

色素蛋白に対する生体の反応

第一編

コンゴロートを用いて作った色素蛋白
及び之を用いての血清学的研究

岡山大学医学部病理学教室 (指導: 妹尾左知丸教授)

専攻生 掃部俊造

(昭和32年3月5日受稿)

Landsteiner に始まる画期的なアゾ蛋白に関する仕事は、抗原の作用機転並に抗体産生の機構の究明に多大の貢献をなした。この仕事の重要性は、一定の化合物をチアゾ化して蛋白に結合させて、アゾ蛋白を作り、之を抗原として用いる場合生ずる抗体は、元の蛋白に無関係に結合蛋白に対して特異的な抗体を生ずるといふにある¹⁾²⁾。この事實は、抗体産生の化学的機構の解明に重要な役割を果し、Hapten として作用するために必要な化学的構造、Schlepper としての蛋白の性格等に関し、一段の進歩をとげさせた。一方、このような化学的抗原体反応の機構の究明と関連し、異種蛋白が生体に取り入れられた場合の生体の反応が、主として病理学者の手によつて進められた。

之等の中で、Sabin は、Heidelberger により合成された赤色の R-salt-azo-benzidine-azo-crystalline-egg albumin を使用して、顕微鏡下に之を追及し、網内系を中心とする貪喰細胞が之をとる事を明かにし、一方血清学的に抗体の産生を追及し、抗体産生場所は網内系の細胞であると主張した⁴⁾⁵⁾。蓋しこの実験は、単純蛋白を色素でラベルして組織学的観察を行つた最初の実験であり、戦後塚田⁶⁾⁷⁾も同様の着色蛋白を合成して之を追試し確証した。その後、Kruse, McMaster⁸⁾⁹⁾が、Evans blue 着色蛋白を用いて同様の実験を行い、略々同様の結論に達している。之等一連の実験は、生体内に入つた異種蛋白の

行動をとらえ、抗体産生細胞に一つの目標を与えた点で一つの段階を画したものと見えよう。この様な状態でアゾ蛋白に対し、特殊の抗体が産生されるのであり、ここに生起せられる化学反応は、分子の直接的接触作用によつて起る筈であるから、抗体の産生を之等の色素蛋白を貪喰する細胞に帰する事は、理論的に妥当である。然し、之等のアゾ蛋白が、生体内で未変性の血清蛋白と全く同様な状態で行動するかどうかに就いては大きな疑問が残されている。事実之等合成色素蛋白は、塚田が Heidelberger の方法に従つて作つたものを病理学会に於て提示したのを見ると、非常に水に溶け難いものであり⁶⁾⁷⁾、Sabin は抗体価を高めるために更に之を Alum-precipitate として使用している⁴⁾、このようなものは凡そ正常の血清蛋白とは縁遠いものであり、少くとも之を以つて直ちに親水性異種蛋白に対する生体反応を論ずるわけには行かない。一方又、Kruse⁸⁾等の用いた蛋白も一部変性蛋白を含んでおり、溶解性の蛋白であるといつても、之が正常の蛋白に比し著しく寒天中の diffusion rate の落ちる事は分子が相当大きくなつてゐる事を意味している。従つてその生体内分布は、Sabin のものに比して溶解性は高いといつても、之をそのまま未変性血清蛋白と同様に取扱うわけには行かないかも知れない。

私は、コンゴロート(以下KRと略記する)を用いて、比較的親水性の着色蛋白を得る事

が出来たので、之を用いて抗体産生細胞の追及を行い、又、抗体を含む細胞が抗原にあつてどのような態度を示すか、又、可溶性着色蛋白と不溶性の同種蛋白が、どのように違つた行動をするかという点について追及した。

即ち著者は、色素で蛋白をラベルして、蛋白が生体内に非経口的に取入れられた場合に、どのような経過を辿るか、又組織内での抗原抗体反応を直接観察する事が可能か否かを知るために、顕微鏡下で認め得る程度の色を持つ着色蛋白を合成する目的で、種々の色素を用いて着色蛋白の成製を試み、KRを用いて略々目的を達する事が出来た。本編に於ては、その製法並に抗体産生能に就いての実験を報告する。

