

肝臓抗体に関する血清学的研究

第 3 編

アゾ色素標識肝抗体について

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂淳夫教授)

谷 野 光 弘

〔昭和34年8月7日受稿〕

I. 緒 言

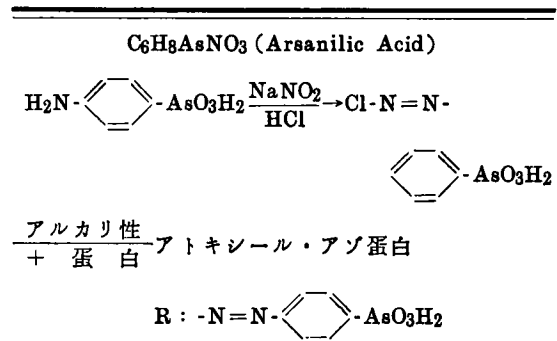
近年免疫化学の進歩により、抗体に azo 色素、螢光物質及び放射性同位元素を label し、しかも抗原に対する結合の減弱しない様に工夫して、抗原抗体反応の特異性を組織化学的研究に応用し、生物化学的活性を有する物質の存在の同定や抗原物質及び抗体の生体内における動態を追跡しようとする試みがなされた。この方面の研究では古くは Landsteiner (1917) の azo—蛋白質に関する広範な研究があり、又 Marrack (1934)¹⁾ は、チフス菌の抗血清に赤い色素をつけて菌に作用させると、凝集した菌が赤く染まることを認め、次いで Heidelberger²⁾ 等も色素をつけた抗体が抗原と反応することをみており、最近では螢光抗体法³⁾ 及び放射性元素⁴⁾⁵⁾ を label した抗体が注目されている。著者は azo—色素標識臓器抗体、特に標識肝抗体を用いて、それが生体内における動態より臓器抗体の臓器特異性並びに臓器障害性につき 2, 3 の検討を加えた。

II. 実験並にその成績

1. Atoxyl 抗体の産生について

先ず Atoxyl 標識方法⁶⁾ として表 1 に示す如く、Para-amino benzene arsonic acid 1 g を N-HCl, 10 cc に溶解し、0°C において N-Na NO₂ を 1 滴宛添加しながらよく混和し、ヨードカリ澱粉紙が紫色を呈するようになるまで滴下して diazo 化し、次にこの溶液を炭酸ソーダでアルカリ性とした 5% 卵白アルブミン溶液に加えると蛋白質に含まれるチロジン又はヒスチジン残基と coupling して Atoxylazo—蛋白質が生成される。生成した Atoxylazo—蛋白質溶液は酸性では黄色沈澱を生じ、アルカリ性では赤色を呈するので、かかる操作を繰返して精製し、流水に透析後醋酸で pH7.2 として使用した。この

表 1



Atoxylazo—卵白アルブミン液 (Atoxyl 30 mg を含む) を、2.0 ないし 2.5 kg の健常家兎大腿筋肉内に隔日、週 3 回の割で注射し感作前並びに後の Atoxyl 抗体の消長を予め作製しておいた 1 cc 中に 10 mg の Atoxyl を含有する Atoxyl 標識健常家兎血清を抗原として沈降反応 (Uhlenhuth の方法)⁷⁾ により経時的に測定した。その結果は表 2 に示す如く、Atoxyl 抗体は感作回数に比例して上昇し、IV 及び V 例を除き漸増の傾向を示した。IV 及び V 例にあつては 7 週目前後までは漸増するが、以後感作継続にも拘らず低減を示した。しかしいずれにあつても 32~4096 倍抗原稀釈において Atoxyl 抗体を証明した。

Atoxyl 抗体と同時に卵白 albumin 抗体を、5% 卵白 albumin 溶液を抗原として同じく沈降反応により測定すると、感作後 10 週目においてはいずれも 1,600 ないし 6,400 抗原稀釈において証明された。

2. Atoxyl 標識健常家兎血清負荷後の血中並びに諸臓器組織内の Atoxyl 量

表 1 の如くにして作製した Atoxyl 標識健常家兎血清を、(Atoxyl 70mg 含有) 2.0 kg 前後の健常家兎の耳静脈より注入し、爾後の血中 Atoxyl 量並びに肝抗体価の消長を経時的に観察した。Atoxyl 測

