ニホンウズラの血液型：同種免疫における 抗体産生能力の個体差および系統差

加藤秀樹・若杉 昇

名古屋大学農学部家畜種学教室

Studies on the Blood Groups in the Japanese Quail :
Individual and Strain Differences in Antibody Producing
Ability in the Alloimmunization.

Hideki Katoh and Noboru Wakasugi

Laboratory of Animal Genetics, School of Agriculture,
Nagoya University, Nagoya, 464

ニホンウズラ (*Coturnix coturnix japonica*) の実験動物としての重要性が指摘されているが (Wakasugi & Kondo, 1973 ; 河原, 1976), 免疫遺伝学の分野における使用例は少なく, 血液型に関する報告は, 天池・光本 (1970) および水谷ら (1977) によるものだけである。我々は免疫遺伝学的研究に適したウズラ系統の育成を目的として血液型の研究を行なっており, QN₁ 抗原, R 抗原および H 抗原は, それぞれの常染色体性の優性遺伝子によって支配されていることを明らかにした (Katoh & Wakasugi, 1980)。これに基づき当研究室において維持されている 9 系統のウズラについて血液型遺伝子の固定を行なっており, ほぼ完成している。

血液型の研究を行なう場合, 同じ特異性をもつ抗血清の補充が要求される。マウスおよびニワトリでは, 血液型のわかっている系統がすでに育成されており, 目的とする抗血清の作製は, 系統間免疫によって容易に行なわれている (Klein, 1975 ; Fujio & Ezzeldin, 1974)。ウズラのような小動物では十分な量の抗血清を得ることが困難なため, 上述のような抗血清作製システムの早期確立が望まれる。

この報告では, 血液型のわかっている個体間および系統間での同種免疫の結果を述べる。

材料および方法

動物： 使用したウズラ系統およびそれらの血液型は, Table 1 に示されている。1 ストック 3 姉妹系統方式 (各ストックは 3 つの姉妹系統より成り, 各系統はそれぞれローテーション交配によって維持され, 時々ストック内の系統間交配を行ない生存力, 繁殖力の低下を防ぐ方式) により系統維持が行なわれている。各系統の特徴および飼育方法は, Wakasugi & Kondo (1973) により報告されている。

免疫方法： 成鶉 (50 日令以上) を使用し, 同種免疫を 2 通りの方法により行なった。第 1 の方法は, 天池・光本 (1970) の方法である。つまり, donor の 2% 血球浮遊液 0.5 ml を 3 日毎に

4回 recipient に静脈注射し、さらに4～5回5%血球浮遊液0.6 ml～0.7 mlを同間隔で静脈注射した。第2の方法は、10%血球浮遊液0.2 mlを3日毎に連続5回 recipient に静脈注射した。採血は、最終免疫後5～7日にヘパリン入り注射筒を用いて行ない、3000 rpm で10分間遠心することにより抗血清を得た。

抗体価の測定および抗血清の特異性： Cooke社製のマイクロプレートを使用し、抗血清25 μ lを等量のPBSで倍々希釈し、2%血球浮遊液を25 μ l加えて後、凝集反応を観察した。抗体価測定のための反応血球にはdonor血球を用いた。得られた抗血清の特異性は、血液型のわかっている赤血球との反応により判定された。

Table 1, Three Stocks of the Japanese Quail Consisting of Nine Sister Strains and Their Blood Groups

Stock No.	Strains	Blood groups		
		QN ₁	R	H
1	Sex-linked white (SW)	-	+	+
	Brown (B)	-	+	+
	Red-eyed brown (REB)	-	+	+
2	Wild type plumage (WP)	-	-	-
	Dominant Black (DB)	-	-	-
	Silver (S)	-	-	-
3	Yellow (Y)	+	-	-
	Black at hatch (BH)	+	-	-
	White (W)	+	-	-

