マウスアデノウイルスの腸管感染経過に及ぼす抗リンパ球血清の影響

岡 田 靖 朗

EFFECT OF ANTILYMPHOCYTE SERUM ON THE TIME COURSE OF EXPERIMENTAL ENTERIC INFECTION OF MICE WITH A MOUSE ADENOVIRUS

Yasuo OKADA

Department of Hygiene and Public Health, Nippon Medical School
(Professor: Hideo NORIKI, Chairman)

[受付: 2月5日, 1973年]

総 括

マウスアデノウイルス K 87株と近交系 DK 1マウスの実験系を用いて、抗マウスリンパ球ウサギ血清 (ALS) をウイルス感染直後より連日3週間、マウスあたり0.15 ml ずつ腹腔内に投与したときのウイルス腸管感染経過に及ぼす影響について実験し、あわせて血清、腸壁、腸内容の中和抗体価および血清、小腸壁、小腸内容の IgA, IgG, IgM を定量し次の結果を得た。

1) ALS 投与によりマウスアデノウイルスの腸管内増殖は確実に延長する。

2) ALS 投与により末梢血の小リンパ球は特異的に減少するが、投与中止後は約1週間で投与前の状態に復する。

3) ALS を投与しても赤血球減少はみられず、ALS 中の溶血素は ALS 作製時に十分注意すれば防ぐことができる。

4) ALS を投与しても血清、小腸壁、小腸内容の中和抗体は、全体としては ALS 非投与群と差があるとは考えられないが、ウイルス増殖の延長が観察されたマウスのうち、数例のマウスではとくに小腸壁、小腸内容の中和抗体に低下がみられた。IgA の面よりみると、ALS 投与群では非投与群に比べ高値を示すものと低値を示すものがあり、中和抗体および IgA の低下しないマウスでは細胞性免疫の関与が特に強く示唆された。

5) IgG, IgM 抗体が積極的にウイルス腸管内増殖の

阻止に関連していると考えられる成績は得られなかった。

序 文

細胞性免疫の名で呼ばれている免疫現象には、ツベルクリンで代表される遅延型アレルギー反応、移植免疫および特殊感染症に罹患したあとにのこる免疫が含まれるのが普通であり、これらの免疫現象は血清抗体の作用としては説明しがたい。細胞性免疫の本態にリンパ球が関与していることは現在一般に認められているところであり、このリンパ球を減少させることにより細胞性免疫の本態をうかがおうとする試みは、種々の方法により多くの研究者によつてなされている (牛場ら, 1959; 前田, 1965; 根本, 1966; 多田隈ら, 1967; 多田隈ら, 1967)。

近年抗リンパ球血清 (antilymphocyte serum, ALS) が Woodruff と Anderson (1963, 1964) の報告以後注目されるようになり、その後 Gray ら (1964) や Monako ら (1965), Iwasaki ら (1967) によつて、基礎的、臨床的に ALS の細胞性免疫に対する効果が確実であることが示された。1968年には Lance & Medawar (1968) がハツカネズミの実験で、ALS は同種移植のみならずヒトの皮膚移植片のごとき異種移植にも有効であることを報告している。

ある種のウイルスに1度罹患したあと“2度がかかり”しない免疫の本態は IgG, IgA や IgM などの液性抗体が主役を演ずるものか、細胞性免疫のほうが主役を演ずるものか明らかでない点がある。

弱毒ポリオ生ワクチンを内服したあと小腸に生ずる局

所抵抗は Sabin によつて粘膜上皮細胞の細胞性免疫と説明されてきたが、Kono ら (1966) は coproantibody 産生によるウイルス中和が実体であることを明らかにした。

橋本ら (1966) は1966年マウスアデノウイルス K 87 株の分離に成功して以来、ウイルス腸管感染後に生ずる腸管局所の抵抗性について研究を進め、局所抵抗性の機序を実験的に解明するため、マウスアデノウイルス K 87株と近交系 DK1 マウスとの実験系を用いて K 87株ウイルスのマウス感染経過および再感染防御機構についての知見をまとめている (Sugiyama, ら, 1967; Hashimoto ら, 1970)。それらの成績によれば、K 87株ウイルスは感染後 2 ~ 3 週で宿主腸管から、その感染価が消失し以後再感染防御が成立するが、そこには何らかの中和物質が関与し、この中和物質は IgA 分画に属する免疫グロブリンであることが明らかとなつた (Hashimoto ら, 1971)。しかし IgA 抗体以外の機序、たとえば細胞性免疫が関与していないという確証はない。そこで今回、細胞性免疫に強い影響をもつといわれている ALS を用いて K 87株マウスアデノウイルスの感染経過がいかなる影響を受けるか、またその時のウイルス中和物質の動向、血清および小腸の IgA, IgG, IgM の動向についても観察し、細胞性免疫関与の指標が得られるかどうかを検討したので報告する。

材料と方法

1) 動物

マウスは市販 (金丸商店) の dd 成熟メスマウス約 20 g のものをリンパ球採取用とし、ウイルス感染実験には慶応義塾大学医学部微生物学教室で自家繁殖せる近交系 DK1 マウス (Ushiba ら 1962) を 4 週齢において使用した。ウサギは日本医科動物社より購入した成熟ウサギの体重 2 kg 前後のものを雌雄の別なく使用し、ALS 作製用とした。

2) 飼料

マウスには日本クレア株式会社製の CE-2 固型飼料と水のみを与え、ウサギには同社の CR-1 固型飼料と水を与えた。

3) 抗マウスリンパ球ウサギ血清 (ALS) の作製

未処置の dd マウスをエーテルで麻酔後、心臓穿刺により全血を採取したのち開胸し、心臓より還流液 (組成: $\text{Na}_2\text{C}_6\text{H}_5$ 0.027 M, NaCl 0.014 M, KCl 0.0005 M, NaHCO_3 0.00025 M) で十分還流し可及的に血液成分を除くよう努めた。ついで腋窩、鼠径、腸間膜リンパ節を摘出し、Hanks 液内でピンセットにより細分して細胞をばらばらにし、 $10^6/\text{ml}$ の細胞浮遊液にしたのち Levey

