

牛 胸 腺 核 蛋 白 質 の 血 清 学 的 研 究

第 一 編

牛 胸 腺 の 抗 原 性 に 就 て

岡山大学医学部衛生学教室 (主任: 大平昌彦教授)
指導: 緒方名誉教授)

石 川 修 一 郎

〔昭和 34 年 6 月 17 日受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 論

第 2 章 実験方法並びに実験材料

- 1) 実験動物
- 2) 免疫用抗原の製法
- 3) 反応用抗原の製法
- 4) 免疫方法
- 5) 実験方法

第 3 章 実験成績

- 第 1 節 牛胸腺免疫家兎血清と牛, 豚胸腺水浸出液及び牛, 豚胸腺核蛋白質との補体結合反応

- 1) 牛胸腺水浸出液抗原による補体結合反応
- 2) 牛胸腺核蛋白質抗原による補体結合反応
- 3) 豚胸腺水浸出液抗原による補体結合反応
- 4) 豚胸腺核蛋白質抗原による補体結合反応

第 2 節 牛, 豚各種臓器抗原による補体結合反応

第 3 節 血清及び生理的食塩水浸出臓器抗原に対する補体結合反応

第 4 章 総括並びに考按

第 5 章 結 論

第 1 章 緒 論

臓器蛋白質の血清学的研究は幾多の業績がある。教室に於て大城¹⁾の生殖腺臓器及び臓器免疫血清の特異性について、又後藤、伊藤²⁾の水晶体、城³⁾の皮膚蛋白、後藤⁴⁾の硝子体、岸岡⁵⁾⁶⁾の腎、肝蛋白、小泉⁷⁾の気管粘膜上皮蛋白、酒井⁸⁾の赤血球、白血球の核についての研究等がある。又京大渡辺門下⁹⁾に於て臓器特異性の広汎な研究が完成されている。然し胸腺に就ては僅かに和田¹⁰⁾の研究がある以外筆者は未だ知らない。和田は牛胸腺生理的食塩水浸出液を以て家兎を免疫した抗血清を使用し、各種牛臓器浸出液と沈降反応、補体結合反応、過敏症反応を行つている。その結果胸腺、腎臓、肺臓、大脳、睪丸等とは比較的高度に反応し、血色素、水晶体、線維素原等に反応はしないか、僅かしか反応しないという。然し過去の研究が殆んど総て生理的食塩水を以て臓器乳剤を作り遠心沈澱或は濾過を行い透明液にして実験している。所が生理的食塩水不溶性蛋

白質、例えば核蛋白質の如きものは生理的食塩水には沈澱するため血清学的には関与出来ないことが考えられる。一方臓器の毒性については H. Bibers-stein u. W. Jadassohn¹¹⁾、中村¹²⁾等の研究がある。中村は牛胸腺浸出液をマウスに注射して観察した結果、毒性が可成り強く静脈内又は腹腔内注射で死亡するが、加熱処理を施すとやや弱毒されることを観ている。

筆者は核蛋白質の水溶性を考慮において、牛胸腺の水浸出液の血清学的研究を行つたのでここに報告する。

第 2 章 実験方法並びに実験材料

1) 実験動物

2,000 g 内外の成熟健全家兎を選び免疫を実施した。

2) 免疫用抗原の製法

若い牛 (3~5 才) の胸腺を屠殺後出来るだけ速かに血塊、結締織等を除去しメスで細片としてから

磨砕し泥状とする。これに蒸溜水を5～6倍量加えて十分に振盪1夜氷室に保存してから晒木綿で濾過、更にその濾液は定性用濾紙にて氷室中で濾過すると半透明淡桃色の液が得られる。免疫原は免疫注射の都度新調し、56°C 30分間浴槽で加温してから使用した。

3) 反応用抗原の製法

牛及び豚の各臓器を使用した。之等の臓器は少量宛細切してから磨砕泥状物とする。蒸溜水に泥状とした試料を20%の割合に加えて振盪1夜氷室に保存してから、濾紙を使用しては濾過困難な試料もあつたため総て脱脂綿濾過を行つた。なお牛及び豚の胸腺核蛋白質抗原はCarter, Hall 法¹³⁾によつて調製した。

