兎(雌雄混合)、後者は生後6週の C57BL/6 (以下 B6) を用いた。

(iii) iT 注射: 両動物種ともに麻酔下に頸部を開き、胸骨に最少限の切開を施してこれより直接胸腺内に注射した。注射量はウサギの場合 HSA 1 mg (0.4 ml の生食水溶液)、マウスにおいては 20  $\mu$ g (0.01 ml 生食水) である。

(iv) challenge と抗体価測定: ウサギの場合は HSA 1 mg を complete Freund's adjuvant (CFA) と共に footpad 内にチャレンジし、マウスの場合は HSA 20  $\mu$ g を同じく CFA と共に腹腔内に注射した。ウサギはチャレンジ後2週目に一次血清を採取した後同様な二次攻撃を行い、更に2週を経て二次血清を採取し、マウスは同一個体について一次応答と二次応答を調べられなかった為、2群に分けて成績を統計的に処理した。血清の titration はいずれも補体結合反応によって行い、術式は Stein and Ngu ら<sup>3)</sup>による 50% 溶血単位法に拠った。

(v) 動物の群別および実験プロトコル: 実験成績の項参照。

## 実験成績

(1) iT 注射による免疫寛容の誘導(ウサギにおける実験)。図-1に示したプロトコルに従って、iT 注射の免疫寛容惹起能を調べた。すなわち20頭のウサギを胸腺内抗原注射群と非注射群とに2大別し、前者(I群, II群)には day 0 に HSA 1 mg を、後者(III群, IV群)には対照として生食水をそれぞれ胸腺内に注射した後、day 4 に両群の半数は胸腺摘出を行い(I, III群)残り(II群, IV群)はこれを行わずに抗体応答を調べた。day 4 に胸腺摘出を行った目的は、一旦抗原と接触した胸腺を除去することにより免疫寛容が部分的に寛解するか否かを調べるためである。結果は表-1に示したが、予期した如く無処置対照の第IV群(HSA iT 注射なし、胸腺摘出せず)に比し、HSA を iT 注射した第II群は、ほとんど

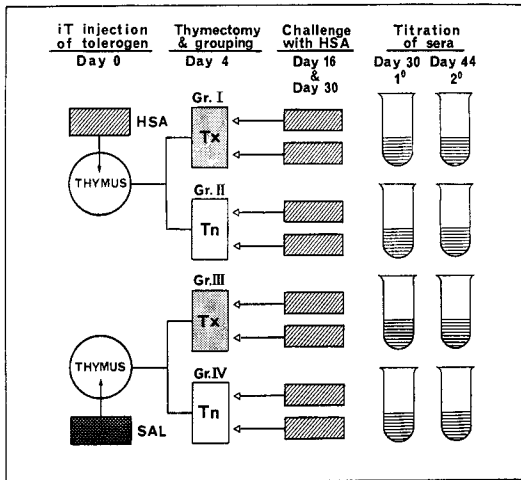


図-1 胸腺内注射による免疫寛容誘導実験のプロトコル

完全に抗体産生が抑えられるのを認めた。すなわちその抗体価を比較してみると、iT 注射を受けない第IV群の一次応答は  $396 \pm 53.2$  (mean titer  $\pm$  SEM), 二次応答は  $3432 \pm 735.4$  の高値を示すのに対し、iT 注射を受けた第II群の抗体価は一次応答が0であり、二次応答においても僅かに  $35 \pm 10.2$  の低値を示したに過ぎない。一旦 iT 注射を受けた後胸腺を摘出した第I群は、一次応答、二次応答がそれぞれ  $40 \pm 18.8$ ,  $160 \pm 48.4$  の値を示し、対照(IV群)と較べて著しく抗体価は抑えられているものの、第II群よりは明らかに高い。すなわち iT 注射後胸腺を除くことによって、寛容状態は部分的に回復することが窺われる。第III群の抗体応答は一次  $37.5 \pm 15.2$ 、二次  $140 \pm 63.1$  で、この群は HSA の iT 注射を受けていないが、thymectomy を施されたために反応が低下したもので、これをトレランスと考えるべきでないことは言うまでもない。

(2) 免疫寛容誘導に対する tolerogen iT 注射と iv 注射の効率(マウスにおける実験)。上記の実験から、抗原の iT 注射がウサギに対して寛容導入の有力な手段であることを知ったが、用いた動物が雑系であるため、個体差の介入を否定できない。従って iT 注射はウサギに対してだけでなく、他の種属にも同じ効果のあることを確かめるため、近交系のマウスを用いて同じ実験を反復すると共に、併せて寛容誘導における iT 注射と iv 注射の効率を比較してみた。合計 86 匹の B6 マウスを 5 群に分ち、I, II 群には HSA 20  $\mu$ g の iT 注射、III, IV 群には同量の iv 注射を行い、V 群は tolerogen を与えずに positive control とした。iT, iv 注射群のうち

