

Azo 蛋白質の血清学的研究

第 1 編

Evans Blue-azo-蛋白質 (EB-azo-蛋白質) の抗原性
血中濃度及び尿中排泄量について

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 大田原一祥教授)

助手 齒 朶 尾 正 幸

〔昭和 34 年 6 月 15 日受稿〕

目 次

第 1 章 緒 言

第 2 章 実験材料並びに実験方法

第 1 節 実験材料

- 第 1 項 EB-azo-人血清アルブミンの精製
- 第 2 項 抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清の作成
- 第 3 項 EB-azo-卵白アルブミンの精製
- 第 4 項 抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清の作成
- 第 5 項 EB-azo-人血清の精製並びに抗 EB-azo-人血清家兎血清の作成
- 第 6 項 実験動物

第 2 節 実験方法

- 第 1 項 沈降反応
- 第 2 項 濾紙電気泳動法
- 第 3 項 寒天重層法

第 4 項 抗原の血中及び尿中濃度測定法

第 5 項 検量線の作製法

第 3 章 実験結果

第 1 節 EB-azo-蛋白質の抗原性

- 第 1 項 寒天中に於ける拡散度
- 第 2 項 沈降反応
- 第 3 項 濾紙電気泳動法による観察
- 第 4 項 寒天重層法による観察

第 2 節 EB-azo-蛋白質の血中濃度及び尿中排泄

第 3 節 各種注射法による血中濃度

第 4 章 総括並びに考按

第 5 章 結 論

文 献

欧文抄録

第 1 章 緒 言

芳香属アミノ誘導体をジアゾ化し蛋白質に結合させて得られるものを一般に Azo 蛋白質と呼んでいる。Azo 蛋白質に関する研究は古く Landsteiner¹⁾²⁾³⁾ によつて始められ、抗体の特異性、化学構造上の関係並びに抗原抗体反応の作用機序に関して多大の貢献をなした。即ち Landsteiner は馬血清に種々のジアゾ化合物を結合させて調製した Azo 蛋白質で免疫した場合に出来る抗体は之と縁の遠い異種蛋白質と結合させて作った Azo 蛋白質抗原とも反応するという事実を述べた。この場合この反応の特異性を決定づける因子は蛋白質ではなくて、之に配結させるジアゾ化合物であることを示し、この因子を反応決定群と呼んでいる。その後 Heiderberger 等⁴⁾ は

Azo 蛋白質を用いて沈降反応に関する定量的研究を行い沈降反応によつて生ずる沈降物の組成の分析を可能ならしめた。又 Pauling⁵⁾⁶⁾⁷⁾ は抗原抗体反応の作用機序を説明するに当つて格子説をとえ、Azo 蛋白質を用いて研究し、抗体の反応群は抗原の決定群を丁度うまく包むような空間構造を示しており、両者の相補的の空間配置が反応の特異性を現わすものと説明している。

以上の如き in vitro の研究と平行して Azo 蛋白質を生体に投与した場合の生体の反応並びに抗原分布状態についての研究が主として病理学者の手によつて行われた。即ち Sabin⁸⁾⁹⁾ は R-salt-azo-benzidine-azo-結晶卵白アルブミンを使用し、又 Kruse, Mc Master¹⁰⁾¹¹⁾ は EB-azo-蛋白質を用いて之を生体に投与した場合の生体反応並びに抗原の分布状態を

顕微鏡下に追求している。彼等は投与された Azo 蛋白質は主として網内系細胞に摂取されるので抗体産生は網内系組織で行われるであろうと推定しているがその血中に於ける態度及び代謝についてはふれていない。抗体生成は抗原の存在なくしては行われぬ筈であり、注射抗原の生体内代謝を追求することはそれ自身有意義であるばかりでなく抗体生成の問題と関連して重要な意義を持つている。抗原の血中代謝については Haurowitz¹²⁾ 等が赤色系の Ato-xyl-azo 蛋白を用いて行つており最近では I¹³¹ 異種蛋白を利用して Dixon¹³⁾¹⁴⁾ 等、I¹³¹ 異種及び同種蛋白を用いて緒方、望月¹⁵⁾ 等、により実験されている。又井上¹⁶⁾ は酵母菌多糖類を使用して抗原の血中代謝につき研究している。

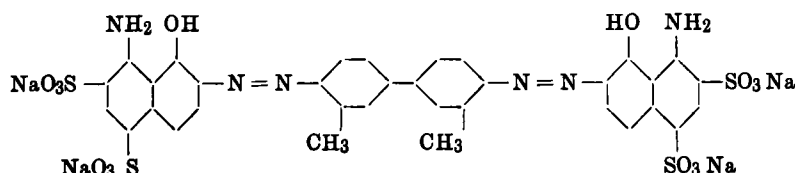
Azo 蛋白質による抗原の代謝を研究するに当つて青色色素と蛋白質とを結合させた Azo 蛋白質を用いることは赤色系の色素でラベルした Azo 蛋白質よりも生体内での判別が遙かに容易であり、同時に抗原抗体反応により抗原の血中濃度を測定し得る利点がある。その意味で著者は青色色素 Evans blue T-1824 をジアゾ化して人血清アルブミン及び卵白アルブミンと結合させて作った EB-azo-人血清アルブミン及び EB-azo-卵白アルブミンを用いてその抗原性並びに血中代謝について研究し、2, 3 の知見を得たのでここに報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験材料