4) 免疫方法

56°C 30分間加温しない胸腺水浸出液を家兎に注射すると1～2回の注射で大抵死亡する。こうした事実は教室の佐伯¹⁴⁾が胎盤浸出液で、大城¹⁾が睪丸精子、精液等でも証明している。和田⁹⁾も免疫中に半数が死亡したといつている。筆者も先人に倣い56°C 30分間加温してから免疫原として使用した。ただこの場合濃厚浸出液を静脈注射すると注射後家兎は死亡する。この現象は臓器の毒性よりも核蛋白質が血液中の無機塩類により凝固され血栓形成による死亡ではないかと考えられる。従つて蛋白質含有量はHeller氏反応500倍稀釈以上陽性の濃厚浸出液の静脈注射は避けて腹腔内注射とし静脈内には50倍稀釈陽性以下の稀薄溶液としなければならない。家兎の初回注射をHeller氏反応50倍まで稀釈陽性の浸出液を静脈内に2cc注射、併せてHeller氏反応500倍まで稀釈陽性の浸出液5ccを腹腔内に注射し3～4日の間隔で10回、次第に注射量を増し5回以降は静脈内4cc、腹腔内7～8ccとした。最後の注射より1週間を経て採血した。

5) 実験方法

従来の研究を見ると臓器の浸出には多く0.85%食塩水が使われている。筆者は臓器の核蛋白質を考慮したため、核蛋白質が0.85%食塩水には不溶性で水には溶けることから、抗原として使用した臓器は総て蒸溜水で浸出した。又抗原抗体反応はその判定を正確にするために専ら補体結合反応を実施した。

補体結合反応：

教室慣用の方法を用いたが抗原が水浸出液であつたため、少し改良を加えた。即ち抗原は蒸溜水で、抗体は1.7%食塩水で稀釈し、各種臓器については

抗体を10倍に稀釈したものについて抗原稀釈法を行い、又牛、豚胸腺水浸出液と牛、豚胸腺核蛋白質については緒方氏稀釈沈降反応に倣い抗原抗体稀釈法を実施した。抗原とした臓器は稀釈の際にHeller氏輪環試験法により最終の蛋白質濃度を測定した。

教室慣用の方法(改良法)：

抗原水溶液 0.5cc + 1.7%食塩水抗体稀釈液 0.5cc + 0.85%食塩水稀釈補体 0.5cc

補体は新鮮海馬血清を用い、実験毎に必ず補体価を測定しその2単位を使用した。全量で1.5ccとなり食塩水の濃度は0.85%等張液となる。

37°Cの恒温器に1.5時間保つてから2.5%山羊血球0.85%食塩水浮游液と抗山羊溶血素血清の等量混合液1.0ccを加える。

抗山羊溶血素免疫家兎血清は56°Cに30分間加温非働性としたもので溶血価は1:2,500、その2単位を使用した。

全量で2.5ccとなり37°Cの恒温器に2時間保つてから1夜氷室に保存後成績を判定した。反応成績は完全溶血阻止を卅とし完全溶血をーとし、溶血程度により卅, 卅, +とした。対照は

- ④ 抗原+食塩水+補体+溶血系(ー)
- ⑤ 食塩水+抗体+補体+溶血系(ー)
- ⑥ 食塩水+食塩水+補体+溶血系(ー)
- ⑦ 食塩水+食塩水+食塩水+溶血系(卅)

以上4種類について実施した。

なお比較のため抗原臓器の浸出を0.85%食塩水を用いて牛胸腺、豚胸腺、牛心筋、牛肺臓、牛水晶体、牛血清について実施した。

第3章 実験成績

第1節 牛胸腺免疫家兎血清と牛、豚胸腺水浸出液及び牛、豚胸腺核蛋白質との補体結合反応

緒方氏稀釈沈降反応に倣い、抗原抗体稀釈法を実施したが胸腺水浸出液も核蛋白質液も50倍稀釈位までは抗体稀釈液と混合されると明かな白色沈殿(胸腺核蛋白質であるヌクレオヒストンナトリウム塩)が現われるが反応には影響がなかつた。

1) 牛胸腺水浸出液抗原による補体結合反応

抗原原液 Heller氏輪環反応 1:2,500(+), 結合帯1:250, 稀釈価1:250である(第1表)。

2) 牛胸腺核蛋白質抗原による補体結合反応

抗原原液 Heller氏輪環反応 1:2,500(+), 結合帯1:25, 稀釈価1:100である(第2表)。

第 1 表

抗体	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250	1:500
抗原						
1:10	+++	+++	+++	++	—	—
1:25	+++	+++	+++	+++	—	—
1:50	+++	+++	+++	+++	—	—
1:100	+++	+++	+++	+++	+	—
1:250	+++	+++	+++	+++	++	—
1:500	+++	+++	++	++	—	—
1:1000	++	++	—	—	—	—
1:2500	—	—	—	—	—	—
対 照	(—)					

