



Title	羊赤血球感作による家兔のMigration Inhibition Test
Author(s)	山中, 樹; YAMANAKA, Taturu
Description	
Citation	結核の研究, 33, 18-25
Issue Date	1973
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26824
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_P18-25.pdf



羊赤血球感作による家兎の Migration Inhibition Test

山中 樹

(札幌医科大学小児科学教室・北大結核研究所病理部門)

(昭和47年9月30日受付)

はじめに

Macrophage migration inhibition 現象は、1962年 George と Vaughan¹⁾ によって、毛細管が応用されてから、delayed hypersensitivity を *in vitro* で研究する手段として利用されるようになった。

その後、David²⁻⁴⁾、Bloom と Bennett⁵⁾ らの精製ツベルクリン蛋白 (PPD) や卵白アルブミンを用いた実験により、これらの抗原に、delayed に感作された donor のリンパ球から migration inhibition factor (MIF) が産生されることが示された。また MIF の物理化学的性質や、cell mediated reaction における役割等につき、多数の研究がなされ報告されている^{6,7)}。

一方、モルモットを、異種血球であるヒツジ赤血球 (SRBC) と Freund complete adjuvant (FCA) とで感作すると、約1週後から遅延型皮内反応を呈し、そのリンパ球を SRBC で刺激すると培養上清には、正常モルモット腹腔細胞の migration を inhibit する MIF が存在することが報告されてきた⁸⁾。

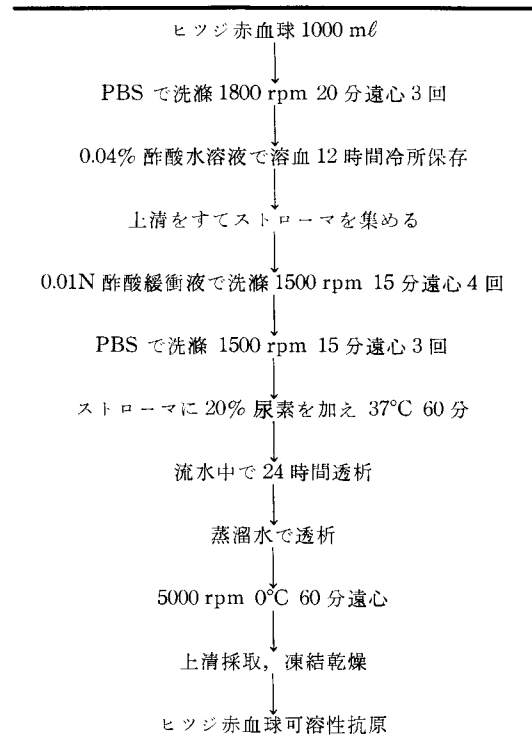
著者らは、モルモットと同様に、家兎を SRBC と FCA とで免疫し、肺胞細胞を indicator cell として、SRBC 及びヒツジ赤血球可溶性抗原 (SagSRBC) に対する migration inhibition test を行なった。

実験方法

正常家兎を 1.0×10^8 匹の SRBC と FCA とで感作し1週目から4週目まで経時的に実験を行なった。感作動物を、4つのグループにわけ、各々の肺胞細胞を直接抗原で刺激する直接法と、脾細胞を抗原で刺激してえた培養上清の MIF を、正常家兎肺胞細胞を indicator cell として調べる間接法とを用いた。

ヒツジ赤血球可溶性抗原 (SagSRBC) とヒト赤血球可溶性抗原 (SagHRBC) は、酢酸水溶液で溶血させたあと、Boyden⁹⁾ の記載した方法により20%尿素で蛋白を抽出し、これを透析後、凍結乾燥し保存した (表1)。SRBC、HRBC より得た可溶性抗原は、Folin 法で750 $\mu\text{g}/\text{mg}$ の蛋白を含んでいた。