実 験 方 法

A) 着色蛋白の成製法

1) KR 家兔血清色素蛋白 (以下 DPK と略記する) KR 0.1 g に、濃塩酸 0.16 cc (比重1.18) と少量の水を加え乳鉢で充分磨砕する。之を 2~5°C に冷却し、強く攪拌し乍ら NaNO₂ の 0.14 g の冷飽和液を極めて少量宛徐々に滴下し、更に15分間上記の温度に保ち乍ら充分攪拌する。之に予め 0~1°C に冷却した家兔血清 6 cc を攪拌しつつ徐々に加える。全部加え終つた後攪拌を続けつつ温度を極めて徐々に室温に迄上昇させる。之に純アルコールを加えて遠沈し、上清をすて、数回エタノールで洗滌後減圧乾燥する。ここに疎水性の着色蛋白を得る。

2) KR 牛血清蛋白

a) DPO No. 1

KR 50 mg に牛血清 100 cc を反応させたもの。KR 50 mg と牛血清 100 cc を用いて、家兔血清蛋白を用いて行つたと全く同様の操作によつて、着色蛋白溶液を作り (使用塩酸量 0.08 cc, NaNO₂ 0.07 g), アルコールを加える事なく、2~5°C に保ちつつ半透膜にて透析し、塩類を除去し、最後に外液

を生理的食塩水にかえ、更に1昼夜低温に放置後遠沈 (15,000回10分) して、不溶性の部分を除き、上澄を直ちに凍結乾燥する。ここに暗赤色親水性の色素蛋白の粉末を得る。

b) DPO No. 2

KR 100 mg に対して牛血清 100 cc を反応させたもので、使用せる濃塩酸量は 0.16 cc, NaNO₂ は 150 mg である。

c) DPO No. 3

KR 500 mg に対して牛血清 100 cc を反応させたもの。使用濃塩酸量は 0.8 cc, NaNO₂ は 700mg.

d) DPO No. 4

KR 1,500 mg に対して牛血清 100 cc を反応させたもの。使用濃塩酸量は 1.6 cc, NaNO₂ は 1,050 mg.

B) 動物：成熟家兔 (平均体重 2 kg) 及び海猿 (平均体重 350 g) を使用した。

C) 感作方法：家兔に DPK 及び DPK No. 1~No. 4 に至る各種の着色蛋白の 5% 食塩水溶液 4.0 cc を毎日 5 回注射し、最後の注射後 22 日目に沈降反応を行つた。

D) 沈降反応術式：抗血清を倍数稀釈して、抗原との重層によつて沈降価を検査した。

E) 組織検査法：組織をフォルマリン固定切片としてヘマトキシリン単染色により観察する (エオチンは痕跡的にも処理液中に入つてはならない)。

実 験 結 果

1) 色素蛋白の性状：上記の諸方法によつて作つた色素蛋白の性状に就いては、第1の DPK は親水性著しく弱く変性蛋白の性格を有している。第2の DPO No. 1 は親水性であり、色素は各種の蛋白沈澱剤で蛋白と共に沈澱し、コンゴローートと異り塩酸によつて青変せず、濾紙泳動によつて色素は蛋白と共に移動する事が証明された。No. 2, No. 3 も略々同様の性格を示したが、着色度は著しく、色素の量が多くなると分子量が大となるためか親水性が色素量の上昇につれて幾分減弱する様である。

2) DPK による抗体産生試験：10匹の家兎を用いて之等に夫々 4.0 cc 宛毎日皮下に5回注射し、最後の注射から22日目に抗体の産生度を検した。即ち重積法により、着色蛋白の水溶液を倍数稀釈した抗血清に重積して沈降反応を調べた結果は、表1の上段に示

した如く著明な抗体の産生を証明し得なかつた。

3) DPO No. 1~No. 4 に対して同様の実験を行つた。この場合 DPK の場合と異り、何れも著明な抗体の産生を見た。その成績は第1表に示す如くである。即ち、DPO

第1表 抗 DP 血清に対する DP 並に牛血清に依る沈降価

抗 体	抗 原	沈 降 価									
		2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	2 ¹⁰
DPK に対する	DPK	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DPO NO. 1 に対する	DPO NO. 4 正常牛血清	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
DPO NO. 2 に対する	DPO NO. 4 正常牛血清	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
DPO NO. 3 に対する	DPO NO. 4 正常牛血清	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
DPO NO. 4 に対する	DPO NO. 4 正常牛血清	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
		+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

