

新生時野牛血製アルブミン投与を受けた ウサギの抗体産生能について *

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

金沢大学結核研究所薬理製剤部 (主任: 伊藤 亮教授)

吉 村 政 弘

(受付: 昭和37年11月30日)

緒 言

1945年 Owen¹⁾ によってウシの二卵性双生児の間に赤血球キメラ現象のあることがはじめて報告され, 1953年 Dunsfordら²⁾ によりヒトにおいて, 更に Stormont ら³⁾ によりヒツジにおいて同様な現象の認められることが相次いで報告されるに至った. しかし1953年 Medawar ら⁴⁾ が胎生期および出生直後のCBA株マウスにA株マウスの脾細胞を注射し, その成熟後A株マウスの皮膚を移植することに成功し, ここにはじめて人工的皮膚キメラ現象を現出せしめた. 以来キメラ現象成立に関する機構の究明が広範に行われた結果, 胎生期あるいは新生期にうけたある種抗原物質に対して動物は成熟後も抗体を産生しがたいことが明らかとなった. この様な現象は acquired immunological tolerance (以下 immunological tolerance 又は単に tolerance と略称) と名付けられて免疫学の新しい研究分野となり, 研究に用いら

れる動物としては多くの哺乳類および鳥類に及び, 抗原としても細胞性^{5) 6) 7) 8)}, 非細胞性^{9) 10) 11) 12)} のものからある種の薬剤¹³⁾ にまで及んでいる.

Burnet¹⁴⁾ は Medawar らの実験結果およびその他の業績を総括して考察することによって, 1959年, 抗体産生に関して clonal selection theory を提唱した. この説によると従来の指令説ではその解釈がきわめて困難であった現象が容易に説明されることは周知の通りである.

私達はこの immunological tolerance の現象を生体内における一種の抗体吸収法ともみなしうるものではないかと考え, その可能性の限界を検討する目的でウサギ対野牛血製アルブミンおよびその誘導体に関する一連の実験を企図したが, まずその基礎的な tolerance の成立とその持続期間について検討した. 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. 動物

白色健常ウサギを交配してえられた子ウサギを, 分

娩直後より使用に供した.

2. 抗原

* 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上において発表した.

使用抗原は野牛血製アルブミン(石津)〔以下BBAと略記〕およびヒト血清 γ -グロブリン(北陸血清製造所にてO型ヒト血清より分画精製)〔以下HGGと略記〕で、用いのにぞみ生食水で所要濃度に希釈して使用した。

3. 抗原の注射方法

a) neonatal injection: 出生当日は分娩後12時間以内に、以後毎日BBA2mgあて合計21回腹腔内に注射した。

b) challenge injection: BBAおよびHGGを生後96日以降に、40mgあて1週おきに3回耳静脈より注射した。

4. 採血

採血はおのおのchallenge injectionの前および最終注射後1週おきに耳静脈を半切して行い、血清を分離した後、56°C 30分間加温して反応に供した。

5. 反応術式

a) 沈降反応: 重層法により抗原希釈(0.4%より)と血清希釈(1:1~1:256)を行つて反応の場を観察した。

b) 補体結合反応: 緒方法¹⁵⁾に準じて行い、沈降反応と同様に反応の場を観察した。この場合の抗原希釈は1:1,000~1:2,048,000, 血清希釈は1:10~1:320であつた。

6. 実験の概要

使用ウサギは図1のように3腹子, 8羽で、すべて21日間BBAでneonatal injectionを行ひ、うち4羽は生後96日より、残りの4羽は生後175~188日より、半数をBBAで、残りの半数をHGGでchallengeし、抗体の産生状況を観察した。対照として新生時無処置ウサギ8羽について同様なchallenge injectionを行つた。

実験成績

1. 生後96日よりBBAおよびHGGを注射したウサギの抗体産生

出生直後より毎日BBAを2mgあて21日間注射したウサギの生後60日および95日目の血清中にはいずれも抗BBA抗体が証明されなかった(表略)。

これらのウサギの半数に生後96日よりBBAを40mgあて1週おきに3回静注しても、抗BBA抗体の産生は認められなかったが、同様にしてHGGを注射した残りの半数では明らかに抗HGG抗体産生が認められ、その抗体価は新生児期無処置ウサギにHGGを注射したものとはほぼ同程度であつた(表1)。