表 2

抗 原 家兎番号	経週	アトキシール 標 識 健 常 家 兎 血 清										卵白ア ルブミ ン	健常家 兎血清
		前	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	10
I		0	0	16	64	32	64	64	128	256	512	512	6,400
II		0	4	32	64	64	256	512	512	1,024	512	1,024	3,200
III		0	16	64	256	256	512	512	512	1,024	2,048	4,096	6,400
IV		0	4	16	16	32	256	512	512	256	64	64	3,200
V		0	0	2	16	64	128	128	256	64	32	32	1,600

定に際しては予め作製していた Atoxyl 抗体を含む家兎免疫血清 (1cc 中 10 mg の Atoxyl を含む Atoxyl 標識健常家兎血清に対し 8192 倍の抗原価のもの) を用いて沈降反応により測定し、肝抗体は 5 % 健常家兎肝生理的食塩水抽出液を抗原として補体

結合反応により測定した。即ち表 3 に示す如く、Atoxyl 量は負荷後 12 時間において既に負荷量の $1/8$ ないし $1/16$ 量に減少し、時日の経過と共に漸減して 4 日目には既に測定不能にまで減少するに反し、肝抗体価は負荷後不変乃至負荷後にやや減少がみられ

表 3

家兎番号	経日	前	直 後	1/2	1	2	3	4	5
		肝 抗 体 負荷アトキシール	肝 抗 体 負荷アトキシール	肝 抗 体 負荷アトキシール	肝 抗 体 負荷アトキシール	肝 抗 体 負荷アトキシール	肝 抗 体 負荷アトキシール	肝 抗 体 負荷アトキシール	肝 抗 体 負荷アトキシール
I		16	16	16	8	8	8	8	8
		0	512	64	16	8	4	0	0
II		16	16	16	16	16	16	16	16
		0	512	32	16	8	4	0	0
III		32	32	32	16	16	16	16	16
		0	256	16	8	4	2	0	0

る程度であつた。

次にかかる血中の Atoxyl 消失の時期、即ち Atoxyl 標識健常家兎血清負荷後 3 日目における諸臓器組織内 Atoxyl 量の分布をみると、第 1 編の表 6 の方法⁸⁾に従つて得た諸臓器抽出液について、抗 Atoxyl 血清を用いる沈降反応によつて測定した抗原価即ち Atoxyl 分布比は表 4 に示す通りで、Atoxyl はいずれの臓器においても認められるが、単位重量

表 4

家兎番号	臓 器						
	血	肝	腎	脾	骨髓	リンパ腺	肺
I	1	1	8	1	4	1	4
II	0	0	8	0	2	1	0
III	0	0	2	0	4	4	0

(臓器 1g の浸出液と血清 1cc の稀釈液の比較)

値では腎が最も高値で、次いで骨髓、リンパ腺の順で肝及び脾は最も低値を示した。

3. Atoxyl 標識抗肝血清負荷後の血中並びに諸臓器組織内の Atoxyl 量

表 1 の如くにして標識した抗体価 128 倍の同種抗肝血清 2 cc/kg (Atoxyl 70 mg を含む) を 2 kg 前後の健常家兎耳静脈より注入し、爾後の血中肝抗体並びに Atoxyl 量を、2 において述べたと同様の方法により測定した。表 5 に示す如く、Atoxyl 量は負荷後 12 時間で既に負荷量の $1/2$ ないし $1/4$ 量に減少し爾後漸減を示すが、健常家兎血清負荷例に比し血中残存はやや遅延し、7 日目において初めて血中より証明不能となつた。一方血中肝抗体は、第 2 編において述べた如く、負荷後 2 ないし 3 日目に軽度上昇を認め、以後 7 日目迄やや減少を示した。

次にかかる血中の Atoxyl 消失の時期即ち Atoxyl 標識抗肝血清負荷後 6 日目における諸臓器組織内 Atoxyl 量比を、予め作製し得た Atoxyl 抗体 (1cc 中 10 mg の Atoxyl を含む Atoxyl 標識肝家兎血清に対し抗原価 8192 倍のもの) を用いて測定すると表 6 の如く、脾、肺を除きいずれの臓器においても認められるが、単位重量値ではやはり腎に最も高値に証明し、肝は比較的低値であるが健常家兎血清負

表 5

家兎番号	経日	前	直 後	1/2	1	2	3	5	6	7
I	肝 抗 体	16	16	8	16	8	32	8	8	8
	負荷アトキシール	0	256	128	64	32	4	4	2	0
II	肝 抗 体	16	16	16	8	16	32	8	8	8
	負荷アトキシール	0	512	128	64	64	8	8	4	0
III	肝 抗 体	16	16	8	8	32	16	4	4	8
	負荷アトキシール	0	256	64	32	32	16	4	2	0

