

[原著]

Alpha-Fetoprotein の免疫抑制効果について

I: リンパ球幼若化反応及び抗体産生に対する抑制効果について

鈴木 光 二*

(昭和55年3月24日受付)

要 旨

最近, alpha-fetoprotein (AFP) は免疫抑制作用を有することが報告されているが, 今回, 著者も, マウス AFP を羊水より抽出して, *in vitro* での種々の免疫反応に対する効果を検討してみた。マウス AFP は, 正常マウス血清に対するウサギの抗体を吸着させたクロマトグラフィーに羊水を通すことにより容易に抽出でき, 抽出した AFP は5%ポリアクリルアミドーゲルにて1本の沈降線として存在することを確認した。Ovalbumin, ヒトγグロブリン, lysozyme, KLH, そして PPD に対する特異的リンパ球幼若化反応, PHA, Con A 及び LPS などの mitogen に対する非特異的リンパ球幼若化反応, さらにヒツジ赤血球に対する IgM 抗体産生反応が, 抽出した AFP により一様に非特異的に抑制されることを示し, AFP の免疫抑制作用について検討した。

Key words: alpha-fetoprotein, immunosuppression, T cell proliferation, lymphocyte

略語一覧: AFP: alpha-fetoprotein, MAF: mouse amniotic fluid

NMS: normal mouse serum

はじめに

Alpha-fetoprotein (AFP) は分子量が約70,000前後の, 電気泳動図上, アルブミンと α_1 -グロブリンの間に認められる胎児性蛋白質で, 胎生期に卵黄嚢や胎児肝で生成され, 妊娠中期の胎児血清中では, その濃度が4 mg/ml にも達し, 胎児期における正常の血清成分として存在する。成人の正常血清中には存在しないが, 妊娠後期の妊婦血清中では500 μ g/ml 前後にも上昇する。それ以外に原発性肝癌や睾丸の teratoblastoma, そして, 時には激症肝炎でも, その血清濃度の上昇がみられ, 特に原発性肝癌の早期診断に有効であることは周知のところである^{1,2)}。

AFP が胎生期に出現する意義や, 生体内における生理的役割については, ほとんど知られていないが, 最近, ヒト AFP やマウス AFP が, phytohemagglutinin

(PHA) や Concanavalin A (Con A) などの mitogen によるリンパ球幼若化反応, リンパ球混合培養, さらにヒツジ赤血球などに対する抗体産生などの種々の *in vitro* での免疫反応を抑制する事実が報告³⁻⁵⁾ されて以来, AFP は, 血中に存在する免疫抑制因子のひとつとして, その免疫学的役割が注目を浴びて来た。さらに, これらの *in vitro* での報告のみならず, AFP の上昇がみられる悪性腫瘍では, AFP が生体の免疫監視機能 (immuno surveillance) を低下させ, その結果として腫瘍の増殖を助長するなど, 生体内での免疫機構調節因子としての AFP の役割を示唆する報告⁶⁾ がみられる。妊娠時においても母親と異った組織適合抗原 (父親からの) をもつ胎児が, 母親から免疫学的拒絶反応をうけることなく, 母体内で生存出来るために, 母親の免疫機能を低下させることに AFP が関与していることが報告⁵⁾ され, さらに新生児の未熟な免疫機能にも AFP が

* 千葉大学医学部第一内科学教室

KOJI SUZUKI: Immunosuppressive effect of alpha-fetoprotein. 1: Suppressive effect on lymphocyte transformation and antibody synthesis.

First Department of Internal Medicine, School of Medicine, Chiba University, Chiba 280.

Received for publication, March 24, 1980.

関与していることが示唆されている¹⁰⁾。

AFP の精製法にはイオン交換クロマト¹¹⁾, 抗 AFP 抗体吸着クロマト^{12,13)}, そしてポリアクリルアミドゲルを使う方法⁹⁾ などが知られているが, AFP が免疫学的活性を持ったままでの精製, 及び回収される AFP の量などを考えると, これらの以前に報告された AFP の精製法には一長一短があるように見える¹⁴⁾。著者は, これらの報告された方法とは異なるが, AFP の免疫学的活性を, 出来るだけ失なわないことを考慮にいて, マウス AFP を羊水中から精製し, mitogen (PHA, Con A 及び lipopolysaccharide) によるリンパ球幼若化反応, 種々の抗原に特異的なリンパ球幼若化反応, さらにヒツジ赤血球に対する IgM 抗体産生反応に対する抑制効果を報告し, AFP の免疫抑制効果に対する問題点を検討してみた。

