

結核アレルギーに関する実験的研究

その3 marked antigen としての Atoxyl-Azo-Tuberculin

国立福岡療養所(所長 佐々 虎雄博士)

九州大学医学部細菌学教室(主任 戸田 忠雄教授)

瀬川二郎

(昭和28年3月6日受付)

(本研究の一部は、第4回日本結核病学会九州地方会、第7回医務局研究発表会に報告した)

緒言

ツベルクリン蛋白を、そのままでは組織化学的に証明することが不可能であるかぎり、何等かのかたちでこれを mark し、その生体内における運命を追求してみた

いと考へ、Atoxyl-Azo-Tuberculin を合成した。

実験方法並びに実験成績

1 Atoxyl-Azo-Tuberculin の合成

砒酸とアニリンから Atoxyl を合成¹⁾する。この Atoxyl をジアゾ化²⁾したものを、ツベルクリン精製蛋白質 π³⁾ にカップリング⁴⁾したものが、Atoxyl-Azo-Tuberculin である。その方法の概略を第1~3表に示す。

このものの特徴は、砒素を含む dye-protein であり、ツベルクリンは、ここにはじめて砒素により mark されるにいたつた。

2 Atoxyl-Azo-Tuberculin の抗原性

モルモット 50 匹、家兎 10 匹について、その皮内反応を、旧ツベルクリン乃至カップリングに用いたツベルクリン精製蛋白質 π と、種々な条件下において、比較検討するに、Atoxyl-Azo-Tuberculin 100γ が π 50γ にほぼ近い力価を示す。

つぎに反応の消長をみるに、Atoxyl-Azo-Tuberculin は、時間の経過とともに消褪する傾向が、他のものに比して、やや強いようである。

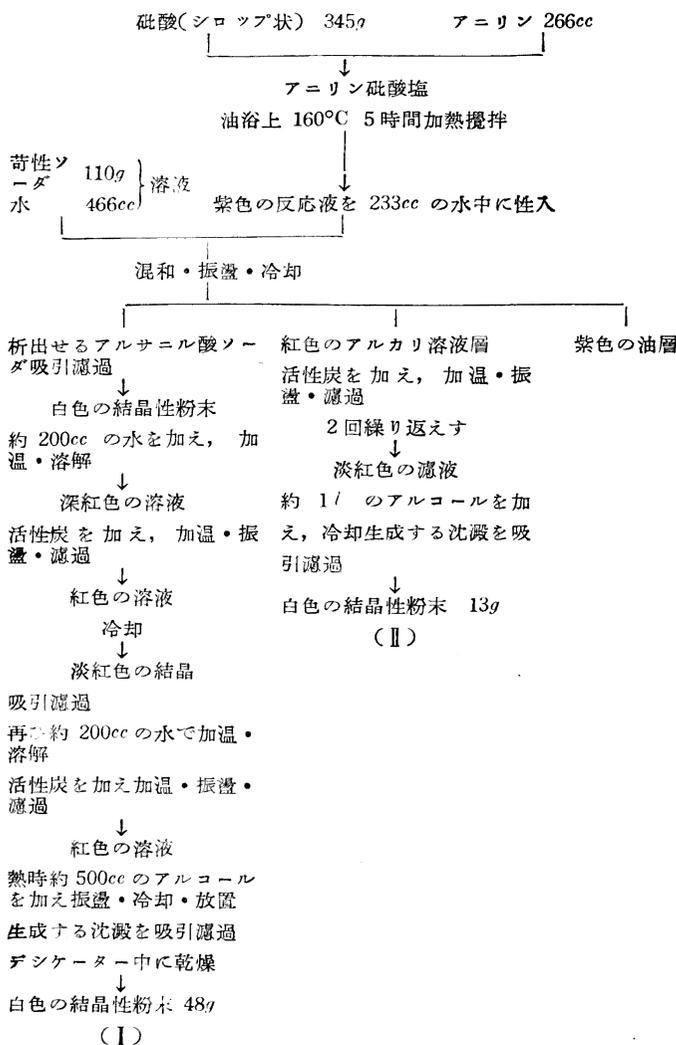
また Atoxyl-Azo-Tuberculin 4.0mg 皮下注入後3週目の家兎2匹について、旧ツベルクリン及び Atoxyl-Azo-Tuberculin で皮内反応を試みるに、硬結を認めることができなかった。

