新生時野牛血製アルブミンの投与を受けたウサギの抗体産生能について

その2．Tolerance の持続期間の検討*

金沢大学結核研究所病態生理部（主任：西東利男教授）

小 西 健 一　越 沢 み ち 子

金沢大学結核研究所薬理部（主任：伊藤　亮教授）

吉 村 政 弘

（受付：昭和38年11月6日）

緒　言

前報[1]において私達は生直後より野牛血製アルブミン（以下BBAと略記）を2 mgあて連日21日間注射されたウサギが，その後154又は167日間無処置のまま放置され，生後175～188日に更に BBA を注射されてもこれに対する抗体を産生せず，明らかに tolerance の状態にあることを指摘した．

そこで今回は BBA の新生時投与がはたしていつまで BBA に対する tolerance を持続させうるものかを更に検討するため，前報に準じてBBA の neonatal injection を行った後，放置期間を前報の場合（154日又は167日）よりはるかに延長し（334日および517日），BBA に対する tolerance の有無を検索した．更に前報記載のウサギのその後の tolerance の持続性についても追求の歩を進めた．以下はその成績の概要である．

実験材料ならびに実験方法

1) 抗　　原

前報[1]記載のごとく野牛血製アルブミン（以下BBA）およびヒト血清γ-グロブリン（以下HGG）の2抗原を用いた．

2) 抗原の注射方法

a) neonatal (tolerance) injection：前報[1]記載のとおり，出生当日は出生後12時間以内に，以後毎日2mg あて合計21回腹腔内に注射した．

b) challenge injection：特に記載しない場合には BBA 又は HGG を40mg あて1週おきに3回耳静脈より注射した．

3) 採血および反応術式（沈降反応および補体結合反応）

前報[1]記載のとおりである．

4) 実験群の組分けと実験の概要

生直後より21日間 BBA の注射を受けた4腹子21羽のウサギは challenge injection 開始時には図1のように13羽が生存し，これを次の4群に分けた．

Ⅰ群（4羽）は生後96日より，Ⅱ群（4羽）は生後175～188日より，それぞれ半数を BBA で，残りの半数を HGG で challenge した．その成績は前報に記載したところであるが，今回はこのⅠ群およびⅡ群につ

* 本論文の要旨は昭和36年10月22日，第15回日本細菌学会北陸地方支部集会において発表した．

いて更に検討を加えた．すなわち，Ⅰ群のウサギは生後288日にそれぞれ初回の challenge（生後96日）の場合と同一抗原で，更に生後411，590および715日に4羽とも BBA で challenge し，Ⅱ群は生後355および538日に4羽とも BBA で challenge した．一方，Ⅲ群（3羽）は生後355日および538日に，Ⅳ群（2羽）は生後538日にはじめてすべて BBA で challenge した．

なお対照として新生時無処置ウサギ12羽に対して，Ⅰ群およびⅡ群に初回の challenge injection を行ったとほぼ同年令時に同方法で BBA 又は HGGの challenge injection を行った．またこのうちⅠ群とほぼ同様生後100日に最初の challenge を行った4羽は更にⅠ群と同間隔をおいて第2回の challenge を行い，neonatal injection の有無による追加注射の効果について比較観察した．

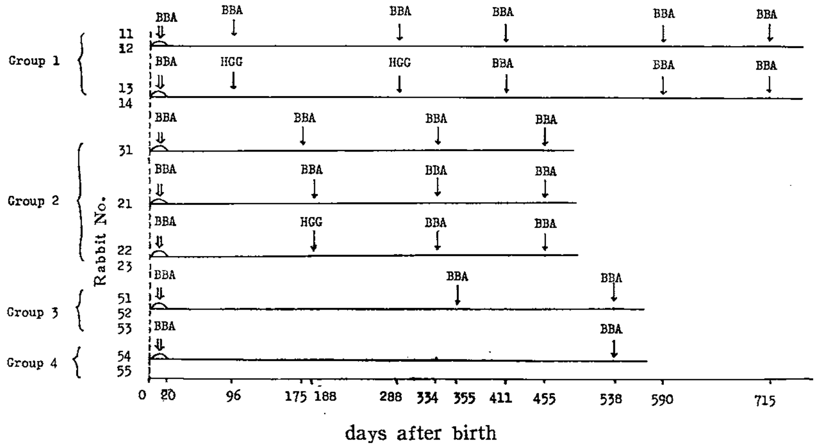

Fig. 1. The outline of the experiment

⇓ = neonatal injection, ↓ = challenge injection.

