ウズラの免疫遺伝學的研究

2. 赤血球抗原抗体反応に対する PVP の効果*

天池 孝子・光本 孝次

帯広畜産大学 帯広市

ウズラの赤血球同種免疫による抗血清の作成は、ほぼ可能とされたが¹⁾、1回に採血できる血液量は4から5 cc. が限度で、絶対量が少ない²⁾。また他の動物に比較して、私共の方法で得られる抗血清の力価は低いものが多い。これらはウズラの血液型研究をやや困難なものとしている。

水溶性の合成高分子であるポリビニルピロリドン (Polyvinylpyrrolidone PVP) は医療品への応用、特に、代用血漿・注射剤・液剤関係に広く利用されている³⁾。

赤血球保存液の成分としても、PVP は有効であり^{4,5)}、白血球に対しても、その保存性や分離上有効である⁶⁾。

McNEIL *et al.*⁷⁾ は、人間の Rh 血液型検査に PVP を使用すると判定が速やかで、容易に、かつ正確に行えると報告した。STIMPLING⁸⁾ は、マウスにおいて、PVP が同種血球反応を鋭敏にし、抗血清の力価を増加させると報告した。PVP は力価の増加法として、クームス・テスト、酵素処理法とともに有効であるという⁹⁾。このことは抗血清の節約のうえからも有効と思われる。

ここでは、その凝集反応に対する効果に注目し、ウズラの赤血球抗原抗体反応に対する PVP の添加効果について実験を試みたところ、凝集反応を鋭敏にする効果が観察されたので報告する¹⁰⁾。また一価抗体の検出についても実験を試みた。

材料と方法

抗原抗体反応に用いた抗血清は、すでに食塩水凝集素の存在が確かめられたものについて、システム (System) や力価の異なるものを使用した。抗血清 A3, A8 および A12 は A システム。B1 と B10 は B システム。C11 は C システムである¹¹⁾。A3, B1 および C11 は雌ウズラから、B10, A8, AT4 および A12 は雄ウズラから得られた抗血清であり、秋から冬に採血されたものであった。同一個体の血清で力価が違うのは、採血日ごとに、それぞれ分注して凍結保存したためである。

赤血球は2% 生理食塩水浮遊液とした。できうるかぎり、おのおのの抗血清に対してドナー (donor) の赤血球を用いたが、死亡したものについてはドナーに類似した凝集性を示す個体からの赤血球を代用した。

実験には平均分子量 360,000 の PVP (K-90, 関東化学 K.K.) を用いた。非特異的凝集様パターンを避け最適濃度を検索するために、兄弟を避けランダムに選出された25羽からの2% 赤血球浮遊液を用いて、PVP の種々の添加濃度で実験した。PVP 濃度は0.75%, 0.3%, 0.2%, 0.15%, 0.1% そして0.05% の6種とし、生理食塩水 0.1 cc に用意された血球1滴をピペットで滴下し、通常の凝集反応と同条件下でその反応を観察した。抗原抗体反応は抗血清 0.1 cc に対し、2% 赤血球浮遊液をピペット1滴の割合とし、判定は1時間後とした。技術的誤差を少なくする意味で 同一血清について少くとも2度実験を繰返した。

一価抗体の検索にあたっては、免疫血清ではあるが食塩水凝集素の存在が示されなかった QR 291, QR 235, QR 294 および QB 840 の4種類を用いた。これらは1ヶ月以上の連続免疫後採取された。さらに QR 294 と QB 840 は体重が、急激に減少した時期に採血された血清であった。0.1% PVP 添加生理食塩水を血清希釈液とし、凝集反応は(1)室温で1時間放置、2,000 R.P.M. で1分間遠心する方法と(2) 37°C で時々振盪しながら1時間静置する方法で、4種類の免疫血清のそれぞれについて観察された。2% 赤血球浮遊液は各々のドナーから得られた。

結果と考察

汎凝集様反応を避けるために表1に示したような PVP 濃度を用いて、全てにまぎらわしいパターンを示さない 0.1% を基準濃度とした。マウスの場合、平均分子量 160,000 の PVP が 1.5% の濃度で使用された⁸⁾。平均分子量は重合度や粘度に関係してくる¹²⁾。従って濃度を決定する際、平均分子量は無視できない要因と考えられる。血清希釈液を 0.15%, 0.1%, 0.05%

* 帯広畜産大学家畜育種学教室からの寄稿 No. 6
昭和45年7月6日受付

表 1. PVP 添加生理食塩水に滴下された赤血球の状態
Table 1. The cell suspension dropped in PVP saline solution

(%)	赤 血 球												Red cells												
	R 1	R 2	R 3	R 4	R 5	R 6	B 1	B 2	B 3	B 4	B 5	B 6	B 7	B 8	B 9	B 10	B 11	B 12	W 1	W 2	W 3	W 4	G 1	G 2	G 3
P V P																									
0.75	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
0.3	0	0	0	+	+	+	0	+	+	0	+	0	0	+	+	+	+	+	0	+	0	0	0	0	0
0.2	0	0	0	+	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.15	0	0	0	+	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.05	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

+: 静止状態ではポジティブなパターン。ふるとネガティブ。

0: 凝集反応なし。

+: False agglutination.