実験方法

AFP の精製について: マウス AFP は妊娠15~20日の Ha-ICR マウスの羊水から精製した。この方法についての詳細は, すでに報告¹⁴⁾されているが, 要約すると次の如くである。無菌的に羊水を採取し, アミコンの濃縮装置で, 羊水の量の5~6倍の0.14 M PBS (phosphate buffered saline) を使って PM 10膜を通すことにより, 羊水を透析し, 分子量一万以下の物質を除去した。そして, この透析した羊水 (MAF: mouse amniotic fluid と略す) を, あらかじめ用意しておいた抗マウス血清吸着クロマトグラフィーに通した。この吸着クロマトグラフィーは Ha-ICR マウスの血清をウサギに免疫した後, ウサギ血清から50%硫酸アンモニウム塩析法で得たグロブリン分画を, 又は DEAE-52 カラムを通して得たガンマーグロブリン分画を, シアン化ブロマイド (CNBr) で活性化した Sepharose 4B (Pharmacia 社) に吸着させたものである。透析した羊水 MAF を, この吸着クロマトグラフィーに通して0.14 M PBS で抽出すると AFP だけが流出してくる。濃縮したのち, オクタローニー法で抗マウス血清抗体との反応を検索し, 抽出した AFP に正常血清成分が残っている様であったら, 再度, 吸着クロマトグラフィーに通した。通常2回程, 吸着クロマトグラフィーに通すことにより純粋な AFP が精製された。免疫電気泳動法, ポリアクリルアミドゲルの泳動法で精製した AFP が純粋であることを確認した。AFP 及び MAF の量測定には $E_{280m\mu}^{1\%} = 0.4$ 及び 1.0 を, それぞれに用いて計算した。また血清中の AFP の濃度は, 二重抗体 radioimmunoassay¹⁵⁾ を用いて測定した。

リンパ球幼若化反応について: 抗原に特異的なリンパ球幼若化反応は Alkan により報告された方法¹⁶⁾ にほぼ従った。抗原は, ovalbumin (OVA: Sigma 社), ヒトグロブリン (HGG: Miles ラボ社), lysozyme (Lyso: Sigma 社), Keyhole limpet hemocyanin (KLH: Calbio 化学社), purified protein derivatives (PPD: Connaught 社) の5つを用いた。Ha 37 Ra 株のヒト型結核菌を含む Freund の完全アジュバント (Difco 社) と, それぞれの抗原を等量ずつ混ぜ, 抗原量にして $100 \mu\text{g}$ を含む乳化液 (emulsion) を $50 \mu\text{l}$, マウスの尾の基部に皮注した。7~8日後に, この免疫した部位の流出リンパ節である鼠径部リンパ節と大動脈周囲リンパ節を無菌的に取り出し, ナイロン網を使ってリンパ球の単一細胞浮遊液 (single cell suspension) を作った。細胞数を $2 \times 10^6/\text{ml}$ に調整し, 平底の microtiter plate (Falcon 社) の各 well に, この細胞浮遊液 $200 \mu\text{l}$ を分配した。そして, 第一次免疫感作に使用した抗原を, 培養時の最終濃度が $250 \mu\text{g}/\text{ml}$ になる様に, 適当濃度の抗原を $20 \mu\text{l}$ ずつ, 各 well に分配した。そして, 4日間, 5% CO_2 , 95% AIR の条件下で培養した。使用した培養液は RPMI 1640 に 5% ウマ血清 (GIBCO 社), 100 units-penicillin, $100 \mu\text{g}$ streptomycin, 2 mM glutamine, 1 mM Hepes Buffer 液, そして 2×10^{-5} モルの 2-mercaptoethanol を含んだものである。細胞をハーベストする16時間前に $^3\text{H}^+$ -methylthymidine (New England Nuclear 社) $1 \mu\text{Ci}$ を各 well に分配し, Mash II を使って細胞を glass-fiber 紙にハーベストした。放射能は各サンプルに Aquazol 1 cc を使って Beckman 液体シンチレーションカウンタで測定した。

mitogen によるリンパ球幼若化反応では, CBA/J または C3H/Anf のマウス脾臓を無菌的に取り出し, ナイロン網を使って脾細胞の単一浮遊液を作った。平底の microtiter plate の各 well が細胞浮遊液 $200 \mu\text{l}$ を含み, その中に, 2×10^5 個の脾細胞が存在するようにした。そして, あらかじめ決めておいた PHA (Wellcome 社), Con A (Difco 社), そして LPS (lipopolysaccharide: Difco 社) の至適濃度の存在下で三日間培養した。培養液の組成は, 5% ウマ血清のかわりに, 5% ウジ胎児血清 (GIBCO 社) を用いた以外は, 上記の抗原特異的なリンパ球幼若化反応の時と同じである。抗原及び mitogen によるリンパ球幼若化反応に対しての AFP の抑制効果は, 適当濃度の AFP を各 well に $20 \mu\text{l}$ ずつ添加し, コントロールとして PBS 又は正常マウス血清 (NMS: normal mouse serum) を添加した時の $^3\text{H}^+$ -

thymidine の DNA への取り込みを比較した。比率は次の如く計算した。

$$\% \text{ stimulation} = \frac{\text{AFP } 20 \mu\text{l} \text{ を添加した時の cpm}}{\text{PBS } 20 \mu\text{l} \text{ を添加した時の cpm}} \times 100$$