& Medawar (1966) の方法に準じて 4 羽の成熟ウサギを免疫した。初回免疫より 3 週間後、頸動脈より全採血を行ない氷室に一晚静置後血清を分離し、 56°C で 30 分間非動化ののち各血清別にただちに -20°C に保存した。

4) ALS の投与量および期間

DK1 マウス 1 匹あたり 1 日 0.15 ml を連日 3 週間、ほぼ同一時刻に腹腔内に投与した。ウイルス感染実験での ALS 使用開始はウイルス接種直後に行ない、連日 3 週間の ALS 投与を全実験を通じて実施した。

5) ALS の末梢血液に及ぼす影響

4 週齢の DK1 マウス雌雄 10 匹をそれぞれ 1 匹飼とし、雌雄 1 匹ずつ 5 群に分け、うち 4 群に 4 羽のウサギ別 ALS を連日 3 週間 0.15 ml ずつ投与し、1 群には対照として連日 3 週間、生理食塩水 0.15 ml を投与した。以後経時、経日的に各マウスの左右眼窩静脈叢より採血し、赤血球数、白血球数および白血球百分率を算出した。各ウサギ別 ALS について末梢血液像にたいする影響に大差のないことを確かめたのち各 ALS を pool し、再度末梢血液像を 5 匹のマウスについて調べたのち ALS としてウイルス感染実験に用いた。

6) ウイルス

マウスアデノウイルス K 87 株 (Hashimoto ら, 1966) を全実験を通じて使用した。ウイルス浮遊原液は DK1 マウス腎初代培養細胞にて 8 ~ 10 回継代したものを 30,000 g 30 分により 10 ~ 100 倍に濃縮したものであり、使用にあたっては $10^{4.5}$ TCD₅₀/ml に希釈して用いた。

7) ウイルス投与方法

エーテル麻酔下金属ゾンデを胃内に挿入し、マウス 1 匹あたり 0.2 ml のウイルス液を投与した。

8) マウス飼育法

ウイルス感染マウスおよび対照マウスともに交差感染を防ぐため、それぞれ 1 匹飼とし適当なる環境下に飼育した。

9) マウス腎初代培養細胞 (MsKTC)

4 週齢 DK1 マウスの腎を雌雄の別なく細胞源として使用した。方法の詳細については文献 (Hashimoto ら, 1966) を参照されたい。培養細胞の growth medium (GM) として 10% 子牛血清、100 u/ml の penicillin (PC)、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の streptomycin (SM) および lactalbumin hydrolysate を 5% 含有する Hanks 液 (LH) を使い、maintenance medium (MM) として 3% 子牛血清、100 u/ml の PC、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の SM および 0.5% の lactalbumin hydrolysate を含む Earle 液を CO_2 により pH 7.4 に調整して用いた。

10) 便からのウイルス分離と定量法

マウスを滅菌ケージに移してから30~60分後に無菌的に採取したマウスの便を、PC 1000 u/ml および SM 500 µg/ml を含む LH で10%の溶液とし、15000 g で10分間遠心し、その上清をウイルス検体とみなした。ウイルス検体は monolayer を形成した MsKTC 2本に MM 1.0 ml 注入後0.1 ml ずつ接種した。接種後1時間、24時間、3日、1週間後に MM を交換して検体の毒性を可及的に防ぎ、さらに1週間隔で MM を交換し、終末点を4週目として cytopathogenic effect (CPE) を観察した。CPE が5~7日以内に出現すれば(卅)、1~2週に出現すれば(卅)、2~4週に出現すれば(+)と表現し、4週を経過しても CPE が出現しなければウイルス陰性とみなし(-)とした。別の実験(Hashimoto ら, unpublished data) から(卅)は原材料10 mg あたり 10^8 TCD₅₀ 以上、(卅)は 10^3 、(+)は 10^1 にほぼ相当することが判明している。

11) 小腸壁からのウイルス分離と定量法

ウイルス定量用には小腸中部の腸管壁約1.2 cm (平均120 mg) を Hanks 液で洗浄のち5%液となるように抗生物質を含む LH 液を加えて均質化し、急速凍結融解を6回行なつたあと10分間15000 g にて遠心し、その上清を検体として MsKTC に0.2 ml ずつ接種した。接種後の MsKTC の取扱いおよび CPE 判定は、便からのウイルス定量の場合と全く同様に行なつた。

12) 血清中和抗体価測定法

エーテル麻醉下に心穿刺により採血し、分離した血清は非動化のち LH で4倍階段希釈し、その0.3 ml に100 TCD₅₀/0.1 ml のウイルス液0.3 ml および MM 2.4 ml 加え、混合後37°C に3時間静置のち4°C に一晚置き、MsKTC にその1 ml を接種した。なおウイルスコントロールとして使用したウイルス液の原液、10倍、100倍、1000倍希釈液に LH を0.3 ml 加えたものおよび細胞コントロールとしてウイルス液、希釈血清を加えないものを同時に観察した。ウイルスコントロールの100倍希釈液試験管2本中1本に CPE が出現した時に判定し、その時の中和抗体価を Reed-Muench 法により算出した。

13) 腸管壁、腸内容からの中和物質の抽出および中和抗体価測定法

腸管は小腸壁、大腸壁、盲腸壁全長を採取し、それぞれ別個に Hanks 液で洗浄後秤量し、抗生物質を含む LH を重量の3あるいは7倍加え、均質化のち2回の急速凍結融解を行ない遠心上清を非動化してのち再度軽く遠心し、その上清を検体とした。これらの上清は切除した腸壁の4あるいは8倍希釈に相当している。腸内容

