緬羊の血清学的体質に関する研究

I. 血球抗原の分類

赤木昭治・渡辺誠喜*・鈴木正三*

(東京都立農業高等学校・*東京農業大学)

(1968. 6. 28 受付)

緬羊の血球抗原の分類については、KACZKOWSKI⁸⁾, Ycas¹⁴⁾ などによって緬羊赤血球に型的抗原の存在することが証明されて以来、ANDERSEN¹⁾, DUJARRIC DE LA RIVIERE, EYQUEN and MILLOT²⁾らが溶血素による分類を報告し、さらに STORMONT¹²⁾, RENDEL⁹⁾などは緬羊の R system を報告している。R system の R 物質は NEIMANN-SØRENSEN, RENDEL and STONE⁴⁾により、人の A 物質、牛の J 物質と生化学的に、血清学的に、また遺伝学的に類似していると報告されている。

また STORMONT, SUZUKI, RASMUSEN¹¹⁾, RASMUSEN⁶⁾は B system を発見し、それは牛の B 抗原によく似ており、少なくとも 52 の phenogroup があると報告している。

さらに RASMUSEN⁶⁾は緬羊血球を家兎に免疫して得られた抗体を用いて X-Z system を認め、血液型は、X, XZ, Z の 3 型に分類でき、牛の FV system に似ていると報告している。RASMUSEN⁸⁾らはさらに同種免疫により、A, C, D, M の 4 種の system を追加しており現在は 7 種の system が存在している。また最近 i 型に関する研究が TUCKER¹³⁾, RASMUSEN⁷⁾らによって報告されている。

わが国では、鈴木¹⁰⁾によって抗緬羊血球家兎血清を用いて S 抗原の存在が確認され、緬羊はこれをもっている S 型ともたない s 型に分けられている。そのほかはこれに関する研究は少ない。そこで著者らは、緬羊の血清学的体質に関する研究の一環として、血球抗原の分類をさらに進め、同種免疫および異種免疫により型的抗体の作成ならびに型的抗原の分類を試み、若干の成績を得たので報告する。

実験材料および方法

1) 供試緬羊: 東京農工大学農学部波丘地農業研究所多摩試験地、農林省福島種畜牧場、農林省畜産試験場(西那須)、福島県古殿町宮牧場(日本緬羊協会所属)で

飼養されているコリデール種、サウスダウン種、ロムニーマーシェ種および雑種の 234 頭を用い、さらに米国イリノイ大学より同定試験のために送られてきたタアグヒー種、ラムプイエ・メリノー種、ハンプシャー種、および雑種など 40 頭の血球を用いた。

2) 免疫動物: 異種免疫では日本白色種の体重 2.5 ~ 3.0 kg の成熟家兎を、また同種免疫ではコリデール種およびその雑種で、明 2 ~ 5 才の成緬羊を用いた。

3) 免疫血球: 凝固を防ぐために 2 % のチトラート生理的食塩水を入れた試験管中に緬羊頸静脈より採血し、生理的食塩水で数回遠沈洗滌した。

4) 免疫方法: 異種免疫では洗滌血球を 10 % の生理的食塩水浮遊液として 5 cc ずつ家兎の耳静脈内に隔日 8 ~ 10 回注入した。同種免疫では 20 % 生理的食塩水浮遊液 5 cc ずつ緬羊頸静脈内に隔日 6 ~ 8 回注入した。

5) 抗血清: 免疫により適当な抗体価を示した家兎および緬羊より採血し、血清を分離し、56°C の恒温槽に 30 分間保ち、非働化した。防腐剤として最終濃度が 0.01 % になるように窒化ソーダを加え、冷蔵庫内に冷凍保存した。

6) 補体: 数頭の健康な成熟モルモットの心臓から採血し、血清を分離し、それを生理的食塩水で 10 倍に稀釈して使用した。

7) 血清反応: 凝集反応はホールグラス法により抗原液は 1 % の血球浮遊液とし、20°C 内外の室温において 30 分後に肉眼で判定した。反応程度は 5 段階に分け、強陽性のものを 3、陽性中等度のものを 2、弱陽性のものを 1、陽性反応の疑わしきものを tr、陰性のものを 0 としてそれぞれ記録した。

溶血反応は、滴下法に従い抗血清を 1 滴ずつ入れた試験管に補体 1 滴を加え、よく振盪した後、2 % 血球浮遊液 1 滴を加え、十分に反応させるため 37°C に 90 分保ち、反応を肉眼で判定し、その強弱により 3, 2, 1, tr, 0 の 5 段階に分けて記録した。