ヒツジ赤血球に対する抗体産生について：

In vitro でのヒツジ赤血球に対する第一次 IgM 抗体産生を検索するには、CBA/J または C3H/Anf マウスの脾細胞 10×10^6 個を Marbrook 培養ビンの中で、 10×10^6 個のヒツジ赤血球と 4 日間培養した。培養液の組成は RPMI 1640 に 5% ウシ胎児血清と 5% ウマ血清を加え、残りはリンパ球幼若化反応の時と同じにした。培養は triplicate で行い、4 日後に IgM 抗体産生細胞について Cunningham のプラーク法¹⁷⁾により検索した。

In vivo における抗体産生については CBA/J 又は C3H/Anf マウスの腹腔内に 5×10^8 個のヒツジ赤血球を注入し、4 日後に脾細胞 1×10^6 について IgM 抗体産生細胞を Cunningham によるプラーク法¹⁷⁾で検索した。

実験結果

今回の方法で精製した AFP の 5% ポリアクリルアミドゲルの電気泳動を Fig. 1 に示した。蛋白量にして 100 μg のサンプルを各ゲルカラムに添加して泳動した。左側のカラムは PM 10 膜で透析した MAF を示しているが、上側より下方に向かって transferrin 20%, α_1 -antitrypsin 6%, AFP 42%, そして albumin 32% であることは、すでに報告されている^{3,4)}。真中のカラムは AFP を示す。通常 1 本の Band により呈示される。しかし、この AFP の Band より易動度の速いところに、別の非常に細い Band がみられることが稀にある。これが AFP の多様性 (heterogeneity) によるものか、または他の物質、例えば Albumin dimer のようなものの混在であるかは現在はっきりしていない。右側のカラムは MAF より AFP を除いたものを示している。これは精製した AFP をウサギに免疫し、抗 AFP 抗体を含むガンマーグロブリン分画をラビット血清から得て、CNBr で活性化した sepharose 4B に吸着させた抗 AFP 抗体吸着クロマトグラフィーに、MAF を通して AFP を除去したものである。

抗原特異的リンパ球幼若化反応における抗原特異性については、すでに報告^{16,18)}されているが、Tab. 1 には今回の 5 つの抗原を用いての抗原に特異的な反応を示した。明らかなように、例えば、ovalbumin (OVA) で感作されたリンパ節リンパ球は in vitro で ovalbumin

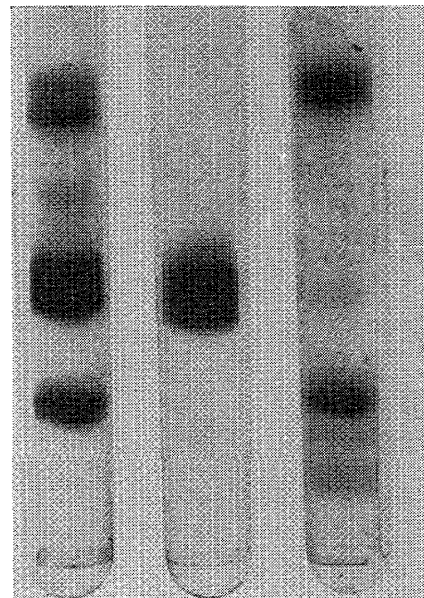


Fig. 1 Disc electrophoresis on 5% gels at pH 9.5.

Left: Diafiltered mouse amniotic fluid (MAF). The bands are primarily transferrin, α_1 -antitrypsin, AFP and albumin from the top downwards.

Middle: AFP preparation from MAF
Right: AFP-depleted MAF, using an anti-AFP affinity chromatography.

と培養された時のみ分裂増殖し、 120×10^3 cpm の $^3\text{H}^+$ -thymidine の DNA への取りこみを示すが、培養液だけ、又は一次感作に使われなかった抗原、例えば HGG などと培養した時は 4,000~6,000 cpm の低い $^3\text{H}^+$ -thymidine の取りこみを呈した。この反応系では、主に T 細胞が分裂増殖しており、そして macrophage 細胞が反応に不可欠であることは、すでに報告¹⁹⁾されている。抗原に特異的な反応であることは、Schwartz らにより報告²⁰⁾された PETLES 反応 (peritoneal exudate T lymphocyte enriched cells) と同じであるが、この方法と比べると今回の方法は全く容易で、個々のマウスについて行うことが出来、非常に便利である。

Fig. 2 では、OVA によるリンパ球幼若化反応に MAF, AFP 及び正常マウス血清 (NMS) を種々の濃度で、培養開始時に添加した時の $^3\text{H}^+$ -thymidine の DNA への取り込みを示し、MAF 及び AFP による抑制効果を明らかにした。Fig. 3 では、種々の抗原に対する反応系で、PBS をコントロールとして加えた時と、MAF または AFP を種々の濃度で加えた時の % stimulation を示した。MAF は添加する量が 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度ですでに 50% 以下に HGG, PPD, Lyso による幼若化反応を抑制し、AFP については添加する量を 100