BBA : albumin from buffalo blood, HGG : human serum gamma globulin.

実 験 成 績

前述のⅠ，Ⅱ，ⅢおよびⅣ群ならびに対照群のすべてのウサギの各 challenge 前の血清は，無希釈で BBA および HGG と沈降反応を示さず，1：10 希釈で両抗原と補体結合反応陰性であった．そこで以下の項では challenge 後の抗体価について記述する．

1）対 照 群

生後100〜180日間無処置のまま経過したウサギ12羽のうち，8羽を BBA で，残りの4羽を HGG で challenge した．その成績は第1表および第2表に一括したごとく，BBA 注射群の抗 BBA 抗体価は沈降反応では 1：4〜32，補体結合反応では 1：20〜80であり，HGG 注射群の抗 HGG 抗体価は沈降反応では 1：16〜128，補体結合反応では 1：80〜160 であった．

両群のうちの各 2 羽に対しては初回 challenge 後192日目に前回と同じ抗原を 100mg あて1週おきに2回注射した．その抗体価は表に示すごとく初回 challenge のそれと同様であった．

2）Ⅰ　　群

新生時 BBA で処置され，生後96日より BBA 又は HGG で第1回 challenge を受けたウサギが生後 288 日に達したとき，第1回と同じ抗原で2回目の challenge injection（この場合は 100mg あて1週おき2回注射）を行った．第3回 challenge は生後 411 日より，第4回は生後 590 日より，第5回は生後 715 日より行い，すべてのウサギに BBA を注射した．これらのウサギの各 challenge injection 後の抗体価は第3表および第4表に一括表示した．

第1回より第5回までBBAで challenge された2羽（No. 11およびNo. 12）は第2回および第3回 challenge によっても抗 BBA 抗体

の産生を認めず，No. 11は第4回 challengeにより沈降反応において 1：1 というきわめて低い抗 BBA 抗体価が観察期間中の短い期間に認められたが，その際補体結合性抗体は証明されなかった．しかして No. 11は第5回 challenge, No.12は第4回 challenge 後，ようやく沈降および補体結合両反応の抗 BBA 抗体価が対照群のそれと同程度となった．

生後 288 日に再び HGG の注射を受けた 2 羽（No. 13 およびNo.14）は，第 1 回と同様明らかに抗 HGG抗体の産生が認められ，その抗体曲線は対照群に対する booster injection の場合と同様に secondary response の形を示した．このことは新生時のBBA投与がHGG抗体産生に影響しないことを示唆している．これらのウサギは第3回（生後411日）以降の challenge では neonatal injeciton に用いたBBAの注射を受けたのであるが，No. 13 では第 3 回 challenge によって明らかに抗 BBA 抗体の産生が認められた．No. 14 では第 3 回 challenge により沈降抗体の産生はみられなかったが，第 4 回（生後590日）challenge 後の両反応における抗体価は対照群のそれと同程度であった．

3）II　群

新生時 BBA で処置され，生後175〜188日に BBA 又は HGG で 1 回目の challenge を受けたすべてのウサギに対し，生後334および455日に BBA の challenge を行った．その成績は第 5 表および第 6 表に示した．

生後175〜188日にBBAの challenge を受けた 2 羽では，第 2 回 challenge（生後334日より）によっても抗 BBA 抗体の産生が認められなかった．しかしながら第 3 回 challenge（生後455日より）後は明らかに抗BBA抗体の産生が認められた．

一方，1 回目の challenge の際HGGを注射された 2 羽のうち，1 羽は第 2 回 challenge 後両反応において対照群と同程度の抗 BBA 抗体価を示すに至ったが，他の 1 羽では補体結合性抗体が認められず，沈降反応のみ陽性であった．しかし，後者のウサギも第3回 challenge 後は両抗体価とも対照群のそれと同程度となった．

4）III　群

生直後より21日間 BBA の注射を受けたまま放置されたウサギ 3 羽を生後355日目にBBA で challenge した．

うち 2 羽の抗体価は沈降反応および補体結合反応において対照群のそれに近い値を示したが，他の 1 羽では補体結合反応のみ陽性で，沈降抗体は証明されなかった．この 1 羽は約 1 カ月後に死亡した．（第 5 表および第 6 表）