No. 4 及び牛血清を用いて沈降反応を観察した結果によれば、No. 1 の注射を行つた家兎よりの血清は着色蛋白に対しては殆んど反応を示さず、牛血清に対する抗体が多量に生じている事が分つた。No. 2 を注射したものでは、着色蛋白に対してある程度の抗体を生じたが、それよりも牛血清に対する抗体の産生の方が強い事が明らかになされた。No. 3 による抗体は、着色蛋白にも牛血清にも略々同様の強さの親和性を有する事を示し、No. 4 によつて産生された抗体は、着色蛋白に対しては強いが、牛血清に対しては弱いものであつた。

4) 感作方法の相違による被感作状態の差異：5% DPO液 (No. 1~No. 4) を用いて各蛋白による感作試験を行つた。12匹の兎を各3匹宛4群に分ち、1つの群に属するものには同一の色素蛋白を注射した。各群共注射は3匹の中1匹は皮下に、1匹は腹腔内に、又他の1匹は静脈内に行つた。蛋白は夫々4cc宛を毎日5日間注射し、最後の注射から

22日目にその血清を分離して沈降反応を観察した。その結果では、之等の着色蛋白は何れもよく家兎に対して抗体を産生させ得る能力を充分にもつており而も皮下及び腹腔内注射は著明な抗体価の産生を起させうる事を示した。今之等の兎に就いて、3種の異つた感作法による抗体産生状態に就いて No. 3 について行つた実験結果を示せば、表2の様である。即ち、皮下及び腹腔内から感作したものは何れもよく抗体を産生し、2⁶⁻⁷ 稀釈迄陽性を示したが、静脈から感作したものは著しく抗体産生能低く、陽性率は略々 2³ 程度に止つた。即ち、腹腔及び皮下からの感作は著しく強く抗体を産生するが、静脈からの感作は抗体産生能が低い。

5) ショック症状惹起試験：海狸7匹を用いて、之等を DPO No. 3 の5%溶液の0.1 cc で1回皮下感作し、3週間後同抗原1cc を用いて、腹腔内に効果注射を行つた所、全ての動物に著明なショック症状が現われ、注射後5分より身震いを始め、瞳孔散大、

第2表 DPO No. 3の各種變作法による沈降価

注射方法	沈 降 価									
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	210
皮 下	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
腹 腔	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
靜 脈	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

排尿, 排便, 呼吸困難等を起し, 腹を床につけて手足を伸ばし, 危篤状態を呈し, 体重の200~250 gの2匹は死亡したが, 体重350~500 gの他の5匹は死に至らずに恢復した.

6) 組織学的検査成績: 注射された着色蛋白は, その色によつて組織細胞内にその存在を認め得る. 家兎着色血清は非常に濃く, 組織球を含む大貪喰球内に摂取せられているのが認められる. DPO No. 1, 2, 3及び4に於ては, No. 1はその色がうすく幾分不鮮明に現われる. No. 2は可成りよく細胞内に認められる. No. 3, No. 4は非常に確然と組織球内でその存在を知り得る.

上記の3つの異つた方法によつて着色蛋白を導入された組織に於ては, 皮下に注射したものでは, 局所の皮下組織の組織球, 単球等に多量の蛋白が摂取せられており, 又局所の淋巴腺の洞内皮の細胞及び洞内の大貪細胞中に可成り明瞭に認められた. 然しその他の全臓器には全く着色蛋白は分布していない事が証明された. 次に腹腔内に注入したものに於ては, 大網の大貪細胞内に極めて多量の着色蛋白が証明された. 之等は主として, 乳斑, 細血管等を中心にして集团的に認められた. 肝では, ごく僅かに網内系の細胞内に入っているものが認められたが, その他の細胞及び組織臓器には全く着色蛋白は認められなかつた. 次に静脈内に注射したものでは, 肝, 脾の網内系の細胞内に色素蛋白が認められたが, その他の臓器には殆んど認められなかつた. 肝, 脾内のものも, 皮下に注射された局所の細胞又は, 腹腔に注射された場合の大網の細胞に比すれば, 極めてその量は少い様である.