Table 1. Antigen-specificity of lymph node cell proliferation

Antigen Added In Vitro	Antigen Dose $\mu\text{g/ml}$	Antigens Used for Initial In Vivo Priming				
		OVA	KLH	HGG	LYSO	CA
		$\text{cpm} \times 10^{-3} \pm \text{SE}$	$\text{cpm} \times 10^{-3} \pm \text{SE}$	$\text{cpm} \times 10^{-3} \pm \text{SE}$	$\text{cpm} \times 10^{-3} \pm \text{SE}$	$\text{cpm} \times 10^{-3} \pm \text{SE}$
Medium		5.5 ± 0.3	4.5 ± 0.1	4.6 ± 0.2	1.5 ± 0.2	2.0 ± 0.2
OVA	250	123.6 ± 5.1	10.5 ± 1.2	ND*	4.8 ± 0.2	3.9 ± 0.2
KLH	250	6.7 ± 0.2	264.6 ± 12.5	5.3 ± 0.3	4.4 ± 0.1	3.8 ± 0.2
HGG	250	5.6 ± 0.4	4.2 ± 0.4	43.1 ± 1.5	ND*	ND*
LYSO	250	11.7 ± 1.3	4.7 ± 0.7	ND*	55.4 ± 5.1	ND*
PPD	50	154.8 ± 0.8	66.2 ± 5.2	41.0 ± 0.9	36.7 ± 4.5	38.8 ± 2.2

Animals were initially primed in vivo with the various antigens indicated and then secondarily stimulated in vitro by the same or different antigens (see Methods). The data illustrates that the proliferative response is specific for the antigen to which the animals were initially sensitized and that there are variations in the magnitude of the proliferative response induced by different antigens.

OVA=ovalbumin

KLH=keyhole limpet hemocyanin

HGG=human gamma globulin

LYSO=lysozyme

CA=complete adjuvant H 37 Ra

ND*=not determined

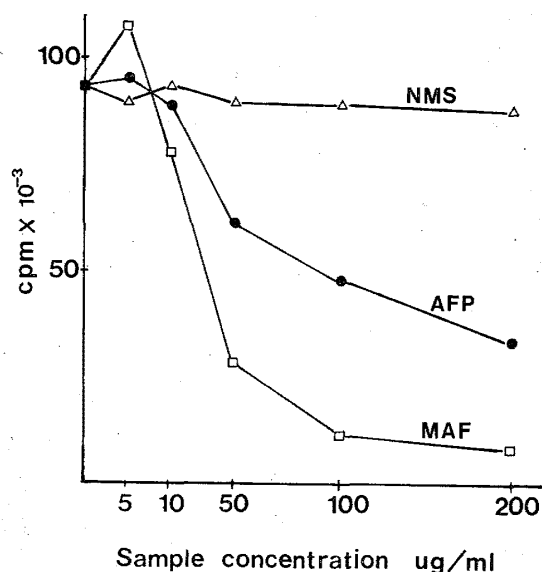


Fig. 2 Dose-dependent inhibition of OVA-induced proliferative responses by AFP, MAF, and NMS.

$\mu\text{g/ml}$ まで増加させると 50%前後の抑制がみられた。Trypan blue による検索で、MAF 又は AFP を添加しても、正常マウス血清を加えた時と比べて違いは認めなかった。MAF 又は AFP による抑制効果は cell viability とは関係していない。KLH のような抗原性の強いものを使用すると ^3H -thymidine の DNA へのとりこみ (Table 1 では $264 \times 10^3 \text{ cpm}$) が著明であり、

同量の AFP を添加しても抑制効果がはっきり認められなかった。Mitogen による非特異的リンパ球幼若化反応も AFP 及び MAF により一様に抑制されるが、PHA より Con A による幼若化反応の方が強く抑制され、LPS による B 細胞の幼若化は明らかに抑制された (Table 2)。

In vitro でのヒツジ赤血球に対する IgM 抗体産生も培養開始時に $100 \mu\text{g/ml}$ の AFP を Marbrook 培養ビンの内腔に添加することにより約 70% 前後の抑制が認められた (Table 3)。

In vivo における IgM 抗体産生に対する抑制効果については実験に必要とされる AFP の量が多量のために MAF を使った。OD=1.0 の MAF を 1 cc づつ、そして、同様にアミコン透析し、OD=1.0 に濃度を調整した正常マウス血清をコントロールとして連日 8 日間それぞれ 5 匹のマウスに静注した。そして、第 4 日目に 1×10^7 個又は 5×10^8 個のヒツジ赤血球を各マウスの腹腔内に注入し、9 日目、即ち最後の MAF を静注した翌日に、脾細胞について IgM 抗体産生細胞を Cunningham のブランク法により検索した。MAF を連日 8 日間静注した翌日の血清中の AFP の濃度は Radioimmunoassay で測定した。Tab. 4 に示した成績から明らかに、正常マウス血清を静注したコントロール群に比べて MAF を静注した群では抗体産生が低下している (Tab. 4)。