表-1 胸腺内 HSA 注射によって起るウサギ抗 HSA 応答の抑制と胸腺摘出による応答の部分的寛解

Group	Thymic HSA	Tx*	Rabbits	Anti-HSA**	
				1° ry	2° ry
I	+	+	1	120	220
			2	40	220
			3	20	130
			4	20	140
			5	20	80
			Mean $\pm$ SEM	$40 \pm 18.8$	$160 \pm 48.4$
II	+	-	7	0	20
			8	0	30
			9	0	20
			10	0	25
			11	0	80
			Mean $\pm$ SEM	$0 \pm 0$	$35 \pm 10.2$
III	-	+	16	90	350
			20	20	40
			21	20	120
			22	20	60
IV	-	-	12	340	4900
			13	340	2500
			15	370	5800
			17	300	2560
			18	630	1400
			Mean $\pm$ SEM	$396 \pm 53.2$	$3432 \pm 735.4$

\* Tx: thymectomy

\*\* 表中の数字は補体結合反応による抗体価を示す。

I 群と III 群は tolerogen 注射 4 日後に thymectomy を施し、ウサギの場合と同じ time schedule で day 30 に一次抗体価、day 44 に二次抗体価を測定した。結果は表-2 に示す通りである。iT 注射による免疫寛容誘導効果はウサギの場合にもまして見事に再現され、II 群においては day 0 に与えられた HSA の iT 注射によって、day 44 の二次応答までが完全に抑えられている。iT 注射後胸腺を摘出した I 群においても、応答が強度に抑制されていることに変わりはない。この群は二度目の抗原チャレンジに対して僅かに応答しているものの ( $15 \pm 6.27$ ), positive control (iT 注射を受けない正常の二次応答) の値 ( $281.5 \pm 15.95$ ) に較べれば negligible と言ってよさう。両者の差は推計学的に highly significant

表一 胸腺内抗原注射と静脈内注射の免疫寛容誘導における効率の比較

Group	Tolerogen injection	Tx after injection*	Primary antibody response				Secondary antibody response							
			(Mean ± SEM)				(Mean ± SEM)							
I	iT	+	0	0	0	0	20	40	0	40	0	0	0	20
			(0 ± 0)				(15.0 ± 6.27)							
II	iT	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
			(0 ± 0)				(0 ± 0)							
III	iv	+	0	0	20	20	140	190	220	310	160	250	170	140
			(8.13 ± 4.00)				(196.3 ± 20.10)							
IV	iv	-	20	20	25	20	85	80	90	70	100	80	110	80
			(21.11 ± 0.74)				(82.92 ± 3.91)							
V	none	-	95	70	70	85	205	220	350	320	330	240		
			(80.5 ± 5.35)				(281.5 ± 15.95)							

\* tolerogen 投与 4 日後における thymectomy.

であった ( $P \ll 0.001$ )。一方 iT 注射と iv 注射の間には、免疫寛容惹起能において明らかな差が認められる。表から明らかなように、iv 注射を受けた III, IV 群はいずれも抗原チャレンジに対してかなりの応答を示し、iT 注射群にみられた如き完全な寛容状態は成立していない。しかしながら III, IV 群の抗体価は、tolerogen を全く受けない V 群に比較すると有意に低い。すなわち水溶液にした tolerogenic form の HSA は、これを静脈内に与えた場合でも、immunogenic form である HSA in CFA チャレンジに対しある程度の抑制作用を持つようである。

### 考 察

われわれはこの実験において、抗原の iT 注射がウサギおよびマウスに対し容易に免疫寛容を惹起せしめるのを見た。iT 注射という特殊な手段はこれ迄ほとんど報告されていないが、少なくとも実験的研究に関する限り、免疫寛容誘導の手段として広く用いられるべきものと考えられる。しかしこの方法は理論的にみて決して新しいものではない。従来から免疫寛容成立の機序として、胸腺のような中枢リンパ組織中の未熟な細胞と抗原との interaction が重要な要因の 1 つに挙げられているのは、周知のことである<sup>4-6)</sup>。

循環血流に入った蛋白抗原のごく少量は胸腺内にも入ると考えられており、その量は Gery ら<sup>7)</sup>によるとラットにおいて腹腔内に注射された蛋白量の 0.1% から