3 Atoxyl-Azo-Tuberculin の組織化学的証明法

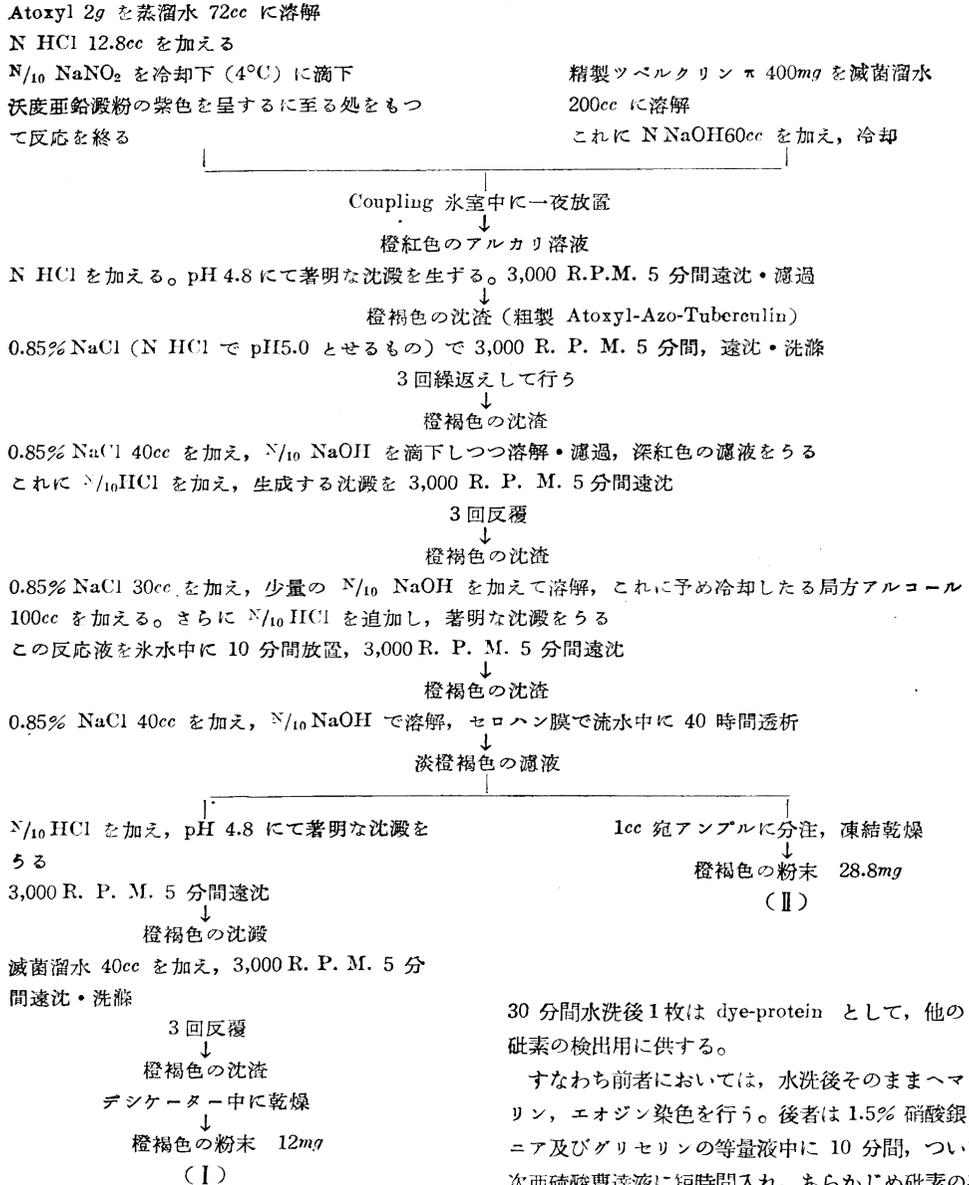
さきに報告せる「ふたがらす」法⁵⁾によるときは、Atoxyl-Azo-Tuberculin はそのままでも、貪食細胞内に、黄金色の光輝性顆粒として認められる。

