



Title	抗体産生機構に関する免疫病理学的研究：Ⅰ．蛍光抗体法による結核動物組織内ツベルクリン蛋白抗体の証明
Author(s)	奥山, 春枝; OKUYAMA, Harue; 浜田, 栄司 他
Citation	結核の研究, 21-22, 13-24
Issue Date	1965-03-25
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26753">https://hdl.handle.net/2115/26753</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	21_22_P13-24.pdf



## 抗体産生機構に関する免疫病理学的研究

### I. 螢光抗体法による結核動物組織内ツベルクリン蛋白抗体の証明

奥山春枝・浜田栄司・森川和雄

(北海道大学結核研究所病理部 主任・森川和雄教授)

(昭和40年1月15日受付)

免疫反応における抗体の産生に関する研究は、血清学的な追及から、今や組織乃至細胞レベルの研究として進められるようになってきた。それには Landsteiner の Azo-蛋白の合成, Coons の螢光抗体法の考案, 更に isotope 使用による radioautography の利用が大いにこの研究の発達に効果をもたらしている。特に Coons が1942年<sup>1)</sup>に fluorescein isocyanate で標識した抗体 globulin により、直接法及びサンドイッチ法で組織内の抗原及び抗体の追求をする一連の実験をしており、異種蛋白あるいは多糖体抗原の体内分布が明らかにされ、それに対する反応としての抗体産生細胞の出現を、脾及び所属リンパ節に証明している。しかし、fluorescein isocyanate は合成がむずかしく、不安定なために、広く利用されることがなかったが、Riggs<sup>2)</sup> が isothiocyanate を合成することに成功して以来、容易に各方面に応用されるようになってきた。

螢光抗体法は、このように組織内抗原の追及に広く用いられており、異種蛋白あるいは多糖体抗原から、細菌菌体、更にはリケッチャまたは virus の細胞内証明など殆んどどの抗原に応用されている。一方、抗体の証明にも多数の研究がなされており、特に最近では自己免疫疾患への応用と、抗体産生機構解明への手段としての利用が著しく盛んになっている。

現在までの多数の抗体証明に関する報告をみると、血清抗体を産生する速時型反応時の抗体産生細胞の証明が主である。免疫反応として、速時型反応と対立して考えられている遅延型反応については殆んどなされていない。特に、螢光抗体法利用による結核症の組織内抗体の証明に関する報告は見られない。遅延型反応系では血清内に

抗体が証明されず、Chase<sup>3)</sup>により初めて細胞によって免疫の passive transfer が成功したのであるが、これらの細胞がどのような免疫学的活性因子をもっているのか興味のある問題である。transfer に有効な細胞である腹腔細胞について、Gillisen<sup>4)</sup>が結核死菌感作モルモットの細胞がツベルクリンを抗原として、螢光抗体法で陽性に染色されることを報告しているが、その他の報告は見当たらない。

本来螢光抗体法は、免疫-globulin を螢光色素で標識したものをを用いて、抗原あるいは抗体を証明する方法であるから、血清内に抗体を証明出来ない遅延型反応の組織内抗体を本法でみつけ出そうとすることは、理論的に困難であると思われる。しかし、遅延型反応をおこす代表的疾患である結核症においても、各種の血清反応に関与する抗体は明らかに血清内に証明され、又、ツベルクリン反応自体にも速時型因子のかかなりの関与があることを考えると、結核においても組織内に抗体産生細胞が証明される可能性が強い。我々はここで、再感作時の兎あるいはモルモットの主に脾及びリンパ節内に螢光抗体法により抗ツベルクリン抗体産生細胞を証明し、更にその反応にあずかる特異的抗原の吟味をした成績を述べる。

### 実験材料

#### 1. 抗原

螢光抗体法染色のため及び皮内反应用の抗原は、表1のようにして作ったツベルクリン蛋白及びツベルクリン多糖体を用いた。われわれはこれをそれぞれ TPt 及び TPs と称している。これらの抗原を螢光染色に用いる際は、TPt 2mg/ml, TPs 0.1mg/ml の濃度のものに、兎

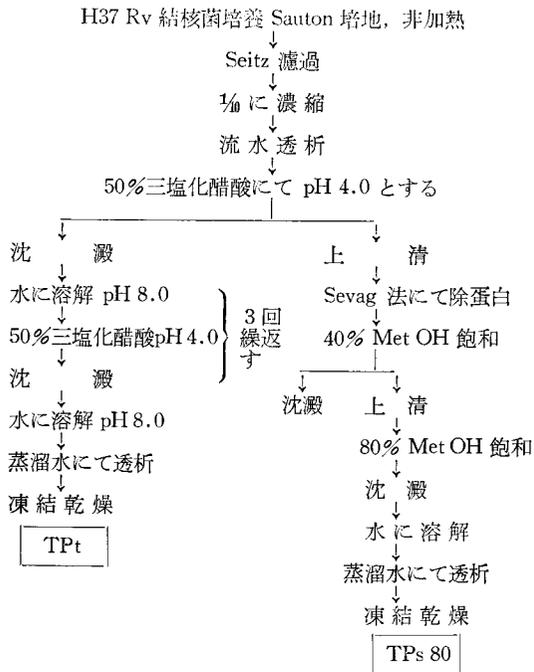
1) Coons, A.H., Creech, H.J., Jones, R.N. & Berliner, E. : J. Immunol., **45**, 159 (1942).