8) 吸収試験: 洗滌血球を一定度に稀釈した抗血清にほぼ等量加え、37°C の恒温器に1時間保った後、室温および冷蔵庫中にそれぞれ2時間保ち、対応する抗体を吸収除去した。吸収不十分な時は同様な操作を繰り返した。

実験成績および考察

A. 血球抗原の分類

1. 正常抗体について

供試綿羊14頭における正常血清中の抗体の存在の有無について調べるため、交叉反応により凝集素および溶血素の検索を行なった結果、正常凝集素の存在は認められなかった。溶血素については、No. 3-5 血清中に No. 1-3 血球に対する正常抗体の存在が認められたが、その反応は極めて弱いのでこの正常抗体を使用して血球抗原を分類することは不適当であると考えられた。

2. 異種免疫による血球抗原の分類

6-4 綿羊血球をもって家兔を免疫して得た抗綿羊血球家兔血清について吸収実験を行なった結果、単一な型的凝集素が産生された。そこで数頭の綿羊血球を用いて、これと抗S凝集素¹⁰⁾との比較同定を行なった結果、全く同様な反応を示した。一方、抗-6-4血清について溶血反応により追求した結果、6例の綿羊血球はすべて陽性反応を示した。そこでこの抗血清の吸収試験を行なった。

Table 1. Absorption-test of Anti-6-4 serum

Absorbed with	Reacted with blood cells					
	101	2-2	3-8	6-2	6-3	6-4
Unabsorbed	3	3	3	3	3	3
101	0	0	0	0	3	3
2-2	0	0	0	0	3	3
3-8	0	0	0	0	3	3
6-2	0	0	0	0	3	3
6-3	0	0	0	0	0	0
6-4	0	0	0	0	0	0

その結果は Table 1 に示すとおりである。

すなわち6-4の抗血清に対して陽性に反応するもののうち、6頭の綿羊血球でこの抗血清をそれぞれ吸収した上清に対するこれら6頭の綿羊血球の反応は、6-3、6-4血球を除く他の血球に対してすべて陰性の反応を示し、6-3、6-4血球に対しては強い陽性反応を示した。この結果、6-4抗血清を101、2-2、3-8、6-2の血球で吸収した上清中に含まれる6-4血球に対する溶血素は、一応単一なものと考えられる。そこでこの上清中に含まれる型的抗体を抗-Sh₁抗体、これに反応する抗原をSh₁抗原と名付けた。鈴木は抗-S抗体を作製する過程において抗S凝集素以外に単一な型的溶血素を分離することができなかった。しかし本実験においては抗綿羊血球家兔血清から新たな抗-Sh₁抗体を単離することができた。これは鈴木が抗-S抗体の作製に用いた綿羊血球と本実験のそれとは全く異なった集団から得られたもので、前者の血球中にSh₁抗原が存在していなかったためか、あるいは吸収綿羊血球中にSh₁抗原が存在し、これに対応する抗体が吸収除去されたためかによるものと思われる。

つぎに抗Sh₁血清の抗体価を6-4血球を用いて調査したところ2倍稀釈血清を用いて128倍の価を示した。

3. 同種免疫による血球抗原の分類

Table 2 に示すように101、3-6、3-9血球を1-3、6-1綿羊に免疫した。

その結果得られた血清について、凝集素および溶血素の反応を調べた結果は Table 3 に示すとおりである。

すなわち、凝集反応においては1-3、6-1抗血清ともに14頭の作用血球に対して全く陽性反応を示さないが、溶

Table 2. Combination of sheep blood cells in isoimmunization

Donor	Receptor
101	1-3 6-1
3-6	
3-9	

Table 3. Agglutination and Hemolysis of isoimmunisera for sheep blood cells

Reaction	No. of Antisera	No. of sheep blood cells													
		101	1-3	1-4	2-2	3-5	3-6	3-8	3-9	5-1	5-4	6-1	6-2	6-3	6-4
Agglutination	1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hemolysis	1-3	tr	0	0	0	tr	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	6-1	0	3	3	3	0	3	0	0	3	0	0	3	0	3

血反応においては陽性反応を示した。すなわち 1-3 抗血清は 101, 3-5 血球に極めて弱い反応を示したが、他の血球に対しては全く陽性反応を示さなかった。これに対して 6-1 抗血清は 1-3, 1-4, 2-2, 3-6, 5-1, 6-2, 6-4 血球に対して強い陽性反応を示した。