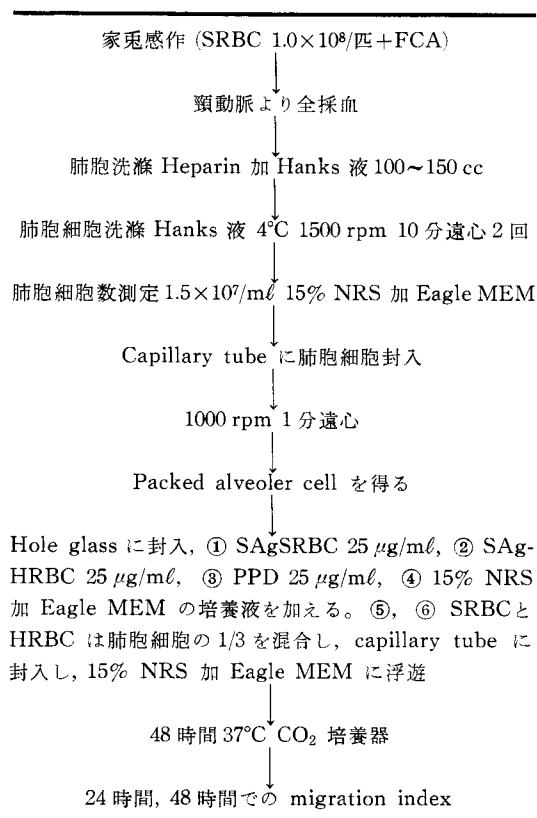
表1 羊赤血球可溶性抗原の作り方



なお PPD, HRBC, SagHRBC は対照抗原として用いた。

Migration inhibition test は、表2と3に示すように、頸動脈より全採血後開胸し、気管、肺を一括して取り出し、気管より100~150 ml の heparin 加 Hanks 液を注入し肺胞細胞をあらひ出した。次に4°C 1500 rpm 10分の遠心によりえた肺胞細胞をさらに Hanks 液で2度洗滌した。この肺胞細胞を15%正常家兎血清 (NRS) 加 Eagle MEM 培養液に $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ になるように浮遊させ、毛細管に吸引した。これを1000 rpm 1分遠心し得られた細胞と液面との境界を、ヤスリで切断し、シリコングリースでカバーグラスに接着した。培養液と各抗原を満した hole glass にこのカバーグラスを封入し37°C 炭酸ガス培養器で培養した。SagSRBC, SagHRBC,

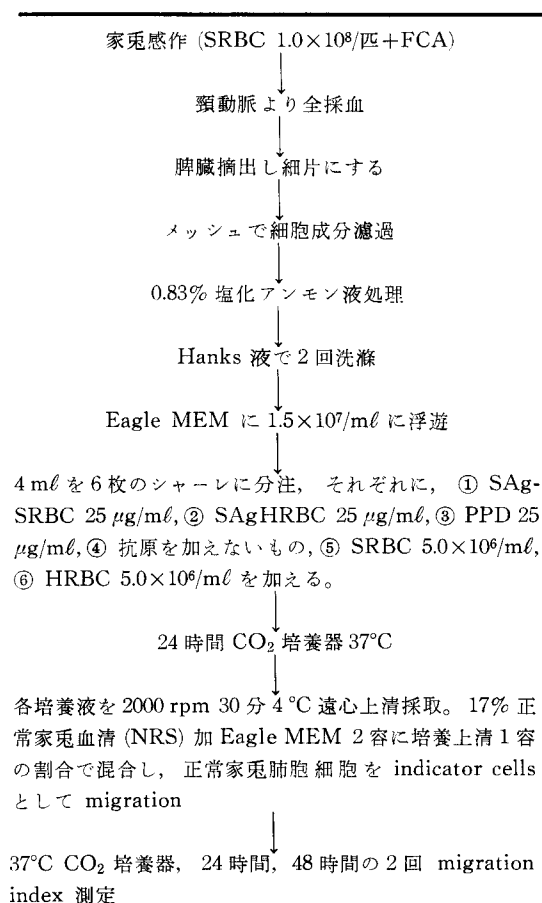
表2 感作家兎肺胞細胞を用いた Migration (直接法)



PPD は 25 μ g/ml となるように 15% NRS 加 Eagle MEM に加えた。また SRBC, HRBC の有形抗原は, 肺胞細胞の 1/3 になるように加え, 毛细管に pack し, 15% NRS 加 Eagle MEM 中で培養した。Migration index (MI) は, 抗原を加えた培養液中での migration area を抗原を加えない培養液中での migration area で除しパーセントであらわした。