さらにラベルされた砒素の組織化学的

第1表 Atoxyl の合成



第2表 Atoxyl のジアゾ化及び Coupling



検出法⁷⁾としては、Brunaur 法・Schümacher 法・田村氏法等があるのであるが、Brunaur 法は比較的時間がかかることより、また田村氏法はオスミウム酸が非常に高価な点より、「ふたがらす」法による砒素の証明には、Schümacher 法がもつとも簡便であろう。

Atoxyl-Azo-Tuberculin の 0.1% アラビアゴム加生理的食塩水溶液の所要量を、「ふたがらす」面上に滴下する。無菌室中に一夜乾燥し、塗抹面を外側にして重ねあわせたものを、2 枚一組として、実験動物背部皮下に挿入する。

経時的にふたたび取りだし、ホルマリンに一夜固定、

30 分間水洗後 1 枚は dye-protein として、他の 1 枚は砒素の検出用に供する。

すなわち前者においては、水洗後そのままヘマトキシリン、エオジン染色を行う。後者は 1.5% 硝酸銀アンモニア及びグリセリンの等量液中に 10 分間、ついで 1% 次亜硫酸曹達液に短時間入れ、あらかじめ砒素の染色を行うた後に、ヘマトキシリン、エオジンによる細胞染色を行う。

標本は、そのまま或いはアルコール、キシロールを通して、バルサムで封入する。

1 枚の「ふたがらす」面上の Atoxyl-Azo-Tuberculin 量は、家兎においては 0.2mg、モルモットでは 0.02mg とした。その全量は、家兎 4.0mg、モルモット 0.16mg である。

4 Atoxyl-Azo-Tuberculin 貪食細胞出現率

前述のごとく、実験動物に Atoxyl-Azo-Tuberculin を与え、貪食細胞出現の状態を観察した。すなわち「ふたがらす」面上にみられる細胞 200 個中、Atoxyl-

第3表 各種濃度 AAT と π との比較

モルモット番号	感 作 条 件	AAT 100γ	AAT 50γ	AAT 10γ	π 50γ
Nr. 19		9×9	8×8	5×4	13×13
Nr. 20	流バラ死	13×12	13×11	5×4	14×13
Nr. 21	菌	11×11	10×9	7×6	15×14
Nr. 22	10 mg	8×7	7×6	5×4	14×14
Nr. 23	筋肉内	11×9	9×8	7×6	17×15
Nr. 24	3 週	11×11	10×9	6×6	15×13
Nr. 25		12×12	8×8	5×4	16×15
Nr. 26		9×8	5×5	3×3	11×9
平均値		10.1	8.3	5.0	13.8

第4表 AAT 100γ と OT10×との比較

モルモット番号	感 作 条 件	AAT 100γ	OT 10×	
Nr. 27	BCG	5×5	16×16	14.3
Nr. 28	80mg 乱切	5×4	4.0 18×16	
Nr. 29	8週	3×2	10×10	
Nr. 30	BCG 80mg 乱切 8週	4×4	5.5 14×13	13.7
Nr. 31	+ H ₃₇ 0.02mg 筋肉 1週	8×6	15×13	
Nr. 32	BCG 2mg	3×3	7×5	8.0
Nr. 33	皮内 8週	4×3	3.0 8×8	
Nr. 34		3×2	10×10	
Nr. 35	BCG 2mg 皮内 8週	4×4	3.0 12×12	11.0
Nr. 36	+ H ₃₇ 0.02mg 筋肉 1週	2×2	10×10	