以上の結果からこの 2 つの抗血清中には、それぞれ型的抗体が含まれていることが明らかにされた。しかし、1-3 抗血清は反応程度が極めて弱く、血球抗原の分類に使用するには不適当であると考えられる。これに比して、6-1 抗血清は反応程度が強く、血球抗原の分類に十分使用できるものと考えられた。

つぎに 6-1 抗血清について陽性反応を示す作用血球で吸収試験を行なった。その結果は Table 4 に示すとおりである。

すなわち 6-1 抗血清に対して陽性に反応する 7 頭の血球でこの抗血清をそれぞれ吸収した上清に対するこれら 7 頭の緬羊血球の反応はすべて陰性を示した。また 6-1 抗血清に反応しない 3-5, 6-3 緬羊血球をもって吸収した

上清に対するこれら 7 頭の緬羊血球の反応はすべて陽性を示した。

以上の吸収試験の結果から、6-1 抗血清には単一な型的溶血素が産生されているものと考えられる。そこで、この血清中に含まれる型的抗体を抗-Sh₂ 抗体、これに対応する抗原を Sh₂ 抗原と名付けた。

つぎに 6-1 抗血清の抗体価を調査したところ Table 5 に示す成績を得た。すなわち、6 倍に稀釈した血清において 16 倍の抗体価を示した。

B. 抗原の出現頻度

1. 各抗原の出現頻度

農林省福島種畜場、農林省畜産試験場、福島県古殿町営牧場に飼養されている 220 頭、および米国イリノイ大学からの 40 頭の緬羊血球について S, Sh₁, Sh₂ の各抗原の出現頻度を調査した結果 Table 6 に示す成績を得た。

わが国で飼養されている 145 頭のコリデール種についてみると、S 抗原を有するものが 66.2 % で鈴木ら¹⁰⁾の調査結果とだいたい一致した。Sh₁ 抗原は 8.3 % で低く、雑種を含めた 220 頭からみても 6.4 % で少ないようである。また Sh₂ 抗原については、コリデール種では 49.6 % で約半数がこれを有しているが、雑種では 5.6 % できわめて少なく、総体的には 36.4 % でかなり多かった。

米国からの 40 頭の緬羊ではわが国でのコリデール種を中心にした調査結果とは対照的に S 抗原を有するものが 30.0 % で少なく、Sh₁, Sh₂ 抗原を有するものはそれぞれ 57.5 %, 67.5 % で多いようであった。すなわちわが国でのコリデール種および雑種における血球抗原の出現頻度と米国での緬羊におけるそれとの間にかなり違いがあるように考えられる。

しかし米国緬羊の各品種の例数が僅少であるので、Table 6 に示す各品種間の差が本質的なものであるか否かは明らかでない。

2. 各抗原の組合せによる型の出現頻度

S 抗原とこの新抗原との組合せにより緬羊の血液型は 8 型に分類される。供試緬羊 260 頭について各型の出現頻度を調査した結果 Table 7 に示す成績を得た。

すなわち、もっとも出現頻度の高い型は、S 型で 30.3 %, つづいて S-Sh₂ 型 21.4 %。O 型 20.0 % という順になっている。出現頻度の低いものは Sh₁ 型、S-Sh₁ 型、S-Sh₁-Sh₂ 型でそれぞれ 2.3 % であった。またわが国での緬羊 220 頭のうち出現頻度の高い型は S 型 34.1 %, つづいて S-Sh₂ 型 24.5 % であり、その低いのは Sh₁-Sh₂ 型 3.2 %, S-Sh₁ 型 1.4 %, S-Sh₁-Sh₂ 型 1.4 %, S-Sh₁-Sh₂ 型 1.4 %, S-Sh₁-Sh₂ 型 1.4 %

Table 4. Absorption-test of isoimmune-hemolysin of Anti-6-1 serum

Absorbed with	Reacted with blood cells									
	1-3	1-4	2-2	3-6	5-1	6-2	6-4	3-5	6-3	
Unabsorbed	3	3	3	3	3	3	3	0	0	
1-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
1-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
2-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3-6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
5-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6-4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3-5	3	3	3	3	3	3	3	0	0	
6-3	3	3	3	3	3	3	3	0	0	

Table 5. Hemolysin-titer of Anti-Sh₂ serum

No. of blood cells	Dilution of Antisera				
	×2	×4	×8	×16	×32
1-3	3	2	2	tr	0
1-4	3	2	1	tr	0
2-2	3	2	1	tr	0
3-6	3	2	2	1	0
5-1	3	2	1	1	0
6-2	3	2	1	1	0
6-4	3	2	1	1	0

Table 6. Frequency of appearance of S, Sh₁ and Sh₂ antigenic factors in a few breeds of sheep

