

anti-recipient alloantiserum の免疫抑制効果に 関する基礎的研究

浅原 利正

広島大学医学部外科学第二講座(主任:江崎治夫教授)

受付 昭和59年3月24日

BALB/Cの皮膚をC3H/Heマウスに移植し、 1×10^7 ヶのBALB/C splenocyteを1週間隔で4回腹腔内注射して免疫することによりC3H/He anti-BALB/C alloantiserumを作成した。

このalloantiserumはBALB/C cellに対して特異的にcytotoxic($\times 128$)であった。

C3H/He anti-BALB/C alloantiserum (anti-recipient alloantiserum)がBALB/Cマウスに移植されたC3H/Heの皮膚の生着を延長さす能力をもつか否かを検討した。

BALB/C recipientにC3H/Heの皮膚を移植する前後3回、C3H/He anti-BALB/C alloantiserumを腹腔内投与すると、1回投与量が50~300 μ lの量では移植皮膚の生着を延長さすことができた。

in vitro studyにおいて、MLRはこのalloantiserumの存在下で特異的に抑制された。

CMLも同じようにBALB/C cellをこのalloantiserumによってpriming phaseで前処置することにより特異的に抑制された。

このalloantiserumによる処置はthird party alloantigenに対する反応にはintactであった。

このデータから次のことが示唆される。つまり、このanti-recipient alloantiserumはskin allograftの生着に対して生着延長効果を示し、MLRとCMLに対してはspecific inhibitionを示した。

これは、このalloantiserumがimmune responseのafferent archのblockを示すことを示す。

臓器移植の臨床において組織適合性の壁は厚く、組織適合性抗原の解析、免疫抑制療法などの免疫学における進歩がみられるもののそれが直ちに満足すべき成績を得るまでに反映されていない。なかでもイムラン、ステロイドを中心とした現在の非特異的免疫抑制療法は、消化管出血、感染症、肝障害などの副作用が問題となり、満足できるものとはいえない。

そこでより理想的な免疫抑制法として特異的免疫抑制法がとりあげられ、これまでに動物実験モデルを中心に研究が重ねられてきた。donor-recipient間の移植免疫のみを抑制するという特異的免疫抑制法は魅力あるものであり、その1つとしてalloantiserumによる特異的免疫抑制の試みがこれまで報告されている。これは、anti-donor alloantibody,^{2,11,23,27,28,30,34}あるいは

は、anti-donor alloantibody + antigen^{40,44}の投与によりtoleranceを導入しようというもので、部分的ではあるが、toleranceの導入に成功したという報告はある。

他方、anti-recipient alloantiserumのtolerance導入に関する研究は殆んどなく、わずかに1976年、Davies, D. A. L.ら⁴³が報告しているのみであり、しかもそれはgraftの生着に有効であったというのではない。anti-recipient alloantiserumがgraftの生着にどのように作用するのか、あるいはgraftの生着に有効であるかどうかは興味ある問題である。

anti-recipient alloantiserumがmouseを用いて作成可能かどうか、又それがallograftの生着延長効果をもたらすかどうか、又生着延長効果があるとすればそのmechanismはどのようなものであるのかを検

索するため本研究を行った。

方法と材料

1) 動物

マウスは, BALB/C (H-2^d), C3H/He (H-2^k), C57 BL/6 (H-2^b), AKR (H-2^k) のオス, 8~12週令, 25~30g のものを用い, rat (Wister) は8~20週令, 200~300g のものを用い, いずれも静岡実験動物研究所より供されたものである。なお各 hybrid 間で skin graft を行い, hybrid であることを予め確認をして用いた。

2) 皮膚移植

マウスの皮膚移植は藤井²⁸⁾の方法に準じて行った。つまり skin donor の背部より直径 1 cm の円形の graft を採取した。次に recipient 背部より移植しようとする graft とはほぼ同じ大きさの皮膚片を除いてここを移植床として, ここに skin graft を移植した。graft の採取及び移植床の作製にあたっては, panniculus を graft より外し, 又移植床には panniculus を残しておいた。移植片は tape で固定をして5日後にこれを外して, 毎日 inspection, palpation にて graft の状態を観察した。ただ tape の固定が skin graft 後5日目までに外れることがあるので著者は graft の周辺を recipient の skin と縫合により更に固定を行った。

3) 拒絶反応の判定

skin graft 後5日目に tape を外して, 毎日 inspection, palpation にて移植皮膚の状態を観察した。graft が atrophy をおこし大きさが元の1/2になった時, 又は graft に硬化が生じこれが graft の1/2に及んだ時 rejection と判定した。

4) 培養液

細胞の preparation, MLC, CML の際に用いた medium は RPMI 1640 (GIBCO) で penicilin, streptomycin をそれぞれ 100 μ /ml, 100 μ g/ml 含む。

FCS (Fetal calf serum) の含有濃度は種々検討したが3~8%のものがよく, 以下の実験に用いたものはいずれも5%のものである。

5) lymphocyte preparation

splenocyte: lymphocyte source として用いた splenocyte は以下のようにして準備した。ネブタール麻酔下に, 先ず腋窩静脈切断により脱血を行った後に spleen を摘出した。摘出した spleen をハサミで細切してメッシュにて濾過して得た cell suspension より Binz ら³⁾の方法に準じて red cell を除去した。つまりこの cell suspension を 0.84% NH₄Cl にて 37°C,

7分間 incubation した後, 800r.p.m, 3分間の遠沈を2回くりかえした。この cell を 5% FCS 加 RPMI 1640 medium (以下 medium) に浮遊して適当な濃度の cell suspension とした。

peripheral blood lymphocyte (PBL): ネブタール麻酔下に腋窩静脈よりヘパリン採血し, medium にて2~3倍に希釈したものを Ficoll-Conray 分離液 (比重1.084) に重層して 1,200r.p.m, 10分間遠沈する。かなり赤血球の混入のあるリングをとり, これを medium にて洗浄した後, 0.84% NH₄Cl にて赤血球を除去して, 適当な濃度の cell suspension を作製した。この方法によると多核白血球の混入は10%以内であった。

以上の cell preparation の操作は可及的 0~4°C 以下において行った。

6) alloantibody preparation

以下の実験に用いる anti-recipient alloantibody (C3H/He anti-BALB/C antiserum) は Voisin ら⁴⁶⁾の方法に準じて次のようにして作製した (Fig. 1)。

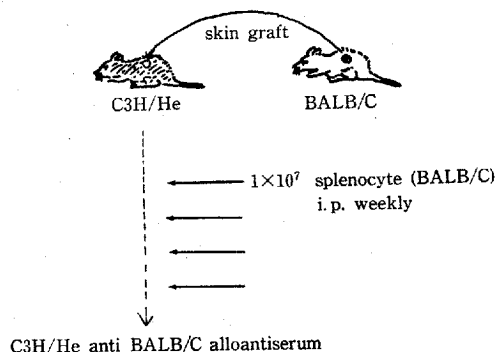


Fig. 1. Alloantiserum preparation

先ず C3H/He の背部に直径 1 cm 大の円形の移植床を作成し, ここに同大の BALB/C skin を移植し, 1週後より 1×10^7 々の BALB/C splenocyte を 1週間隔で計 4 回, 腹腔内に注射した。最後の注射より 1週後に腋窩静脈より全血採血した。これから遠沈により血清を採取して, 56°C, 30分間非働化, 更に免疫に用いた BALB/C の赤血球と 37°C, 20分間 incubate して赤血球に対する抗体を除き以下の実験に用いた。

7) lymphocyte cytotoxicity test

lymphocyte cytotoxicity test は NIH の standard method に準じた。つまりメッシュを用いて splenocyte を採取し, 0.84% NH₄Cl にて赤血球を除去して, medium にて $300 \sim 500 \times 10^4$ /ml の cell

suspension を作成した。この cell suspension 1 μ l と antiserum 1 μ l を microtest plate (Terasaki Tray) の well 内で混合, 30分間室温にて静置し, 次いで rat の fresh serum 5 μ l を加えて更に室温で60分間静置, 5% エオジン, フォルマリンを加えて顕微鏡下に死細胞数を算定した。50%以上の cell death をもって陽性とした。