第5表 モルモットにおける AAT, π, OT 皮内反応の時間的推移

モルモット番号	感 作 条 件	ツベルクリン	24時間	48時間	72時間
Nr. 1	H ₃₇ 0.05mg	OT 10×	28×29	30×29	27×25
		AAT 20γ	11×9	6×5	4×3
Nr. 2	皮下 4週	OT 10×	28×24	29×29	26×25
		AAT 20γ	9×8	5×4	5×4
Nr. 3		OT 10×	30×28	30×28	22×22
		AAT 20γ	11×10	8×7	7×7
Nr. 5	H ₃₇ 0.05mg	π 200γ	30×25	30×27	23×23
		AAT 200γ	20×17	17×15	5×5
Nr. 6	皮下12週	π 200γ	21×20	20×19	20×19
		AAT 200γ	15×14	15×12	4×3

Azo-Tuberculin を貪食する細胞の数を、百分率で表わしたものが、第 6~8 表であり、その一例を図示したものが第 1, 2 図である。

結核未感染動物においては、経過日数とともに、Atoxyl-Azo-Tuberculin 貪食細胞の出現の増加を認め、5~7 日に至り最大値を示し、以後急激に減少する。こ

のことは dye-protein のままでも、砒素をトレーサーとする場合でも同様である。

これに反して、結核感染動物では、dye-Protein のままで追求するときは、5~7 日に至るも貪食細胞出現の著しい増加をみることなく、概ね一定した値をとり、砒素をトレーサーとしたものが、未感染群と同様な傾向を示すのと著しい相違である。

総括及び考按

Atoxyl のカップリングによるツベルクリン力価の減弱については、精製過程に伴う不可避的操作、Atoxyl 基の結合による分子量の増大、さらに Atoxyl 基の導入による反応面の立体構造の変化等を考慮しなければならない。したがってより正確な近似値をうるためには、種類の量的組合せにおいてカップリングせるものによる実験値を、さらに必要とするであろう。なおこれに附随して、非特異的要素の検討もまた忘れられない問題であろう。

Atoxyl-Azo-Tuberculin の免疫原性に関しては、少なくとも Atoxyl-Azo-Tuberculin 乃至旧ツベルクリンの皮内反応を指標とするかぎり、これを認めることができなかったのであるが、このことはツベルクリン自体がハブテンであるとすれば、当然の帰結と云わなければならない。

Atoxyl-Azo-Tuberculin 貪食細胞出現率が、モルモットにおいては最高 90% 近い値をとるのに反し、家兎ではたかだか 20 数%に過ぎないことは、両者における検索時の光学的条件を異にしていたことによるのが主たる原因と考えられ、モルモットの場合は、きわめて微細な顆粒まで追求しうる条件にあつたと云いうるであろう。

ただここで一考を要したいことは、動物の種属による結核感受性の相違というものが、結核菌乃至その分割に対するそれぞれの動物の有する貪食細胞の貪食能に、その原因の一つを求めることができはしないであろうか。反応の深さを規定するものの一つとして、貪食細胞の種属による貪食能の相違の検討は、今後の実験にゆずりたい。

Atoxyl-Azo-Tuberculin の貪食像を、dye-protein のままで追求するときは、結核感染群と未感染群との間に、その処理形式において顕著な相違の存することが認められる。

この事実は、さきに報告のせるごとく、感作動物の抗体条件先在による貪食細胞の抗原消化能力の昂進ということ仮定するならば、きわめて都合よく説明できる。すなわち非感作動物においては、生体内に導入された抗原を、貪食細胞によつて、いちおう摂取するのであるが、その分解処理にあつては、単なる非特異的反應として終始する。したがって、つぎつぎに出現する貪食細胞の貪食作用に比して、個々の細胞内にみられる消化の

第6表 AAT 貪喰細胞百分率 (家兔)