第1項 EB-azo-人血清アルブミンの精製

EB は緑色光沢を放つ青色結晶性色素で水、アルコール、酸、アルカリに容易に溶解し、次に示す化学構造式を有する¹⁷⁾¹⁸⁾。



EB 1 ミリモル (960 mg) を蒸留水 30.0cc に溶解し、之に 1 N HCl 6.0 cc を加える。この混合液を 10°C に保ち乍ら 10% NaNO₂ 5.0 cc を加えてよく攪拌しジアゾ化して 10°C のまま 30 分間保存する。一方 3% 人血清アルブミン 100 cc に 1 N NaHCO₃ を加えて pH を 8 に調整する。次に両液を混合し 10°C にて 24 時間保存する。この粗 EB-azo-人血清

アルブミンに純アルコールを加えてアルコールの濃度が 80% になる様にした後 3000 回転/分にて 5 分間遠心沈澱を行うと人血清アルブミンと結合した色素は沈澱物となつて残り、結合しない色素は上清に留まる。次に沈澱物に 80% アルコールを加えてよく攪拌し再び遠心沈澱する。この操作を 3 回繰返した後沈澱物を蒸留水に溶かしてセロファン膜に入れ流水中にて 24 時間透析し塩類を除去した後に氷室中に保存する。

第2項 抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清の作成

第1表 抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清

抗原稀釈	千	2.5千	5千	1万	2.5万	5万	10万	2.5万
血清番号 No. 1	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
" No. 2	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-

EB-azo-人血清アルブミンに等量の生理的食塩水を加えたものを 2~5 cc 宛漸次増量しつつ成熟家兎の耳静脈に徐々に注射する。3 日間隔で 10 数回注射を繰返し、最後の注射日より 5 日後試験採血を行い、所期の力価を示せば更に 2 日後無菌的に採血を行つて血清を分離し、1:10,000 の割合に Merzonin を加えて氷室に保存する。本編に於て実験に使用した。抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清の抗原価 (Uhlenhuth 価) は第 1 表に示す如くである。

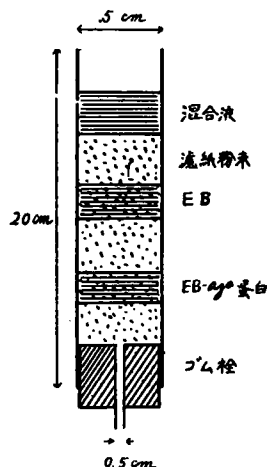
第3項 EB-azo-卵白アルブミンの精製

人血清アルブミンの場合と同様の方法を用いて EB 960mg をジアゾ化して 3% 卵白アルブミン 100 cc と結合させる。EB-azo-卵白アルブミンの精製には濾紙粉末を使用した。即ち第 1 図に示す如きガラス円筒に東洋濾紙製濾紙粉末を 15 cm の高さまで

入れて上方から適度に圧縮した後、12% 硫酸ソーダを流し込み濾紙粉末に透過せしめる。次に上部に粗 EB-azo-卵白アルブミンを注入し更に硫酸ソーダを追加すると、沈降速度の差により

上下に 2 個の青色輪を生ずる。上部の青色輪は蛋白と結合しなかつた色素であり、下部の青色輪は蛋白と結合した部分である。下部の青色輪が最下端に達した時にゴム栓をはずし、EB-azo-卵白アルブミンの部分を試験管に移し蒸留水にて溶解せしめた後遠心沈澱して濾紙を取り除き最後にセロファン膜に入れて流水中にて 24 時間透析する。

第 1 図



第 4 項 抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清の作成

抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清と同様にして抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清を調製した。

第 5 項 EB-azo-人血清の精製並びに抗 EB-azo-人血清家兎血清の作成

人血清 60 cc に蒸留水を加えて 100 cc とし、人血清アルブミンの場合と同じ方法にて EB と結合精製し、抗血清の調製も之に準じて行つた。

第 6 項 実験動物

実験動物としては体重 2,000~3,000 g の強健なる成熟家兎を使用した。

第 2 節 実験方法

第 1 項 沈降反応

緒方氏抗原抗体稀釈沈降反応法¹⁹⁾を用いた。即ち免疫血清を 1%アラビヤゴム食塩水溶液にて遞減的に稀釈し、その少量宛を沈降反應用小試験管に数列に分つて入れ、各列毎に濃度を異にした抗原を重層せしめた。この場合最高稀釈抗体と反応し得る至適抗原濃度を結合帯と称し、結合帯に於ける免疫血清の陽性最高稀釈度を抗体価とする。尚成績の判定は抗原重層後 15 分以内に白輪を生じたものを $\equiv$, 30 分以内に $\equiv$, 1 時間以内に $\equiv$, 2 時間以内に $+$ とした。

第 2 項 濾紙電気泳動法

小林式濾紙電気泳動装置²⁰⁾²¹⁾を使用した。東洋濾紙 No. 51 にて pH 8.5, イオン強度 0.045 のペロナールソーダ、酢酸ソーダ、酢酸各緩衝液を使用し、0.3mA/cm の電流で泳動を行つた。

第 3 項 寒天重層法

Qudin²²⁾²³⁾ 並びに進藤²⁴⁾ の方法に準じて行つた。

即ち 0.6% 寒天溶液を 45°C に温め、之に等量の抗 EB-azo-人血清家兎血清を混合する。次によく洗つて乾熱滅菌した直径 3.0 mm 長さ 7.0 cm の 2 本の小試験管の底部に 5.0 cm の高さにこの混合液を入れ冷蔵庫中にて凝固させる。次に之を室温に保ちながら 1.5 cm の高さまで各々に抗原を重層すると、その境界面から抗原が下方に滲透して寒天層中に白色の沈降帯を生ずる。