8) mixed lymphocyte culture (MLC)

MLC は Binz ら⁷⁾ の方法に準じて行った。つまりメッシュを用いて採取した splenocyte より 0.84% NH_4Cl にて赤血球を除去し, responder cell はそのまま medium にて $200 \times 10^4/\text{ml}$ に調整する。stimulator cell は ^{60}Co 2000rad 照射して同様に $200 \times 10^4/\text{ml}$ に調整。responder cell, stimulator cell それぞれ 0.1ml をとり micro culture plate (NUNC) の各 well 内で混合して 5% CO_2 , 37°C の条件下で5日間培養をする。培養終了16~20時間前に 0.2 μCi の ^3H -thymidine を加えてその uptake を測定して MLR とした。なお culture は triplicate で行い, 3つの値で最も数値のかけ離れたものを除き, 残りの値の平均値を出して求めた。

9) cell mediated lympholysis (CML)

CML は Law ら⁸⁾, Batchelor ら⁹⁾ の方法に準じて行った。つまり priming MLC はメッシュにより採取した splenocyte から 0.84% NH_4Cl を用いて赤血球を除去し, responder cell は medium にて $200 \times 10^4/\text{ml}$ に調整して, stimulator cell は ^{60}Co 2000rad 照射して同様に $200 \times 10^4/\text{ml}$ に調整した。それぞれ responder cell, stimulator cell を 0.1ml ずつとり microculture plate (NUNC) の各 well 内で混合して 5% CO_2 , 37°C の条件下で5日間培養して $250 \times 10^4/\text{ml}$ の濃度に調整して effector cell を作成した。

target cell は次のようにして作成した。先ずメッシュ, 0.84% NH_4Cl の処理にて得た splenocyte $40 \times 10^4/0.2\text{ml}$ を PHA-P (Difco laboratory: 1 vial を 5 ml に溶解したもの) 0.4 μ l と共に48時間培養した。培養終了後この cell の $200 \times 10^4/0.2\text{ml}$ に ^{51}Cr 100 μCi を加えて 37°C, 60分間 incubate し, 細胞内へとり込まれなかった ^{51}Cr は洗浄にて除き, $10 \times 10^4/\text{ml}$ の濃度に調整して target cell を作成した。

effector cell 0.2ml と target cell 0.1ml を榮研スピッツ (榮研) に加えて (E:T ratio 50:1), 5% CO_2 , 37°C, 5時間 incubate した。培養終了後, medium 0.7ml を加えて遠沈し, 上清 0.5ml の ^{51}Cr の活性を γ -counter にて測定して以下に述べる式にて CML 値 (% release) を求めた。

$$\% \text{ release} = \frac{\text{exp. release} - \text{spont. release}}{\text{max. release} - \text{spont. release}}$$

10) 実験群

(I) alloantiserum による skin graft 生着延長効果の検討: 投与 schedule に関する検討

recipient が BALB/C, skin donor が C3H/He の組み合わせにおいて C3H/He anti-BALB/C antiserum の1回投与量を 100 μ l と一定にして a) -4, -2, 0, b) -3, -2, -1, 0, c) 0, +2, +4, d) 0, +1, +2, +3, e) 0, +1, +2, +3, +4, +5, +6, +7, f) -7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0, の6種の異なる投与 schedule の群を作成した。対照として recipient-donor が同じ組み合わせで skin graft した無処置のものを作り, これと実験群とを比較した。

(II) alloantiserum による skin graft 生着延長効果の検討: 投与量に関する検討

recipient が BALB/C, skin donor が C3H/He の組み合わせにおいて, C3H/He anti-BALB/C antiserum の投与 schedule を移植当日, 2日目, 4日目の3回に一定にして, 投与量を, a) 50 μ l, b) 100 μ l, c) 200 μ l, d) 300 μ l の4種の群に分けて実験群を作成した。対照としては同じ recipient-donor の組み合わせで無処置のものを作成して実験群と比較した。

(III) alloantiserum による skin graft 生着延長効果の検討: allospecificity に関する検討

recipient-donor の組み合わせがそれぞれ, a) BALB/C-C3H/He, b) AKR-C57BL/6, c) C3H/He-C57BL/6, の3種の組み合わせを作り, C3H/He anti-BALB/C antiserum を 200 μ l, 皮膚移植の4日前, 2日前, 当日と3回投与し, その skin graft survival を比較した。対照として recipient-donor が同じ組み合わせで無処置のものを作り実験群と比較した。この実験は alloantiserum の効果の *in vivo* allospecificity を検索する目的で行った。

(IV) alloantiserum 投与の末梢白血球数, リンパ球数に及ぼす効果の検討

BALB/C recipient の背部に直径約 1 cm の C3H/He skin を移植し, 移植日より4日間連続で, C3H/He anti-BALB/C antiserum を 100 μ l ずつ投与して, 移植後17日目までの末梢白血球, リンパ球を算定した。末梢血の採血は血球算定用にごく少量のみを尾静脈より採取して検査に用いた。

(V) alloantiserum の MLR に及ぼす効果の検討: responder に働くもの

responder-stimulator の組み合わせを BALB/C-C3H/He とした MLC に C3H/He anti-BALB/C antiserum

を medium に対して1/8, 1/64, 1/512, 1/2048 量の4種の異なる濃度群に分けて添加し, 又添加時期を培養当日, 1日後, 2日後, 3日後, 4日後の5種の添加時期群に分け, これらの投与量と投与 schedule を組合わせた実験群を作成し, その MLR を何も添加しない MLR と比較した。

この実験は alloantiserum が MLC responder の receptor site に働くかどうか, リンパ球の proliferation を抑制するかどうかを検索する目的で行った。

なお本実験も含め以下の実験で対照と比較した MLR は全て次の式により求めた。

$$\text{実験群 MLR}(\%) = \frac{\text{MLR (実験群)}}{\text{MLR (対照)}} \times 100$$

(V) alloantiserum の MLR に及ぼす効果の検討 : stimulator に働くもの

responder-stimulator の組合わせた C3H/He-BALB/C とした MLC に C3H/He anti-BALB/C antiserum を medium に対して 1/8, 1/64, 1/512, 1/2048量の4種の異なる濃度群に分けて添加し, 又添加時期を培養当日, 1日後, 2日後, 3日後, 4日後の5種の異なる添加時期群に分け, これらの投与量と投与 schedule を組合わせた実験群を作成し, その MLR を何も添加しない MLR と比較した。

この実験は alloantiserum が MLC stimulator の antigen site を block するかどうかを検索する目的で行った。

(VI) alloantiserum の MLR に及ぼす効果の検討 : MLR に対する効果の allospecificity に関するもの

responder-stimulator をそれぞれ C57BL/6-C3H/He, C3H/He-C57BL/6 の2種の組合わせとして, この MLC に C3H/He anti-BALB/C antiserum を添加時期を培養当日, 1日後, 2日後, 3日後の4種の異なる時期の添加群に分け, 又 antiserum の添加量を medium に対して 1/64, 1/512, 1/2048の3種の異なる濃度群に分けて, これらの投与量と投与 schedule を組合わせた実験群を作成して, その MLR を何も添加しない対照の MLR と比較した。

この実験は alloantiserum の MLR に及ぼす効果の allospecificity を検索する目的で行った。

(VII) alloantiserum の MLR に及ぼす効果の検討 : alloantiserum による pretreatment 効果

responder-stimulator の組合わせたそれぞれ (a) BALB/C-C3H/He, (b) C3H/He-BALB/C, (c) C57BL/6-C3H/He, (d) BALB/C-C57BL/6 の4種として, 1つはこの MLC の responder cell のみの200×