一方間接法では, 摘出した脾臓を, はさみで細片とし, これをメッシュを通して脾細胞を得た。次に 0.83% 塩化アンモン液で溶血させ, Hanks 液で 3回洗滌し, 完全に赤血球を除いてから, Eagle MEM に 1.5×10^7 /ml に浮遊させた。この脾細胞浮遊液を 6 枚のシャーレにとり, それぞれに SAgSRBC, SAgHRBC, PPD を 25 μ g/ml 加えた。また SRBC, HRBC は 2.0×10^6 /ml 加え, 37°C 24時間, 炭酸ガス培養器で培養した。その後, 2000 rpm 20分, 4°C で遠心し, 細胞成分を除き上清を 17% NRS 加 Eagle MEM で 3倍に稀釈し, hole glass にみだし, 正常家兎肺胞細胞を indicator cell として MIF の assay を行なった。MI は, 抗原を加えた培養上清の migration

表3 感作家兎脾細胞を用いた Migration (間接法)



area を, 抗原を加えない培養上清の migration area で除してパーセントであらわした。また, 培養上清に残っている抗原の影響をみるため, 培養液に可溶性抗原を加えた対照群をおいた。

SRBC に対する凝集素と溶血素は Boyden⁸⁾ と Adler⁹⁾ の方法により測定した。また, 2メルカプトエタノール (2ME) 処理による抗体価の変化も同時に測定した。

皮内反応は, migration inhibition test を行なう 2 日前に, 10% SRBC および HRBC 溶液を 0.1 ml, SAgSRBC, SAgHRBC を 100 μ g/0.1 ml 皮内に注射した。注射後 24時間, 48時間の発赤と硬結の径を測定した。

成 績

対照である 5 匹の正常家兎では, SAgSRBC, SRBC による遅延型皮内反応も, 血清中に凝集素, 溶血素も認められなかった。Migration inhibition test の直接法

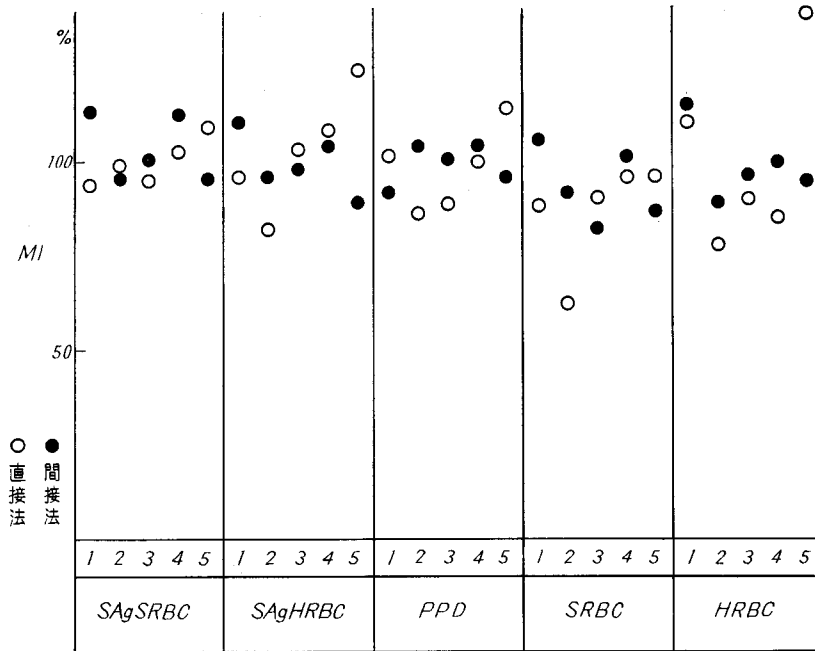


図1 正常家兎の Migration index

表4 正常家兎の Migration index

抗原	直接法	間接法
SAgSRBC	99.8 ± 5.9	102.8 ± 7.2
SAgHRBC	104.0 ± 14.7	100.1 ± 7.6
PPD	98.5 ± 10.6	99.8 ± 4.9
SRBC	83.4 ± 13.4	94.4 ± 8.8
HRBC	98.4 ± 25.7	99.9 ± 9.1

SAgSRBC: 羊赤血球可溶性抗原 (25 μg/ml)

SRBC: 羊赤血球

SAgHRBC: ヒト赤血球可溶性抗原 (25 μg/ml)