第 4 項 抗原の血中及び尿中濃度測定法

抗原の血中及び尿中濃度の測定は EB の比色定量法並びに Uhlenhuth 法によつた。即ち被検血液から分離した血清及び被検尿中の EB 量を Beckmann 型分光光度計にて比色定量し、又一方被検血清及び尿を抗原として前述の抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清に重層して抗原価を測定し、抗原の反応し得る最高稀釈濃度により EB-azo-人血清アルブミンの量を求めた。

第 5 項 検量線の作製法

EB を家兎血清及び尿にて稀釈し夫々の溶液 1 cc 中の EB 含有量が 0, 2.5 γ , 5.0 γ , 7.5 γ , 10.0 γ になるよう調整液を作り、夫々の吸光度を Beckmann 型分光光度計で測定し、0~10.0 γ の検量線を作製した。本法では EB 0~10.0 γ の範囲は Lambert-Beer の法則に従つた。

第 3 章 実験結果

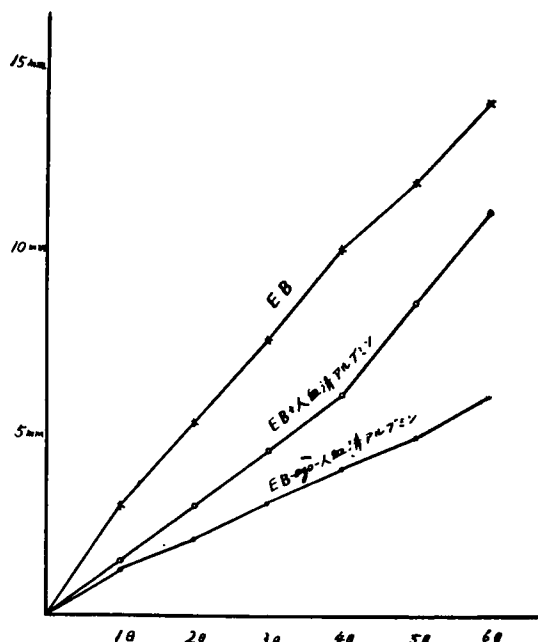
第 1 節 EB-azo-蛋白質の抗原性

第 1 項 寒天中に於ける拡散度

直径 3 mm, 長さ 8 cm の 3 本の小試験管に 1% 寒天を底部より 6 cm の高さまで入れ、寒天の凝固するのを待つて夫々の試験管に 1 cm の高さだけ EB と EB-azo-人血清アルブミン及び EB, 人血清アルブミン混合液を入れ、それ等の寒天中に於ける拡散度を測定した。

結果は第 2 図に示す如くであつた。即ち 24 時間後までは EB-azo-人血清アルブミンと EB+人血清アルブミンとは略々同速度で拡散するに比し EB は之等の約 2 倍の 3.0 mm 拡散した。以後 4 日迄は 3 者とも時間に比例して直線状を示すが、時間の経過と共に EB, 人血清アルブミン混合液は漸次 EB に接近し、6 日後にて EB 14.0 mm, EB, 人血清アルブミン混合液 11.0 mm, EB-azo-人血清アルブミン 6.0 mm を示した。以上の結果は Kruse¹⁰⁾ 等の卵

第2図 寒天層中に於ける EB, EB-azo-蛋白及び EB-人血清アルブミン混合液の拡散度,



白アルブミンを用いて行つた実験結果とはほぼ一致し、純粋に精製された EB-azo-人血清アルブミンは EB 及び EB と人血清アルブミンの混合液に較べ異つた拡散度を示すものである。

第2項 沈降反応

EB-azo-卵白アルブミンで免疫して作つた抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清に EB-azo-卵白アルブミンを抗原とした場合と同抗血清に卵白アルブミンを抗原として加えた交叉反応とを比較した。

第2表 抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清と EB-azo-卵白アルブミンとの沈降反応

抗体希釈 (抗 EB-azo-egg-alb)	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
抗原希釈 (EB-azo-egg-albumin)						
1:10	+++	+	-	-	-	-
1:20	+++	++	-	-	-	-
1:40	+++	++	+	-	-	-
1:80	+++	++	++	-	-	-
1:160	+++	+++	++	+	-	-
1:320	+++	+++	++	+	-	-
1:640	+++	+++	++	++	-	-
1:1280	+++	+++	++	++	+	-
1:2560	+++	++	++	+	-	-
1:5120	++	+	-	-	-	-
1:10240	+	-	-	-	-	-

第3表 抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清と 卵白アルブミンとの沈降反応

抗体希釈 (抗 EB-azo-egg-alb)	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
抗原希釈 (egg-albumin)						
1:10	+++	++	++	-	-	-
1:20	+++	+++	++	+	-	-
1:40	+++	+++	++	++	-	-
1:80	+++	+++	++	++	-	-
1:160	+++	+++	++	++	+	-
1:320	+++	++	++	+	-	-
1:640	++	++	+	-	-	-
1:1280	++	+	-	-	-	-
1:2560	++	-	-	-	-	-
1:5120	+	-	-	-	-	-
1:10240	-	-	-	-	-	-

結果は第2及び第3表に示す如く抗体価は共に 1:160を示し同じであつたが、結合帯に可成りの相異が見られた。即ち抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清と EB-azo-卵白アルブミンの同質反応に於ては結合帯が 1:1,280 であるに比して抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清と卵白アルブミンの交叉反応に於ては結合帯は 1:160 を示し、前反応に較べ結合帯が低希釈度の方に移動している事実が認められた。