10⁴ヶ/ml に antiserum 15 μ l を加えて4°C, 60分間放置して後, この cell を medium にて2回洗浄して培養液中の antiserum を除き MLC を行い, その反応値を求めて, 同じ組合わせで antiserum による前処置を行わない MLR を比較した。もう一方は, stimulator に対して同じ antiserum による前処置を行い, その MLR を求めて対照の MLR と比較した。この実験は, alloantiserum の pretreatment による MLR 抑制効果をみる目的で行った。

(IX) alloantiserum の MLR に及ぼす効果の検討 : *in vivo* 投与の MLR に及ぼす効果

recipient-donor の組合わせた BALB/C-C3H/He として皮膚移植を行い, 移植当日, 2日後, 4日後に C3H/He anti-BALB/C antiserum を各200 μ l 腹腔内投与し, recipient である BALB/C の末梢血リンパ球を responder として, C3H/He stimulator に対する MLR を求めた。対照として同じ組合わせの recipient-donor で皮膚移植をし, antiserum を投与しない BALB/C recipient の末梢血リンパ球を responder として, C3H/He stimulator に対する MLR を求めて実験群の MLR と比較した。

この実験は *in vivo* に投与された antiserum がその recipient の免疫反応の主役である末梢血リンパ球に対してどのように働いているかを MLR を用いて検索する目的で行った。

(X) alloantiserum の CML に及ぼす効果の検討 priming MLC は micromethod にて行った。つまり responder 20×10⁴/0.1ml と stimulator 20×10⁴/0.1ml を mix して microculture plate (NUNC) にて5% CO₂, 37°C にて5日間培養し, この cell を集めて effector cell とした。effector-target の組合わせた (a) BALB/C-C3H/He_x/C3H/He (b) C3H/He-BALB/C_x/BALB/C (c) C57BL/6-C3H/He_x/C3H/He (d) BALB/C-C57BL/6_x/C57BL/6 の4種類作成し, priming MLC を行う前に responder cell を 200×10⁴/ml に対して C3H/He anti-BALB/C antiserum 15 μ l を加えて4°C, 60分間放置した後, medium にて2回洗浄して培養液中の antiserum を除き MLC を行った。この MLC によって得た effector cell と PHA blast にて得た target cell を用いて CML を行い, この反応値を実験群の CML 値とした。対照として priming MLC の際に antiserum による前処置を行わずに effector cell を作成し CML を行いその反応値を求めた。実験群の CML を対照の CML 値で除して実験群 CML 値(%)とした。

$$\text{実験群 CML 値(\%)} = \frac{\text{実験群 CML 値}}{\text{対照 CML 値}} \times 100$$

この実験は *in vivo* の拒絶反応の model といわれる CML に対する antiserum の抑制効果を検索する目的で行った。

成 績

1) alloantiserum の力価

Fig. 1 に示した方法によって作成した C3H anti-BALB/C antiserum の免疫過程の各時期における BALB/C splenocyte に対する cytotoxic titer を Fig. 2 に示す。3, 4 週目と titer は上昇して、5,

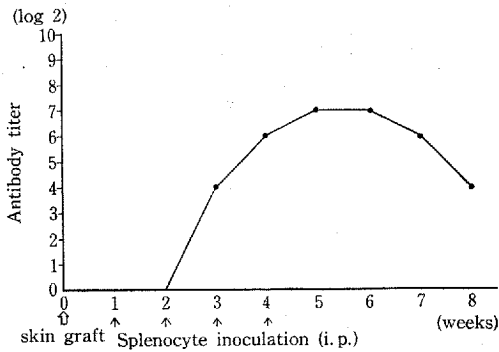


Fig. 2. Cytotoxic titer of alloantiserum (C3H/He anti-BALB/C antiserum)

6 週目で peak となるが 5 週目と 6 週目で titer に殆んど差を認めなかった。以降 7 週目から急激に下降する。

このことから本研究において以下の実験に用いる antiserum は 5 週目に採血したものとし、cytotoxic titer は ×128 のものである。

2) alloantiserum の cytotoxic specificity

作成した C3H/He anti-BALB/C antiserum の cytotoxicity を Table 1 にみられる如く、BALB/C, C3H/He, C57BL/6 cell に対して検索した。この antiserum は BALB/C cell に対して ×128 と最も強い cytotoxicity を示したが、C57BL/6 cell に対しては ×8 と weak ではあるが抗体を含んでいた。

3) alloantiserum の skin graft 生着延長効果の検討

対照を含めて recipient-donor の組み合わせ、antiserum の投与量、投与 schedule の違いによって 14 の実験群に分けた (Table 2)。

対照として無処置の BALB/C recipient に移植した C3H/He skin の survival は 10~15 日で、mean survival time (MST) ±SD は 12.6 ± 1.8 日であった。実験群の (2) から (8) までの C3H/He skin を BALB/C recipient に移植して antiserum を投与したものの graft survival は、その MST ±SD が短いもので (2) の 17.6 ± 3.0 日から長いものでは (8) の 22.5 ± 4.3 日と

Table 1. Cytotoxic titer & Specificity of alloantiserum (C3H/He anti-BALB/C antiserum)

cell titer	× 2	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128	× 256	× 512
BALB/C	+	+	+	+	+	+	+	-	-
C57BL/6	+	+	-	-	-	-	-	-	-
C3H/He	-	-	-	-	-	-	-	-	-

いずれも対照と比べて有意に延長している (いずれも $p < 0.001$)。この中で最も長く生着したのは (7) の 30 日であった。

(I) 投与 schedule に関する検討

これを更に詳細に検討する目的で Fig. 3 の如く一回投与量を 100 μl と一定にして、投与、schedule を a)~f) の 6 種に変えてその MST ±SD をみた。最も長期生着をみたのは a) の術前 4 日、2 日、術当日投与したものの 22.4 ± 4.3 日であった。実験群 d) の術当日、1, 2, 3 日目投与の 18.8 ± 2.6 日が幾分短

かいものの、いずれの実験群においても対照に比して有意の生着延長効果を認めている ($p < 0.001$)。この中では若干術前投与群の方において生着延長効果が大きいようにみられた。

なお投与回数を増やしても生着延長効果は増大しなかった。

(II) 投与量に関する検討

投与量の違いが graft survival に及ぼす効果を検討する目的で投与時期を術当日、2, 4 日目と一定にして、投与量を Fig. 4 に示すとおり a)~d) の 4 種に分

Table 2. Alloantiserum effect on skin graft survival (1)

No	host	donor	treatment	volume	schedule	n	MST \pm SD	(days)
1	BALB/C	C3H/He	(-)			15	12.6 \pm 1.8	10,10,10,11,11,11,11,11,11,11,12,12,13,14,14,15,15
2	"	"	C3H/He anti-BALB/C	50 μ l	0, 2, 4	14	17.6 \pm 3.0	12,15,15,15,17,17,17,18,18,19,20,20,20,24
3	"	"	"	100 μ l	"	14	21.5 \pm 3.7	16,17,18,19,19,20,21,21,22,24,24,25,27,28
4	"	"	"	200 μ l	"	14	21.6 \pm 3.8	15,17,18,19,20,20,22,22,23,23,24,24,28,28
5	"	"	"	300 μ l	"	13	20.7 \pm 4.1	14,15,18,18,19,20,21,22,23,25,26,28
6	"	"	"	50 μ l	-4, -2, 0	10	18.8 \pm 2.9	14,16,16,18,19,19,20,21,22,23
7	"	"	"	100 μ l	"	13	22.4 \pm 4.2	16,18,19,19,20,22,24,25,25,26,28,30
8	"	"	"	200 μ l	"	13	22.5 \pm 4.3	17,17,18,19,21,22,24,25,26,26,29,29
9	"	"	"	100 μ l	-3, -2, -1, 0	12	22.0 \pm 3.9	16,18,19,20,21,22,23,24,26,27,29
10	"	"	"	"	0, 1, 2, 3	12	18.8 \pm 2.6	15,15,16,18,18,19,19,20,21,22,23
11	"	"	"	"	0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	12	21.5 \pm 2.7	18,19,19,20,20,21,21,21,23,24,25,27
12	"	"	"	"	-7, -6, -5, -4, -3, -2, -1, 0	8	22.1 \pm 3.8	16,19,21,21,22,24,27,27
13	C3H/He	C57BL/6	"	200 μ l	-4, -2, 0	8	11.5 \pm 1.3	10,10,11,11,12,12,12,14
14	AKR	C57BL/6	"	"	"	7	11.9 \pm 1.7	10,11,11,11,12,13,1