は各腸管全長より採取し、抗生物質を含む LH による最終希釈が各内容の4または8倍になるようにして遠心上清を得た。腸壁、腸内容の中和抗体価測定法および判定は血清の場合と同様に行なつた。なお小腸壁、小腸内容の遠心上清および血清は IgA, IgG, IgM 定量用の検体としても用いた。

14) IgA, IgG, IgM に対する免疫血清

IgA, IgG, IgM を定量するために用いた抗血清は、分娩3~6日後の dd・系母マウスのミルクから分離した分泌性 IgA を adjuvant とともにウサギに注射して得たものであり、すべて慶応義塾大学医学部橋本一男博士より恵与されたものである。詳細については文献(Hashimoto ら, 1971) を参照されたい。

15) ゲル内沈降反応による免疫グロブリン定量法

160×80 mm のガラス平板上に約2 mm の厚さになるよう0.9%の Agarose (veronal buffer pH 8.6 μ =0.025) を25 ml 流し、室温にて硬化のち70×1 mm の溝を掘り、溝より3 mm はなれて直径2 mm の穴を16個ずつ作つた。それぞれの穴には2倍階段希釈した検体を0.004 ml ずつマイクロピペットにより別々に入れ、溝には最高の免疫グロブリン活性が得られるように希釈した抗 IgA・G・M を0.1 ml ずつ入れた。実際には抗 IgA は4倍に、抗 IgG は32倍に、抗 IgM は8倍に veronal buffer で希釈して用い、湿度100%の密閉箱に室温にて48時間静置後肉眼的に沈降線を判定した。

成 績

1) ALS の末梢血液像に及ぼす影響

4羽のウサギから得た ALS を別個に3週間連日投与し、それぞれの ALS について末梢血液像にたいする影響を比較した結果、各 ALS の間にいちじるしい差を認めなかつたため4羽のウサギ血清を pool して5匹のマウスについて血液像を調べたのが図1~3である。ALS は被検マウスの腹腔内に連日3週間0.15 ml ずつ投与し、その1時間後より40日間適当な間隔で眼窩静脈叢より採血した。正常マウスの白血球は5000~9000/mm³ の間にあり、リンパ球は約70~80%を占めている。図1は5匹のマウスについて ALS 投与による白血球数の変化を各マウス別に示したものである。ALS を投与すると投与1時間後より白血球数は著明に減少した。マウスによる個体差があり、8日後より白血球は除々に増加するけれども、ALS 投与期間中は確実に投与前の70%以下を維持し、投与中止後は約1週間ではほぼ投与前の数に復した。ALS 投与前後の白血球分類の動きは図2に示してある。図2は被検マウス5匹それぞれの塗抹標本を鏡検し、200個の白血球について分類した%から絶対数を

Fig. 1 Effects of ALS on white blood cells (WBC).

Fig. 2 Classification of WBC. mean value of five mice.

Fig. 3 Effects of ALS on red blood cells (RBC).

算出し、各計測時について平均したものである。図に示すように ALS 投与中は大リンパ球、好中球、単球その他の白血球の減少は小リンパ球の減少に比し著明ではなく、小リンパ球のみが著しく減少していることからみて、白血球数の減少は小リンパ球の減少によるものであるといえる。

白血球の算定と同時にこなつた赤血球数の算定は図3に示すように全期間を通じて大きな変化を示さなかつたが、No. 2のマウスのみ ALS 投与期間とほぼ一致して赤血球数のわずかな変動がみられた。本研究に用いた ALS は多くの研究者が行なつている、マウス赤血球に

Fig. 4 Time course of the growth of K 87 mouse adenovirus.

↓ : K 87 mouse adenovirus challenge

よる吸収操作を行ななかつたが、図3に示すように ALS 投与によつてもほとんど赤血球数に変動のなかつたことや、ALS 投与中にマウスを剖検しても脾腫のみられなかつたことから、ALS 作製時ウサギ体内での溶血素の産生は少なかつたものと考えられる。これは抗原液の作製にあたつてあらかじめマウスを十分に還流しているため、抗原への赤血球成分の混入が少なかつたためと考えられる。

2) マウスアデノウイルス K 87株の感染経過

図4に示されるごとく、ALS 非投与群ではウイルス感染後1週には小腸中部の腸壁よりウイルスが検出され、2.5週までは確実にウイルス陽性であるが、3週目にはウイルスの検出はみられず、以後6週までウイルスは検出されない。いつばうウイルス感染直後より連日3週間 ALS を投与した群では1週後から小腸壁より検出され、3週目に3匹中1匹のマウスに検出されなかつたが3.5週目には3匹中3匹に、以後4週目で3匹中1匹、5週目で3匹中1匹にウイルス陽性であつた。6週目には3匹ともにウイルスは検出されなかつた。

Fig. 5 Percentage of mice in which K 87 virus was detected in their feces.

↓ : K 87 mouse adenovirus challenge

● : ALS treated mouse

○ : ALS not treated mouse

同一条件下に飼育したウイルス・ALS 非投与の対照群ではウイルスは検出されなかった。

小腸壁からのウイルス検出と平行して行なつた便からのウイルス検出を%で示したのが図5である。ALS 非投与群ではウイルス感染後1週、2週、2.5週目までウイルスは便から検出されたが3週目以後には検出されなかった。ALS 投与群では感染後1週、2週、2.5週、3週、3.5週目まで3匹中3匹に、4週目、5週目で3匹中1匹(33%)に便からウイルスが検出され、6週目には3匹ともに検出されなかった。3週目に小腸壁からウイルスの検出されなかった1匹のマウスは便からはウイルスが検出された。この1匹のマウスを除いて他のマウスは小腸壁と便からのウイルス検出が同一成績を示した。以上から ALS 投与群においては非投与群に比較して明らかにマウスアデノウイルス感染は延長しているものとみることができ、このことは ALS がウイルスの腸管における増殖に有利な条件を作っている可能性をうかがわせる。

3) 血清、小腸壁および小腸内容の中和抗体価

血清中和抗体価は ALS 投与群、非投与群ともウイルス感染後2週ごろから上昇をはじめ、3週以後はほぼ一定の抗体価を維持するが ALS 投与群では3～4週の血清抗体価が非投与群に比して一般に高値を示した。小腸壁中和抗体価の動きは血清よりやや遅れて、ウイルス感染3週後より上昇し、以後6週まで一定した抗体価を保った。小腸内容の中和抗体価は小腸壁と同様に、ウイルス感染3週後より上昇を示すマウスもいるが、小腸壁に比べてマウスによる個体差が大きい。しかし3週以後はほぼ一定した抗体価を維持する。総じて ALS 投与群と非投与群の間に中和抗体価のうえで大きな差を見いだすことはできない(図6、表1)。

Fig. 6 Observation of K 87-neutralizing activity of the small-intestinal wall, the small-intestinal contents, and the serum of mice.