結 果

(1) 抗体産生能力の個体差： 天池・光本の方法を用い、血液型の異なるdonorにより41個体の recipient を免疫した。そのうち12個体が既知のdonor抗原に対して抗体産生を行なった (Table 2)。抗体価は1:1～1:128の範囲であった。No.9390 (QN₁⁺)をdonorにして4個体の兄妹 (mongrel) を免疫したが抗体産生は認められなかった。No.9460 (R⁺, H⁺)をdonorにして9個体の兄妹 (mongrel)を免疫した結果、5個体が抗体産生を行なった。また、No.5851 およびNo.5853 (SW系統-R⁺, H⁺)をdonorにした場合6個体の親子 (第3ストック) すべてが抗体産生を行なった。しかしながら、同じdonorを用いて免疫したWP系統 (第2ストック) の12個体は、抗体産生を行なわなかった。さらに、抗体産生を示さなかった両親 (WP系統) より得られた6個体の子供においても抗体産生が認められなかった。以上の結果より、抗体産生能力に個体差があることが明らかにされ、抗体産生能の遺伝子支配が示唆された。

Table 2. Titers and Specificities of Alloimmune Antisera

Donor		Recipient		Titer	Specificity
Wing No.	Blood groups	Wing No.	Blood groups		
9390	QN ₁	9161	R, H	0	
		9162	R, H	0	
		9236	R, H	0	
		9317	R, H	0	
		9323	R	0	
		9324	R, H	x 8	Anti-QN ₁
9460	R, H	9410	QN ₁ , R	x 2	Anti-H
		9412	QN ₁ , R, H	x 4	Anti-H
		9415	—	0	
		9440	QN ₁ , H	0	
		9441	QN ₁ , R	x 2	Anti-H
		9443	QN ₁ , H	x 128	Anti-R
		9452	H	0	
		9453	QN ₁	0	
		9454	QN ₁ , R	x 8	Anti-H
5851	R, H	2227	R	x 32	Anti-R + H
5853		8447	QN ₁ , R	x 32	Anti-H
		2232	QN ₁	x 1	Anti-H
		2233	QN ₁ , R	x 8	Anti-H
		2234	QN ₁ , R	x 4	Anti-H
		2235	QN ₁	x 4	Anti-H

Individuals enclosed by the upper two broken rectangles are full-sibs. Wing No. 2227 and 8447 are the parents of the 2232, 2233, 2234 and 2235.

(2) 抗体産生能力の系統差: 第2の免疫方法を用いて, SW系統(第1ストック)をdonorにし, 第2ストック(WP, DBおよびS系統)および第3ストック(Y, BHおよびW系統)を免疫した。第2ストックを免疫した結果をTable 3に示した。WP系統の31個体中4個体が抗体産生を行な

Table 3. Antibody Production in the Three Strains (Wild, Dominant Black and Silver) as Immunized with QRBC of Sex-linked white strain Possessing R and H Antigen

Strain	Wild type plumage		Dominant Black		Silver	
	Antibody* production rate	4 / 31 (12.9%)	6 / 11 (54.5%)	3 / 30 (10.0%)		
Individual No., Specificity and Agglutination Filter	4227	Anti-R,H + X** (x 2)	8636 Anti-R,H	(x 2)	6841 Anti-H	(x 4)
	4235	Anti-R,H + X (x 2)	8646 Anti-H	(x 2)	6862 Anti-R,H + X	(x 16)
	4278	Anti-X (x 4)	8648 Anti-H	(x 2)	6872 Anti-H	(x 1)
	4289	Anti-H (x 1)	8650 Anti-H	(x 64)		
			8651 Anti-H	(x 2)		
			8654 Anti-X	(x 2)		

* No. of antibody producers / No. of recipients

** These antibodies were not studied in detail.

Table 4. Antibody Production in the Three Strains (Yellow, Black at hatch and White) as Immunized with QRBC of Sex-linked white strain Possessing R and H Antigens