0.3% と推測される。機序が全く分らない low-zone tolerance を別にして、一般に免疫寛容を起さしめるのに大量の抗原を要するのは、胸腺に penetrate する抗原が極めて少ないためと説明することが出来る。また抗原は blood-thymus barrier によって胸腺内に浸透することは通常困難であるが<sup>8-11)</sup>、neonate の時期にはこの barrier が比較的弱い。このことが幼若な動物に寛容の成立し易い理由とも考えられる。同様に、aggregate した蛋白や粒子状抗原がトレランスを起さしめにくいのは、これらが thymus 内に penetrate できないためと解されようが、われわれの教室において行った実験（未発表）によれば、ヒツジ赤血球はこれをマウス胸腺内に注射しても寛容は成立しなかった。従って寛容を成立させるためには、単に胸腺に入った量ばかりでなく、抗原の性状、形態なども関係するのであろう。

ウサギとマウスを用いた今回の実験において、両種属間のデータに僅かな相違がみられた点は、iT 注射後に胸腺摘出を行った場合の成績である。すなわちウサギにおいては day 4 の胸腺摘出により寛容の部分的回復をみたが、マウスにおいてはほとんどその効果が認められていない。しかしこれをもって種属による差と考えるためには、iT 注射後日を追って胸腺を摘出し、寛容成立に要する胸腺存在の期間を詳細に調べる必要がある。胸腺摘出の時期はウサギ、マウスとも day 4 であったが、この timing は機械的には同じであっても、両者の life span を考えれば equivalent な時期とは思われない。

この点を明らかにするため、目下われわれの教室では tolerogen 投与前後のいろいろな時期に胸腺を摘出し、胸腺の存在と免疫寛容成立との関係を検討中である。

最後に、iT 注射による免疫寛容成立の機序について考えてみたい。一般的に言うと、免疫寛容は単一の機序によって起ると考えるよりも、むしろ異った機序によるいろいろな型の寛容があると考えた方が合理的かも知れない。これまでに挙げられた機序を要約してみると、(i) クローンの消失、(ii) レセプターの封鎖・固定、(iii) 抗体による中和またはフィードバック、(iv) blocking factor の産生、(v) サプレッサー T 細胞の出現、などが考えられる。これらは互いに exclusive な説ではないが、その根底に横たわる cellular and molecular event については、まだ不明な点が多い。われわれは胸腺内抗原注射によって起る寛容の場合、サプレッサー T 細胞の誘導される可能性が最も高いと考え、別な実験においてこれを証明しようと試みた。すなわち B6 マウスの胸腺内に HSA を注射した後適当な時期にその脾細胞をとって同系マウスに adoptive transfer を行い、recipient の抗 HSA 応答が抑えられることを観察した。すなわち tolerant donor の脾細胞によって infectious tolerance が成立する。この観察から進んで更にサプレッサー細胞の性状、免疫学的機能、サプレッサーの分離法などについて実験を行いつつあるので、近い将来に得たるデータを報告したいと考えている。

## 結 論

抗原を胸腺内に直接注射することにより、ウサギ及び

マウスに対し容易に免疫寛容を成立せしめ得る。寛容誘導における胸腺内注射と静脈内注射の効率をマウスについて比較してみると、前者の効率は後者に比し遙かに高く、且誘導された寛容の状態もより完全である。なお胸腺内注射が寛容誘導の有力な手段であることの原因、及び寛容成立の機序について若干の考察を行った。

## 引用文献

- 1) Burnet, F. M.: The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity. Cambridge Univ. Press. 1959.
- 2) Billingham, R. E., Brent, L. and Medawar, P. B.: Nature. **172**, 603, 1953.
- 3) Stein, G. J. and Ngu, D. V.: J. Immunol., **65**, 17, 1950.
- 4) Isaković, K., Smith, S. B. and Waksman, B. H.: J. Exp. Med., **122**, 1103, 1965.
- 5) Smith, S. B., Isaković, K. and Waksman, B. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **121**, 1005, 1966.
- 6) Vojtišková, M. and Lengerová, A.: Experientia, **21**, 661, 1965.
- 7) Gery, I. and Mueller, M.: Unpublished data cited from reference 4.
- 8) Marshall, A. H. E. and White, R. G.: Brit. J. Exp. Path., **42**, 379, 1961.
- 9) Clark, S. L., Jr.: In "The thymus" (Defendi, V. et al. eds) Philadelphia, Wistar Institute Press, 9, 1964.
- 10) Weiss, L.: Anat. Rec., **145**, 413, 1963.
- 11) Clark, S. L., Jr.: Am. J. Anat., **112**, 1, 1963.

## Induction of Immunological Tolerance by Intrathymic Injection of Antigens

Tohru OHARA, Masahide SHIMIZU, Mitsuaki KAKINUMA  
Takuro KIMURA and Masahiko OKADA

Direct injection of antigens into the thymus has proved to be an effective means for tolerance induction in rabbits and in mice. The efficiency of intrathymic injection (iT) of antigen to induce tolerance was far better than that of intravenous one and the tolerant state induced by the former was more complete than by the latter. The reason why iT could induce immunological tolerance with ease was discussed.