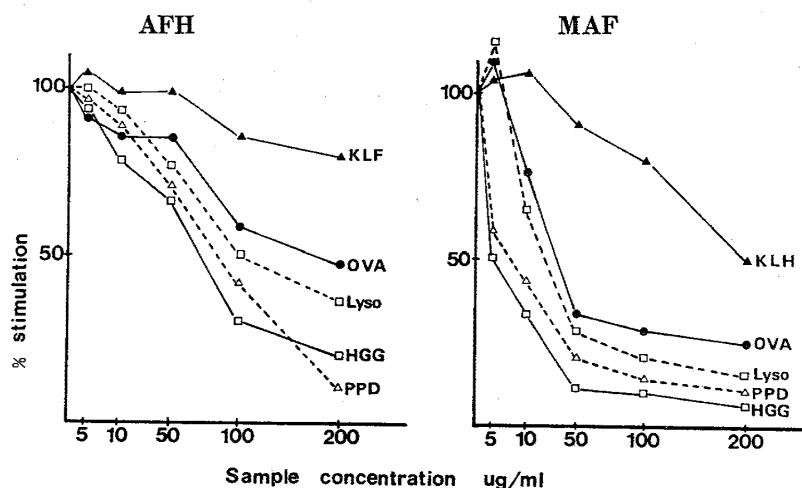


Fig. 3 Inhibitory effect of various concentration of AFP and MAF on the proliferation induced by different antigens.

$$\% \text{ stimulation} = \frac{\text{cpm with AFP or MAF added}}{\text{cpm with PBS added}} \times 100$$

Table 2. Inhibition of Mitogen Induced Lymphocyte Transformation by AFP and MAF

Mitogen	$^3\text{H}^+$ -thymidine uptake (cpm $\pm$ SE)		
	PBS 20 μl	AFP 100 $\mu\text{g/ml}$	MAF 100 $\mu\text{g/ml}$
PHA 0.2 $\mu\text{g/ml}$	54200 $\pm$ 4000	34800 $\pm$ 3200 (46)	20200 $\pm$ 2080 (63)
Con A 2.0 $\mu\text{g/ml}$	44000 $\pm$ 3800	26600 $\pm$ 3120 (39)	12400 $\pm$ 3820 (72)
LPS 50 $\mu\text{g/ml}$	33200 $\pm$ 2510	14400 $\pm$ 1220 (57)	8420 $\pm$ 310 (75)

20 μl of AFP or MAF as added to each culture so that it's final concentration in the culture became 100 $\mu\text{g/ml}$.

Numbers in parentheses represent % inhibition, calculated as follows:

$$\left(1 - \frac{\text{CPM with sample added}}{\text{CPM with PBS added}}\right) \times 100$$

Table 3. AFP and MAF Inhibit The In Vitro PFC Response against SRBC

PFC/culture	samples added to cultures		
	PBS 20 μl	AFP 100 $\mu\text{g/ml}$	MAF 100 $\mu\text{g/ml}$
	4200 $\pm$ 380	1260 $\pm$ 108 (70)	440 $\pm$ 13 (89)

20 μl of AFP or MAF was added to cultures so that it's final concentration became 100 $\mu\text{g/ml}$ respectively.

Figures in parentheses are % inhibition, as compared with PBS added control group.

Table 4. MAF Inhibits The In Vivo PFC Response against SRBC

Numbers of SRBC Injected	PFC/ 1×10^6 viable spleen cells			AFP level in serum ng/ml
	PBC	NMS	MAF	
1×10^7	385 $\pm$ 65	294 $\pm$ 34 (34)	24 $\pm$ 4 (92)	190×10^3
5×10^8	562 $\pm$ 78	402 $\pm$ 60 (29)	198 $\pm$ 5 (65)	168×10^3

PFC Assay was performed on individual mice and the mean value obtained from 5 mice. Figures in parentheses are % inhibition, as compared with PBS injected control group.

考 察

正常の血清中にも免疫抑制物質が存在しているが、Cooperband らにより報告²¹⁾されている IRA (immuno regulatory α -globulin) は、正常の血清の α -globulin 分画に存在し、PHA などによるリンパ球幼若化反応や、ヒツジ赤血球に対する抗体産生などの反応を抑制することが知られている。しかし、ある条件下での血清、例えば、新生児血清²²⁾、妊娠時の血清^{5, 22)}、また癌患者の血清²³⁾には、IRA よりさらに強度の免疫抑制物質が含まれていることも、すでに周知のところである。そして、これらの免疫抑制物質が生体内での免疫機構の調節に関与していることが多くの報告により示唆されている。例えば、妊娠時では、母親と不適合な組織抗原(父親側よりの)をもつ胎児が、母親より免疫学的拒絶反応をうけることなく母体内で生存出来るために、血中の免疫抑制物質は母親の免疫機能を低下させることに関与している^{5, 22)}。遅延型アレルギー免疫反応や、in vitro でのリンパ球幼若化反応の低下で示されているように癌動物や癌患者では免疫機能が低下しているが、これも suppressor 細胞の存在などに依ること以外に血中の免疫抑制因子が充分に関与していることが報告され^{22, 23)}、生体側の免疫機能が低下しているため、癌細胞が自由に増殖できるのではないかと推定される。