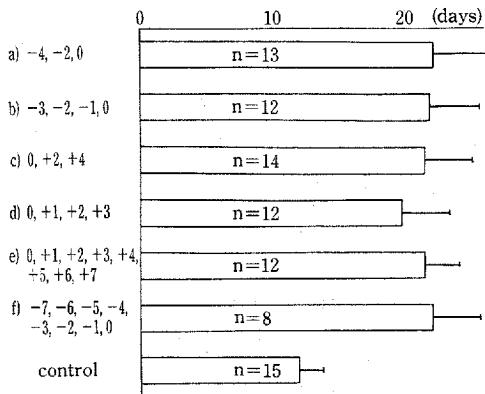


Fig. 3. Alloantiserum effect on skin graft survival (II)

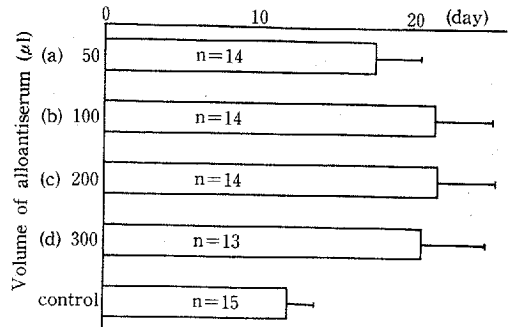


Fig. 4. Alloantiserum effect on skin graft survival (III) (0, +2, +4)

	host	donor	alloantiserum	volume	schedule	MST ± SD (days)		
						10	20	30
	BALB/C	C3H/He	(-)			n=15		
(a)	BALB/C	C3H/He	C3H/He anti-BALB/C	200 μl	-4, -2, 0	n=13		
(b)	AKR	C57BL/6	"	"	"	n=7		
(c)	C3H/He	C57BL/6	"	"	"	n=8		

Fig. 5. Alloantiserum effect on skin graft survival (IV)

けて比較した。a) の 50μl 投与群の MST ± SD が 17.6±3.0 日と他の 3 つの実験群と比較すると短かいが、4 群いずれも対照と比して有意に延長していた (p<0.001)。100μl, 200μl, 300μl の 3 群の間には差を認めず、100μl の投与で充分であると考えられた。

(III) allospecificity に関する検討

この antiserum の skin graft に及ぼす効果の allospecificity を検討する目的で Fig. 5 に示すように antiserum の投与量を 200μl, 投与時期を移植前 4 日, 2 日, 移植当日と一定にして, recipient-donor の組み合わせを a)~c) の 3 種にかえてその MST±SD を比較した。

a) の BALB/C-C3H/He の組み合わせの MST±SD は 22.5±4.3 日と他の 2 つ, b) と c) のその 11.9±1.7 日と 11.5±1.3 日と比べて有意に延長していた (p<0.001)。これに反して b) と c) の MST±SD は対照と比較して差を認めず、この antiserum が skin

graft 生着延長に及ぼす効果は特異的であるといえる。

4) alloantiserum の末梢血白血球数, リンパ球数に及ぼす効果

BALB/C 背部に C3H/He skin をを移植して, 移植当日, 1, 2, 3 日目に antiserum をそれぞれ 100μl ずつ腹腔内投与した時の末梢血白血球, リンパ球数の変化を Fig. 6 に示した。

白血球数は移植直後一時的に上昇する (投与前値の 1.42 倍) が, antiserum の投与につれて急に下降して投与終了直後に投与前値の約 70% と最低値となる (p<0.05)。その後 8 日目あたりで再び上昇するがバラツキが大きく, 移植後 12 日余りで投与前値に安定する。

又末梢血リンパ球数は白血球と同様, 移植直後に一時的に上昇する (投与前値の 1.46 倍) もの antiserum の投与につれて急に減少してゆき, 投与終了直後から 8 日間くらい投与前値の約 50% の値に保たれる (p<

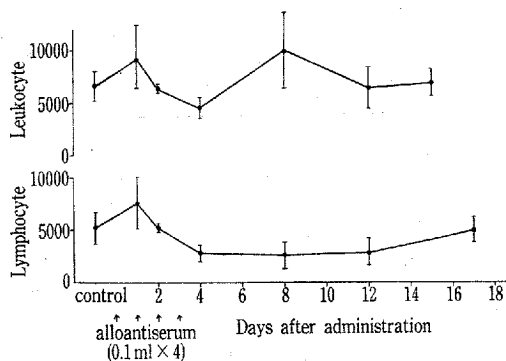


Fig. 6. Alloantisera effect on peripheral blood leukocyte & lymphocyte

0.002)。その後は次第に回復してゆき、投与終了後2週間でほぼ投与前値に復する。

以上のように antiserum 投与による影響はほぼ白血球とリンパ球とで同じ傾向を示したが、リンパ球数の抑制がやや強く、やや長期間持続した。

5) alloantisera の MLR に及ぼす効果:

responder に働くもの

responder-simulator が BALB/C-C3H//He の組み合わせの MLR に対する antiserum の影響、つまり MLR の responder に対する antiserum の効果を Fig. 7 に示した。Fig. 7 に示した MLR (%) は実験群の項で説明した如く、対照と比較したものを示してある (以下の MLR についても同様)。

培養当日に antiserum を加えると、添加した antiserum の量が培養液量に対して 1/2048 と最も少ない量のもでも対照群に対して 65% の値であり、従って 35% の抑制をうけていることになる。しかしこの濃度では培養 1 日後に、antiserum を添加すると 96% と殆んど抑制は認められず、以降 2 日目、3 日目、4 日目に添加したものも抑制をうけない。

ところが培養液量に対して 1/512, 1/64 の濃度に antiserum を添加したものの MLR は、培養 2 日目までに加えると対照と比較して 50% 以下と強い抑制をうける。ただこの濃度の実験群も 3 日目以降に加えたのでは抑制効果は認められない。つまり MLR 開始後 2 日目までに antiserum を添加しないと antiserum による MLR 抑制効果は出現しないことがわかった。培養液量に対して最も高濃度の 1/8 量に antiserum を加えた実験群では、3 日目までに添加すると極めて強い抑制が認められ、4 日目に添加したものでもその MLR の値は対照と比較して 34% と MLR 抑制効果もこの実験群が最大であった。

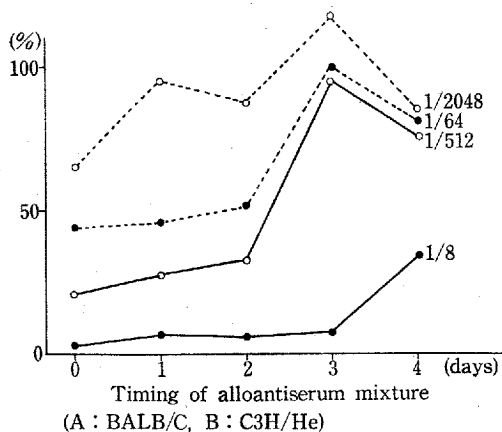


Fig. 7. Alloantisera effect on MLR (ABx)

つまり添加する antiserum の量が増すにつれて添加時期がおくられても抑制効果が認められる。又同じ添加時期だと antiserum の量が多いだけ MLR 抑制効果は強くなっている。MLR 抑制効果は添加する antiserum の量に対して dose-dependent であるといえる。

6) alloantisera の MLR に及ぼす効果:

stimulator に働くもの

responder-stimulator が C3H/He-BALB/C の組み合わせの MLR に対する antiserum の影響、つまり MLR の stimulator に対する antiserum の効果を Fig. 8 に示した。