5）IV　群

neonatal injection を受けたまま放置されていた 2 羽のウサギに，生後538日目にBBA を challenge して抗 BBA 抗体の産生状態を検討した．その結果，いずれも対照群と同程度の抗体価を示すことが確認された．（第 5 表および第 6 表）

考　　案

前述の成績を要約すると，出生直後より連日21日間 BBA を 2 mg あて投与されたウサギではその後の BBA での challenge injection までの間隔がある程度以上延長されるにつれ次第に tolerance が低下し，ついに消失するが，適当な時期の challenge injection は tolerance を更に延長維持させる上で効果的であるということである．すなわち，新生時 BBA で処置され生後96日に最初の BBA challenge を受けたウサギ 2 羽は生後288日および411日まで，うち 1 例は更に生後 590 日においてもなお BBAに対して tolerant であった．しかし生後175〜188日に初回の BBA challenge を受けたウサギは生後 334日では tolerant であったが，生後455日ではすでに tolerance の状態にはなかった．一方，neonatal injection に用いた BBA と関係のない HGG を生後96日および288日の 2 回にわたって challenge されたウサギ

は生後411日において，生後188日にHGG 1回のみ challenge を受けたウサギは生後334日において，また新生時処置を受けその後無処置のまま放置されたウサギは生後355日において，もはやBBAに対して partial tolerance であるにすぎないかあるいは完全に untolerant となっていた．又更に新生時 BBA 処置のみでその後放置されていたウサギは生後538日には BBA に対してすべてtolerant でなくなっていた．

前報[1]において私達は生直後より21日間に42mgの BBA を投与されたウサギが，生後188日までは BBA に対して tolerant であったと報告した．しかして今回のような neonatal injection と challenge injection との間隔(334日ないし538日）をとった実験成績からは，この tolerance が更に前報記載以上に持続するか否かを明らかに推定することはできなかった．しかしながら，生後334，355 あるいは 411日にはじめて BBA の challenge をうけたウサギで対照群に比して低い抗体産生能しか示さないもののあったことは，neonatal injection の影響がなおこの時期にまで及ぶ可能性のあることを示唆しているものと考えられる．

一方，生後96，288 および 411 日に BBA の challenge をうけたウサギの抗体産生が生後411～590日まで抑止されたこと，および生後175～188日にBBAを challenge されたウサギが生後334日でもなお tolerant であったことは，生後96，175～188 および 288日（1例では生後 411 日よりの challenge をも加えて）よりの challenge injection がその時期に存在した tolerance を更に延長させたものと考えられる．Smith & Bridges[2]はウシ血清アルブミンに対する tolerance について実験し，生直後100mg の注射を受けたウサギは生後167日で半数が tolerant であるが，生後 189 日ではすべて untolerant であり，90 日間に 1 回の割で10mgあて challenge すると生後620日でも tolerant であったと報告している．又 Dresser[3]はマウスを用いてウシ血清γ-グロブリンに対する tolerance の持続を検討し，消失するはずの tolerance が booster injection によって更に持続するようになると述べている．本実験でも，生後333日以前に challenge injection を受けなかった新生時処置ウサギにおいて tolerance の持続が最も短く，生後175～188日に BBA の challenge を受けたウサギではこれに次ぎ，生後96日および288日の両度にわたり BBA の投与を受けたウサギにおいて最も長くて生後 411 日まで，そのうち1例では更に生後 590 日までも tolerance の状態が持続した．この知見は Smith & Bridges の指摘したところとよく一致している．今日血球に対する tolerance は成り立ちにくいものの一つとされているが，Nossal[4]はヒト A 型血球を週2回あて8週間以上マウスに注射することによって tolerant となし得たと報告しており，こうした長期の tolerance injection も又前述の tolerance 維持のための booster injection と同じ機転にあるものと考えられないものでもなかろう．

結　　論

生直後より BBA を毎日 2 mg あて21日間注射したウサギは生後175～188日までは少なくとも BBA に対して tolerant であることを前報において指摘した．今回はこの tolerance の持続期間を更に検討し，次の結果を得た．