Strain	Yellow	Black at hatch	White
Antibody* production rate	11 / 22 (50.0%)	10 / 18 (55.6%)	6 / 15 (40.0%)
Individual number, Specificity and Agglutination titer	2227 Anti-R,H (x32) 2232 Anti-H (x 1) 2233 Anti-H (x 8) 2234 Anti-H (x 4) 2235 Anti-H (x 4) 2244 Anti-R + X** (x 8) 2246 Anti-R,H (x 4) 2280 Anti-R,H (x 1) 2292 Anti-H (x 1) 2293 Anti-R,H (x 8) 2295 Anti-H (x16)	7477 Anti-R,H (x 4) 7862 Anti-H (x 2) 7866 Anti-H (x 4) 7869 Anti-H (x 4) 7879 Anti-R,H + X (x64) 7886 Anti-H (x16) 7887 Anti-H (x 2) 7894 Anti-R,H (x32) 7895 Anti-H (x 8) 7901 Anti-H (x16)	8447 Anti-H (x32) 8468 Anti-H (x 2) 8469 Anti-X (x 2) 8006 Anti-R,H (x 2) 8008 Anti-R,H (x 2) 8030 Anti-R (x 8)

* No. of antibody producers / No. of recipients

** These antibodies were not studied in detail.

い、抗体産生率は12.9%であった。抗体価の範囲は、1:1~1:4であった。S系統の30個体中3個体に抗体産生が認められ、抗体産生率はWP系統とほぼ同じ10%であった。抗体価は1:1, 1:4および1:16であった。それに対してDB系統は、11個体中6個体が抗体産生を行ない、WP, S両系統より明らかに高い抗体産生率(54.5%)を示した。しかし抗体価は全体として低く、5個体が1:2で1個体が1:64であった。次に第3ストックを免疫した結果をTable 4に示した。Y系統22個体中11個体が抗体産生を行ない、抗体産生率は50%であった。抗体価の範囲は1:1~1:32であったが、1:8以下が9個体と多かった。BH系統では、18個体中10個体が抗体産生を行ない、抗体産生率は55.6%であった。抗体価の範囲は1:2~1:64で、1:8以下が6個体と多かったが、全体的にY系統よりも高い抗体価をもつ傾向が認められた。W系統においては、抗体産生が15個体中6個体に認められ、抗体産生率は40%と、他の2系統より低い値を示し、また、抗体価も1:8以下が5個体で全体的にBH系統より低い傾向がみられた。

以上の結果から、同種免疫における抗体産生能力に系統差が認められ、抗-Rおよび抗-H抗体の作製は、第1ストック→BH系統、第1ストック→DB系統、第1ストック→Y系統、および第1ストック→W系統の組合せにおいてよい結果が得られた。

(3) 産生された特異的抗体の種類

抗体産生を行なった40個体中、抗-H抗体を産生した個体が22個体(55%)と最も多く抗-Hおよび抗-R抗体を同時に産生した個体は13個体(32.5%)であったが、抗-R抗体を産生した個体は2個体(5%)だけであった。また、HまたはR抗原以外の未知の抗原に対する抗体を産生した個体が3個体(7.5%)あった(Table 3および4)。系統によって特定の抗原に対して抗体産生を行なうといった傾向はなかった。

考 察

第1ストックのSw系統をdonorにして、第2および第3ストックの6系統に免疫した結果、第2ストックではDB系統が他の2系統(WPおよびS系統)より高い抗体産生率を示した。この原因は、次のように考えられる。つまり、WPおよびS系統は系統としての育成期間が長いものに対して、DB系統は1976年に豊橋の孵卵場より導入された羽装のミュータントであり育成期間が短かく、また系統育成において、WPおよびS系統からの遺伝子の導入は行なったが、その逆は行なわなかった。従ってWPおよびS系統は、本来R抗原又はH抗原に対する抗体産生能力が低いと考えられる。それに対して、DB系統および第3ストックの3系統(Y, BHおよびW系統)は、本来抗体産生能力が高い系統であると考えられる。以上のことと、Table 2に示した結果より、同種免疫における抗体産生能力は遺伝子の支配を受けていると考えられ、抗体産生率の高低に基づく系統の選抜により抗体産生能力の高い系統が育成される可能性が強く示唆された。また抗-Rおよび抗-H抗体の作製においてもっともよい組合せは、第1ストック→BH系統であることが明らかにされた。本研究の目的である能率の良い抗血清作製のための系統の組合せが見出されたことを意味する。