Breed		No. tested	Frequency of appearance					
			S		Sh ₁		Sh ₂	
			No.	%	No.	%	No.	%
Japan	Corriedale	145	96	66.2	12	8.3	72	49.6
	Romney Marsh	2	1	50.0	0		0	
	Corriedale × R.M.	19	13	68.4	1	5.3	5	26.3
	Hybrids	54	23	42.6	1	1.9	3	5.6
	Total	220	133	60.5	14	6.4	80	36.4
U.S.A.	Crossbred	25	7	28.0	17	68.0	19	76.0
	Targhee	2	0		1	50.0	0	
	Rambouillet Merino	7	2	28.6	3	42.9	6	85.7
	Hampshire	6	3	50.0	2	33.3	2	33.3
	Total	40	12	30.0	23	57.5	27	67.5
Grand Total		260	145	55.8	37	14.2	107	41.2

Table 7. Frequency of appearance of each type classified by S, Sh₁ and Sh₂-antigens in a few populations

Breed	Japan					U.S.A.					Grand total
	Corriedale	Romney Marsh	Corriedale × R.M.	Hybrids	Total	Crossbred	Targhee	Rambouillet Merino	Hampshire	Total	
	No. %	No. %	No. %	No. %	No. %	No. %	No. %	No. %	No. %	No. %	
Type	145	2	19	54	220	25	2	7	6	40	260
S	45 31.0	2 100	9 47.3	19 35.1	75 34.1	1 4.0	0	1 14.3	2 33.2	4 10.0	79 30.3
Sh ₁	2 1.4	0	0	0	2 0.9	2 8.0	1 50.0	0	1 16.7	4 10.0	6 2.3
Sh ₂	16 11.0	0	1 5.3	9 16.7	26 11.8	6 24.0	0	3 42.8	0	9 22.5	35 13.7
S-Sh ₁	2 1.4	0	0	1 1.9	3 1.4	3 12.0	0	0	0	3 7.5	6 2.3
S-Sh ₂	46 31.7	0	4 21.1	4 7.4	54 24.5	1 4.0	0	0	1 16.7	2 5.0	56 21.4
Sh ₁ -Sh ₂	6 4.2	0	1 5.3	0	7 3.2	10 40.0	0	2 28.6	1 16.7	13 32.5	20 7.7
S-Sh ₁ -Sh ₂	3 2.1	0	0	0	3 1.4	2 8.0	0	1 14.3	0	3 7.5	6 2.3
O	25 17.2	0	4 21.0	21 38.9	50 22.7	0	1 50.0	0	1 16.7	2 5.0	52 20.0

Sh₁ 型 0.9 % であった。米国の緬羊 40 頭については出現頻度の高いものは Sh₁-Sh₂ 型 32.5 %, Sh₂ 型 22.5 % で、低いものは S-Sh₂ 型, O 型でそれぞれ 5.0 % であった。

摘 要

緬羊血球の型的分析を行なうために異種血球免疫および同種血球免疫による型的抗体の産生、およびこれによ

る新血球抗原の分類を試み、つぎの結果を得た。

1) 緬羊正常血清中には同種血球凝集素は存在しなかった。また同種溶血素は存在するように見受けられたが、その出現頻度は極めて低く、抗体価も極めて弱かった。

2) 家兎を免疫動物とした血球免疫により、単一な型的溶血素を産生し、これにより血球抗原 Sh₁ を分類した。抗-Sh₁ 血清の抗体価は 128 倍であった。

3) 同種血球免疫により単一の型的溶血素を産生し、これにより血球抗原 Sh_2 を分類した。抗- Sh_2 血清の抗体価は 16 倍であった。

4) Sh_1 , Sh_2 抗原の出現頻度は、わが国で飼養されているコリーデール種 145 頭では、それぞれ 8.3 %, 49.6 % であった。特に Sh_1 の出現頻度は低かった。これに対して米国の緬羊 50 頭では、それぞれ 57.5 %, 67.5 % で比較的高かった。またこの緬羊は S 抗原についてもわが国で飼養されている緬羊にくらべてその出現頻度は低かった。

5) 新しい Sh_1 , Sh_2 抗原と S 抗原の組合せにより、緬羊の血液型は 8 型に分類でき、360 頭の緬羊のうち各型の出現頻度は S 型がもっとも高く、30.3 % を示し、 Sh_1 型、S- Sh_1 型、S- Sh_1 - Sh_2 型は極めて低くそれぞれ 2.3 % であった。またわが国の緬羊 220 頭のうち S 型の出現頻度はもっとも高い (34.1 %) のに対して、米国の緬羊 40 頭のそれは Sh_1 - Sh_2 型が高かった (32.5 %)。