次に同様にして EB-azo-人血清アルブミンと抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清の同質反応並びに人血清アルブミンと抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清の交叉反応につき比較した。

結果は第4及び第5表に示す如く結合帯の低希釈度への移動は軽度であつた。即ち抗体価は共に 1:

第4表 抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清と EB-azo-人血清アルブミンとの沈降反応

抗体希釈 (抗 EB-azo-人血清alb)	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
抗原希釈 (EB-azo-人血清albumin)						
1:10	+++	+	-	-	-	-
1:20	+++	++	+	-	-	-
1:40	+++	++	++	-	-	-
1:80	+++	+++	++	+	-	-
1:160	+++	+++	++	+	-	-
1:320	+++	+++	++	++	+	-
1:640	+++	+++	++	++	++	-
1:1280	+++	++	++	+	+	-
1:2560	++	++	+	-	-	-
1:5120	++	+	-	-	-	-
1:10240	+	-	-	-	-	-

第5表 抗EB-azo-人血清アルブミン家兎血清
と人血清アルブミンとの沈降反応

抗体稀釈 (抗EB-azo-人血清alb)		1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320
抗原 濃度 (人血清alb)	1:10	+++	++	—	—	—	—
	1:20	+++	+++	++	—	—	—
	1:40	+++	+++	++	—	—	—
	1:80	+++	+++	++	+	—	—
	1:160	+++	+++	++	++	+	—
	1:320	+++	+++	++	++	++	—
	1:640	+++	++	++	+	+	—
	1:1280	++	++	+	—	—	—
	1:2560	+	+	—	—	—	—
	1:5120	—	—	—	—	—	—
	1:10240	—	—	—	—	—	—

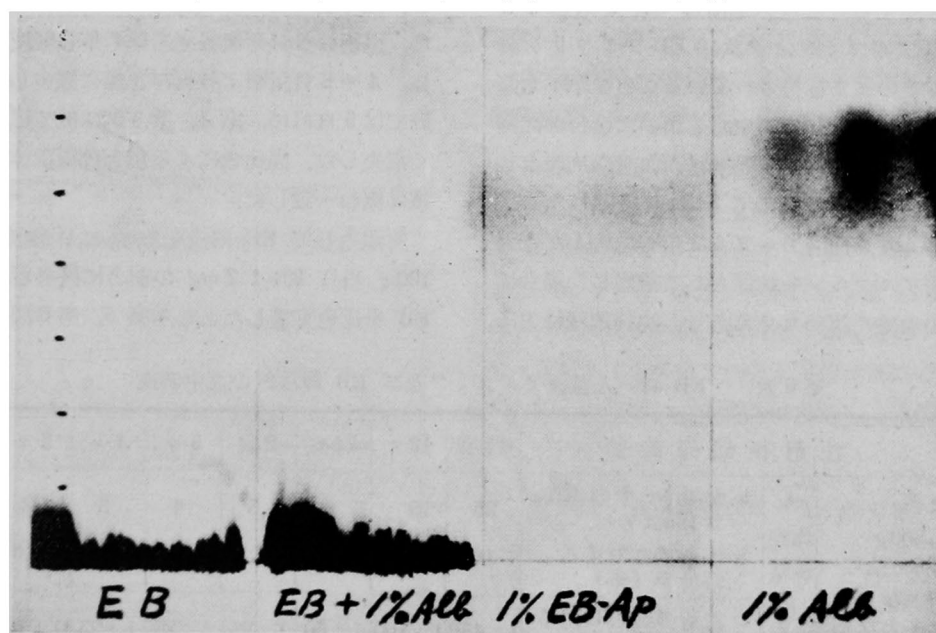
160であつたが結合帯はEB-azo-人血清アルブミンと抗EB-azo-人血清アルブミン家兎血清との同質反応が1:640であるに比し、人血清アルブミンと抗EB-azo-人血清アルブミン家兎血清との交叉反応に於ては1:320を示した。

尚抗EB-azo-人血清アルブミン家兎血清とEB-azo-卵白アルブミン、及び抗EB-azo-卵白アルブミン家兎血清とEB-azo-人血清アルブミンとの間に於ける真の交叉反応は何れも認められなかつた。

第3項 濾紙電気泳動法による観察

蛋白含有量1%のEB-azo-人血清アルブミン及び之と同濃度のEB溶液、EB溶液と1%人血清アルブミンの混合液、並びに1%人血清アルブミンの四液を濾紙電気泳動法により泳動し次の結果を得た。

第3度 濾紙電気泳動法による観察



第3図に示す如く泳動開始4時間後EBは原点に留つて移動せず、EBと1%人血清アルブミンの混合液は原点より約1.0cmだけ移動し、EB-azo-人血清アルブミンは5.0cm、1%人血清アルブミンは最も早く6.0cm移動した。尚EBと人血清アルブミンの混合液では原点に多量の色素を残しているのに較べEB-azo-人血清アルブミンでは原点に色素を全く残さなかつた。この事實はEBと人血清アルブミンとの結合が完全に行われており、且つその精製が充分に行われていることを示すものであり、EB-azo-人血清アルブミンと人血清アルブミンとの移動度の差はEBを結合したことによりその抗原性の多