Numbered mouse is discussed in text as a special case.

● : ALS treated mouse

○ : ALS not treated mouse

4) 大腸壁および大腸内容の中和抗体価

大腸壁および大腸内容について検討したが ALS 投与群、非投与群とも抗体価の上昇はみられなかった。

5) 盲腸壁および盲腸内容の中和抗体価

盲腸壁および盲腸内容について中和抗体価をしらべたが ALS 投与群、非投与群とも抗体価の上昇はみられなかった。

6) 血清、小腸壁、小腸内容における免疫グロブリン

IgA (図7、表1)。血清 IgA は ALS 投与群で2週頃より上昇の傾向がみられ、以後6週までほぼ同じレベルを維持した。ALS 非投与群では投与群と同様に2週頃より上昇を示したが、以後6週まで ALS 投与群に比し若干低いレベルで推移するようにみえる。

小腸壁の IgA は ALS 投与群、非投与群とも同じよ

Table 1 Titers of K87-neutralizing activity, Immunoglobulin A, G, and M, and detection of K87 virus in the small intestinal wall and feces of each mouse.

W	ALS	No.	Serum				Wall				Contents				Virus	
			NT	Ig			NT	Ig			NT	Ig				
				A	G	M		A	G	M		A	G	M	I	F
2.5	—	23	8	8	512	8	∠ 4	32	4	∠ 4	∠ 4	32	∠ 4	∠ 4	+	+
		24	32	128	512	∠ 1	∠ 4	32	8	∠ 4	∠ 4	16	∠ 4	∠ 4	+	+
		25	16	32	256	4	8	32	8	∠ 4	∠ 4	32	∠ 4	∠ 4	+	+
	+	47	32	128	1024	4	∠ 4	32	16	∠ 4	∠ 4	16	4	∠ 4	+	+
		48	16	16	1024	8	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	64	4	∠ 4	+	+
		49	8	64	1024	∠ 1	∠ 4	16	16	∠ 4	∠ 4	16	∠ 4	∠ 4	+	+
3.0	—	26	16	32	1024	4	16	32	4	∠ 4	8	64	∠ 4	∠ 4	—	—
		27	32	32	256	∠ 1	16	16	4	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		28	32	16	256	2	16	16	8	∠ 4	16	16	∠ 4	∠ 4	—	—
	+	50	128	32	1024	8	32	32	32	∠ 4	32	32	8	∠ 4	—	+
		51	64	128	512	1	8	8	16	∠ 4	8	32	4	∠ 4	+	+
		52	32	64	1024	∠ 1	32	32	32	∠ 4	∠ 4	32	4	∠ 4	+	+
3.5	—	29	16	32	1024	2	16	32	32	∠ 4	16	64	∠ 4	∠ 4	—	—
		30	16	8	256	8	32	16	4	∠ 4	32	64	∠ 4	∠ 4	—	—
		32	16	8	256	8	16	16	4	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
	+	53	128	16	256	4	nt	8	16	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	+	+
		54	64	32	256	8	8	8	16	∠ 4	∠ 4	4	∠ 4	∠ 4	+	+
		56	64	128	nt	8	8	16	32	∠ 4	∠ 4	16	∠ 4	∠ 4	+	+
4.0	—	33	128	16	1024	16	64	16	8	∠ 4	32	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		34	32	64	512	∠ 1	64	32	4	∠ 4	32	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		35	32	64	512	16	16	32	4	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
	+	57	256	128	256	8	32	32	32	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		58	64	32	128	8	32	32	32	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		59	64	128	128	8	32	32	32	∠ 4	∠ 4	32	4	∠ 4	+	+
5.0	—	36	32	16	128	4	32	32	4	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		37	128	16	1024	8	16	16	16	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		38	128	16	512	8	16	16	4	∠ 4	32	32	∠ 4	∠ 4	—	—
	+	61	128	64	1024	8	32	16	16	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		63	32	16	256	8	nt	16	16	∠ 4	16	16	∠ 4	∠ 4	—	—
		44	8	32	256	8	8	8	8	∠ 4	∠ 4	8	∠ 4	∠ 4	+	+
6.0	—	39	128	32	1024	8	16	32	4	∠ 4	8	16	∠ 4	∠ 4	—	—
		40	64	16	128	2	16	16	∠ 4	∠ 4	8	16	∠ 4	∠ 4	—	—
	+	65	128	128	1024	1	nt	16	∠ 4	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		66	128	32	256	8	32	32	16	∠ 4	8	32	∠ 4	∠ 4	—	—
		67	128	128	1024	1	32	32	8	∠ 4	16	32	∠ 4	∠ 4	—	—

W: Weeks after challenge ALS: Antilymphocyte serum No.: Mouse number NT: Titer of K87-neutralizing activity Ig A, G, M.: Immunoglobulin A, G, M I: Small intestinal wall F: Feces nt: Not tested

うなレベルで推移するが、3週以後では ALS 投与群にやや低いレベルの IgA を示すマウスがみられた。すなわち3週以後小腸壁 IgA が8倍に位置する4匹 (No. 51, 53, 54, 64) のマウスであり、これらのマウスすべてに小腸壁からウイルスが検出された。3週で32倍の小腸壁 IgA を示した ALS 投与マウス2匹のうち No. 52のマウスは小腸壁および便から、No. 50のマウスは便

からウイルスが検出された。

小腸内容の IgA は血清 IgA と同様な経過で上昇の傾向を示すが、ALS 投与群で3週以後8倍以下の IgA を示す2匹のマウス (No. 54, 64) および IgA 32倍を示す3匹のマウス (No. 50, 51, 52,) では No. 50のマウス以外は小腸壁および便からウイルスが検出され、No. 50のマウスは便からウイルスが検出された。

Fig. 7 Observation of immunoglobulin A of the small-intestinal wall, the small-intestinal contents, and the serum. Numbered mouse is discussed in text as a special case.