2. 生後175日および188日よりBBAおよび

HGGを注射したウサギの抗体産生

出生直後より毎日BBA 2mgあて21日間注射されたウサギでは生後174日および187日に抗BBA抗体はいずれも認められなかった。

そこでその翌日より半数の動物にBBA, 残りの半数にHGGをそれぞれ40mgあて1週おきに3回注射して、その抗体産生状況を観察した(表2)。その結果、生後175日~188日においても新生児期にBBAで処置されたウサギでは抗BBA抗体の産生能は阻止されているが、新生児期に注射されていないHGGに対する抗体産生能はほとんど抑制されていないことが示された。

考案

今日 immunological tolerance あるいは immunological unresponsiveness の研究に最も多く用いられている非細胞性抗原はウシ血清アルブミン, ウシ血清 γ -グロブリンおよびヒト血清アルブミンで、動物はマウス, ラット, モルモット, ウサギ, トリ, 七面鳥である。しかしこれらを用いてのこれまでの報告が指摘し

ていることは immunological tolerance 成立の成否は抗原の種類および動物の選択, 新生児期における抗原処置(tolerance injection)の時期および量, 更に成熟後における抗原注射の量, 方法および時期に左右されるということである。

この実験では野牛血製アルブミンを出生直後

より 2 mg あて 21 日間 ウサギに注射することによってその後どれくらいの期間は BBA 注射を行っても抗 BBA 抗体の産生が阻止されるかを検討した。tolerance injection の回数は研究者によりいろいろであるが Levi & Schechtman¹⁶⁾ は出生当日より 21 日間注射を行って非特異性抗体の産生が抑制されたと報告し、Cinader & Pearce¹¹⁾ はウサギ対ヒト血清アルブミンおよびそのアゾ化物についての実験で、出生直後アゾ・ヒト・アルブミン 5 mg 1 回だけの注射では tolerant となしえないが、10mg, 4 回あるいは 1 mg, 20 回によって tolerant とすることができたと述べている。

Thorbeck ら¹⁷⁾ はマウスに出生直後 1 mg のウシ γ -グロブリンを注射すると生後 14 日で partial tolerant になるが生後 40 日ではかえって sensitive となり、出生直後 10mg 以上の注射を行うと生後 40 日でも tolerant であるが生

後 80 日ではもはや tolerant ではなかったと報告している。Dresser¹⁸⁾ は出生直後のマウスにウシ血清アルブミン分画 10mg を注射したところ、4 カ月後では tolerant, 6 カ月後では partial tolerant であったと述べている。ウシ血清アルブミン 100mg を出生直後にウサギに注射した Smith & Bridges¹⁹⁾ の実験では、生後 167 日では半数が tolerant であったが、生後 189 日ではすべて tolerant ではなかったという。

私達の実験では出生直後より連日 2 mg あて 21 日間 BBA をウサギに注射 (総量 42mg) することにより、生後 188 日に至るもなお明らかに BBA に対し tolerant であった。しかし新生児期に同様に処置されて BBA に tolerant となっているウサギも、HGG に対しては対照と同程度の抗体産生を示したことは tolerance の特異性を示すものであろう。

結 論

出生直後より BBA を連日 2 mg あて 21 回注射したウサギに成熟後 BBA および HGG を 1 週 1 回 40mg あて 3 回静注し、その抗体産生を沈降反応および補体結合反応によって観察し、次の結果を得た。

出生直後より 21 日間 BBA の注射を受け、生後 96, 175 あるいは 188 日のいずれかに、更に BBA の注射を受けたウサギではすべて抗 BBA 抗体の産生は認められなかった。しかし出生直後より BBA の注射を受け、成熟後 HGG の注射を受けたウサギでは新生児期無処置のウサギとほぼ同程度の抗 HGG 抗体の産生が認められた。

これらの成績から次のことが結論できよう。

- 1) BBA を 2 mg あて出生直後から毎日 21 日間ウサギに注射することにより BBA に対する acquired immunological tolerance が成り立つ。
- 2) この immunological tolerance は少なくとも生後 188 日まで持続する。
- 3) HGG に対する抗体産生は BBA の tolerance injection によって影響されない。

[本研究の遂行には文部省科学研究費の補助を受けた。]

文 献

- 1) Owen, R.D.: Science, 102, 400, 1945.
- 2) Dunsford, I., Bowley, C.C., Hutchison, A.M., Thompson, J. S., Sanger, R. and Race, R.R.: Brit. Med. J., 2, 81, 1953.
- 3) Stormont, C., Weir, W.C. and Lane, L.L.: Science, 188, 695, 1953.
- 4) Billingham, R. E., Brent, L. and Medawar, P.B.: Nature, 172, 603, 1953.
- 5) Hasek, M., Hraba, T. and Hort, J.: Nature, 183, 99, 1959.
- 6) Martinez, C., Smith, J.M., Shapiro, F. and Good, R.A.: Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 102, 415, 1959.
- 7) Guttman, R. and Aust, J.B.: Nature,