考 按

着色蛋白の抗原性については, DPKで

は, 沈降反応の結果その抗原性は弱い事が明らかになつた. その原因は不明であるが, 主として結合色素の量が少いために蛋白に全く異つた性格を与え得なかつたという様な事にある様に思われる¹⁰⁾¹¹⁾. 牛血清蛋白では, 蛋白に対する色素の量が増加するに従つて, 牛血清と異つた抗原性を得る様な結果が得られた. 即ち, No. 1, 2に対しては着色蛋白に対するよりも牛血清に対する抗体の方が多く產生され, No. 3に対する血清抗体は, DPO No. 3並に牛血清に対して略々同程度の沈降価を示し, No. 4では牛血清に対する抗体価が着色蛋白に対するそれよりも減じている. 牛, 馬, 家兎及び人間等の血清を, アゾ色素と結合させて, Landsteiner¹²⁾が行つたアゾ蛋白の実験は, 同種血清を用いて作つたアゾ蛋白に対して強い抗体の產生が認められているが, アゾ色素の量は, 私の用いたより遙かに多量である. 恐らく, 蛋白に対する色素の量を増加すれば牛血清に対する抗体を全く作らず, 着色蛋白に特有な抗体を產生させる様な着色蛋白が作られるものと考えられるが, 蛋白の親水性が著しく減弱するため, 私の目的と反するので, この先の追及は行わなかつた.

Sabin⁴⁾⁵⁾は, Heidelbergerの作つたR-salt-azo-benzidine-azo-crystalline-egg albuminのCollodion-particles及びAlum-precipitateの2種を使用して実験を行つているが, 該色素蛋白に対して著明な抗体の產生を証明し, 且つ皮下, 腹腔, 静脈からの3つの方法での感作成績も観察しており, 皮下感作が最も強く抗体を產生し, 腹腔感作之につき, 静脈内の感作が最も弱いといつている.

私の用いた色素蛋白に於ても, やはり略々

同様な結果が得られたが、皮下感作と腹腔感作の間には殆んど差異を認めず、何れも同程度に静脈感作の場合に比して著明に強い抗体産生を示した。

組織学的所見は蛋白が大喰細胞に摂取せられる事を証明し、而も皮下、腹腔内注射のものが、静脈内に注射したものよりも遙かに多量に摂取せられている点から見て、抗体の産生度は、蛋白が大喰細胞に摂取される程度の差によつて決定される事が想像される。Pauling¹²⁾、島内¹⁰⁾等のいう様に、抗体は抗原との接触に於て起る蛋白合成の結果産生されるものであれば、この場合の抗体産生細胞は明かに網内系、大単核球、その他の大喰細胞に由来するものと考えねばならない。組織内には少量のプラズマ細胞が認められたが、之等は何れも色素蛋白を摂取してはいなかつた。

なお、Sabin⁴⁾は、彼女の“Dye protein”を使用して抗体産生を追及中、抗体の産生される時期に一致して、大喰細胞の細胞質に Shedding off なる現象を認め、同細胞の細胞質の崩壊産物が抗体となるであろうと考えているが、抗原を摂取する能力のある細胞に抗体の産生を帰する点に於て理論的な考察と考えられる。この様な Shedding off の現象は著者も感作動物に抗原を移入した場合に認める事が出来た。之に就ては第三編に詳しく述べる筈である。

又、Kruse⁹⁾及び McMaster⁹⁾は廿日鼠を、Echt Säure-Blau 着色蛋白を用いてその抗原性を観察しているが、彼等の最初の報告で、彼等は色素のみ注射する場合は全く速かに排泄せられて、細胞内に殆んど顆粒状には認められなかつたが、蛋白(牛グロブリン)に結合させると、各種臓器の喰細胞内に滴状の顆粒

状に認められるといつている。この関係は、私のコンゴロート着色蛋白の場合も全く同様であつた。なお、彼等の着色蛋白の摂取される細胞も又、私のものと略々同様であつた。之等に就ては第二編に詳しく述べる。

なおこの着色蛋白によつて感作された海狼が、その効果注射によつてショック症状を惹起する事も又、McMaster 等の着色蛋白に於ける観察と同様である。

結 論

1) コンゴロートと牛血清を用いて、種々の色素量を以て着色蛋白を作つた。之等は、各種の蛋白沈澱剤により蛋白と色素とは共に沈澱し、濾紙泳動法により色素は血清蛋白と共に動く事が証明された。又蛋白量に対して色素量の少い時は、着色蛋白に対するよりも牛血清に対する抗体を多量に産生し、色素の量が多くなる場合は、着色蛋白に対する抗体を強く産生し、牛血清に対する抗体の産生は低下した。