● : ALS treated mouse
○ : ALS not treated mouse

IgG (図8, 表1). 血清におけるIgGの推移は1~3週まではALS投与群での上昇が速く, ALS非投与群では2週頃から上昇の傾向がみられた. 2, 2.5, 3週でのIgGはALS投与群が高く, 3.5週以後はALS投与群, 非投与群ともほぼ同様のレベルで推移した. 小腸壁のIgGは2週頃よりALS投与群でやや高いレベルを維持するが, 非投与群では2.5週頃から6週まではほぼ一定のレベルで推移した. 小腸内容のIgGはALS投与群にのみ2~3週で高いレベルを示すマウスがみられるが, 3.5週以後はALS非投与群とともに検出されないレベルで推移した.

IgM (図9, 表1). 血清のIgMはALS投与群, 非投与群ともほぼ同様に推移し, 両群とも3週以前に比べ3.5週以後若干高い値を示す傾向がみられた. 小腸壁および小腸内容のIgMは6週間を通じて検出されない

Fig. 8 Observation of immunoglobulin G of the small-intestinal wall, the small-intestinal contents, and the serum.

● : ALS treated mouse
○ : ALS not treated mouse

レベルで推移し, IgMの上昇は認められなかった.

考 察

異種血清を用いることによりリンパ球をこわそうとする試みは, Metchnikoff (1899) がモルモットの脾臓, リンパ節の浮遊液でラットを免疫し, 得られた抗血清がリンパ球ならびに多核白血球をころす作用のあることをみているように, 決して新しいことではない. その後Chewら(1937), Cruickshanks(1941)によつてこの種の抗血清が特異的にリンパ球を減少させること, 赤血球で吸収してもその効果に変化がないことが確められ, 近年リンパ球と細胞性免疫との関係に強い関心が寄せられるにつれて, 各方面でALSを用いた研究の成果が相次いで報告され, より強力な免疫抑制効果をもつALSはウサギを胸管リンパ球または胸腺細胞で免疫した時に得られることが認められている(Nagayaら, 1965; Tursiら, 1969; Winnら, 1970; Southworthら, 1970; Balner, 1970; Pichlmayr, 1970; Skamene,

Fig. 9 Observation of immunoglobulin M of the small-intestinal wall, the small-intestinal contents, and the serum.

● : ALS treated mouse
○ : ALS not treated mouse

1970 ; Traeger ら, 1970 ; 藤本, 1970).

本研究に使用した ALS はマウスのリンパ節細胞でウサギを免疫して作製し、白血球減少を指標として ALS が *in vivo* でたしかに何らかの作用をしているものとみなして実験をすすめた。ALS の免疫抑制効果を *in vitro* で正確に判定する方法がまだ確立されていない現状では、白血球とくに小リンパ球の減少を指標とする方法も一法であろう。しかし、リンパ球の減少がなくても移植免疫の強い抑制がみられたという報告 (Levey ら, 1966) もあることは注意しなければならない。

本研究の白血球分類でみるように、ALS 投与により特に小リンパ球が減少していることは Agnew (1968) や Tyler ら (1969) の報告とも一致しており、さらに ALS の効果とよく似ているといわれる新生マウス胸腺摘除の実験で末梢血中の小リンパ球の動向をみている Miller ら (1967) や田尻 (unpublished data) の結果でも小リンパ球は著明に減少していることからみて、ALS の免疫抑制効果と小リンパ球の減少とは平行するものとみてよいであろう。

本研究では ALS 投与 1 時間後に小リンパ球の著明な

減少を認めており、この点は投与後 4 時間で同様の減少を認めている Gray ら (1966) の報告とも一致する。ALS のいかなる作用によつて小リンパ球が減少するかということは、現在なお、論議の分かれているところであるが、ALS の量が少量でも小リンパ球が急激に減少することからみて、Denman ら (1968) が推論するように少なくとも cytotoxic に末梢リンパ球を選択的に破壊するという mechanism は存在するのであろう。

白血球の変動に比べて赤血球の受ける影響は少なく (多田隈, 昭和 43 年), 本研究でも ALS 投与期間中赤血球の変動はほとんど認められなかった。No. 2 のマウス (図 3) で ALS 投与期間とほぼ一致して赤血球の増加がみられるが、その増加は 10% 以下であり、他のマウス (No. 1, 3, 4, 5) で増加がみられないことから考えて、測定誤差によるものか、あるいは頻回の採血による造血機能の亢進が原因しているものと考えられる。本研究で用いた ALS はマウス赤血球による吸収操作はしていないが、赤血球数に著明な変化がみられず、ALS 投与により死亡したマウスのなかつたことから、十分注意して抗原細胞を調製すれば溶血素の形成は防ぐことができるものと考えられる。