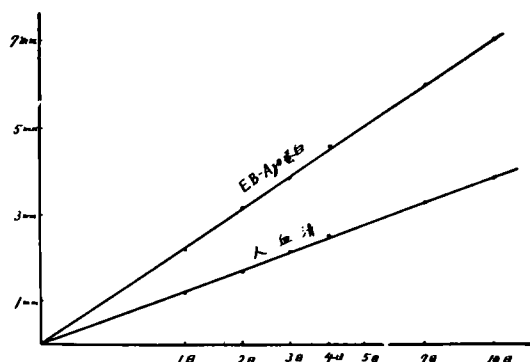
少とも変化したことを推定せしめるものである。

第4項 寒天重層法による観察

2本の小試験管に等量の抗EB-azo-人血清家兎血清を含んだ寒天層を作り、その一方の試験管には抗原としてEB-azo-人血清、他方の試験管には人血清を重層してその間に出来る白輪（沈降帯）の沈降度を10日間に亘つて観察した。

先ず抗原としてEB-azo-人血清を重層した場合1時間後に寒天層との境界面に1個の白輪を生じたが、更に24時間後には2個の白輪となつて認められた。即ちEB-アルブミン分子とEB-グロブリン分子であり、EBアルブミン分子の方がEB-グロブリン分子

第4図 寒天重層法による白輪の沈降度



よりも早く沈降し、時間の経過と共に両者の間隔は大きく拡がり24時間後アルブミン分子は 2.2 cm グロブリン分子は 1.8 cm であったのが10日後には夫々 7.2 cm 及び 5.5 cm であった。以上の如く2個の沈降帯を生ずることは人血清に EB を結合せしめても EB-アルブミン分子及び EB-グロブリン分子の性状はそのまま維持されていることを示すものである。次に抗原として人血清を用いた場合の沈降速度は第4図に示す如く EB-azo-人血清を抗原とした場合よりも遅く10日後にて 3.2 cm を示した。

又抗 EB-azo-人血清アルブミンを等量含んだ寒天層に入血清アルブミンを抗原として重層した場合に唯1個の白輪を認めた丈であり、沈降速度は先に

行つた実験のアルブミン分子に一致した。

第2節 EB-azo-蛋白質の血中濃度及び尿中排泄

EB-azo-人血清アルブミンを体重 2,200~2,500 g の3頭の家兎に体重 100g 当り 1.0 cc (EB 含有量 1.2 mg) の割合に耳静脈内注射により投与した。注射後10分、6時間、12時間及び24時間後より6日後まで毎日一定時刻に採血し、血清を分離後、前述の二方法、即ち光電分光光度計による EB の比色定量並びに抗原抗体反応により血中の抗原濃度を測定した。尚抗原抗体反応による実験には血清番号 No. 1 の抗血清を使用した。

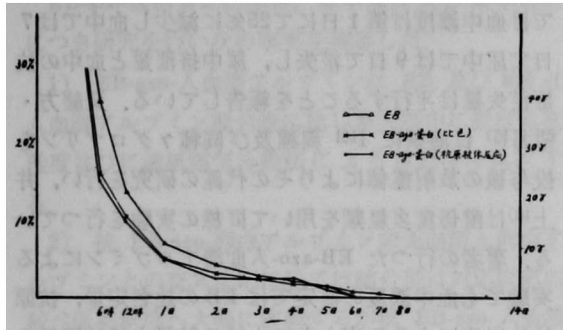
結果は第6表及び第5~第7図に示す如く抗原注射後6時間迄は急激に減少し投与量の約15% (血清 1 cc 当り 23.47) に、12時間迄はやや急激に減少し、投与量の約5% (血清 1 cc 当り 7.87) になつた。以後は概ね平衡状態を保ち乍ら軽度の減少を示し、4~5日目頃より再び急激に減少し、第2例に於ては5日目に、第1, 第3例に於ては6日目に全く消失した。尚比色による値と抗原抗体反応による値は概ね一致した。

対照として EB 溶液を家兎の耳静脈より体重 100 g 当り EB 1.2 mg の割合に投与し、血清中の EB を比色定量したところ第5, 第6図に示す如く、