血清中に存在する、これらの免疫抑制因子の種類や性状については不明なところが多いが、妊娠時の血清では estrogen などの性ホルモン²⁵⁾や α_2 -macroglobulin²⁶⁾などが、そして癌患者血清では低分子の polypeptide²³⁾などが報告されている。さらに最近では、AFP も、Tomasi²²⁾、Murgita^{3, 4)}、Yachnin⁷⁾、Auer⁶⁾ らの多くの研究者により、血中の免疫抑制因子の1つとして生理的役割りを有することが示唆され、注目を浴びて来た。Mitogen やリンパ球混合培養による幼若化反応、SK-SD や *Candida albicans* などの抗原に対する特異的リンパ球幼若反応、in vitro での cytotoxic T 細胞の誘導、さらにはヒツジ赤血球に対する抗体産生などの種々の in vitro での免疫反応が、精製抽出されたマウス AFP やヒト AFP により非特異的に抑制されることが報告された⁸⁻⁹⁾。さらに、in vivo での AFP の免疫抑制効果は Gerschwin ら⁹⁾ の報告で示唆されている。即ち、精製した AFP をマウスの腹腔中に投与することにより Suppressor 細胞が誘導され、それにより生体での免疫機能が低下し、同時に接種した Moloney virus sarcoma 肉種の発育が促進されることが報告された。Murgita⁵⁾ も、AFP が血中において有力な免疫抑制因子であるこ

とを報告した。彼は妊娠時血清より抗 AFP 抗体吸着クロマトグラフィーを使って AFP を除去すると、それまで強い免疫抑制効果を呈していた妊娠時血清は免疫抑制効果が著減するのを示した。AFP が上昇している一部の肝疾患や ataxia teleangiectasia の患者血清も同様に AFP を除去することで、リンパ球幼若化反応などに対する血清の抑制効果が著減することが報告されている^{27, 28)}。以上の報告をふまえて今回、著者も AFP を羊水より精製し、それが種々の in vitro での免疫反応を非特異的に抑制することを報告した。さらに、in vivo でも AFP が抗体産生に対して充分に抑制効果があることを示唆した。

しかし、AFP の免疫抑制効果については上記した多くの研究者により報告されているものの、問題点がないわけではない。それは、最近、Sell²⁹⁾ や Charpentier¹¹⁾ らが、精製した AFP に免疫抑制効果を認めなかった旨を報告しているからである。これらの相反する報告の理由は現在はっきりしないが、次の3点から、今後検討が必要であると思われる。

1) AFP の多様性 (heterogeneity) について。

Yachnin ら^{7, 30)} の報告によると、ヒト AFP は荷電の違いから電気泳動法で6つの異った AFP に分けることが出来、最も陰性に荷電している AFP が免疫抑制効果を有することが知られている。また、胎児肝より抽出した AFP は $1 \sim 5 \mu\text{g/ml}$ で充分に抑制効果を示すが、同じ方法で、肝癌患者の血清より抽出された AFP は同じ程度の抑制効果を呈するのに $10 \sim 300$ 倍もの量が必要であることが報告されている³¹⁾。これらの報告は、AFP の精製法や材料により、免疫抑制効果が相違することを示唆している。Sell²⁹⁾ や Charpentier ら¹¹⁾ の報告では、免疫抑制効果のない AFP が使われたのではないだろうかという推察も可能である。Tyrosinemia 患者の血清には AFP が上昇しているが、患者の細胞免疫機能の低下が、はっきりしないのも免疫抑制効果のない AFP が増加している可能性がある³²⁾。

2) AFP の免疫学的活性が不安定であり、抽出する過程において免疫抑制作用が失われる可能性について。

この可能性は Auer ら⁶⁾ の報告で示唆される。3モルの NaSCN を使って抽出した AFP には免疫抑制効果が認められなかったが、pH 10 の glycine-NaOH Buffer 液を使った時は抑制効果が、はっきりみられた。著者も Nishi らの方法¹³⁾に従って pH 2.0 の強酸で AFP を精製抽出してみたが、免疫抑制効果ははっきりしなかった。著者が使った今回の方法では、強酸を使って AFP

を抽出することなく、0.14 M PBS を用いての生理的に近い条件下で、AFP を抗マウス血清抗体吸着クロマトグラフィーを通して抽出するようにしてあるので、抽出過程で、免疫学的活性が失なわれないと考えられる。以上のことは、AFP の免疫抑制効果を論ずる上で、その精製法が肝要であることを示している。

3) AFP 自体には免疫抑制効果がなく、血清や羊水中に存在している低分子の免疫抑制物質が精製の AFP に混在していたり、あるいは、AFP が、それらの物質と結びついて carrier のような役目を果たしているかも知れない。例えば、estrogen³³⁾、prostaglandin³⁴⁾あるいは polyamine³⁵⁾ などのような物質と結びついて抑制効果を発揮する可能性も否定出来ない。抗 AFP 抗体吸着クロマトグラフィーに羊水を通して AFP を除去しても (Fig. 1 で右側のゲルカラムに示してある。) 強い免疫抑制効果が残っていることが最近の著者らのデータでわかって来た。このことは羊水 (MAF) には AFP 以外にも免疫抑制物質が存在していることを示しているが、逆に、この物質が AFP に結びついていたり、混在している可能性も否定できない。この物質の同定については現在進行中である。