家兔番号	感作条件	細胞種	経過日数		1		3		5		7		10		14		28		
			百分率		p	P	p	P	p	P	p	P	p	P	p	P	p	P	
Nr. 27	—	偽好酸球	7.5		4.5		1.0		0		0		0		0		0		0
		単核球	2.0	9.5	6.5	11.0	17.5	18.5	9.0	9.0	8.0	8.5	5.0	7.5	6.0	6.0			
		巨細胞	0		0		0		0		0.5		0		2.5	3.5	4.0	4.5	
Nr. 28	—	偽好酸球	4.5		5.5		2.5		0		0		0		0		0		0
		単核球	2.0	6.5	1.5	7.0	6.5	9.0	21.5	22.5	8.5	9.0	8.0	9.0	5.0	5.0	4.0	4.0	
		巨細胞	0		0		0		1.0		0.5		1.0		0		0		0
Nr. 23	牛三輪 1.0mg 静注 30日	偽好酸球	4.0		7.0		0.5		2.5		0.5		0		0.5		0		0.5
		単核球	0.5	4.5	2.0	9.0	19.5	20.0	7.0	9.5	6.5	8.5	4.5	5.0	3.0	3.5			
		巨細胞	0		0		0		0		1.5		0.5		0		0		0
Nr. 29	同上	偽好酸球	4.0		2.0		3.5		2.5		0		0		0		1.5		1.5
		単核球	0	4.0	8.5	10.5	17.5	21.0	6.5	9.0	7.5	7.5	4.0	4.0	0.5	2.0			
		巨細胞	0		0		0		0		0		0		0		0		0

註：数字の上段は Brunaur 法，下段は Schümacher 法を示す

第7表 AAT 貪喰細胞百分率 (家兔)

家兔番号	感作条件	細胞種	経過日数		1		3		5		7(8)		10		14		
			百分率		p	P	p	P	p	P	p	P	p	P	p	P	
Nr. 30	牛三輪 1.0mg 静注 58日	偽好酸球	3.0		0		0.5		0		1.5		0		0		0
		単核球	0	3.0	10.5	10.5	6.5	7.0	5.0	5.0	1.5	4.5	4.0	4.5			
		巨細胞	0		0		0		0		1.0		0.5		1.5		1.5
Nr. 31	—	偽好酸球	0.5		3.5		2.5		0		0		0		0		0
		単核球	7.5	8.0	11.0	14.5	16.0	18.5	8.0	10.0	7.0	10.0	4.5	6.0			
		巨細胞	0		0		0		3.0		2.0		3.0		1.5		2.0

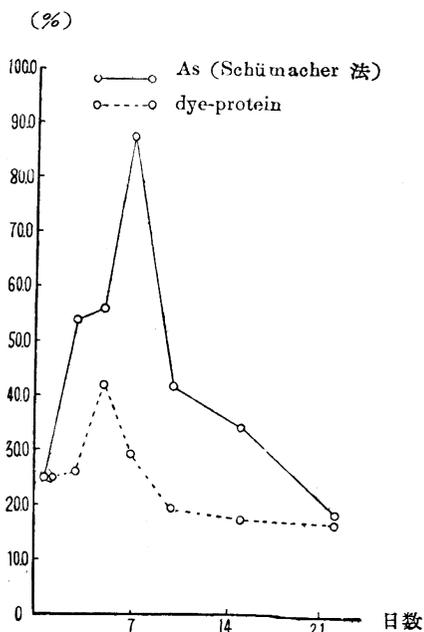
註：数字の上段は dye-protein, 下段は Schümacher 法を示す

第8表 AAT 貪喰細胞百分率 (モルモット)

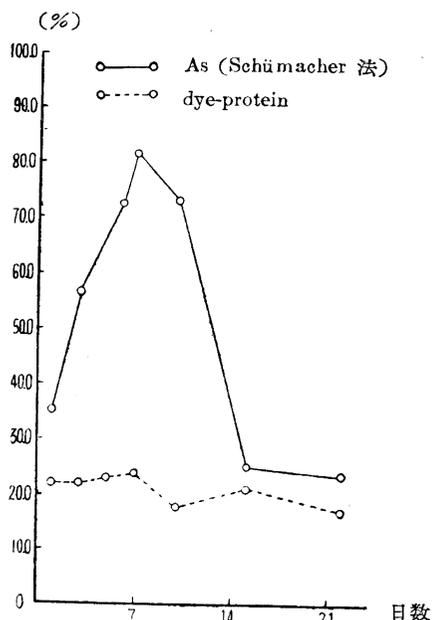
モルモット番号	感作条件	細胞種	経過日数		1		3		5(6)		7		10		15		22	
			百分率		p	P	p	P	p	P	p	P	p	P	p	P	p	P
Nr. 21	流バラ死菌 10mg 筋肉内 25日	偽好酸球	0		0.5		1.0		0		0		0		0		0	
		単核球	22.0	22.0	21.5	22.0	22.0	23.0	20.0	24.0	17.0	18.0	21.5	21.5	17.0	17.0		
		巨細胞	0		0		0.5		11.0		2.0		0.5		4.5			
Nr. 62 63	—	偽好酸球	1.0		0.5		0.5		0		0		0		0		0	
		単核球	24.0	25.0	25.5	26.0	41.5	42.0	26.5	29.5	19.5	19.5	17.5	17.5	17.0	17.0		
		巨細胞	0		0		0.5		3.0		1.0		0		0		3.5	