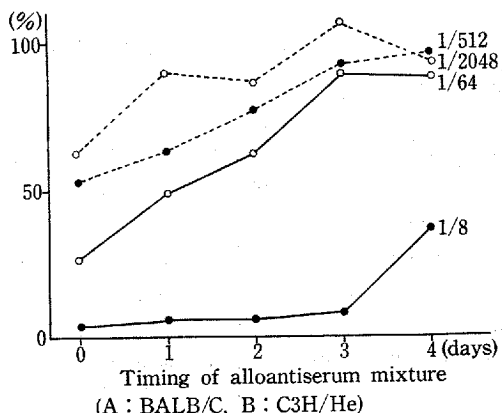


Fig. 8. Alloantisera effect on MLR (BAx)

この Fig. 8 は先に示した responder に対する効果を示した Fig. 7 とはほぼ同様である。つまり、antiserum の添加時期が遅れてくると MLR 抑制効果は弱くなり、又 antiserum の各添加時期における

MLR 抑制効果は添加する antiserum の量に比例しており dose-dependent であるといえる。ただ Fig. 7 と比較して異なることは Fig. 8 に示した stimulator に働く antiserum の MLR 抑制効果の方がやや弱いということである。

7) alloantiserum の MLR に及ぼす効果：MLR

に対する効果の allospecificity に関するもの

3rd partyを含めた他のMLRに及ぼす alloantiserum の効果を検討するため responder-stimulator がそれぞれ C57BL/6-C3H/He, C3H/He-C57BL/6 の組合わせの MLC を行い, antiserum を加えてその MLR を対照と比較して Fig. 9 の左右にそれぞれ示した。

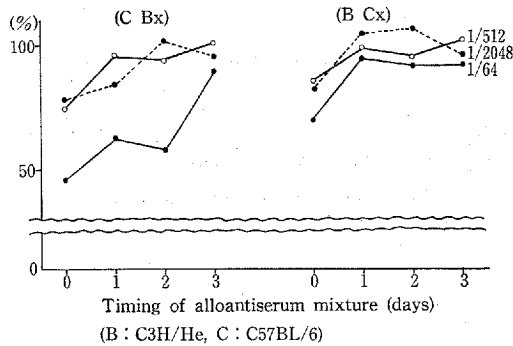


Fig. 9. Alloantiserum effect on MLR

先ず Fig. 9 右側の responder-stimulator が C3H/He-C57BL/6 の組合わせの MLR に添加する antiserum の濃度を 3 種に変えて, 添加時期も移植当日, 1, 2, 3 日目と変え MLR を測定して対照と比較した。Fig. 9 から判るようにいずれの濃度, いずれの添加時期においても対照と比較した MLR は 70% 以上と, alloantiserum による抑制効果は殆んど認められない。つまり, C3H/He anti-BALB/C antiserum は C3H/He responder, C57BL/6 stimulator のいずれにも影響を及ぼしていないといえる。

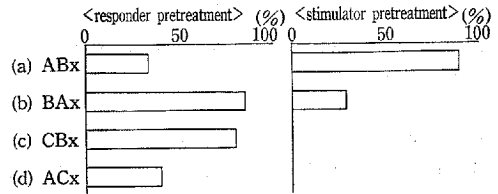
次に Fig. 9 左側の responder-stimulator が C57BL/6-C3H/He の組合わせの MLR においては, 添加する antiserum の量が培養液量に対して 1/64 の量の濃度である場合, 培養開始 2 日目までに加えると対照と比較した MLR は 50~60% と抑制をうけているが, 3 日目に添加したものでは抑制はとれている。その他の 1/512, 1/2048 の濃度のものはいずれの添加時期においても対照と比較した MLR は 75% 以上と抑制をうけていない。

一応 MLR 抑制を 50% 以上とすると, 3rd party を

含む他の MLR に及ぼす antiserum の効果はないといえる。従ってこの antiserum の MLR に及ぼす効果は特異的である。

8) alloantiserum の MLR に及ぼす効果：alloantiserum による pretreatment 効果

Fig. 10 の左側に responder を antiserum によって pretreatment した結果, 右側に stimulator を antiserum によって pretreatment した結果を示す。



(A : BALB/C, B : C3H/He, C : C57BL/6)

Fig. 10. Alloantiserum effect on MLR

先ず左側の responder を antiserum で pretreatment したものは (a) と (d), つまり responder-stimulator が BALB/C-C3H/He, BALB/C-C57BL/6 の組合わせの MLR を対照と比較したものはそれぞれ, 33%, 40% と antiserum の pretreatment により MLR 抑制効果を示している。しかし (b) と (c), responder-stimulator が C3H/He-BALB/C, C57BL/6-C3H/He の組合わせの MLR はほとんど抑制をうけていない。云いかえると responder が BALB/C cell の MLR では抑制が強いが, responder が C3H/He 又は C57BL/6 cell の MLR は抑制がみられていない。

次に stimulator の pretreatment 実験群では, (a) の responder-stimulator が BALB/C-C3H/He の組合わせの MLR はほとんど抑制をうけないが, (b) の responder-stimulator が C3H/He-BALB/C の組合わせの MLR は対照と比較して 29% と強い抑制が認められた。つまり antiserum による stimulator の pretreatment 実験群においては stimulator が BALB/C cell である時強い MLR が認められた。

以上 responder 及び stimulator の antiserum による pretreatment 効果において, BALB/C cell を含む組合わせの MLR は強い抑制を示し, その効果は allospecific であった。

9) alloantiserum の MLR に及ぼす効果：in vivo 投与の MLR に及ぼす効果

C3H/He skin を移植し, antiserum を投与した BALB/C recipient の末梢血リンパ球を responder と

して, C3H/He を stimulator とする MLR を行ない, 対照と比較した各時期の値を Fig. 11 に示した。

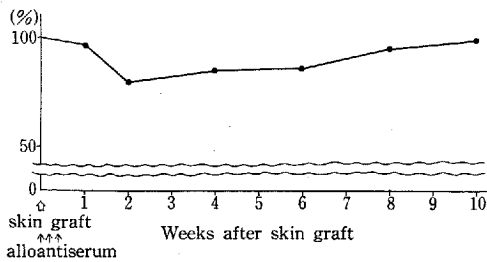


Fig. 11. Alloantiserum effect on MLR *in vivo* sensitization

skin graft 後1週目の MLR は対照の97%と殆んど antiserum 投与の影響をうけていない。これが2週目になると対照の80%と, 全経過を通じて最も低下する。

その後4, 6週目は対照の80%代の MLR が持続するが, 8~10週目ではほぼ対照の値に復する。全経過を通じて antiserum 投与による MLR 抑制効果は20%以内と軽微ではあるが, 2週目から6週目までかなりの長期間にわたって認められた。

10) alloantiserum の CML に及ぼす効果

antiserum によって responder cell の pretreatment を行い priming MLC にて effector cell を作成, CML assay を行った。この実験群の値を antiserum による pretreatment を行わないで同様の組合わせで effector cell を作成して行った CML を比較して Fig. 12 に示した。

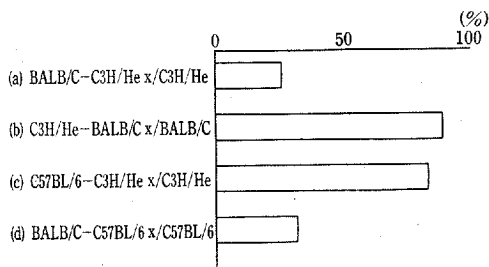


Fig. 12. Alloantiserum effect on CML

(a) と (d) の組合わせ, つまり BALB/C-C3H/He x/C3H/He と BALB/C-C57BL/6 x/C57BL/6 の CML 値は対照と比較してそれぞれ26%, 32%と著明に抑制されている。ところが, (b), (c)の組合わせの CML 値は対照と比較してそれぞれ89%, 83%とほとんど抑制をうけていない。

つまり effector cell が C3H/He, C57BL/6 cell の場合の CML は antiserum による pretreatment の

影響をうけないが, effector cell が BALB/C cell の場合の CML は antiserum の pretreatment により著明に抑制されていた。この antiserum による CML 抑制効果は allospecific であるといえる。