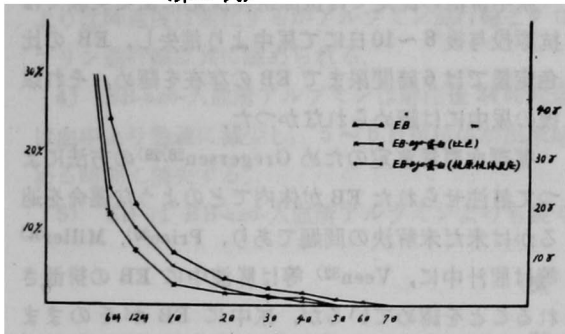
第6表 EB-azo-人血清アルブミン及び EB 静注後の血中濃度

注射後経過時間			6時間	12"	24"	2日	3"	4"	5"	6"	8"
第1例 体重 2,500g 抗原 25cc 投与 抗原注射直後血清 番号 No. 1 と反応 し得る血清の最高 稀釈度 1:1000	A	a 血清 1cc 中の EB 含有量(γ)	25	16	8	5	4	3	2	0	0
		b 注射量に対する 百分率(%)	16	10.3	5	3.2	2.5	1.9	1.3	0	0
	B	c 血清の反応し得る 最高稀釈度	1:150	1:100	1:50	1:25	1:25	1:25	1:10	0	0
		d 注射直後に対する 百分率(%)	15	10	5	2.5	2.5	2.5	1	0	0
第2例 体重 2,200g 抗原 2cc 投与 1:500	A	a	18.5	11	4	2.5	2	1	0	0	0
		b	11.8	7	2.5	1.6	1.3	0.6	0	0	0
	B	c	1:150	1:50	1:25	1:10	1:5	1:5	0	0	0
		d	15	10	5	2	1	1	0	0	0
第3例 体重 2,400g 抗原 24cc 投与 1:1000	A	a	22	14	6.5	4	3	2	2	0	0
		b	14.1	8.9	4.2	2.5	1.9	1.3	1.3	0	0
	B	c	1:150	1:100	1:50	1:25	1:25	1:25	1:10	0	0
		d	15	10	5	2.5	2.5	2.5	1	0	0
第4例 体重 2,600g EB 31.2mg 投与	A	a	29	21	11	6.5	4.5	3.5	2	1	0
		b	25	13.5	7	4.2	2.8	2.2	1.3	0.6	0

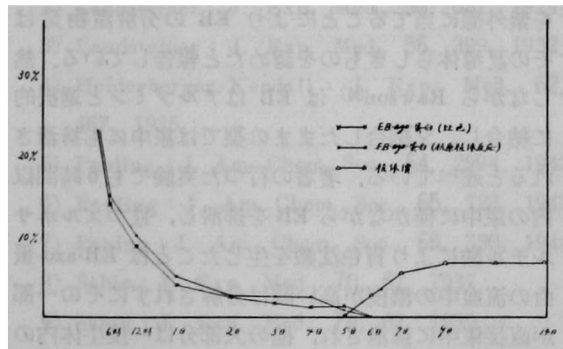
第5図 EB-azo-蛋白及び EB の血中濃度
(第1例)



第6図 EB-azo-蛋白及び EB の血中濃度
(第2例)



第7図 EB-azo-蛋白の血中濃度と抗体価
(第3例)



EB-azo-人血清アルブミンと概ね平行し乍ら減少するが EB-azo-人血清アルブミンよりも長く血中に残存し、7～8日にて消失した。

また抗原投与後抗体価の出現時期を調べたところ第7図に示す如く抗原投与後5日目、即ち抗原が急激に血中より消失する頃より抗体価は出現し始めた。以後次第に上昇して9日目には1:50に達し、その後は暫く平衡状態を保った。

尿中への抗原排泄の実験には以上の家兎を採尿器中に飼育しつつ、抗原投与後6時間、24時間、以後毎日10日後まで採尿し、血清の場合と同様にして抗原量を測定した。抗原投与後 EB の比色定量は6時間尿のみ可能であり以後の尿中には認められな

かつた。第1例では6時間尿に於て尿1cc 当り EB 20γ を含有し、尿量は22cc であつたので全体にて440γ、即ち抗原投与量の1.4%を排出した丈であつた。第2、第3例にては夫々0.9%、1.3%であつた。また6時間尿にズルフォサルチル酸を滴下したところ青色の沈澱を生じた。尚 EB のみを投与した場合にはその尿中への排泄は全く認められなかつた。

次に抗原抗体反応による測定では、その第1例を示せば次の如くであつた。

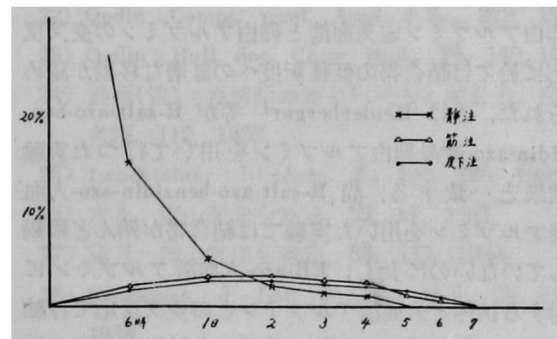
時間	尿稀釈度
6時間後	1:500
24 "	1:100
2～4日	1:10
5～7 "	1:5
8～9 "	1:2.5
10 "	0

即ち抗原投与後10日にて尿中より消失し、第2、第3例では夫々8日、9日にて完全に消失した。

第3節 各種注射法による血中濃度

体重2,000g 前後の家兎3頭を選び夫々に耳静脈内、背部筋肉内及び背部皮下注射により EB-azo-人血清アルブミン 10.0cc (EB 含有量 12mg) を投与し、注射後6時間、24時間、以後毎日7日後まで夫々耳静脈より採血し血清を分離後前述の方法にて EB を比色定量し、各種注射方法による抗原の血中濃度を比較した。

第8図 各種注射法による抗原の血中濃度



結果は第8図に示す如くであつた。即ち静脈注射の場合は前述の実験結果と同じく24時間迄は急速に減少し、以後は徐々に減少して5日後には全く消失した。筋肉内注射及び皮下注射の場合には両者ともほぼ同じ経過を辿り、注射後徐々に上昇して24時間にて最高値即ち血清1cc 当り EB 2.3γ (投与量の3%)を示した。その後暫く平衡状態を保った後4

日目頃より減少度はやや急となり7日後には両者共に完全に消失した。

第4章 総括並びに考按

EB-azo-蛋白質の抗原性に就する実験に於て、EB溶液、EB溶液と人血清アルブミンの混合液、及びEB-azo-人血清アルブミンの三液の寒天層中に於ける拡散度の差、交叉沈降反応に於ける結合帯の低稀釈度への移動、濾紙電気泳動法に於けるEB溶液、EBと人血清アルブミンの混合液、EB-azo-人血清アルブミン及び人血清アルブミンの4液の進行速度の差、寒天重層法に於ける人血清とEB-azo-人血清の沈降速度の差等は何れもEBと蛋白質とが完全に結合していることを示すと共に、蛋白質にEBを結合させることによりその抗原性に变化を来すことを示すものである。