ウイルス感染に対する ALS の影響は、そのウイルスと細胞性免疫との関係が強いほど ALS の投与によつて増悪し (Hirsch, 1970 ; Allison, 1970), methylcholanthrene による腫瘍も ALS の投与によつて発生しやすくなる (Cerilli ら, 1969 ; Rabbat ら, 1970) といわれており、この辺の事情は抗原に対するマウスの免疫反応が ALS によつて抑制されるためと理解されている。さらに ALS の免疫抑制の様相は新生時胸腺摘除の効果と類似しているといわれ (Levey, 1970 ; Hirsch, 1970), 本研究で ALS の投与により、マウスアデノウイルス K 87 株の腸管内増殖が次第に低下はするが明らかに延長していることから、本研究に用いたウイルスと細胞性免疫の関係を示唆するものと考えられる。この点については ICR 系無菌マウスの新生時胸腺摘除群についてマウスアデノウイルス K 87 株の感染経過をしらべた田尻 (unpublished data) の結果でもウイルスの腸管内増殖は延長し、本研究の結果と一致する。

血清、小腸壁および小腸内容の中和抗体価は ALS 投与群と非投与群との間に大きな差はみられず、両群ともほぼ同様なレベルで推移するが 3 週以後に小腸壁および便からウイルスの検出されたマウスでは、とくに小腸壁中和抗体価に高値を示すものと、低値を示すものがあることが注目される。小腸内容の中和抗体価は一般に小腸壁中和抗体価より低いか、同じ価を示すマウスが多い。

K 87ウイルスの増殖部位は小腸に限られるといわれており (Hashimoto ら, 1970), その部位における抗体はたしかに検出されたが, 盲腸および大腸についての中和抗体価は実験した範囲内では上昇はみられなかった。

免疫グロブリン IgA のうち, 血清 IgA は ALS 投与群でやや高いレベルを示すが, ALS 自体のゲル内沈降反応による抗 IgA・G・M との cross は IgA, IgM では検出されず, IgG のみ32倍の cross を認めたことからみて, ALS 中の IgA が ALS 投与群の血清 IgA を見かけ上上昇させたとは考えられない。小腸壁, 小腸内容の IgA は ALS 投与群, 非投与群との間に特別の差はみられない。

橋本らはマウスアデノウイルス K 87株に対する腸管抵抗性は, 腸管局所で産生されて腸管内に分泌される IgA に属する中和抗体に依存する現象であることを示しており (Hashimoto ら, 1971), さらに cyclophosphamide を用いて IgA 抗体を積極的に低下させた実験および初感染後長期間を経ての再感染実験 (Hashimoto ら, unpublished data) で腸管局所の IgA に属する中和抗体が K 87株ウイルスの腸管内増殖阻止に関連していることを示している。この点に関して本研究の結果を検討すると, 3 週以後ウイルスの検出されなかったマウスでは ALS 投与群, 非投与群ともに小腸壁中和抗体は 16倍以上, 小腸内容中和抗体は 8 倍以上を示し, 小腸壁および小腸内容の IgA はともに16倍以上を示している。いつぼう, 3 週以後もウイルスの検出されたマウスは, すべて ALS 投与群であり, これらのマウスでは小腸壁および小腸内容中和抗体に高値を示すものと低値を示すものがあり, 小腸壁中和抗体の高いマウスで小腸壁, 小腸内容の IgA は高く, 中和抗体の低いマウスの IgA はマウスにより差がみられるが総じて低い抗体価を示している。ウイルスの腸管内増殖が延長したマウスを小腸壁中和抗体価より分けると表 2 に示すように小腸

壁中和抗体価の高いマウスでは小腸壁 IgA は高く, 小腸壁中和抗体価の低いマウスでは小腸壁 IgA は低いことを示している。本研究で定量している IgA は total IgA であつて IgA ウイルス中和抗体ではないが, ALS 投与群の血清 IgA が非投与群よりやや高いレベルを示したことからもみて, ALS 投与によつて IgA レベルが抑制されたとは考えられない。小腸壁の IgA 抗体に属する中和抗体が低下したマウスにウイルス増殖の延長がみられたことは, 橋本ら (1971) の報告と一致するが, 小腸壁の中和抗体および IgA 抗体の低下がみられなかったマウスでは, ALS 投与によつて細胞性免疫が抑制された結果, ウイルスの腸管内増殖が延長されたものと考えられる。免疫に関与する免疫適格細胞としてリンパ系細胞と形質細胞があり, これらには胸腺由来 (T) 細胞と骨髄由来 (B) 細胞のあること (Burnet, 1968 ; Miller ら, 1968 ; Mitchell ら, 1968), さらに ALS によつて機能が抑制されるのは T細胞であること (齊藤, 昭和47年) が示されており, 本研究でウイルスの増殖延長がみられたことは, ALS 投与によつて T細胞の機能が抑制された結果と考えられ, 反面, ウイルスの増殖延長が比較的早期に停止したマウスでは T細胞の抑制が比較的弱かつたためか, または ALS投与中止後 T細胞の機能回復がすみやかに行なわれて, 抗体産生細胞前駆細胞である B細胞に induction がかつたものと考えられる。

血清, 小腸壁, 小腸内容の IgG は, とくに小腸壁, 小腸内容で ALS 投与群に高いレベルを示すマウスがみられるが, ALS 自体の IgG が寒天内沈降反応で32倍を示したことからもみて, 腹腔内に投与した ALS の IgG が小腸壁, 小腸内容にまで滲出したものと思われ, IgG がウイルスの腸管内増殖阻止と相関しているとは考えられない。

IgM は血清にのみ検出され小腸壁および小腸内容には検出されない。血清における IgM は ALS 投与群, 非

Table 2 Data referred to a discussion from Table 1.

Weeks after challenge	ALS	Mouse	Serum		Wall		Contents		Virus	
		No.	NT	IgA	NT	IgA	NT	IgA	I	F
3.0	+	51	64	128	8	8	8	32	+	+
3.5	+	54	64	32	8	8	< 4	4	+	+
3.5	+	56	64	128	8	16	< 4	16	+	+
5.0	+	64	8	32	8	8	< 4	8	+	+
3.0	+	50	128	32	32	32	32	32	—	+
3.0	+	52	32	64	32	32	< 4	32	+	+
4.0	+	59	64	128	32	32	< 4	32	+	+

See the footnotes of Table 1.