1）新生時 BBA 処置を受け，（i）生後334日，355日あるいは411日に，はじめて BBA の challenge を受けたウサギはいずれも抗 BBA 抗体を産生したが，その中には低い抗体価のみしか示さないものが認められた．しかし，(ii) 生後538日にはじめて BBAの challenge をうけたウサギではいずれも高価の抗 BBA 抗体の産生が認められた．

2）新生時BBA処置を受け，生後175～188日にBBAの challenge を受けたウサギは，生後334日における BBA の challenge 後も抗

BBA 抗体を産生しなかった．

3）新生時BBA処置を受け，生後96日および288日に再度BBAの challenge を受けたウサギは，生後411日におけるBBAの challenge 後も抗 BBA 抗体を産生しなかった．このうちの1例では更に179日後（生後590日）における BBA の challenge 後も抗 BBA 抗体の産生が認められなかった．

以上のことは，新生時 BBA 処置後の適当な時期における BBA 投与が booster tolerance injection として働き，BBA に対する tolerance を延長持続させうる可能性のあることを示している．

文　　献

1) 小西健一，吉村政弘：金大結研年報，20，145，1963.
2) Smith, R.T. and Bridges, R. A.: J. Exp. Med., 108, 227, 1958.
3) Dresser, D. W.: Immunol., 4, 13, 1961.
4) Nossal, G.J.V.: Nature, 180, 1427, 1957.

Tabel 1

Antibody production of rabbits challenged with BBA and HGG*

Neonatal treatment	Rabbit No.	Maximal antibody titre in precipitation reaction (anti-HGG / anti-BBA): the 1st challenge injection — Beginning on	Antigen**1)	Titre***	the 2nd challenge injection — Beginning on	Antigen**2)	Titre***
none	1001	about the 100th day after birth	BBA	1:32 / –	the 192th day after the 1st challenge injection	BBA	1:16 / –
	1002		BBA	1:32 / –			1: 4 / –
	1003		HGG	– / 1:16			– / 1:64
	1004		HGG	– / 1:16			– / 1:32
	1005		BBA	1: 8 / –			
	1006		BBA	1: 4 / –			
	1007		HGG	– / 1:128			
	1008		HGG	– / 1:64			
	1013	about the 180th day after birth	BBA	1: 4 / –			
	1014			1: 8 / –			
	1015	about the 140th day after birth	BBA	1: 8 / •			
	1016			1:16 / •			

* BBA: Albumin from buffalo blood, HGG: Human serum gamma globulin

**1) Rabbits were injected with three weekly doses of 40mg of BBA or of HGG each from the time showed in above column.

**2) Rabbits were injected with two weekly doses of 100mg as same as above description.

*** Antibody titre indicates the dilution of serum, and – represents no precipitation reaction in a non-diluted serum.

Table 2

Antibody production of rabbits challenged with BBA and HGG*

Neonatal treatment	Rabbit No.	Maximal antibody titre in complement fixation reaction (anti-BBA / anti-HGG): the 1st challenge injection — Beginning on	the 1st challenge injection — Antigen**1)	the 1st challenge injection — Titre***	the 2nd challenge injection — Beginning on	the 2nd challenge injection — Antigen**2)	the 2nd challenge injection — Titre***
none	1001	about the 100th day after birth	BBA	1 : 80 / –	the 192th day after the 1st challenge injection	BBA	1 : 80 / –
	1002		BBA	1 : 40 / –			1 : 20 / –
	1003		HGG	– / 1 : 160			– / 1 : 160
	1004		HGG	– / 1 : 160			– / 1 : 160
	1005		BBA	1 : 20 / –			
	1006		BBA	1 : 20 / –			
	1007		HGG	– / 1 : 80			
	1008		HGG	– / 1 : 80			
	1013	about the 180th day after birth	BBA	1 : 20 / –			
	1014		BBA	1 : 20 / –			
	1015	about the 140th day after birth	BBA	1 : 20 / •			
	1016		BBA	1 : 40 / •			

*, **1), **2) See Table 1.