表 6

家兎番号	臓 器	血	肝	腎	脾	骨髄	リンパ腺	肺
I		1	0	2	0	0	0	0
II		0	1	2	0	2	4	0
III		0	1	1	0	0	1	0

(臓器1gの浸出液と血清1ccの希釈液の比較)

荷例に比べ相対的に増量の傾向が認められた。

III. 総括並に考按

Atoxyl¹⁰⁾は従来 Para-amino phenyl arsonic acid のナトリウム塩として同量の亜砒酸に比し毒性は $1/40$ 以下であるという点において古くから Spirocheta 疾患者の治療に使用されてきたが、近年になり免疫化学の進歩と共に、抗原或いは抗体に Atoxyl を label し、これら標識 azo 色素の検出によつて抗原或いは抗体の推移乃至は運命を推定し、更に生体内における抗原抗体反応の動態を把握せんと試みられるようになった。1919年 Landsteiner¹⁰⁾は azo 蛋白を用い、家兎を免疫してえた抗血清により azo 蛋白との間に沈降反応を行い、且又純粹の azo 色素との間に反応して沈降物を作ること報告した。更に1932年 Haurowitz¹¹⁾は抗原に Atoxyl を label して動物を感作し、その際における臓器中の抗原分布を砒素の量より測定して報告した。著者も Atoxyl で label した抗体を作成して 2, 3 の検討を加えたが、Atoxyl が砒素を含む有機化合物であるため、その毒性を考慮して使用しなければならないわけで、武藤¹²⁾によれば Atoxyl は亜砒酸の $1/40$ ないし $1/50$ 以下の毒性を有しているが、家兎に対しては経静脈投与に際し、致死量は $0.2\sim0.3/\text{kg}$ で慢性の中毒量としては連日 10 mg/kg 前後と報告されている。さて Atoxyl 抗体作製については、 0.5% 卵白 albumin 溶液に Atoxyl を標識したのであるが、半抗原¹³⁾に対する抗体産生は一般に長期間の免

疫を要するので、感作回数による Atoxyl 量も上述慢性中毒量をも考慮し一応週3回で、1回の Atoxyl 投与量は 30 mg 宛とした。このような感作により家兎血中に産生された Atoxyl 抗体は、Atoxyl 標識健常家兎血清を抗原として沈降反応により測定した。その結果は明らかに Atoxyl 抗体の産生されることが確認されたのであるが、表2のIV, V例の如く、感作回数を重ねるにもかかわらず8週目以後低減を示したのは、おそらく家兎の一般状態悪化による抗体産生能力の減退によるものと推定される。次に Atoxyl 標識健常家兎血清を健常家兎に負荷した際の血中の Atoxyl 消失は、負荷後12時間にして既に負荷量の $1/8$ ないし $1/16$ 量に減少し、その後漸減して4日目には既に血中より測定不能となるに反し、Atoxyl 標識抗肝血清負荷においては負荷後12時間で負荷量の $1/2$ ないし $1/4$ 量に減少するが、その後漸減しながら7日目に測定不能にまで減少する。この差違については諸種の要約が考えられるが、おそらく第1編及び第2編でえた実験成績から考察すると Atoxyl 標識健常家兎血清は、負荷後殆んど何ら家兎血中において抗原抗体反応を起すことなしに腎から排泄或いは諸臓器特に網内系に固定乃至貪喰されるに反し、Atoxyl 標識抗肝血清は、実験家兎体内においては一部網内系細胞に貪喰され、又一方諸臓器組織抗原と反応し、従つて臓器組織細胞結合肝抗体が家兎体内に長期間残存すると共に血中にも長期に検出されるものと推定される。一方抗肝血清負荷後の肝抗体は健常家兎血清負荷の際には肝抗体はみられないか、自然肝抗体価の動揺範囲内に止まるのに反し2ないし3日目に軽度の上昇を示しており、第2編において述べた成績と一致している。

次に諸臓器組織内の Atoxyl の量比について観察すると、Atoxyl 標識健常家兎血清負荷例にあつては、凡ゆる臓器に Atoxyl の存在を証明し、単位重量値では腎が最も高値で、次いで骨髄、リンパ腺の