HRBC: ヒト赤血球

では、SRBC と HRBC を肺胞細胞とともに毛細管に封入した場合の MI に、時々大きなばらつきが認められることもあったが、SAgSRBC、SAgHRBC、PPD 等の可溶性抗原では、MI はほぼ 100% に近い値を示し、抑制現象は全く見られなかった。間接法では、SRBC、HRBC の有型抗原の場合もこれと同じくほぼ 100% に近い MI がえられた。また 24 時間判定の MI は 48 時間測定のものよりばらつく傾向が認められた (図 1、表 4)。

感作家兎は、SRBC と SAgSRBC に対して遅延型皮内反応を示し、特に感作 3 週目のグループに著明であった。

感作家兎の各抗原に対する migration inhibition test

では、感作 1 週目が直接法で、SAgSRBC 66.7 ± 15.9%、SAgHRBC 91.1 ± 8.8%、PPD 68.6 ± 12.3%、SRBC 70.7 ± 7.3%、HRBC 91.9%、間接法ではそれぞれ 65.6 ± 17.1%、110.2 ± 10.9%、66.5 ± 7.5%、73.0 ± 14.9%、93.2% (図 2)、感作 2 週目では、直接法で、SAgSRBC 61.7 ± 13.5%、SAgHRBC 90.4 ± 13.9%、PPD 50.2 ± 16.1%、SRBC 85.7 ± 7.0%、HRBC 104.2 ± 2.1%、間接法では、それぞれ 60.2 ± 18.0%、97.8 ± 9.4%、51.6 ± 27.1%、69.4 ± 12.9%、104.1 ± 14.2% であった (図 3)。3 週目では、直接法で SAgSRBC 71.5 ± 10.8%、SAgHRBC 107.1%、PPD 48.7 ± 11.1%、SRBC 71.6 ± 16.5%、HRBC 91.2%、間接法では、それぞれ 70.9 ± 2.5%、94.1%、60.6 ± 20.2%、73.8 ± 11.2%、111.9% であった (図 4)。4 週目では、直接法で SAgSRBC 74.1 ± 3.3%、PPD 60.6 ± 20.2%、SRBC 73.8 ± 11.2%、HRBC 101.0 ± 9.7%、間接法で 81.5 ± 6%、53.9 ± 21.4%、67.9 ± 13.8%、107.2 ± 6.0% であった (図 5)。

以上の結果を、直接法、間接法で正常家兎グループの MI と比較すると、図 6、図 7 に示すように、感作家兎の場合 SAgSRBC、PPD、SRBC で低かった。また図 8 に示すように、SRBC、SAgSRBC に対する、皮内反応の程度と、MI との間には、皮内反応が強いものほど MI が小さくなるというような関係は得られなかった。