考 按

臓器移植の臨床において, この20年間, そして今もなお用いられている免疫抑制剤は, 免疫抑制効果も非特異的で, 移植免疫のみならず感染防御機構に対しても抑制的で, 時にはその副作用のため死を結果することもある。それ故, より安全で, より効果的, かつ特異的に拒絶反応を防止するような免疫抑制剤の開発が望まれている。

化学的製剤に比してより副作用が少なく, 比較的特異的作用点をもつと考えられる生物学的製剤として ALS (anti-lymphocytic serum) が最初に Starzl によってヒトの腎移植に使用されたのが1966年である。その後1967年, ロンドンで開かれた "Ciba Foundation Study Group No. 29 Anti-lymphocytic serum"³⁶⁾ において Starzl, Medawar, Bekkum, Monaco らは ALS の免疫抑制剤としての有用性を報告し, 以後 ALS はイムラン, ステロイドに次ぐ第3の免疫抑制剤として広く使用されてきた。

使用経験が多くなるにつれて ALS の免疫抑制効果について疑問視するものもいるが, 現在のところ唯一の生物学的製剤として ALS は移植臨床において使用されている^{18), 19)}。

しかし ALS が異種動物血清であるため, 投与後抗体が出現して効力が減ると共に, 血清病様の副作用 (発熱, 関節痛, じん麻疹) が出現するという欠点を有する。

そこで異種血清であるという欠点をカバーし, より特異的な作用点をもつと考えられる同種抗血清 (alloantiserum, alloantibody) がより理想的な免疫抑制剤として考えられるに至った。

実験動物において specific unresponsiveness が最初に報告されて^{8), 42)} 以来, 多くの仕事がこの現象を臨床的に結びつけようとなされてきた。

Rapaport ら³⁹⁾ が1968年ヒトの白血球を一度 freeze して移植の際投与すると skin graft survival が延長したと述べているが, 他にもリンパ系細胞^{5), 21), 47)}, tumor^{12), 31)}, liver extract^{9), 26), 38)} などの抗原を移植の際同時に投与して active enhancement がみられたという報告がある。

又, alloantibody をそのまま用いて graft の着着をはかる passive enhancement の報告は rat をはじめと

して多くの実験モデルにおいてみられる^{10, 14-16, 25, 33, 40, 41}。Hartら²⁵は ALG と anti-donor alloantibody を投与することによって rat の renal allograft の enhancement 効果が得られたと報告しており、Schilling ら⁴¹は anti-donor alloantibody の F(ab')₂ Fragment と prednisone の投与によって、Rowinski ら⁴⁰は ATG(anti-thymocyte globulin), donor strain cellular antigen と anti-donor alloantibody の投与によって同様に allograft の enhancement 効果が得られたことを報告している。これらは alloantibody と他の免疫抑制剤を併用した報告であるが anti-donor alloantibody のみを投与して allograft の enhancement 効果を報告したのも多くみられている^{2, 28, 7, 30, 32, 33, 34, 43, 45, 49, 50}。French ら³³は AS anti-AUG alloantiserum を作成し、これを投与することによって AS recipient に移植した (AUG×AS)F₁ kidney が11匹中11匹共無限に生着したことを報告している。

Zimmerman⁵⁰, Batchelor², Winears ら⁴⁹が rat で、Holter ら²⁷が rabbit で、Jeekel ら³⁰は dog のモデルにおいてそれぞれ anti-donor alloantibody の enhancement 効果について報告している。mouse においても Steines⁴³, Sugarbaker⁴⁵, Law³², McKenzie ら³³が anti-donor alloantibody の allograft に対する enhancement 効果を報告している。著者らも mouse の skin graft のモデルで anti-donor alloantibody の enhancement 効果を確認している¹⁷。

このように anti-donor alloantibody が enhancement 効果をもつという報告のある一方、Binz ら⁶は anti-donor alloantibody によって rat renal allograft の生着延長効果はみられなかったと報告しているがこれは anti-idiotypic antibody によるものである。以上の報告から、動物種の違いがあっても、これら間で作製した anti-donor alloantibody の allograft に対する enhancement 効果については、これを認める報告は多い。

しかし、anti-donor alloantibody は enhancement をもつ一方、graft に対する antibody ともなりうるため、graft 自体に対して cytotoxic であったり、hyperacute rejection をおこす危険性がある。Ishikawa ら²⁹は rat のモデルで anti-donor alloantibody を皮膚移植前後 4 回投与することにより移植された skin は対照よりも早く拒絶されたと報告しており、Hutchinson ら²⁸も anti-donor alloantibody が hyperacute rejection をひきおこす危険性について報告している。この点は anti-donor alloantibody の臨床応用に関しての問題点であるといえる。

そこで、著者はより安全で、特異的免疫抑制法という観点から anti-recipient alloantibody に注目してみた。

anti-recipient alloantibody の allograft に対する enhancement 効果を検討した報告は少ない。わずかに 1976 年 Davies ら¹⁹が H-2 congenic strain の間で H-2 alloantiserum を作製して、anti-recipient alloantiserum の skin graft survival に対する効果を検討しているが、無効であったと報告している。

この他には 1972 年 Myburgh ら³⁷が baboon liver allograft のモデルで pool した 10 匹の lymphoid tissue を用いて alloantiserum を作製 (この alloantiserum は多種類の抗原を免疫原として用いているため polyspecific である)、これを投与することによって liver allograft の生着が対照の 13 日から 35 日と延長したと報告している。しかし、この alloantiserum は polyspecific であり、anti-donor 及び anti-recipient antibody の両者を含んでおり、anti-recipient alloantibody 単独の効果と認め難い。

このように anti-recipient alloantibody を用いて allograft の生着延長効果を認めたという報告は過去にみられない。

著者の用いた alloantiserum は一回の skin graft と、その後 1 週間隔で 4 回、 1×10^7 個の splenocyte による免疫にて作製したもので、cytotoxic titer は $\times 128$ のものであった。

著者は alloantiserum の作製にあたり、最初の免疫で skin graft を行わずに splenocyte のみを用いて免疫して alloantiserum を作製したが、この alloantiserum は skin graft を用いて作製した alloantiserum と比べて cytotoxic titer は変わらないものの skin graft の enhancement 効果は劣った¹⁷。

投与 schedule 投与量に関して Davies ら¹⁹は $10 \mu\text{l}$ の anti-recipient alloantiserum を移植後毎日、1 週間投与している。著者の検討によると、anti-recipient alloantiserum の一回投与量 $50 \mu\text{l}$ を、移植前後 3 回投与したもので、skin graft に対する enhancement 効果は不十分で、一回投与量を $100 \mu\text{l}$ にして移植前後、3 回投与すると skin graft の生着延長効果がみられた。それ以上投与回数 を 8 回迄増しても、又、一回投与量を $300 \mu\text{l}$ 迄増加しても skin graft に対する enhancement 効果は変わらなかった。この点 Davies らの anti-recipient alloantiserum の $10 \mu\text{l}$ を連日、1 週間の投与は effective dose に足りなかったため、enhancement 効果がみられなかった可能性がある。

alloantiserum の *in vivo* 効果として、末梢血リ

リンパ球に対する作用に関しては Davies らはふれていない。著者の検討によると, antiserum の投与により, 末梢血の白血球, リンパ球数は投与直後から減少している。特に recipient の免疫系の主役をなすリンパ球は, 投与直後は投与前値の約50%にまで減少しており, 後述する MLR, CML にみられるようなリンパ球の機能的抑制と共に, 初期においては末梢を循環するリンパ球の絶対数も減少している。