AFP それ自体に免疫抑制効果があること、または、低分子の免疫抑制物質と結びついて抑制効果を呈する、二つの可能性について論じたが、今後、これらの点を考慮して AFP の精製法や同定の検討が必要とおもわれる。しかし、これらの二つの可能性が残るものの、今回の著者の結果は、AFP が免疫抑制作用に参加し、生体での免疫機能の調節にかかわっていることを示唆している。免疫抑制効果の機序については別に報告する予定である。

御指導、御校閲を賜りました奥田邦雄教授に謝意を表すると共に、本研究に対して直接御教示下さいました Mayo clinic の Tomasi 及び Fathman 両教授に感謝の意を表します。

SUMMARY

It has been suggested that the immunosuppressive factors in mouse amniotic fluid could play an important biological role, such as in the immunological "immaturity" of the fetus, newborn, and in the maintenance of the fetal allograft in the histo-incompatible pregnant mother. In this regard, alpha-fetoprotein (AFP) has been suggested to be one of the main immunosuppressive

factors contained in mouse amniotic fluid (MAF).

In the present study, to reexamine the immunosuppressive effect of AFP, mouse AFP was purified from MAF using an anti-normal mouse serum affinity column chromatography, and its purity was examined by 5 % polyacrylamide gel electrophoresis.

Purified AFP inhibited the in vitro proliferative responses of lymph node cells sensitized to a variety of soluble antigens (ovalbumin, human gamma globulin, lysozyme, keyhole limpet hemocyanin, and purified protein derivatives), and also the nonspecific blastogenesis of spleen cells induced by PHA, Con A and lipopolysaccharide. In vitro IgM antibody synthesis against sheep red blood cells (SRBC) was also inhibited by addition of AFP to cultures, and in vivo IgM antibody response was inhibited by MAF administered in vivo.

文 献

- 1) Abelev, G.I.: Alpha-fetoprotein with teratocarcinoma. *Advances in Cancer Research* 14, 349-352, 1971.
- 2) Bent Norgaard Pedersen: Human alpha-fetoprotein. *Scand. J. Immunol. suppl.* 4, 1-45, 1976.
- 3) Murgita, R.H., and Tomasi, T.B. Jr: Suppression of the immune response by α -fetoprotein. I. The effect of mouse α -fetoprotein on the primary and secondary antibody response. *J. Exp. Med.* 141, 269-286, 1975.
- 4) Murgita, R.H., and Tomasi, T.B. Jr: Suppression of the immune response by α -fetoprotein. II. The effect of mouse α -fetoprotein on mixed lymphocyte transformation. *J. Exp. Med.* 141, 440-452, 1975.
- 5) Murgita, R. H.: The immunosuppressive role of α -fetoprotein during pregnancy. *Scand. J. Immunol.* 5, 1003-1014, 1976.
- 6) Auer, I.O., and Kress, H.G.: Suppression of the primary cell-mediated immune response by human α -fetoprotein in vitro. *Cell. Immunol.* 30, 173-179, 1977.
- 7) Yachnin, S., and Lester, E.P.: Inhibition