註：数字の上段は dye-protein, 下段は Schümacher 法を示す

第1図 非感作モルモット Nr. 62, 63



第2図 感作モルモット Nr. 20, 21



反応速度が緩徐なために、未消化抗原残留細胞として、相対的な蓄積像を示すのが、5~7日の姿である。これに反して、感作動物の貪食細胞内における抗原消化は、特異的の反応として急速に分解処理される。したがって蓄積像として、多数の貪食細胞の出現を認めることができない。

かかる見解にもとづいて、著者は前者を所詮修飾された異物処理形式と見做し、これに対して後者を抗原処理形式と呼んでいるのであるが、個々の細胞の有する抗原消化の化学が、まだ未開の領域に属するかぎり、なお多

くの問題を残しているであろう。

また Atoxyl-Azo-Tuberculin の貪食像を、砒素をトレーサーとして追求するときは、結核感染未感染いずれの群においても、単なる異物処理形式をとることは、消化の最終段階たる砒素の検索を行つているかぎり当然である。アゾ蛋白としての構造が破壊され、dye-proteinとしての性質を失い、砒素化合物のみが証明される段階の組織化学的検討は、また逆に個々の胞体内における蛋白消化の化学に、ひとつの形態学的証明を与える可能性をもたらすものであろう。

結 論

ツベルクリン蛋白の、生体内における運命を窺うためのよすがとして、Atoxyl-Azo-Tuberculin を合成した。このものの特徴は、砒素によつて mark された dye-protein である。したがつてその目的に応じて、あるいは dye-protein として、あるいは砒素をトレーサーとすることによつて、ツベルクリン蛋白の組織化学的検索に利用しうる。

「ふたがらす」法の展開は、貪食細胞胞体内の摂取抗原量乃至その貪食能の数的表現を可能ならしめた。感作、非感作両動物の抗原処理像の相違から、前者を抗原処理形式、後者を異物処理形式と呼び、前者を抗体条件の先に帰納せしめた。もちろん繰りかえし述べた如く、個々の細胞による抗原消化の化学が明らかならざるかぎり、その当否はしばらくおくとしても、抗原消化の過程を、いささかなりとも推察せしめるものとして、かかる marked antigen の利用は、ひとつの方法ではあるまいか。

御指導、御校閲を賜つた恩師戸田教授、並びに本研究の機会を与えられ、御校閲を辱うした恩師佐々博士に感謝いたします。

また Atoxyl-Azo-Tuberculin の合成にあつて御指導、御協力を賜つた薬学科西海技教授並びに吉名助手に厚く御礼申し上げます。

(本研究は厚生省特別研究費によるところが多い、記して謝意を表す)

文 献

- 1) Organic Synthesis, 67—69, 丸善, 昭 13.
- 2) P. Ehrlich und A. Berthein: Ber. d. chem. Gesellsch. in Berlin, 40, 3292—3297, 1907.
- 3) 武谷健二: 医学と生物学, 20, 200—202, 昭 26.
- 4) R. Ito and S. Koshimura: Jap. Med. J., 1, 427—430, 1948.
- 5) H. Okamoto: Ann. Rep. of Resear. Instit. of Tuberc., Kanazawa Univer., VIII, part II, 1949.
- 6) 瀬川二郎: 結核, 26, 309—313, 昭 27.
- 7) 森 優: 組織化学の理論と方法, 21—22, 南山堂, 昭 26.