2) 感作方法の相違は抗体産生に大きく影響し、皮下、腹腔内感作は抗体の産生強く、静脈内感作では弱い。又、皮下感作の場合、注射した色素蛋白は主として局所及び所属の淋巴腺の大喰細胞中に多量に認められ、腹腔内では、大網の大喰細胞に多量に認められ、又静脈内注射の場合には肝、脾、その他の網内系細胞内に多量に認められた。

3) 感作された海狼は、効果注射によつて、著しいショック症状を起す事が証明せられた。

4) 之等の結果から、このアゾ蛋白を注射した場合、抗体は主として網内系を含む大喰細胞に於て作られるであろう事を示唆した。

この研究は、文部省の科学研究費によるものであり、ここに謝意を表す。

参 考 文 献

- 1) Landsteiner, K. u. Lampl, H.: Über die Antigeneigenschaften von Azoprotein. Zeit. Imm. Forsch. 26, 293, 1916.
- 2) Landsteiner, K.: The specificity of serolo-

gical reactions. Harvard Univ. Press, Cambridge, 1947.

- 3) Kendall, F. E. Check, M. and Soo Hoo. C. M.: Quantitative studies on the precipitin

- reaction. Antibody production in rabbits injected with an azo-protein by Michael Heidelberger. *J. Exp. Med.* **58**, 137, 1933.
- 4) Sabin, F. R. Cellular reaction to a dye-protein with a concept of the mechanism of antibody formation. *J. Exp. Med.* **70**, 67, 1939.
- 5) Sabin, F. R.: Dye protein and antibody formation. *J. Exp. Med.* **70**, 67, 1937.
- 6) 塚田英之: アゾ蛋白による免疫化学の組織学的解析, 日本病理学会誌, **40**, 274, 1951.
- 7) 塚田英之: アゾ蛋白及びチアミン系チアゾ色素による免疫の組織化学的解析, 日本病理学会誌, **39**, 110, 1950.
- 8) Kruse, H. and McMaster, P. D.: The distribution and storage of blue antigenic azo-protein in the tissue of mice. *J. Exp. Med.* **89**, 583, 1949.
- 9) McMaster, P. D. and Kruse, H.: The persistence in mice of certain foreign proteins and azoprotein tracer antigens. *J. Exp. Med.* **94**, 323, 1951.
- 10) 島内武彦: 抗体の分子構造, 科学, **18**, 11, 1948.
- 11) 江上不二夫, 八木康夫: 免疫化学, 河出書房, 東京, 1949.
- 12) Pauling, L.: A theory of the structure and process of formation of antibodies. *J. Am. Chem. Soc.* **62**, 2643, 1940.

Biological Reaction to a Dye Protein

I Congo red-azo-serum protein and its serological specificities

By

Shunzo KAMON

Department of Pathology Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. S. Seno)

The hydrophilic dye-proteins have been prepared combining oxen serum protein with Congo red (CR) in varied proportion. DPO No. 1 (50 mg. of CR per 100 cc. of serum), 2 (100 mg. per 100 cc), 3 (500 mg per 100 cc), 4 (1500 mg. per 100 cc). The binding between protein and dye molecules proved to be fairly strong by the test using several protein-precipitating agents and electrochromatograph.

1) The paraenteral introduction of these dye-proteins proved to produce two sorts of antibodies, the antibodies to the normal serum protein and to the dye-protein. The antibody to the normal serum decreased as the quantity of dye bound to antigen increased, showing the increased production of the antibody specific to the dye-protein.

2) Antibody formation varied according to the varied route of the introduction of antigen. Subcutaneous and intraperitoneal injection resulted in the higher antigen production comparing to the intravenous injection. The dye-protein introduced were mainly found in the macrophages.

3) The sensitized animals showed a severe shock symptoms by the reinjection of antigen.

From the results mentioned above it has been suggested that the responsibility for the antibody formation to the dye-protein will be attributed to the macrophages, in which cytoplasm the injected antigen is found in a mass.