- of human lymphocyte transformation by human alpha-fetoprotein (HAFP) : HAFP monomers and multimers and a resistant lymphocyte subpopulation. *J. Immunol.* **119**, 555-539, 1977.
- 8) Littman, B.H., Alpert, E. and Rocklin, R. E.: The effect of purified α -fetoprotein on in vitro assays of cell-mediated immunity. *Cell. Immunol.* **30**, 35-42, 1977.
 - 9) Gerschwin, M.E., Cathels, J.J., Ahmed, A., and Makishima, R.: The influence of α -fetoprotein on Moloney sarcoma virus oncogenesis: Evidence for generation of antigen nonspecific suppressor T cells. *J. Immunol.* **121**, 2292-2298, 1978.
 - 10) Murgita, R.A., Goidal, E.A., Kontainen, S., Beverley, P. C. L and Wigzell, H.: Adult murine T cells activated in vitro by α -fetoprotein and naturally occurring T cells in newborn mice: Identity in function and cell surface differentiation antigens. *Proc. Natl. Acn. Sci. USA* **75**, 2897-2001, 1978.
 - 11) Charpentier, B., Guttman, R.D., Shuster, J. and Gold, P.: Augumentation of proliferation of human mixed lymphocyte culture by human α -fetoprotein. *J. Immunol.* **119**, 897-901, 1977.
 - 12) Shepard, H.W., Sell, S., Teft, P. and Baku, R.: Effects of α -fetoprotein on murine immune response. I. Studies on mice. *J. Immunol.* **19**, 91-96, 1977.
 - 13) Nishi, S., and Hirai, H.: Radioimmunoassay of α -fetoprotein in hepatoma, other liver disease and pregnancy. *Gann Monigr. Cancer Res.* **14**, 79-87, 1973.
 - 14) Labib, R. S., and Tomasi, T. B. Jr.: Immunosuppressive factors in mouse amniotic fluid and neonate serum. *Immunol. Commum.* **7**, 223-237, 1978.
 - 15) Gleich, G., Auerbeck, A.K., and Sweclund, H.A.: Measurement of IgE in normal and allergic serum by radioimmunoassay. *J. Lab. Clin. Med.* **77**, 690-698, 1971.
 - 16) Alkan, S.S.: Antigen-induced proliferation assay for mouse T lymphocytes. Response to a monovalent antigen. *Eur. J. Immunol.* **8**, 112-119, 1978.
 - 17) Cunningham, A.J., and Szenberg, A.: Further improvement in the plaque technique for detecting single antibody forming cells. *Immunol.* **14**, 599-600, 1968.
 - 18) Suzuki, K., and Tomasi, T.B. Jr: Inhibition of antigen induced lymph node cell proliferation by murine amniotic fluid and α -fetoprotein. *Immunol.* **38**, 539-545, 1979.
 - 19) Suzuki, K., and Tomasi, T.B. Jr.: The regulatory effect of macrophages on the antigen induced lymph node cell proliferative response. *Cell. Immunol.* **49**, 317-328, 1979.
 - 20) Shwartz, R.H., Jackson, L., and Paul, W. E.: T lymphocyte-enriched murine peritoneal exudate cells. I. A reliable assay for antigen induced T lymphocyte proliferation. *J. Immunol.* **115**, 1330-1338, 1975.
 - 21) Cooperband, S.R., Bladger, A.H., Davis, R. C., Schmid, K., and Mannick, J. A.: The effect of immunoregulatory globulin (IRA) upon lymphocyte in vitro. *J. Immunol.* **109**, 154-162, 1972.
 - 22) Tomasi, T.B. Jr., Murgita, R.H., Thompson, R.L. and Keller, R.H.: Alpha-feto protein and the immune response during murine pregnancy and neonatal development. In "Development of Host Defenses" edited by Cooper, M.D., and Dayton, D.H. P 273-285, Raven Press, N.Y.; 1978.
 - 23) Nimberg, R.B., Glasgow, A.W., Menzonian, J.O., Lewtanian, M.B., Cooperband, S.R., Manninck, J.A. and Schmid, K.: Isolation of an immunosuppressive peptide fraction from the serum of cancer patients. *Cancer Res.* **35**, 1489-1494, 1975.
 - 24) Broder, S., Waldman, T.A.: Suppressor cell network in cancer. *N.E.J. Med.* **279**, 1281-1284, 1978.
 - 25) Rembiesa, R., Ptak, W., and Bubak, W., and Bubak, M.: The immunosuppressive effects of mouse placental steroid. *Experimentia* **30**, 82-86, 1974.
 - 26) Than, G.N., Csaba, I.F., and Karg, N.J.:

- Immunosuppressive effect of pregnancy-associated α_2 -glycoprotein. *Lancet* **1**, 515-519, 1975.
- 27) Keller, R.H., Dattwyler, R.J., Summerskill, W.H.J., Geubel, A.P. and Tomasi, T.B. Jr.: Immunosuppression in chronic active liver disease: Possible role of AFP. Submitted to *Gastroenterology*, 1979.
- 28) Tomasi, T.B. Jr., Dattwyler, R.J., Murgita, R.A., and Keller, R.H.: Immunosuppression by alpha-fetoprotein. *Trans. Asso. Am. Physicians*. **83**, 293-299, 1975.
- 29) Sell, S., Sheppard, H.W., and Poler, M.: Effect of α -fetoprotein in immune response. II. Studies on rats. *J. Immunol.* **119**, 98-103, 1977.
- 30) Lester, E.P., Miller, J.B., and Yachnin, S.: Human alpha-fetoprotein as a modulator of human lymphocyte transformation: Correlation of biological potency with electrophoretic variants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4645-4649, 1976.
- 31) Yachnin, S. and Lester, E.P.: Inhibition of human lymphocyte transformation by human α -fetoprotein: Comparison of fetal and hepatoma HAFP and kinetic studies of in vitro immunosuppression. *Clin. Exp. Immunol.* **26**, 484-490, 1976.
- 32) Belanger, L., Dagnillard, F., Waithe, W.I., and Dofour, D.: in "Onco-Development Gene Expression" Academic Press, N.Y., 1976.
- 33) Uriel, J., Aussel, C., Bouillon, O., Loistler, F. and de Nechaud, B.: Liver differentiation and the estrogen-binding properties of α -fetoprotein. *Ann. NY. Acad. Sci.* **259**, 119-130, 1975.
- 34) Webb, D.R., and Oshenoff, P.L.: Antigen stimulation of prostaglandin synthesis and control of immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **73**, 1300-1304, 1976.
- 35) Rijke, E.O. and Ballieux, R.E.: Is thymus derived lymphocyte inhibitors a polyamine? *Nature* **274**, 804-805, 1978.