投与群との間に差はみられず、IgM が積極的にウイルスの腸壁内増殖阻止と相関しているとは考えられない。

本研究で定量されていない盲腸、大腸の IgA・G・M は今後さらに検討するべきものであろう。

(本研究の要旨は第18回日本ウイルス学会において発表された)

謝 辞

執筆するにあたり終始ご懇篤なご指導ならびにご校閲を賜った恩師乗木秀夫教授、柚木斉教授ならびに第一外科代田明郎教授に衷心より深謝いたします。また研究施設を快く貸与下さり、直接研究のご指導、ご校閲を賜った慶応義塾大学医学部佐々木正五教授、橋本一男助教授に深甚の謝意を表しますとともに種々ご指導、ご協力をいただいた慶応義塾大学医学部微生物学教室各位、日本医科大学大学院田尻孝医学士に心からの感謝を捧げます。

Summary

Rabbit antimouse antilymphocyte serum (ALS) was examined for effect on the time course of growth of mouse adenovirus strain K 87 in oral infection. Four-week-old DK 1 inbred albino mice were used. At the same time examinations were carried out for the peripheral blood cells, the mouse adenovirus-neutralizing substance, and the 3 classes of immunoglobulin, IgA, IgG, and IgM, in the small intestine, as well as in the serum, of the mouse. Sera were collected from four rabbits and pooled as an ALS, which was injected intraperitoneally in a dose of 0.15 ml/head/day every day for 3 weeks. The results obtained are summarized as follows.

1) In ALS-treated mice, prolonged growth of the virus was observed distinctly, as compared with ALS-not-treated mice.

2) Peripheral small lymphocytes decreased in count especially with ALS treatment. After about a week of discontinuance of ALS treatment, however, the small-lymphocyte count returned to the level before the treatment.

3) No peripheral erythrocyte count decreased with ALS treatment. It seemed that the hemolysis-formation may have been prevented by the careful preparation of antigen cells.

4) In all the mice except a few, K 87-neutralizing activity and immunoglobulin of the serum and small-intestinal wall and contents were at almost the same levels, regardless of the application or omission of ALS treatment. In several mice in which was observed prolongation of virus growth, the appearance of K 87-neutralizing ac-

tivity and IgA in the small-intestinal wall and contents was retarded in some cases or not retarded in others. It was suggested that the effect of humoral immunity might have induced the former cases and the effect of cell-mediated immunity the later.

文 献

- 1) Agnew, H. D. (1968) : The effect of heterologous antilymphocytic serum on the small lymphocyte population on rats. *J. Exp. Med.*, **128**, 111-119.
- 2) Allison, A. C. (1970) : Effects of antilymphocytic serum on host responses to infectious agents. *Fed. Proc.*, **29**, 167-168.
- 3) Balner, H. (1970) : In vivo evaluation of antihuman lymphocyte sera. *Fed. Proc.*, **29**, 117-119.
- 4) Burnet, F. M. (1968) : Evolution of the immune process in vertebrates. *Nature*, **218**, 426-430.
- 5) Cerilli, G. J. and Treat, R. C. (1969) : The effect of antilymphocyte serum on the induction and growth of tumor in the adult mouse. *Transplantation*, **8**, 774-782.
- 6) Chew, W. B. and Lawrence, J. S. (1937) : Antilymphocytic serum. *J. Immunol.*, **33**, 271-278.
- 7) Cruickshank, A. H. (1941) : Antilymphocytic serum. *Brit. J. Exp. Path.*, **22**, 126-136.
- 8) Denman, A. M. and Frenkel, E. P. (1968) : Mode of action of anti-lymphocyte globulin. 1. The distribution of rabbit anti-lymphocyte globulin injected into rats and mice. *Immunol.*, **14**, 107-113.
- 9) 藤本吉秀 (1970) : 抗リンパ球血清, 総合臨床, **19**, 1506-1513.
- 10) Gray, J. G., Anthony, P., Monaco, A. P., Wood, M. L. and Russell, P. S. (1966) : Studies on heterologous antilymphocyte serum in mice. 1. In vitro and in vivo properties. *J. Immunol.*, **96**, 217-228.
- 11) Gray, J. G., Monaco, A. P. and Russell, P. S. (1964) : Heterologous mouse antilymphocyte serum to prolong skin homografts. *Surg. Forum.*, **15**, 142-144.
- 12) Hashimoto, K., Sugiyama, T. and Sasaki, S. (1966) : An adenovirus isolated from the feces of mice. 1. Isolation and identification. *J. J. M.*, **10**, 115-125.
- 13) Hashimoto, K., Sugiyama, T., Yoshikawa, M. and Sasaki, S. (1970) : Intestinal resistance in the experimental enteric infection of mice with a mouse adenovirus. 1. Growth of the virus and appearance of neutralizing substance in the intestinal tract. *J. J. M.*, **14**,