*** Antibody titre indicates the dilution of serum, and – represents complete hemolysis in 1 : 10 diluted serum.

Table 3

Antibody production of rabbits treated neonatally with BBA and challenged later with BBA and HGG*

Neonatal treatment	Rabbit No.	Maximal antibody titre in precipitation reaction (anti-BBA / anti-HGG) — Days after birth: 96		288		411		590		715	
		Challenge injection with**1)	Titre***	Challenge injection with**2)	Titre***	Challenge injection with**1)	Titre***	Challenge injection with**1)	Titre***	Challenge injection with**1)	Titre***
Daily injection with 2mg of BBA during 21 days following birth	11	BBA	– / –	BBA	– / –	BBA	– / –	BBA	1: 1 / –	BBA	1: 4 / –
	12		– / –		– / –		– / –		1: 4 / –		1: 8 / –
	13	HGG	– / 1: 8	HGG	– / 1 : 16		1: 4 / –		1: 4 / –		1: 8 / –
	14		– / 1: 4		– / 1: 8		– / –		1: 8 / –		1 : 16 / –

*, **1), **2), *** See Table 1

Table 4

Antibody production of rabbits treated neonatally with BBA and challenged later with BBA and HGG

Neonatal treatment	Rabbit No.	Maximal antibody titre in complement fixation reaction $\left(\frac{\text{anti-BBA}}{\text{anti-HGG}}\right)$ — Days after birth: 96		288		411		590		715	
		Challenge injection with**1)	Titre***	Challenge injection with**2)	Titre***	Challenge injection with**1)	Titre***	Challenge injection with**1)	Titre***	Challenge injection with**1)	Titre***
Daily injection with 2 mg of BBA during 21 days following birth	11	BBA	–/–	BBA	–/–	BBA	–/–	BBA	–/–	BBA	1 : 20/–
	12	BBA	–/–	BBA	–/–	BBA	–/–	BBA	1 : 20/–	BBA	1 : 40/–
	13	HGG	–/1 : 20	HGG	–/1 : 40	BBA	1 : 40/–	BBA	1 : 40/–	BBA	1 : 20/–
	14	HGG	–/1 : 20	HGG	–/1 : 20	BBA	1 : 10/–	BBA	1 : 10/–	BBA	1 : 20/–

*, **1), **2) See Table 1.

*** See Table 2

Table 5

Antibody production of rabbits treated neonatally with BBA and challenged later with BBA and HGG*

Neonatal treatment	Rabbit No.	Maximal antibody titre in precipitation reaction (anti-BBA / anti-HGG): Days after birth 175 or 188 — Challenge injection with**1)	175 or 188 — Titre***	334 — Challenge injection with**1)	334 — Titre***	355 — Challenge injection with**1)	355 — Titre***	455 — Challenge injection with**1)	455 — Titre***	538 — Challenge injection with**1)	538 — Titre***
Daily injection with 2mg of BBA during 21 days following birth	31	BBA	– / –	BBA	– / –			BBA	1 : 8 / –		
	21	BBA	– / –	BBA	– / –			BBA	1 : 4 / –		
	22	HGG	– / 1 : 64	BBA	1 : 2 / –			died			
	23	HGG	– / 1 : 128	BBA	1 : 4 / –			BBA	1 : 4 / –		
	51					BBA	1 : 2 / –			BBA	1 : 4 / •
	52					BBA	1 : 2 / –			BBA	1 : 4 / •
	53					BBA	– / –			died	
	54									BBA	1 : 4 / •
	55									BBA	1 : 8 / •

*, **1), *** see Table 1.

Table 6

Antibody production of rabbits treated neonatally with BBA and challenged later with BBA and HGG

Neonatal treatment	Rabbit No.	Maximal antibody titre in complement fixation reaction (anti-BBA / anti-HGG) — Days after birth: 175 or 188 — Challenge injection with**1)	175 or 188 — Titre***	334 — Challenge injection with**1)	334 — Titre***	355 — Challenge injection with**1)	355 — Titre***	455 — Challenge injection with**1)	455 — Titre***	538 — Challenge injection with**1)	538 — Titre***
Daily injection with 2mg of BBA during 21 days following birth	31	BBA	– / –	BBA	– / –			BBA	1 : 40 / –		
	21	BBA	– / –	BBA	– / –			BBA	1 : 20 / –		
	22	HGG	– / 1 : 40	BBA	– / –			died			
	23	HGG	– / 1 : 80	BBA	1 : 20 / –			BBA	1 : 40 / –		
	51					BBA	1 : 20 / –			BBA	1 : 20 / •
	52					BBA	1 : 10 / –			BBA	1 : 20 / •
	53					BBA	1 : 10 / –			died	
	54									BBA	1 : 20 / •
	55									BBA	1 : 40 / •

*,**1) See Table 1.

*** See Table 2.