第 2 表

抗体	1:10	1:25	1:50	1:100	1:250
抗原					
1:10	+++	+++	+++	+	—
1:25	+++	+++	+++	++	—
1:50	+++	+++	++	+	—
1:100	+++	++	++	—	—
1:250	++	+	—	—	—
1:500	++	—	—	—	—
1:1000	+	—	—	—	—
1:2500	—	—	—	—	—
対 照	(—)				

第 3 表

抗体	1:10	1:25	1:50	1:100
抗原				
1:10	+++	+++	—	—
1:25	+++	+++	++	—
1:50	+++	+++	++	—
1:100	+++	++	—	—
1:250	—	—	—	—
対 照	(—)			

第 4 表

抗体	1:10	1:25	1:50	1:100
抗原				
1:10	+++	+++	+	—
1:25	+++	+++	++	—
1:50	+++	++	—	—
1:100	+++	++	—	—
1:250	—	—	—	—
対 照	(—)			

3) 豚胸腺水浸出液抗原による補体結合反応

抗原原液 Heller 氏輪環反応 1:1,000 (+), 結合帯 1:50, 稀釈価 1:50である(第3表)。

4) 豚胸腺核蛋白質抗原による補体結合反応

抗原原液 Heller 氏輪環反応 1:1,000 (+), 結合帯 1:25, 稀釈価 1:50である(第4表)。

以上の結果から豚胸腺水浸出液並びに豚胸腺核蛋白質の反応が牛胸腺のそれよりも弱く胸腺浸出液は種属特異性を有する。

第2節 牛、豚各種臓器抗原による補体結合反応

抗体は総て1.7%食塩水で10倍に稀釈したものを使用した。その成績は第5表に示す如くである。

第3節 血清および生理的食塩水浸出臓器抗原に対する補体結合反応

前項までは総て抗原は水浸出液、水稀釈による改良法で施行しているが比較のために本項は総て生理的食塩水を使用して実験した。その結果は、第6表の如くである。

以上の結果から牛胸腺並びに肺臓に強く反応している。第5表と比較すると牛胸腺、牛肺臓共に水浸出液も生理的食塩水浸出液も反応の程度は同じで差異はなく、豚胸腺生理的食塩水のみ、水浸出液に比較して著明な差異が現われている。

第4章 総括並びに考按

臓器浸出液を以て家兎を免疫する場合は多く0.85%食塩水浸出液が使用されたが、筆者は核蛋白質を考慮したために胸腺を蒸留水で浸出したものを使用した。胸腺水浸出液を稀薄な濃度で少量注射するならば、家兎は死亡を免れるけれども得られる免疫血清の力価は低い。先人に倣い56°C 30分間加温してから注射すると有毒物質は破壊されて家兎も免疫中に死亡せず充分高価な免疫血清が得られた。補体結合反応は教室慣用の方法を少し改正して、抗原は蒸留水で稀釈し、抗体は1.7%食塩水で稀釈して実施したが、0.85%食塩水浸出、同濃度の食塩水稀釈血清並びに臓器抗原との比較では豚胸腺に変化が見られた他は、反応には変化が認められなかつた。抗原と抗体の稀釈法による反応では牛胸腺水浸出液抗原、豚胸腺核蛋白質抗原の順に反応が弱くなる。また牛、豚の種属間では同種属の方が反応が強い。21種類の各種臓器水浸出液の実験結果からは

1:1,000まで陽性のもの 牛 胸腺、胸腺核蛋白質、骨髓(3種類)

豚:なし

各種臟器		抗原稀釈		1 : 10	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 250	1 : 500	1 : 1000	1 : 2500	対照	Heller 反応
1	胸 腺	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +	+++ -	+++ -	+++ -	- -	- -	1 : 2500(+) 1 : 1000(+)
2	胸 腺 核蛋白質	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ -	++ -	++ -	++ -	- -	- -	1 : 2500(+) 1 : 1000(+)
3	骨 髓	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ ++	+++ -	+++ -	++ -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 1000(+)
4	小 腦	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ ++	++ +	- -	- -	- -	1 : 500(+) 1 : 1000(+)
5	大 腦	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +	+++ -	+++ -	- -	- -	- -	1 : 500(+) 1 : 1000(+)
6	脾 臓	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ ++	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 1000(+)
7	甲 状 腺	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ +	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 2500(+)
8	肝 臓	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	++ -	++ -	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 2500(+) 1 : 2500(+)
9	辜 丸	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ ++	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 1000(+)
10	副 辜 丸	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ ++	++ +	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 1000(+)
11	腎 臓	牛 豚	+++ +++	+++ +++	+++ +++	+++ +	++ -	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 1000(+)
12	胃	牛 豚	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	++ -	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 500(+) 1 : 100(+)
13	肺 臓	牛 豚	+++ ++	+++ ++	+++ ++	++ ++	++ -	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 500(+) 1 : 1000(+)
14	膀 胱	牛 豚	+++ -	+++ -	+++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 1000(+)
15	腸	牛 豚	+++ ++	+++ -	+++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 500(+) 1 : 1000(+)
16	食 道	牛 豚	++ ++	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	++ -	- -	- -	- -	1 : 250(+) 1 : 100(+)
17	卵 巢	牛 豚	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	- -	- -	- -	1 : 500(+) 1 : 500(+)
18	氣 管	牛 豚	+++ ++	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	+++ -	- -	- -	- -	1 : 500(+) 1 : 500(+)
19	血 清	牛 豚	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	- -	1 : 1000(+) 1 : 2500(+)