- 381-395.
- 14) Hashimoto, K., Yoshikawa, M., Sugihara, Y. and Sasaki, S. (1971) : Intestinal resistance in the experimental enteric infection of mice with a mouse adenovirus. 2. Determination of the neutralizing substance in the intestinal tract as an IgA antibody. *J. J. M.*, **15**, 499-508.
 - 15) Hirsch, M. S. (1970) : Effects of antilymphocytic serum on host responses to infectious agents. *Fed. Proc.*, **29**, 169-170.
 - 16) Iwasaki, Y., Porter, K. A., Amond, J. R., Marchioro, T. L., Zuhlke, V. and Starzl, T. E. (1967) : The preparation and testing of horse antidog and antihuman antilymphoid plasma or serum and its protein fractions. *Surg. Gyn. & Obst.*, **124**, 1-24.
 - 17) Kono, R., Ikawa, S., Yaoi, H., Hamada, C., Ashihara, Y. and Kawakami, K. (1966) : Studies on poliovirus coproantibody. 2. Characterization of neutralizing substance in fecal extracts. *Amer. J. Epidem.*, **83**, 14-23.
 - 18) Lance, E. M. & Medawar, P. B. (1968) : Survival of skin heterografts under treatment with antilymphocytic serum. *Lancet*, **I**, 1174-1176.
 - 19) Levey, R. H. (1970) : Influence of antilymphocyte serum on cell mediated and antibody-mediated responses. *Fed. Proc.*, **29**, 156-158.
 - 20) Levey, R. H. and Medawar, P. B. (1966) : Some experiments on the action of antilymphoid antisera. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **129**, 164-177.
 - 21) 前田勝利 (1965) : マウスにおける諸種免疫反応の発現に及ぼす6-mercaptopurine 連続投与の影響 *日本細菌学雑誌*, **21**, 106-111.
 - 22) Metchnikoff, E. (1899) : Etudes sur la resorption des cellules. *Ann. Inst. Pasteur*, **13**, 737-769.
 - 23) Miller, J. F. A. P., Dukor, P., Grant, G., Sinclair, N. R. St C. and Sacquet, E. (1967) : The immunological responsiveness of germ-free mice thymectomized at birth. 1. Antibody production and skin homograft. *Clin. exp. Immunol.*, **2**, 531-542.
 - 24) Miller, J. F. A. P. and Mitchell, G. F. (1968) : Cell to cell interaction in the immune response. 1. Hemolysin-forming cells in neonatally thymectomized mice reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **128**, 801-820.
 - 25) Mitchell, G. F. and Miller, J. F. A. P. (1968) : Cell to cell interaction in the immune response. 2. The source of hemolysin-forming cells in irradiated mice given bone marrow and thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **128**, 821-838.
 - 26) Monako, A. P., Wood, M. L. and Russell, P. S. (1965) : Effect of adult thymectomy on the recovery from immunological depression by antilymphocyte serum. *Surg. Forum.*, **16**, 209-211.
 - 27) Nagaya, H. and Sieker, H. O. (1965) : Allograft survival : Effect of antiserum to thymus glands and lymphocytes. *Science*, **15**, 1181-1182.
 - 28) 根本一郎 (1966) : マウス, ウサギにおける諸種免疫反応の発現に及ぼす mitomycin-C 連続投与の影響. *移植*, **1**, 341-349.
 - 29) Pichlmayr, R. (1970) : Aspects in production of antilymphocyte sera. *Fed. Proc.*, **29**, 111-113.
 - 30) Rabbat, A. G. and Jeejeebhoy, H. F. (1970) : Heterologous antilymphocyte serum (ALS) hastens the appearance of methylcholanthrene-induced tumors in mice. *Transplantation*, **9**, 164-166.
 - 31) 斉藤和久 (昭和47年) : 免疫応答の induction と免疫現象の発現, *慶応医学*, **49**, 373-380.
 - 32) Skamene, E. (1970) : Antilymphocyte serum binding to cell surfaces. *Fed. Proc.*, **29**, 126-127.
 - 33) Southworth, J. G., Ohanian, S. H., Plate, J. M. and Amos, D. B. (1970) : Heterologous antihuman and antimouse sera prepared in horse, goat, rabbit and cow. *Fed. Proc.*, **29**, 101-103.
 - 34) Sugiyama, T., Hashimoto, K. and Sasaki, S. (1967) : An adenovirus isolated from the feces of mice. 2. Experimental infection. *J. J. M.*, **11**, 33-42.
 - 35) 多田隈卓史 (昭和43年) : 抗リンパ球血清について——とくにマウスの諸種免疫反応の成立に及ぼす効果について——*モダンメディカ*, **14** : 493-499.
 - 36) 多田隈卓史, 秋山武久, 根本一郎, 牛場大蔵 (1967) : Cyclophosphamide の諸種免疫反応の成立に及ぼす効果, *移植*, **2**, 74-82.
 - 37) 多田隈卓史, 根本一郎, 秋山武久, 牛場大蔵 (1967) : 抗リンパ球血清の免疫抑制作用 (I). —抗マウスリンパ球血清の諸種免疫反応の成立に及ぼす効果—, *移植*, **2**, 52-60.
 - 38) Traeger, J., Fries, D., Revillard, J. P., Durix, A., Carraz, M. and Plan, M. (1970) : Production of human antilymphocytic serum in horse with thoracic duct lymphocytes and peripheral lymphocytes. *Fed. Proc.*, **29**, 108-110.
 - 39) Tursi, A., Greaves, M. F., Torrigiani, G., Playfair, J. H. L. and Roitt, I. M. (1969) : Response to phytohaemagglutinin of lymphocytes from mice treated with antilymphocyte globulin. *Immunology*, **17**, 801-818.
 - 40) Tyler, R. W., Everett, N. B. and Schwarz,

- M. R. (1969) : Effect of antilymphocytic serum on rat lymphocytes. *J. Immunol.*, **102**, 179-186.
- 41) Ushiba, D., Kitasato, B., Saito, K., Nakano, M. and Nomura, T. (1962) : Selective inbreeding of mouse strains uniformly susceptible to mouse typhoid and experimental infections of those strains. 1. Trial of establishing inbred strains with different time-to-death after infection with *Salmonella enteritidis*. *J. Exp. Med.*, **32**, 505-517.
- 42) 牛場大蔵, 斉藤和久, 秋山武久 (1959) : X線全身照射の実験チフス症の免疫学に及ぼす影響. *医学と生物学*, **50**, 232-236.
- 43) Winn, H. J. and Daddi, G. (1970) : Properties of antimouse lymphocyte sera produced in various species. *Fed. Proc.*, **29**, 104-105.
- 44) Woodruff, M. F. A. & Anderson, N. A. (1963) : Effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of antilymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats. *Nature*, **200**, 702.
- 45) Woodruff, M. F. A. and Anderson, N. A. (1964) : The effect of lymphocyte depletion by thoracic duct fistula and administration of antilymphocytic serum on the survival of skin homografts in rats. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **120**, 119-128.