凝集素、溶血素は、両者とも感作 1 週目より認められ、前者は、1~2 週では 2ME sensitive のものが多かった

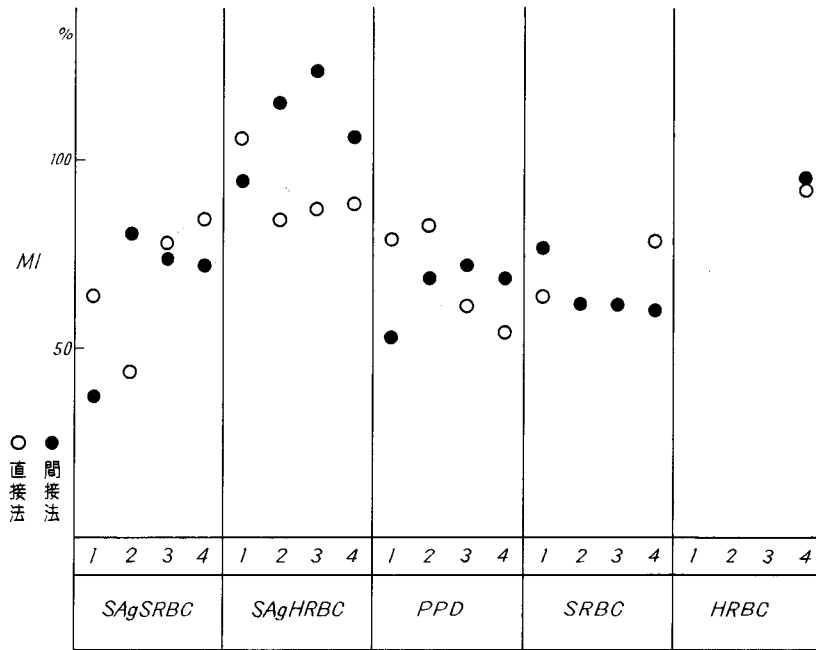


図2 感作1週目の Migration index

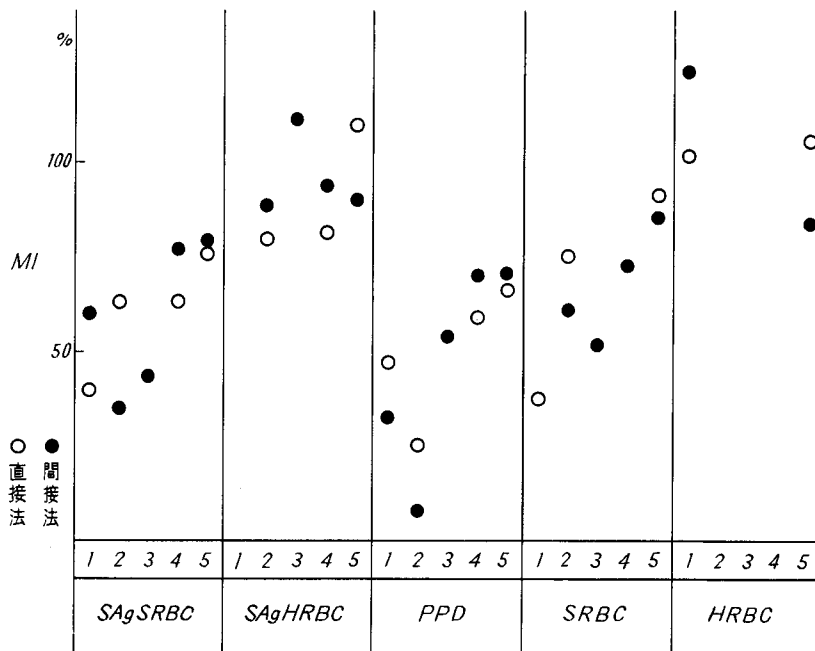


図3 感作2週目の Migration index

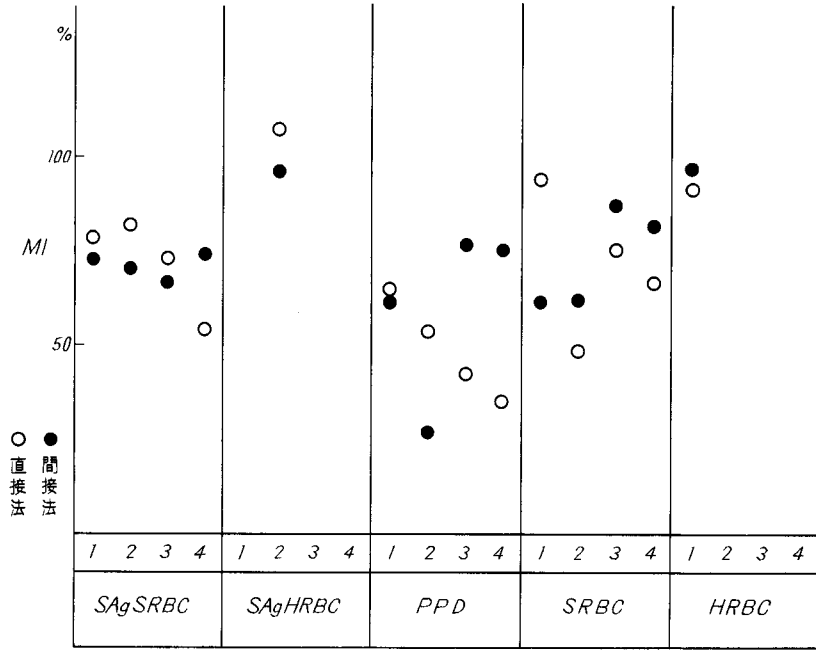


図4 感作3週目の Migration index

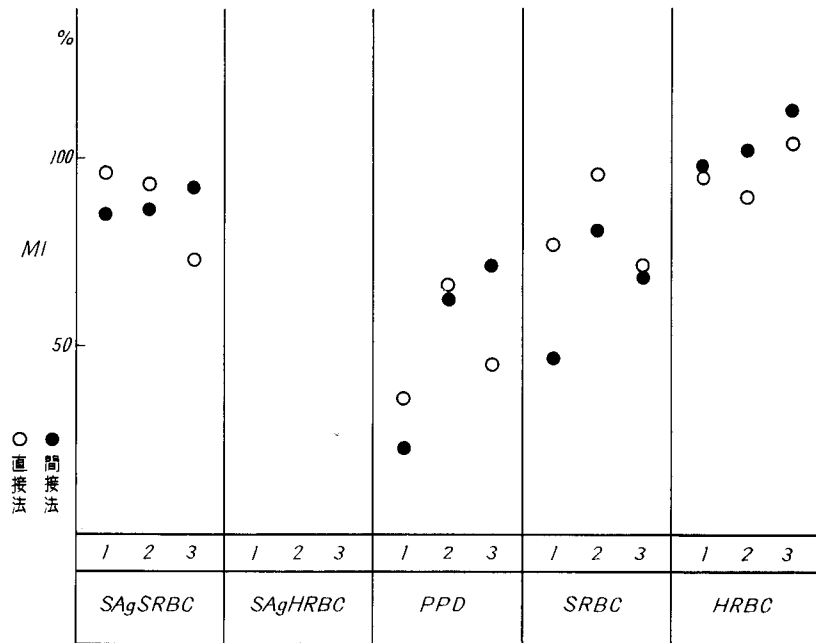


図5 感作4週目の Migration index

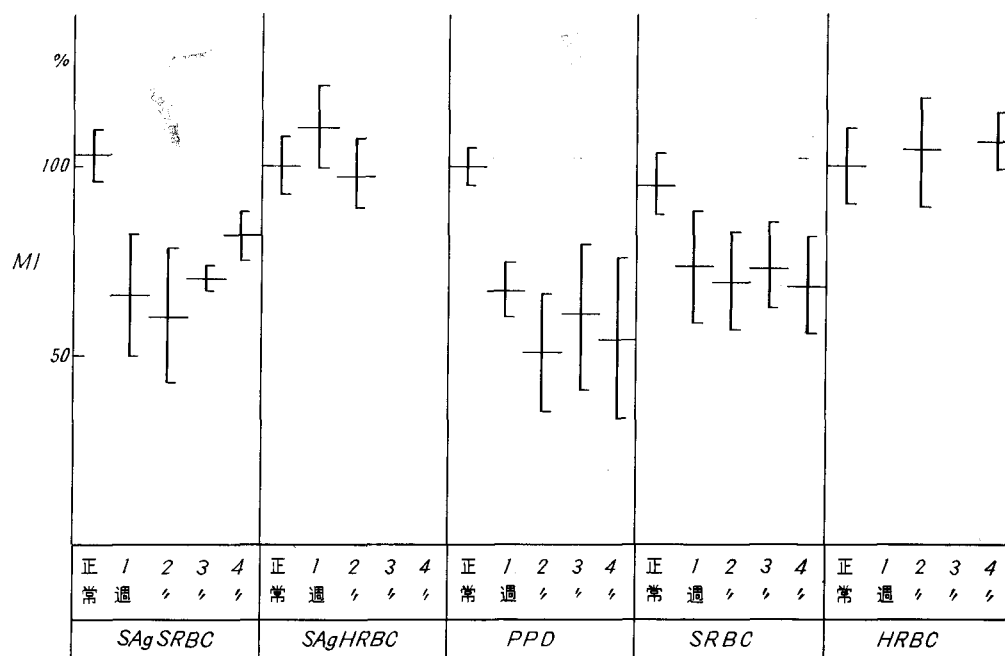


図6 脾細胞培養上清(間接法)による Migration index

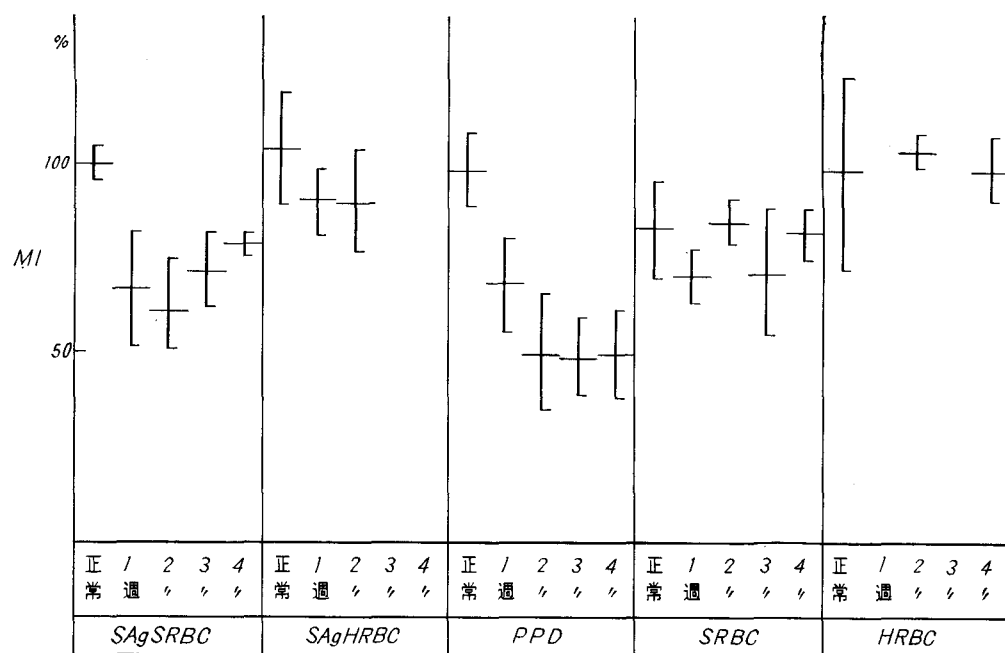


図7 肺細胞(直接法)による Migration index

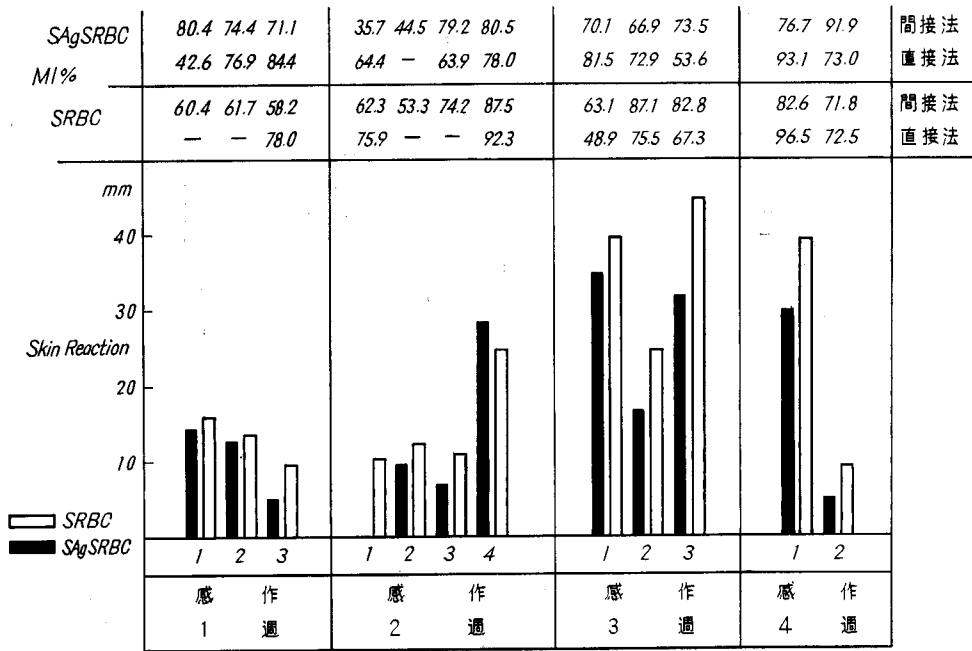


図8 皮内反応と Migration index

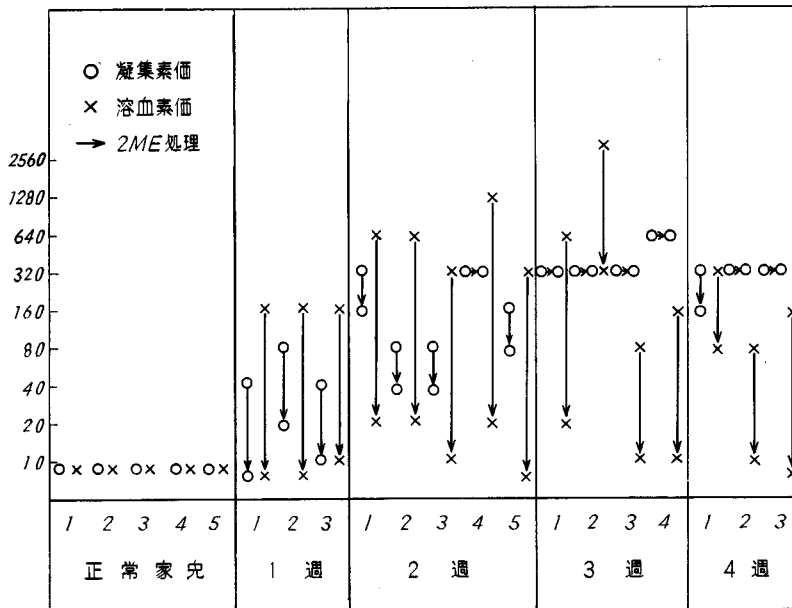


図9 羊赤血球に対する凝集素価及び溶血素価