メカニズムの解明のための *in vitro* study においても, 先ず MLR に対する alloantiserum の効果は MLR 抑制効果は dose dependent である。timing としては MLR 開始後2日目までに alloantiserum を加えれば充分 MLR 抑制効果が認められたが3日目以降に添加したものでは MLR 抑制効果は認められなかった。又, この alloantiserum による MLR 抑制効果は特異的で, 抗原に用いた BALB/C cell 以外の cell に対しては抑制効果をもたなかった。

responding cell や stimulating cell を, 予めこの alloantiserum により前処置をして行った MLR においても, responding cell か stimulating cell のいずれかが alloantiserum 作成の際に抗原に用いた BALB/C cell である場合は MLR 抑制効果がみられたが, BALB/C cell 以外の cell に対しては抑制効果はみられず, MLR 抑制効果は特異的であった。

CML assay における alloantiserum の効果の検討においても, この alloantiserum は MLR と同様, CML priming phase 抑制効果を示し, その CML 抑制効果は BALB/C cell に特異的で, 他の cell に対しては抑制効果を示さなかった。

以上の *in vitro* MLR, CML の結果から, この alloantiserum は *in vitro* の BALB/C cell の receptor site, antigen site の両方を block して, その proliferation を抑制し, effector cell への induction を抑制していることが判った。このことは前に述べた *in vitro* の実験結果から, 即ち, BALB/C lymphocyte を alloantiserum によって前処置することにより, C3H/He stimulator, BALB/C responder の組合わせの MLR でも BALB/C effector, C3H/He target の組合わせの CML でも, その反応が抑制されることにより明らかである。

したがって, *in vivo* での BALB/C recipient に移植された C3H/He skin graft の生着延長が生じるのは BALB/C の抗原認識相の block, つまり immune response の afferent block によると考えられた。

anti-recipient alloantiserum の allograft enhancement 効果の検討に関して, *in vitro* MLR, CML を用いてこ

のようなメカニズムの検索を行った報告はみられない。

以上, 著者は C3H/He mouse に BALB/C の skin graft を1回, 次いで 1×10^7 個の splenocyte を1週間隔で4回免疫して C3H/He anti-BALB/C alloantiserum (anti-recipient alloantiserum) を作製した。この alloantiserum の cytotoxic titer は $\times 128$ であり, BALB/C cell に対して特異的であった。BALB/C recipient に C3H/He skin を移植し, この C3H/He anti-BALB/C alloantiserum の $100 \mu\text{l}$ を移植前後3回, 腹腔内投与することにより, 移植 skin の生着は対照の 12.6 ± 1.8 日より 22.4 ± 4.3 日に延長した。

今まで, このような anti-recipient alloantiserum の allograft に対する enhancement 効果の存在を報告したものはなく, 著者が初めてである。

今のところ, anti-recipient alloantiserum の投与のみで完全な tolerance を得ることは難しいので, 他の免疫抑制剤との併用, alloantiserum の長期投与などの検討により, 更に効果が期待できるものであるといえよう。

anti-recipient alloantiserum のヒトへの応用にあたっては, 予め recipient の抗原を用いて donor を感作して anti-recipient alloantiserum を作製し, これを移植の際投与する方法が考えられるが, このような作製法は好ましい方法とはいえない。そこで biotechnology の手技を応用して, 先ず donor cell の cloning を行い, この cell を recipient の cell で感作して大量の抗体 (anti-recipient alloantibody) を得て, これを移植の際投与するということが近い将来可能になると思われる。

この副作用が少なく, 特異的免疫抑制作用をもつ anti-recipient alloantibody を用いて, 近い将来, ヒトの臓器移植がより安全に, より確実に行われる時がくることを期待するものである。

(本論文の要旨は第19回日本移植学会において発表した)

謝 辞

本研究を行うにあたって終始ご指導いただいた広島大学医学部第二外科土肥雪彦講師, 江崎治夫教授に感謝します。

参 考 文 献

1. Asahara, T. (unpublished)
2. Batchelor, J. R., Welsh, K. I., Maynald, A. and Burgos, H. 1979. Failure of long surviving, passively enhanced kidney allografts to provoke

- T-dependent alloimmunity; I. Retransplantation of (AS XAUG) F1 kidneys into secondary recipients. *J. Exp. Med.* 150 : 455-464.
3. **Batchelor, J. R., Welsh, K. I. and Burgos, H.** 1977. Immunologic enhancement. *Transplant. Proc.* IX(1) : 931-936.
 4. **Batchelor, J. R., Ellis, F., French, M. E., Bewick, M., Cameron, J. S. and Ogg, C. S.** 1970. Immunological enhancement of human kidney graft. *Lancet*:1007-1010.
 5. **Belldegrun, A. and Cohen, I. R.** 1979. Immunospecific deletion of graft-versus-host-reactive lymphocytes using sensitized syngeneic initiator T lymphocytes. *Transplantation* 28 : 382-382-386.
 6. **Binz, H. and Wigzell, H.** 1979. Induction of specific transplantation tolerance in adult animals. *Transplant. Proc.* XI : 914-918.
 7. **Binz, H. and Askonas, B. A.** 1975. Inhibition of mixed leukocyte culture by anti-idiotypic antibodies. *Eur. J. Immunol.* 5 : 618-623.
 8. **Billingham, R. E., Brent, L. and Medawar, P. B.** 1953. Activity acquired tolerance of foreign cells. *Nature* 172 : 603-606.
 9. **Brent, L., Hansen, J. A., Kilshaw, P. J. and Thomas, A. V.** 1973. Specific unresponsiveness to skin allografts in mice. I. Properties of tissue extracts and their synergistic effect with antilymphocytic serum. *Transplantation* 15 : 160-171.
 10. **Capel, P. J. A., de Waal, R. M. W., Démant, P. and Koent, P. and Koene, R. A. P.** 1981. Enhancement and antibody-mediated rejection of mouse skin allografts with anti-H-2K, H-2D, H-2L antibodies. *Transplant. Proc.* XIII : 649-653.
 11. **Carpenter, C. B., Soullilou, J. P., d'Ápice, A. J. F., Strom, T. B. and Garovoy, M. R.** 1976. The role of antibodies in the rejection and enhancement of rat organ allografts: non-Ag-B(Ia) antigens. *Transplant. Proc.* VIII : 199-205.
 12. **Chiu, K. M., Faanes, R. B. and Choi, Y. S.** 1980. Activation of specific suppressor cells with heat-treated allogeneic tumor cells. *Cell. Immunol.* 49 : 283-292.
 13. **Davies, D. A. L. and Staines, N. A.** 1976. A cardinal role for I-region antigens (Ia) in immunological enhancement, and the clinical implications. *Transplant. Rev.* 30 : 18-39.
 14. **Davis, W. C. and Feruce, G. J.** 1976. Immune facilitation of allograft survival across restricted differences at the H-2 complex. *Adv. Exp. Med. Biol.* 64 : 449-455.
 15. **Davis, W. C.** 1977. Enhancement of heart allograft survival across H-2 complex. *Transplant. Proc.* IX : 937-939.
 16. **Davis, W. C. and McKenzie, I. F. C.** 1980. Immunological enhancement can be mediated by anti-Ia and anti-K, D antibodies. *Transplantation* 29 : 77-79.
 17. **Dohi, K., Asahara, T., Fukuda, Y., Yahata, H. and Ono, E.** 1984. Alloantibody effect on skin graft survival in mice. (in press)
 18. 土肥雪彦, 浅原利正, 辰川自光, 福田康彦, 八幡浩, 中村雄二, 山根修治, 小野荣治, 田部康次, 田中一誠, 江崎治夫 1978. 生体血縁腎移植臨床例における抗リンパ球血清大量静注療法の実験. *臨床免疫* 10 : 421-435.
 19. 土肥雪彦, 福田康彦, 八幡浩, 浅原利正, 小野荣治, 田部康次, 竹中正治, 丸林誠二, 表原多文, 福田誠, 江藤高陽, 江崎治夫 1983. 抗ヒトリンパ球グロブリン (Pressimmune®) 大量投与の実験. *移植* 18 : 42-49.
 20. **Duc, H. T., Kinsky, R. G. and Voisin, G. A.** 1979. Ia versus K/D antigens in immunological enhancement of tumor allografts. II. Studies with alloimmune sera prepared in recombinant strains. *Ann. Immunol.* 130 : 461-474.
 21. **Elson, C. J. and Coeshott, M.** 1981. Tolerance to allotypic determinants induced by lymphoid cells from congenic mice bearing the allotype. *Immunology* 43 : 281-285.
 22. **Fabre, J. W. and Morris, P. J.** 1973. Dose response studies in passive enhancement of rat renal allografts. *Transplantation* 15 : 397-403.
 23. **French, M. E. and Batchelor, J. R.** 1969. Immunological enhancement of rat kidney grafts. *Lancet* : 1103-1106.
 24. 藤井源七郎 1976. 皮膚移植法 p.566-575 免疫実験操作法日本免疫学会金沢
 25. **Hart, D. N. and Fabre, J. W.** 1982. Mechanism