本研究につき試験緬羊を提供していただき終始御懇切な御指導を賜りました東京農工大学森田琢磨先生・松本正雄先生・杉本文三先生はじめ波丘地農業研究所関係各位に衷心より御礼申し上げるとともに、実験にあたり貴重な資料を御供与いただきました農林省福島種畜牧場、農林省畜産試験場（西那須）関係各位に対して深甚なる

感謝の意を表する次第である。また本研究にあたり深い御理解と御激励を賜りました東京都立農業高等学校長栗崎寅市先生に厚く感謝の意を表するものである。

文 献

- 1) ANDERSEN, T. (1938) Zeitschr Rassenphysiol, 10: 88-103.
- 2) DUJARRIC DE LA RIVIERE, R., A. EYQUEN and P. MILLOT (1952) Ann. Inst. Pasteur., 83: 576-581.
- 3) KACZKOWSKI, B. (1928) Compt. rend. soc. biol., 98: 386-387.
- 4) NEIMANN-SØRENSEN, A., J. RENDEL and W.H. STONE (1954) J. Immunol., 73: 407-414.
- 5) RASMUSEN, B.A. (1958) Genetics, 43: 814-821.
- 6) RASMUSEN, B.A. (1960) ibid., 45: 1405-1417.
- 7) RASMUSEN, B.A. (1965) ibid., 51: 767-770.
- 8) RASMUSEN, B.A., C. STORMONT and Y. SUZUKI (1960) ibid., 45: 1595-1603.
- 9) RENDEL, J., A. NEIMANN-SØRENSEN and M.R. IRWIN (1954) Genetics, 39: 396-408.
- 10) 鈴木正三・渡辺誠喜 (1965) 東京農業大学家畜育種学研究室創設 15 年記念論文集, 29-32.
- 11) STORMONT, C., Y. SUZUKI and B.A. RASMUSEN (1957) J. Animal, Sci., 16: 1102.
- 12) STORMONT, C., W.C. WEIR and L.L. LANE (1953) Science, 118: 695-696.
- 13) TUCKER, E.M. (1965) Vox. sang., 10: 195-205.
- 14) YCAS, M.K.W. (1949) J. Immunol., 61: 327-347.

Résumé

Studies on the serological constitution of sheep

I. Classification of antigenic factors in sheep blood cells

Shoji AKAGI*, Seiki WATANABE** and Shozo SUZUKI**

(*Tokyo Metropolitan Agricultural Senior High School and **Tokyo University of Agriculture)

For the purpose of studies on the serological constitution of sheep, the present experiments were carried out to confirm the new cellular antigenic factors by hetro and iso-immunization of blood cell, and to clarify the frequencies of appearance of new antigenic factors in a few groups of sheep in Japan and U.S.A. The results obtained were as follows:

1) Normal antibodies in sheep blood sera caused by agglutination were not recognized to be present. However, hemolysins seemed to be present in sheep blood sera. Their frequencies of appearance were extremely low and their titers were also very weak.

2) The specific hemolysin anti-Sh₁ was produced by the antirabbit serum immunized with sheep blood cells. The new cellular antigenic factor Sh₁ corresponding to anti-Sh₁ was confirmed in sheep blood cells. The titer of the anti-Sh₁ serum was 128 fold.

3) The specific hemolysin anti-Sh₂ was produced by the iso-immunization with sheep blood cells. The cellular antigenic factor Sh₂ corresponding to anti-Sh₂ was also confirmed in sheep blood cells. The titer of the anti-Sh₂ serum was 16 fold.

4) The frequencies of appearance of Sh₁ and Sh₂ antigens in 145 Japanese Carriedales were 8.3 % and 49.6 %, respectively. On the contrary, those in 40 sheep from the Uneversity of Illinois, Urbana, U.S.A. were 57.5 % and 67.5 %, respectively. The frequency of appearance of S antigen of sheep in U.S.A. was also lower than that of those in Japan.

5) By combining these antigenic factors, the blood of sheep can be classified into 8 types. The frequencies of sppearance of each types in 260 sheep are as shown in Table 10. The frquency of appearance of S type was the highest, 30.3 % and that of Sh₁, S-Sh₁ and S-Sh₁-Sh₂ types was the lowest, 2.3 %, respectively. The frequencies of appearance of S type among 220 sheep in Japan were the highest, 34.1 %, and that of Sh₁-Sh₂ type among sheep in U.S.A. was the highest, 32.5 %.