が、3~4週ของกลุ่มは resistant であつた。また後者は、1週から4週目のグループまで sensitive なものが多かった。

考 按

感作家兎の肺胞細胞が、直接抗原刺激を行なうことにより、特異的にその migration が inhibit された。こ

れは、肺胞細胞中に antigen と specific に反応し、遊走細胞の migration を阻止する MIF を産生する cell population が存在するためと考えられるが、最近 Pick らは、antigen-antibody complex やその他の非特異的な因子による刺激によっても、MIF をはじめとする多くの soluble mediator が release される可能性を示している^{10,11)}。

また直接法で肺胞細胞と、SRBC 又は HRBC を混合し毛細管に封入した際の MI が、soluble antigen を用いた場合よりばらつきが多かった。これは毛細管に封入し遠心し細胞を pack する際に、赤血球は上方に、indicator cell は下方に、2層にわかれてしまい、上方にある有形抗原が障害となり安定した migration が得られないものと考えられる。

皮内反応は、感作3週目のグループで著明であったが、皮内反応の強さと、migration inhibition の程度は、並行しなかった。Dumonde も同様のことを報告している¹²⁾。

ま と め

正常家兎では、SRBC, SAgsRBC に対する遅延型皮内反応も、また凝集素、溶血素も認められなかった。Migration inhibition test で indicator cell と赤血球を毛細管に封入した場合、時に indicator cell の migration が障害されることがあった。

感作家兎は、1週目から SRBC, SAgsRBC に遅延型皮内反応を示した。凝集素、溶血素も認められ、前者は

3週目から 2ME resistant に変化したが、後者は4週まで sensitive なものが多かった。

感作家兎は、1週目から SRBC, SAgsRBC, PPD に特異的な migration inhibition が認められた。しかし皮内反応と migration index との間には相関を示す成績は得られなかった。

文 献

- 1) George, M. and Vaughan, J. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y. **3**, 514 (1962).
- 2) David, J. R., Al-Askari, D., Lawrence, H. S. and Thomas, L.: J. Immunol. **93**, 264 (1964).
- 3) David, J. R., Lawrence, H. S. and Thomas, I.: J. Immunol. **93**, 274 (1964).
- 4) David, J. R., Lawrence, H. S. and Thomas, L.: J. Immunol. **93**, 279 (1964).
- 5) Bloom, B. R. and Bennett, B.: Fed. Proc. **27**, 13 (1968).
- 6) Lamelin, J. P.: Cell-Mediated Immunity, In vitro Correlates. p. 75, S. Karger (1971).
- 7) Bloom, B. R.: Advance in Immunology. **13**, 101 (1971).
- 8) Boyden, S. V.: Immunology **7**, 474 (1964).
- 9) Adler, F. L.: J. Immunol. **95**, 26 (1965).
- 10) Pick, E., Krejci, J. and Turk, J. L.: Immunology **22**, 25 (1972).
- 11) Pick, E. and Turk, J. L.: Immunology **22**, 29 (1972).
- 12) Dumonde, D. C.: Brit. med. Bull. **23**, 9 (1967).