20	心 筋	牛 豚	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 : 100(+)
			—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 : 500(+)
21	眼 (硝子体)	牛 豚	—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 : 100(+)
			—	—	—	—	—	—	—	—	—	1 : 500(+)

第 6 表

抗原稀釈		1 : 10	1 : 25	1 : 50	1 : 100	1 : 250	1 : 500	1 : 1000	1 : 2500	対 照
各種臓器	牛 胸 腺	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	—	—
	豚 胸 腺	/	/	/	—	—	—	—	—	—
	牛 肺 臓	+++	+++	+++	++	+	—	—	—	—
	牛 心 臓	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	牛 水 晶 体	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	牛 血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—

1 : 500まで陽性のもの 牛 : 小脳, 大脳, 脾臓, 甲状腺, 肝臓, 睪丸, 副睪丸, 腎臓, 胃
(9種類)

豚 : 小脳 (1種類)

1 : 250まで陽性のもの 牛 : 肺臓, 脾臓 (2種類)
豚 : 胸腺, 骨髓, 大脳, 脾臓, 甲状腺, 睪丸, 副睪丸 (7種類)

1 : 100まで陽性のもの 牛 : なし
豚 : 胸腺核蛋白質, 腎臓, 肺臓 (3種類)

1 : 50 まで陽性のもの 牛 : 腸, 食道 (2種類)
豚 : 肝臓 (1種類)

1 : 25 まで陽性のもの 牛 : 卵巢 (1種類)
豚 : なし

1 : 10 まで陽性のもの 牛 : 気管 (1種類)
豚 : 腸, 食道, 気管 (3種類)

陰性のもの 牛 : 血清, 心筋, 眼 (3種類)
豚 : 胃, 脾臓, 卵巢, 血清, 心筋, 眼 (6種類)

牛では21種類中陽性のもの18種類 (85.7%), 豚では21種類中陽性のもの15種類 (71.4%) で牛, 豚の差異は著明とは思われないが, 稀釈倍率から比較すると 1 : 500, 1 : 1,000 まで陽性のものは牛では半数以上の12種類なのに, 豚では僅かに1種類で明かな差異が認められる。

今仮りに Heller 氏反応1 : 1,000陽性を標準として補体結合反応価を調整すると

補体結合反応

1 : 500以上 陽性のもの 牛 : 胸腺, 胸腺核蛋白質, 骨髓, 大脳, 小脳, 胃, 肺臓, 脾臓, 甲状腺, 睪丸, 副睪丸, 腎臓 (12種類)

豚 : 小脳 (1種類)

1 : 250まで 陽性のもの 牛 : 肝臓, 脾臓, 食道 (3種類)
豚 : 胸腺, 骨髓, 大脳, 脾臓, 睪丸, 副睪丸 (6種類)

1 : 100まで 陽性のもの 牛 : 腸 (1種類)
豚 : 胸腺核蛋白質, 腎臓, 肺臓, 食道, 甲状腺 (5種類)

1 : 50 まで 陽性のもの 牛 : 卵巢 (1種類)
豚 : なし

1 : 25 まで 陽性のもの 牛 : 気管 (1種類)
豚 : 気管, 肝臓 (2種類)

1 : 10 まで 陽性のもの 牛 : なし
豚 : 腸 (1種類)

陰性のもの 牛 : 血清, 心筋, 眼 (3種類)
豚 : 血清, 脾臓, 卵巢, 心筋, 眼, 胃 (6種類)