順に証明するが、肝及び脾は最も低値を示し、腎の約 $1/15$ 以下となつてゐる。これを臓器全量についてみると、健常家兎の臓器平均重量値¹⁴⁾即ち肝が体重の4.14%に対し腎は0.36%であり、これより計算すればやはり腎は肝に対し優位を占める結果となる。即ち負荷された健常家兎血清は Atoxyl と共に主として腎よりの排泄され、他方骨髓、リンパ腺等諸臓器に固定されるものと考え、これに対し Atoxyl 標識抗肝血清負荷例にあつては、やはり単位重量当り腎が最も高値を示すが、健常家兎血清負荷例のそれに比べては低値であり、肝は腎に比して相対的に増量の傾向がみられた。これを臓器全量よりみれば、肝に4ないし5倍多く証明されることになる。このことは抗肝血清の肝に対する比較的臓器特異性を推定せしめるところである。又上述の実験における Atoxyl の臓器内分布はこれをすべて肝抗体の臓器親和性と解釈するには、更に詳細な検討が必要であるが、label された Atoxyl そのものが或る程度家兎生体にとっては毒性を持つものであり、生体反応として当然体外排泄乃至体内解毒作用を受ける点も考えられ、従つて Atoxyl で label された抗肝血清の臓器特異性についても同様の考慮が問題にはなるとしても、上述の実験結果より肝抗体は比較的臓器特異性を有するものと考えられる。一方 1949

年 Pressman⁴⁾ は抗腎血清に放射性ヨードを label したマウスの実験で、腎の皮質に放射性ヨードを証明すると共に、他の諸臓器にも同程度の分布を認め、肝臓にあつては最低値の放射性ヨードを証明しているが、いずれにしても上述の結果より抗臓器血清の臓器に対する絶対的特異性については全くこれを否定されなければならないが、相対的特異性を示すことは否定出来ない事実と考えられる。

IV. 論 論

Atoxyl 標識卵白 albumin により家兎を免疫してえた Atoxyl 抗体を使用して、Atoxyl 標識健常家兎血清並びに同種抗肝血清負荷後における家兎血中並びに臓器内の Atoxyl の消長を追求し、抗肝血清の絶対的臓器特異性は認められないが、比較的臓器特異性並びに臓器障害性が認められた。

稿を終るに当り終始御懇切なる御指導と御校閲の労を賜つた恩師小坂教授並に長島助教授に深甚なる謝意を捧げます。

主 要 文 献

- 1) J. R. Marrack: *Nature*, **133** (1934), 292.
- 2) M. Heidelberger: *J. exp. Med.*, **65** (1937), 885.
- 3) A. H. Coons: *J. exp. Med.*, **91** (1950), 1.
- 4) D. Pressman: *J. Immunol.*, **59** (1948), 141.
D. Pressman: *Science*, **109** (1949), 65. D. Pressman: *J. Immunol.*, **64** (1950), 281. D. Pressman: *J. Immunol.*, **65** (1950), 559.
- 5) A. G. S. Hill: *Brit. J. Exp. Path.*, **34** (1953), 27.
- 6) 赤堀・水島: 蛋白質化学, **3**, 共立出版。(昭和30年).
- 7) 緒方: 血清学実験法, 南山堂, (昭和22年).
- 8) 川越忠夫: 日本法医誌, **6**, 3~4, 別冊 (昭和27年), 153.
- 9) Heffter: *Handbuch d. experimentelle Pharmakologie*. III, 1.
- 10) K. Landsteiner: *Z. Biochem.* **93** (1919), 106.
- 11) F. Haurowitz: *Z. physiol. Chemie*, **205** (1932), 259. F. Haurowitz: *Z. physiol. Chemie*, **239** (1936), 76.
- 12) K. Muto: *Arch. f. exp. Path. u. Pharm.* **62** (1909), 494.
- 13) E. A. Kabat, M. M. Mayer: *Experimental Immunochemistry*, Thomas, Springfield. (1948)
- 14) 安東・田嶋: 医学研究(動物実験法), 朝倉書店, (昭和31年).

Serological Studies on the Liver Antibody

Part 3. Studies on the Azo-dye Labelled Liver Antibody

By

Mituhiko TANINO

Department of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director: Prof. Kiyowo Kiosaka)

With the use of Atoxyl antibody obtained from the rabbit immunized with Atoxyl labeled egg-white albumin the author traced the changes of Atoxyl in the blood and organs of the rabbit inoculated with Atoxyl labeled normal rabbit serum and homologous liver antiserum. As the results it has been clarified that the liver antiserum does not reveal absolute visceral specificity but it shows a relative visceralspecificity and also it tends to disturb the liver function.