Landsteiner¹⁾等はAtoxyl-azo馬血清を用いて家兎を免疫した場合、出来る抗体は免疫に用いた抗原と沈降反応を起すばかりでなくAtoxyl-azo-卵白アルブミンとの間にも沈降反応を起し、而もこの反応は特異的であつて上記抗体にAtoxyl又はAtoxylとチロジンの結合物を加えておき、その後Atoxyl-azo蛋白質を加えると沈降反応は阻止されると述べている²⁵⁾。然しながらEB-azo-蛋白質を用いて著者の行つた実験では抗EB-azo-人血清アルブミン家兎血清とEB-azo-卵白アルブミン及び抗EB-azo-卵白アルブミン家兎血清とEB-azo-人血清アルブミンとの間に真の交叉反応は認められず、又EBによる沈降阻止も認められなかつた。然るに抗EB-azo-卵白アルブミン家兎血清と卵白アルブミンの交叉反応に於ては結合帯の低稀釈度への顕著な移動が認められた。之はHeiderberger⁴⁾等がR-salt-azo-benzidin-azo-結晶卵白アルブミンを用いて行つた実験結果と一致する。尚R-salt-azo-benzidin-azo-人血清アルブミンを用いた実験では結合帯が殆んど移動していないのに比し、EB-azo-人血清アルブミンに対する抗体と人血清アルブミンとの交叉反応では結合帯が2倍だけ低稀釈度へ移動する結果を得た。即ち特異性に差がある。

以上に述べたAzo蛋白質による一連の実験結果より考えられることは同じ芳香族アゾ色素でも結合させる蛋白質の種類によつて、或は又同じ蛋白質でも導入するアゾ色素の種類によつてその特異性に可成り大きな差を生ずるということである。

末永²⁶⁾は家兎に山羊血清を、望月²⁷⁾は家兎に卵

白及び卵白アルブミンを経口的に投与してその血中濃度と尿中排泄について追求し、卵白アルブミンでは血中濃度は第1日にて25%に減少し血中では7日で尿中では9日で消失し、尿中排泄量と血中の抗原消失量は平行することを報告している。又緒方・望月¹⁶⁾は海豚に¹³¹I異種及び同種γグロブリンを投与後の放射能値によりその代謝の研究を行い、井上¹⁶⁾は酵母菌多糖類を用いて同様の実験を行つている。著者の行つたEB-azo-人血清アルブミンによる実験でも血中濃度の測定ではEBの比色定量、抗原抗体反応による測定ともに上述の結果とはほぼ同様の結果を得た。

尿中排泄の測定では抗原抗体反応による実験では抗原投与後8~10日にて尿中より消失し、EBの比色定量では6時間尿までEBの存在を認め、それ以後の尿中には認められなかつた。

循環血漿量測定のためGregersen²⁸⁾²⁹⁾の方法によつて静注せられたEBが体内でどのような運命を辿るかは未だ未解決の問題であり、Price³⁰⁾、Miller³¹⁾等は胆汁中に、Veen³²⁾等は胆汁中にEBの排泄されることを認めているが、尿中にEBがそのままの型で排泄されたという報告は未だみない。只北条³³⁾が尿にタングステン酸ソーダ硫酸を加え、之を紫外線に当てることによりEBの分解産物又はその誘導体らしきものを認めたと報告している。然しながらRawson³⁴⁾はEBはアルブミンと選択的に結合し、又結合したままの型では尿中にも排泄されると述べている。著者の行つた実験でも6時間以内の尿中に僅かながらEBを排泄し、且つズルホサルチル酸により青色沈澱を生じたことはEB-azo-蛋白質の流血中の濃度が高い間は分解されずにその一部が直接尿中に排泄され、他の大部分は一度生体内の各臓器に摂取され分解された後尿中に排泄されるものと思われる。又EBのみの方がEBをアルブミンと結合させた場合よりも永く血中に留るのは後者が一部尿中に排泄されるに比し、前者は尿中には排泄され難い為と思われる。

掃部³⁵⁾はコンゴローート蛋白による実験に於て皮下注及び筋注の場合は網内系細胞の抗原摂取は認められないと述べているが、EB-azo-蛋白質による実験に於て静脈注射の場合は別として抗原を皮下注及び筋注した場合血中濃度が最高にて僅かに投与量の3%しか示さなかつたことはこの場合抗原の網内系臓器への移行の可能性が極めて少いことを意味するものである。

第5章 結 論

EB-azo-蛋白質の抗原性、血中濃度及び尿中排泄につき研究を行い次の事実を確認した。

- 1) EB-azo-人血清アルブミンは EB 及び EB と人血清アルブミン混合液に比し寒天層中に於ける拡散度並びに濾紙電気泳動法による泳動度を異にする。
- 2) 抗 EB-azo-卵白アルブミン家兎血清と卵白アルブミンとの交叉反応に於ては結合帯は対応反応に較べ低稀密度へ大幅に移動するが抗 EB-azo-人血清アルブミン家兎血清反応系の場合はその移動は少い。
- 3) 人血清に EB を結合させた場合寒天重層法により沈降速度は変化するがアルブミン進行輪とグロブリン進行輪は共に認められる。
- 4) EB-azo-人血清アルブミンは静注後 24 時間迄は血中より急速に減少し、5～6 日後抗体が出来始める時期に消失する。
- 5) EB は EB-azo-人血清アルブミンよりも長く