- 192, 564, 1961.
- 8) **Brooke, M.S. and Karnovsky, M.J.** : J. Immunol., 87, 205, 1961.
- 9) **Hanan, R. and Oyama, J.** : J. Immunol., 83, 49, 1954.
- 10) **Nossal, G.J.V.** : Nature, 180, 1428, 1957.
- 11) **Cinader, B. and Pearce, J.H.** : Brit. J. Exp. Path., 39, 8, 1958.
- 12) **Curtain, C.C.** : Brit. J. Exp. Path., 40, 255, 1959.
- 13) **Harber, L.C., Rosental, S.A. and Baer, R.L.** : J. Immunol., 88, 66, 1962.
- 14) **Burnet, F.M.** : Brit. Med. J., 5153, 645, 1959.
- 15) 緒方富雄 : 梅毒の新しい血清学的検査法, 南山堂, 1954.
- 16) **Levi, E., Schechtman, A.M., Sherins, R.S. and Tobias, S.** : Nature, 184, 563, 1959.
- 17) **Thorbeck, G. J., Siskind, G.W. and Goldberger, N.** : J. Immunol., 87, 147, 1961.
- 18) **Dresser, D.W.** : Immunol., 4, 13, 1961.
- 19) **Smith, R.T. and Bridges, R.A.** : J. Exp. Med., 108, 227, 1958.

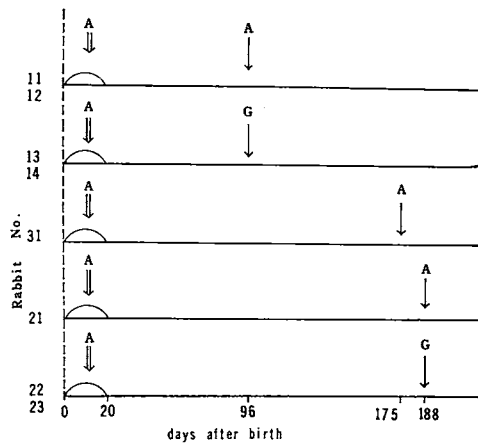


Fig. 1. The outline of the experiment

⇓ = neonatal injection, ↓ = challenge injection.

A : albumin from buffalo blood, G: human serum albumin.

Table 1. Antibody Production of Rabbits Treated Neonatally with BBA and Challenged Later with BBA and HGG (a)

Pretreatment		Challenge injection		Rabbit No.	Maximal antibody titer*			
Antigen	Duration	Antigen	Beginning on		Precipitation test		Complement fixation test	
					Antigen used in the test			
				BBA	HGG	BBA	HGG	
2 mg of BBA daily	21 days following birth	three weekly doses of 40 mg of BBA each	the 96th day after birth	11	—	—	—	—
				12	—	—	—	—
		three weekly doses of 40 mg of HGG each	the 96th day after birth	13	—	1 : 8	—	1 : 20
				14	—	1 : 4	—	1 : 20
none		three weekly doses of 40 mg of BBA each	about the 100th day after birth	1001	1 : 32	—	1 : 80	—
				1002	1 : 32	—	1 : 40	—
		three weekly doses of 40 mg of HGG each	about the 100th day after birth	1003	—	1 : 16	—	1 : 160
				1004	—	1 : 16	—	1 : 160

BBA : Albumin from buffalo blood, HGG: Human serum albumin.

* Antibody titer indicates the dilution of serum.

Table 2. Antibody Production of Rabbits Treated Neonatally with BBA and Challenged Later With BBA and HGG (b)

Pretreatment		Challenge injection		Rabbit No.	Maximal antibody titer*			
Antigen	Duration	Antigen	Beginning on		Precipitation test		Complement fixation test	
					Antigen used in the test			
				BBA	HGG	BBA	HGG	
2 mg of BBA daily	21 days following birth	three weekly doses of 40 mg of BBA each	the 96th day after birth	31	—	—	—	—
				21	—	—	—	—
		three weekly doses of 40 mg of HGG each	the 96th day after birth	22	—	1 : 64	—	1 : 40
				23	—	1 : 128	—	1 : 80
none		three weekly doses of 40 mg of BBA each	about the 100th day after birth	1005	1 : 8	—	1 : 20	—
				1006	1 : 4	—	1 : 20	—
		three weekly doses of 40 mg of HGG each	about the 100th day after birth	1007	—	1 : 128	—	1 : 80
				1008	—	1 : 64	—	1 : 80

BBA : Albumin from buffalo blood, HGG: Human serum albumin.

* Antibody titer indicates the dilution of serum.