0: No agglutination.

表 2. PVP 添加法が凝集力価に及ぼす効果
Table 2. The effect of PVP in the agglutinin titer of quail cells

抗血清 Antiserum	赤血球 Red cells	血清希釈液		Antiserum diluent		
		生 食 Saline	PVP (%)			
			0.15	0.1	0.05	
A 3	R293†	32※	—	64	64	
B 1	A Y 25†	32	—	64	64	
B10	B819	256	—	1024	1024	
A 8	B827	4096	—	16384	16384	
A T 4	R215	4	4	4	—	
A12	B823	32	—	64	—	
C11	A Y 25	4	4	4	—	
C11	A Y 25	16	—	16	—	

†: ドナーが死亡のため別個体の赤血球

※: 倍数希釈

†: Red cells from another bird because donor had died.

※: Two-fold dilution.

PVP 添加生理食塩水とした結果は表 2 のごとくであった。凝集力価は倍数希釈の試験管にして、1 ないし 2 本高くなった。そして生理食塩水で高い力価を示す抗血清 (B10, A8) ほど、PVP 添加の効果が観察された。AT4 や C11 のように低い力価の場合は、ほとんど変化がみられなかった。この原因として、低希釈であると血清中の高分子が多く存在するために、PVP 添加の効果が現われないものと思われる。そこで PVP 添加濃度を 0.1%、0.3% そして 0.5% とした結果は表 3 のごとくであった。生理食塩水で低い力価を示した A3, B1, C11 そして AT4 は倍数希釈にして 1 ないし 2 本の力価の増加を示した。生理食塩水で高い力価の A8 は 0.1% と 0.3% PVP 添加濃度で力価に変化を生じなかった。これらは対照に弱い偽凝集のパターンを示す個体もあるの

で、比較判定に注意を必要とする。

A, B, C, 3 つのシステムにおける結果から、シテス間に PVP 効果の差異はないと推察された。また雌雄間にも差異は観察されなかった (表 2, 表 3)。鳥類は季節によって血清成分含量が大きく変動するといわれるが、この実験で秋から冬に採血された血清を使ったことは意識的ではなかった。

以上のことから、PVP はウズラの赤血球抗原抗体反応を鋭敏にし、大きな効果を及ぼすことが観察された。抗血清の節約のうえからも有効と考える。しかし、安心して使用できる 0.1% PVP (K-90) 濃度で力価の増加がみられるのは力価 32 倍以上の場合であった。これより低い力価の抗血清については、当然 PVP 濃度を高くする必要があるが、非特異的反応の原因をつくることに

表 3. PVP 添加法が凝集力価に及ぼす効果
Table 3. The effect of PVP in the agglutinin titer of quail cells.

抗血清 Antiserum	赤血球 Red cells	血清希釈液 Antiserum diluent			
		生 食 Saline	P V P (%)		
			0.1	0.3	0.5
A 3	R 293†	8※	—	32	32
B 1	A Y 25†	8	—	16	32
C 11	A Y 25	16	—	16	32
A T 4	R 215	1	—	2	2
A 8	B 827	2048	8192	8192	—

†, ※: 表 2. に同じ
†, ※: See Table 2.

もなる。この非特異的反応パターンは強く試験管を振盪することで、真の凝集と比較区別することは可能である。もちろん、この濃度にも限度があり、基準濃度を極端に越えると振盪によっても解決しえなくなるのであろう。一方、PVP の分子量の異なるものを適切な濃度で使用することが有効かも知れない。

1 つの抗血清で多くのサンプルを検査する場合、0.1% PVP 添加生理食塩水を使用しているが、抗血清の節約の他に、ネガティブ (negative) とポジティブ (positive) を明確に区別することが可能なので、判定が容易で正確に行えるという利点がある。

種々の酵素や異種アルブミンあるいは異種血清に比較して、PVP 法は溶液の作成、実験条件が簡単であることも重要な利点とも考えられる。

PVP の溶媒として、生理食塩水の代りにリン酸緩衝液を使用しても、ほとんど変りはなかった。従って、この実験では簡単に作成できる生理食塩水とした。凝集力価は反応時間の経過 (1 時間と 2 時間) で一定の変化を示さず、単に、いくぶん 2 時間の方がネガティブとポジティブな状態を明確にするとと思われる。