以上の如くなり, 牛の胸腺, 胸腺核蛋白質抗原と同じく, 牛の骨髓, 大脳, 小脳, 胃, 肺臓との反応も強い。和田⁹⁾の牛胸腺免疫家兎血清を使って牛各種臓器の反応性を見た成績からは, 同じ補体結合反応の抗原稀釈法で, 反応の程度は胸腺, 腎臓質, 肺臓, 平滑筋, 大腸, 小腸, 睪丸, 精子, 耳下腺, 脊髓, 前立腺, 乳腺, 皮膚の順に強く反応し, 血清, 線維素原, 骨髓, 脾臓, 肝臓, 心筋, 脳灰白質, 胃, 卵巢, 甲状腺, 脾臓, 硝子体, 水晶体等は反応が陰

性になつている。筆者の成績と比較すると共通点もあるが、骨髓、脾臓、肝臓、睪丸等では差異が見られる。

第5章 結 論

牛胸腺水浸出液免疫家兎血清に対する牛、豚各種臓器水浸出液の反応性を補体結合反応改良法によつて検討した。その結果

1. 牛胸腺水浸出液免疫家兎血清に対する牛胸腺水浸出液、牛胸腺核蛋白質、豚胸腺水浸出液、豚胸腺核蛋白質の反応性は、牛胸腺水浸出液 $\geq$ 牛胸腺核蛋白質 $>$ 豚胸腺水浸出液 $=$ 豚胸腺核蛋白質の順である。

2. 牛胸腺水浸出液によつて免疫した場合、牛胸腺核蛋白質に対する抗体が産生される。

3. 牛、豚各21種類の臓器蛋白質の抗原性を抗原稀釈法により検討した成績は、反応性の強いもの牛では胸腺、胸腺核蛋白質、骨髓、大脳、小脳、胃、肺臓、脾臓、甲状腺、睪丸、副睪丸、腎臓等である。豚では胸腺、小脳等が反応性が強い。

4. 胸腺生理的食塩水浸出液の抗原性と胸腺水浸出液の抗原性との間には大した差異は認められなかつた。

擧筆するに当り終始御懇篤なる御指導を賜わり且つ御校閲を賜りました恩師緒方名誉教授並びに大平教授に深甚なる謝意を表す。

(本論文の要旨は昭和27年12月20日の第465回岡山医学会通常例会に於て報告した)

文 献

- | | |
|--|--|
| 1) 大城 岡医誌, 第43年, 4号, 5号, 9号, (昭6) | 8) 酒井: 岡医誌, 第46年, 5号, 6号, 7号, (昭9) |
| 2) Y. Gotoh, K. Itoh: Arbeiten aus der Medizinische Universität Okayama, 3 Band, 2. Heft, 172 (1932) | 9) 渡辺: 日微誌, 第22巻, 第10号, (昭3) |
| 3) 城 岡医誌, 第44年, 6号, 1628 (昭7) | 10) 和田 日微誌, 第22巻, 第10号, 277 (昭3) |
| 4) 後藤: 岡医誌, 第44年, 9号, 2533 (昭7) | 11) H. Biberstein u. W. Jadassohn: Zeitschr. f. Immunitätsf. Bd 42, 149 (1925) |
| 5) 岸岡: 岡医誌, 第45年, 7号, 1640 (昭8) | 12) 中村: 日微誌, 第22巻, 1113 (昭3) |
| 6) 岸岡 岡医誌, 第46年, 3号, 460 (昭9) | 13) Carter, R. O., Hall, J. L.: J. Am. Chem. Soc., 62, 1194 (1940) |
| 7) 小泉: 岡医誌, 第47年, 7号, 1963 (昭10) | 14) 佐伯: 岡医誌, 第44年, 6号, 1604 (昭7) |

Serological Studies on the Bovine Thymus Nucleoprotein

Part 1. Antigenicity of Bovine Thymus

By

Shuichiro Ishikawa

Department of Hygiene Okayama University Medical School
(Director: Prof. Masahiko Ohira)

With an improved technique of complement fixation test the author studied the reactivity of the aqueous extracts of various bovine and swine viscera on the serum of the rabbit immunized by bovine thymus aqueous extract, and obtained the following results.

1. Grades of the reactivity of bovine thymus aqueous extract, bovine thymus nucleoprotein, swine aqueous extract, and swine thymus nucleoprotein are in the order of bovine thymus aqueous extract $\geq$ bovine thymus nucleoprotein $>$ swine thymus aqueous extract $=$ swine thymus nucleoprotein.

2. When the animal is immunized with bovine thymus aqueous extract, antybody against bovine thymus nucleoprotein is produced.

3. In the stndy of antigenicity of 21 different visceral proteins in bovine and swine by antigen dilution test, those that show a strong reactivity are thymus, thymus nucleoprotein, bone marrow, cerebrum, cerebellum, stomach, lung, spleen, thyroid, testis, epididymus and kidney in bovine, while they are thymus and cerebellum in swine.