- of induction of passive enhancement: evidence for an interaction of enhancing a antibody with donor interstitial dendritic cells. *Transplantation* 33 : 319-322.
26. **Hilgert, I., Rieger, M., Kristofova, H. Vlachov, K. and Singh, S. K.** 1979. Possible manipulations of allograft tolerance by suppressor cells. *Transplant. Proc.* XI : 887-890.
 27. **Holter, A. R., Neu, M. R., McKearn, T. J., Lynch, A. F. and Stuart, F. P.** 1973. Abrogation of hyperacute rejection of renal allografts by pepsin digest fragments of anti-donor antibody. *Transplant. Proc.* V : 593-596.
 28. **Hutchinson, I. V. and Brent, L.** 1981. Immunological enhancement of tumor allografts following treatment of mice with TNP-conjugated all oantigen and anti-TNP antibody. *Nature* 292 : 353-355.
 29. **Ishikawa, M. and Watanuki, T.** 1981. Experimental studies on effect of humoral antibodies on transplanted tissues in rats. *Jikeikai Med. J.* 28 : 71-76.
 30. **Jeekel, J., Obertop, H., Vriesendorp, H. M., McDicken, I. and Westbroek, D. L.** 1975. Effect of anti-donor serum(ADS) and donor cells on renal allograft survival in DL-A tissue typed littermate beagles. *Transplant. Proc.* VII : 435-438.
 31. **Jirsch, D. W., Kraft, N. and Diener, E.** 1974. Tolerance induction to a heterotopic cardiac allograft in the irradiated reconstituted mouse. *Transplantation* 18 : 155-162.
 32. **Law, L. W., Appella, E., Cohen, J. M. and Wright, P. W.** 1974. Role of serum factors from tolerant mice in blocking and in immunological ological enhancement. *Transplantation* 18 : 14-19.
 33. **LeWaal, R. M. W., Capel, P. J. A. and Koene, R. A. P.** 1980. The role of anti-H-2K and H-2D alloantibodies n enhancement and acute antibody mediatete drejection of mouse skin allografts. *mmunol.* 124 : 719-723.
 34. **McKenzei, Ian F. SC., Henning, M. M. and Morgan, G. M.** 1980. Skin graft enhancement studies with antigenic differences arising from the H-2K, H-2D and H-2L rloci, Tansplantation 29 : 439-443.
 35. **McKenzie, Ian F. C. and Snell, G. D.** 1973. Comparative immunogenicity and enhance ability of individual H-2K and H-2D specificities of themurine histocompatibility - 2 complex. *J. Exp. Med.* 138 : 259-277.
 36. **Monaco, A. P., Wood, M. L., Were, B. A. Van DER. and Russel, P. S.** 1967. Effect of antilymphocyte serum in mice, dogs and man. *In Wolstenhome G. E. W. & O'Conner, M.* (Eds), *Ciba Foundation Study Group No .29, Ntilymphocytic Serum*, London, J. & A. Churchill Ltd.
 37. **Myburgh, J. A. and Smit, J. A.** 1972. Passive and active enhactive enhancement in baboon liver allografting. *Transplantation* 14 : 227-235.
 38. **Pinto, M., Brent, L. and Thomas, A. V.** 1974. Specific unresponsiveness to skin allografts in mice. III. Synergistic effect of tissue extracts, Bordetella pertussis, and antilymphocytic serum. *Transplantation* 17 : 477-486.
 39. **Rapaport, F. T., Dausset, J., Lawrence, H. S. and Converse, J. M.** 1968. Enhancement of skin allograft survival in man. *Surgery* 64 : 25-30.
 40. **Rowinski, W., Stekoski, S. Ryffa, T. and Wasowska, B.** 1978. Enhancement of cardiac allografts in rats at the major Ag-B locus. I. Synergistic effect of specific and non-specific immunosuppression. *AArch. Immunol.* 26 : 1009-1012.
 41. **Schilling, W. and Suehag, S. E.** 1976. Synergistic effect of alloantibodies or $F(ab')_2$ and prsdnisonone on rumine split heart allograft survival. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. C.* 84 : 325-332.
 42. **Snell, G. D., Cloudman, A. M., Failor, E. and Douglass, P.** 1946. Inhibition and stimulation of tumor homoiotransplants by prior injections of lyophilized tomor tissue. *J. Natl. Cancer Inst.* 6 : 303-316.
 43. **Steines, N. A., Keith, G. and Davis, D. A. L.** 1974. Passive enhancement of mouse skin allografts. Specificity of the antiserum for major histocomatibility complex antigens. *Transplantation* 18 : 192-195.

44. **Stuart, F. P., Saitoh, T., Fitch, F. W. and Spargo, B. H.** 1968. Immunologic enhancement of renal allograft in the rat. *Surgery* **64** : 17-24.
45. **Sugarbaker, P. H. and Chang, A. E.** 1979. Enhancing alloantibody effective during sensitization but not effector phase of skin graft rejection. *Transplantation* **28** : 60-65.
46. **Voisin, G. A., Kinsky, R., Jansen, F. and Bernard, C.** 1969. Biological properties of antibody classes in transplantation immune sera. *Transplantation* **8** : 618-632.
47. **Wachtel, S. S.** 1981. A transplanters' look at gonadal induction. *Transplantation* **31** : 1-3.
48. **Wilson, D. B.** 1967. Quantitative studies on the mixed lymphocyte interaction in rats. I. Conditions and parameters of response. *J. Exp. Med.* **126** : 625-654.
49. **Winearls, C. G., Fabre, J. W., Millard, P. R. and Morris, P. J.** 1979. A quantitative comparison of whole antibody and F(ab')₂ in kidney allograft enhancement. *Transplantation* **28** : 36-39.
50. **Zimmerman, B. and Heldman, J. D.** 1970. Enhancing antibody. III. Site of activity. *J. Immunol.* **104** : 626-632.

Basic Studies of Anti-Recipient Alloantiserum for Immunosuppressive Properties

Toshimasa ASAHARA

The Second Department of Surgery, Hiroshima University School of Medicine
(Director: Prof. Haruo EZAKI)

C3H/He anti-BALB/c alloantiserum was prepared by BALB/C skin grafting to C3H/He mice followed by a total of four injections of 1×10^7 BALB/C splenocytes on C3H/He mice at one week interval.

This alloantiserum was specifically cytotoxic ($\times 128$) to BALB/C cells.

C3H/He anti-BALB/C alloantiserum (anti-recipient alloantiserum) was tested to determine whether it possessed the ability to enhance C3H/He skin graft on BALB/C mice.

Injection of C3H/He anti-BALB/C alloantiserum three times to BALB/C recipients before and after C3H/He skin grafting at a single dose between 50 to 300 μ l was effective in enhancing the skin graft survival.

In *in vitro* study, mixed lymphocyte culture response (MLR) was specifically inhibited in the presence of this alloantiserum.

Cell-mediated lympholysis (CML) was also specifically inhibited by pretreatment of BALB/C effector cells at the priming with this alloantiserum.

This alloantiserum treatment left intact the response to third party alloantigens.

The data suggested that this alloantiserum possessed an enhancing effect on skin graft survival, specifically inhibited MLR and CML, and consequently blocked the afferent arch of immune response.