血中に残存し、そのままの型では尿中には排泄されない。但し EB-azo-人血清アルブミンは 6 時間以内の尿中には排泄される。

6) 6 時間以後に於ても人血清アルブミンは EB と分離して排泄され 8～9 日にて尿中より消失する。

7) EB-azo-人血清アルブミンを筋注、皮下注した場合は 24 時間後に血中最高濃度を示し、両者平行を保ちながら 7 日にて共に消失する。

擧筆するに当り御懇篤なる御指導並に御校閲の勞を賜つた恩師大田原教授に対し深甚の謝意を表すると共に、終始御親切なる御指導を仰いだ緒方助教授に深謝する。

(本論文の要旨は昭和 33 年 4 月 9 日第 28 回日本衛生学会総会に於て発表した)

文 献

- 1) Landsteiner-Lampl Z. Imm. Forsch., 26, 293, 1917.
- 2) Landsteiner : J. Exp. Med., 39, 631, 1924.
- 3) Landsteiner : J. Exp. Med., 56, 399, 1932.
- 4) Heiderberger-Kendall J. Exp. Med., 62, 467, 1935.
- 5) Pauling : J. Am. Chem. Soc., 64, 2994, 1942.
- 6) Pauling : J. Am. Chem. Soc., 65, 728, 1943.
- 7) Pauling : J. Am. Chem. Soc., 66, 330, 1944.
- 8) Sabin : J. Exp. Med., 70, 67, 1937.
- 9) Sabin : J. Exp. Med., 70, 67, 1939.
- 10) Kruse-Mc Master : J. Exp. Med., 89, 583, 1949.
- 11) Kruse-Mc Master J. Exp. Med., 94, 323, 1951.
- 12) Haurowitz-Breiml : Z. Physiol. Chem., 205, 259, 1932.
- 13) Dixon-Bukantz-Dammin : Science., 113, 274, 1951.
- 14) Dixon-Bukantz-Dammin : Fed. Proc., 10, 553, 1951.
- 15) Ogata-Mochizuki : Acta. Med. Okayama., 10, 70, 1956.
- 11) 井上 : 岡山医学会雑誌, 70, 319, 1958.
- 17) Hartwell-Fieser : Org Synth., 16, 12, 1936.
- 18) Reeve : Nutrition Abstracts and Reviews., 17, 811, 1948.
- 19) 緒方(益)・第 1 回衛生学、微生物学、寄生虫病学連合会講演, 1927.
- 20) 小林 : 生物物理学, 2, No. 1, 3, 1954.
- 21) 森一小林・濾紙電気泳動法の実際, 南江堂, 1955.
- 22) Qudin : Compt. rend. Acad. d Sc., 222, 1946.
- 23) Qudin : Bull. Soc. Chim. Biol., 29, 140, 1947.
- 24) 進藤(宙) 血清学の新しい見方と考え方, 医学書院, 112, 1952.
- 25) Landsteiner : Biochem. Z., 104, 280, 1920.
- 26) 末永・岡山医学会雑誌, 53, 11, 1935.
- 27) 望月 : 岡山医学会雑誌, 68, 439, 1956.
- 28) Gregersen : J. Lab. & Clin. Med., 23, 423, 1938.
- 29) Gregersen : J. Lab. & Clin. Med., 29, 1266, 1944.
- 30) Price-Longnine : Bull. Johns Hopk. Hosp., 71, 51, 1942.
- 31) Miller : Am. J. Physiol., 151, 229, 1947.
- 32) Veen-Fishman : Am. J. Physiol., 151, 26, 1947.

33) 北条 : 医学と生物学, 21, 183, 1951.

35) 掃部 岡山医学会雑誌, 69, 855, 1957.

34) Rawson : Am. J. Physiol., 138, 708, 1943.

Serological Studies on Azoproteins

Part I Studies on Antigenicity of Evans Blue Azoproteins, its Concentration in Blood, and Excretion in Urine.

By

Masayuki Sidao

Department of Public Health, Okayama University, Medical School
(Director Prof. K. Ohtahara, M.D.)

The author reached to the following results experimenting on the antigenicity, the concentration in the blood and the excretion into the urine, of evans blue-azo-proteins.

1) Evans blue-azo-human serum albumin possesses other diffusibility in agar and other paper electrophoresis than evans blue or mixed solution of evans blue and human serum albumin.

2) The movement of the binding zone to the weaker solution at the cross reaction of rabbit serum anti-evans blue-azo-egg albumin and egg albumin is very remarkable compared with the reaction of same qualities, and on the contrary the movement is not so remarkable in case of rabbit serum anti-evans blue-azo-human serum albumin.

3) In case of being combined human serum and evans blue, sedimentation speed at an agar method experiment changes itself but albumin and globulin maintain their natural states.

4) Evans blue-azo-human serum albumin in the blood decreases rapidly by 24 hours after the injection and disappeared at the time of producing antibody in 5 or 6 days.

5) Evans blue stays in the blood longer than evans blue-azo-human serum albumin and not excreted into the urine, but the latter is excreted into the urine produced within 6 hours after the injection.

6) But only human serum albumin is excreted into the urine in more than 6 hours being isolated from evans blue, and disappears from the urine in 8 or 9 days.

7) Evans blue-azo-human serum albumins injected intramuscularly or hypodermically both show high concentration in the blood in 24 hours after the injection and disappear in 7 days maintaining the parallel each other,