産生された抗体の抗体価は一般に低く、1:8以下が全体の75%を占めた。同種免疫における抗体価は変動することが知られており、免疫回数をさらに多くしても抗体価の上昇は期待できないと考えられる。しかし、系統内の各個体は同じような免疫反応を示すため、異なる個体から得られた同じ特異性の抗血清をプールすることによって、多量の抗血清の作製が可能である。また、抗体産生能力

の遺伝子支配が示唆されたので、抗体価の高い系統の育成も可能と考えられ、今後の課題の1つである。

抗-H抗体だけを産生した個体が40個体中22個体あり、全体の55%であったのに対して、抗-R抗体だけを産生した個体は2個体(5%)にすぎなかった。この結果は、H抗原とR抗原の抗原性の差を表わすものと考えられ、前者の方が高いのかもしれない。Schierman & McBride (1967)は、ニワトリのB抗原がAシステム抗原に対する抗体産生においてアジュバント効果を示したことを報告した。ウズラにおいても同じ現象が認められるのかもしれないが、H抗原又はR抗原だけを単独にもつdonorで免疫を行なわなかったので、上記の現象との関係は明らかではない。ニワトリでは同種免疫によって目的以外の抗原に対しても抗体産生が行なわれるために吸収操作が必要である(Fujio & Ezzeldin, 1974)。しかし、ウズラでは、Table 3および4に示したように、吸収操作の必要がない場合が多く、ウズラの特徴と考えられる。

この報告では、第1ストック(QN_1^+ , R^+ , H^+)を第2ストック(QN_1^- , R^- , H^-)および第3ストック(QN_1^+ , R^- , H^-)に免疫して得られた結果を示したが、第3ストックから第1および第2ストックへの免疫を行なってみる必要があり、今後の課題であろう。

要 約

血液型の異なる個体間での免疫および、血液型の明らかな系統間での免疫により次の結果が得られた。

- (1) 血縁関係の明らかな兄妹および親子を免疫した結果、抗体産生能力に個体差が認められ、その能力は遺伝子の支配を受けていることが示唆された。
- (2) 抗体産生率を指標にして抗体産生能力を比較した場合、明らかな系統差が認められ、BH系統、DB系統、Y系統、W系統の順で高く、WP系統およびS系統は低かった。
- (3) 能率のよい抗血清作製のための系統の組合せを検討したところ、抗-Rおよび抗-H血清は第1ストックをdonorにしてBH系統(第3ストック)を免疫した場合にもっとも効果的に作製されることが明らかになった。
- (4) 抗体産生能力の遺伝子支配に関しさらに詳細な検討を行なうことおよび抗体産生能力(抗体産生率)の高い系統の育成が今後の課題であろう。

謝 辞

本研究にあたり、適切な御指導を賜った近藤恭司教授に、また、動物飼育に関し御世話になった早川つゆ技官に感謝する。

文 献

- 天池孝子・光本孝次, 1970 帯畜大学研報, 6: 565-589.
Fujio, Y. and Z. A. Ezzeldin, 1974 Jap. J. Zootech. Sci., 45: 412-418.
Katoh, H. and N. Wakasugi, 1980 J. Develop. Comp. Immunol. (in press).

Klein, J., 1975 Biology of the mouse histocompatibility-2 complex, pp. 81-127, Springer-Verlag New York Inc.

河原孝忠, 1976 シンポジウム 実験動物の開発改良(第4回) —実験動物の純化と開発(1)—
講演集.

Mizutani, M., H. Umezawa and S. Kuramasu, 1977 Jap. J. Zootech.
Sci., 48 : 227-234.

Mizutani, M., H. Umezawa and S. Kuramasu, 1977 Jap. J. Zootech.
Sci., 48 : 463-467.

Schierman, L. W. and R. A. McBride, 1967 Science, 156 : 658-659.

Wakasugi, N. and K. Kondo, 1973 Exp. Anim, 22 : 151-159.