PVP 添加法で一価抗体は、用いられた 4 種の血清には検出できなかったが、これらの血清を採取した生体が急激に衰弱した現象は、外部から抗原的異物が注入したために生じた免疫病群に起因すると推察されている。しかし、免疫学的情報の不足により、ウズラにおいて類似する機構を論ずることはできない。その後、QR 294 および QB 840 は生命に別状なく、免疫操作のうち切りと共に除々に回復し、処理されなかったウズラ同様に生存した。以前、クームス・テスト法や Papain, Bromelin, Trypsin 等を用いた酵素処理法の結果も一価抗体は検出されなかったことから、私共が保有するウズラの抗血清には一価抗体の産生はないものと推察されるが、一価抗体の検出のために、McNEIL *et al.* (1952) は 10%, STIMPLING (1961) は 1.5% と分子量は異なるが、かな

り高い濃度の PVP を使用しているので付加の実験を試みる必要があると思われる。

要 約

ウズラの赤血球凝集反応に対する PVP 添加効果についての実験を試みた。生理食塩水に添加する PVP (K-90) 濃度を調べた後、血清希釈液を生理食塩水とした場合と PVP 添加生理食塩水とした場合とを、凝集反応力価を測定することで比較検討した。結果は次のとおりである。

- 1) 生理食塩水に PVP (K-90) を 0.1% 添加することにより、非添加のそれと比較して、倍数希釈の試験管で遺伝的システムに関係なく 1 ないし 2 本の力価の増加が観察された。この効果は生理食塩水で 32 倍以上の力価を示した抗血清にかぎって生じた。
- 2) 生理食塩水での力価が 16 倍以下の抗血清については、PVP 濃度を 0.3% もしくは 0.5% とすることにより添加効果が観察された。
- 3) PVP 添加法により、実験に用いられた抗血清の中に一価抗体の検出はできなかった。
- 4) PVP 添加法の有利性は技術的に簡単であり、しかも抗血清を節約できる点にある。

文 献

1) 天池孝子・光本孝次: 帯広畜産大学紀要に投稿中, 1969.
2) 高橋富美子: 帯広畜産大学卒業論文, 1970.
3) 内海 勇・伊田忠夫: 高分子, 16, 494, 1967.
4) 光本孝次・広瀬礼子: 日本万国家禽会誌秋季要旨, 23, 1966.
5) 広瀬礼子: 帯広畜産大学卒業論文, 1967.
6) BRAUNSTEINER, H., PAKESCH, F. AND VETTER, H.: Acta. Haemat., 8, 304, 1952. Cited from WALFORD, R.L.: Leukocyte antigens and antibodies, CRUNE AND STRATTON, New York and London, 4, 1960.

- 7) McNEIL, C., E. F. TRENTLMAN, N. SULLIVAN AND C. ARGALL: Amer. J. Clin. Pathol., 22, 1216, 1952.
- 8) STIMPFLING, J. H.: Transplant. Bull., 27, 109, 1961.
- 9) OWEN, R.D.: Methods in Mammalian Immunogenetics, Holden-day, 347, 1963. 光本孝次: 家禽における免疫遺伝学の展開, 家禽会誌, 6, 59, 1969. より引用.
- 10) 天池孝子・光本孝次: 家禽会誌春季大会講演要旨, 1970.
- 11) 天池孝子・光本孝次: 日畜会報第 58 回大会講演要旨, 41, 35, 1970.
- 12) 藤井光雄: 高分子化学通論, 共立出版, 東京, 47, 1967.

Immunogenetic Studies in Japanese Quail

2. The Effects of PVP as an Enhancing Agent in Quail Iso-hemagglutination Tests

Takako AMAIKE and Takatsugu MITSUMOTO

Laboratory of Animal Breeding, Obihiro Zootechnical University, Obihiro-shi.

The effectiveness of polyvinylpyrrolidone (PVP, K-90) as enhancing agent in quail iso-hemagglutination reactions are tested. A comparison of the saline isotonic solution with the PVP technic reveals a comparable degree of sensitivity in the enhancement of hemagglutinin titer.

The results are summarized as follows:

- 1) It is observed that 0.1 percent PVP and antiserum mixture technic develops successfully the agglutination titers of quail cells by one or two tubes regardless of the genetic systems. However, 0.1 percent PVP saline is effective to antiserum showing a titer or higher.
- 2) It is observed that 0.3 or 0.5 percent PVP saline is useful to enhance antiserum of 1 : 16 or less titer.
- 3) The incomplete agglutinins in the used iso-immune sera are not detected with the PVP technic.
- 4) The relative simplicity in the routine laboratory use and a saving in iso-antiserum are the added advantages of the PVP technic. (Japan. Poultry Sci., 7, 182, 1970)