2) Riggs, J.L., et al. : Amer. J. Clin. Path., **34**, 1081 (1958).

3) Chase, M.W. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med. : **59**, 134 (1945).

4) Gillisen, G. : Revue d'Immunologie, **27**, 43 (1963).

表1 抗原の作製



肝粉末を 100 mg/ml の割合に加えて, 抗原の組織への非特異的吸着性を除いてから使用した。

又一部の試験では, 蛋白分解酵素 pronase (科研) を蛋白量の 1/200 量加え, 37°C 24 時間作用させて消化し, そのあと 80°C 10 分加熱して酵素作用を不活性化し, 13,000 廻転 30 分冷却遠心後上清を抗原として用いた。この方法で約 50% の蛋白が消化された。

## 2. 抗体

H37Rv 結核死菌 5 mg/ml 浮遊液に, Arlachel 1; Drackeol 9 の割合に混合した adjuvant を等量加え, その 2 ml を 5 日おき 4 回家兎臀部皮下に注射して感作した。随時採血して, 沈降反応重層法で抗体価を測定し, 128 倍陽性以上の抗体価を示した家兎より全採血により血清をえた。

この抗血清より, 硫酸矽飽和で沈澱させたものを抗体  $\gamma$ -globulin として用いた。

## 3. 螢光色素

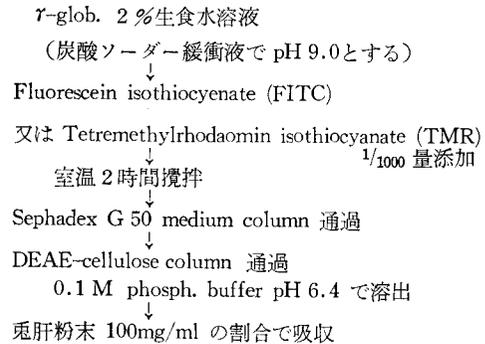
結晶性の fluorescein isothiocyanate (BBL) 又は tetramethylrhodamin isothiocyanate (BBL) を蛋白の標識に用いた。

## 4. 螢光抗体液及び抗原液の作製

螢光抗体液の作製は, 鈴江・浜島<sup>5)</sup> の螢光抗体法に大略のつとって行なった。

この螢光抗体液の F/P 比は 1~2 で, 染色には 3~5 倍に稀釈して用いた。

表2 螢光抗体液の作製



螢光抗原液は, 抗体液と同様な方法で TPt を FITC で標識した。その精製は, 流水及び蒸留水で十分に透析して遊離の色素を除き, 最後に緩衝生食水で透析した。このものの F/P 比は 0.64 であった。

## 実験方法

### 1. 実験方法

第 I 実験: H37 Rv 結核死菌感作後 4 週以上経過した兎の耳静脈に, 同死菌 5 mg (乾燥量) を 1 ml 生食水浮遊液として注射し, その後 3, 5, 7 及び 10 日目に屠殺して, 脾, リンパ節 (主として側腹リンパ節) 及び肺をとり出して 95% ethanol 固定をし, 低温で脱水, クロロホルムを通じてパラフィンで包埋, 4  $\mu$  の切片を作製した。又一部の試験では cryostat により凍結切片を作製した。これらについて螢光抗体法により抗体保有細胞の出現をしらべ, 更に hematoxylin-eosin 染色及び methylgreen pyronin 染色で組織学的検索をした。

屠殺前に採血して血清抗体価をしらべた。

結核死菌感作モルモットの各組織についても, 兎と同様にしてしらべた。

第 II 実験: この実験で証明される抗体産生細胞の特異的抗原抗体系を求めめるために, 次の方法を行なった。抗体産生細胞の多数みられた脾及びリンパ節切片を, 抗原として TPt 及び TPs を用いてサンドイッチ法で染色, あるいは pronase (蛋白分解酵素) 消化 TPt 又は TPs を抗原として染色, 更に FITC TPt, TMR TPt, FITC TPs 及び TMR TPs をそれぞれ組合わせて二重染色をしてそれぞれに染色される細胞を隣接する切片または同一切片上で比較して検討した。

5) 鈴江・浜島: 螢光抗体法, 医学書院, 東京大阪 (1963)。

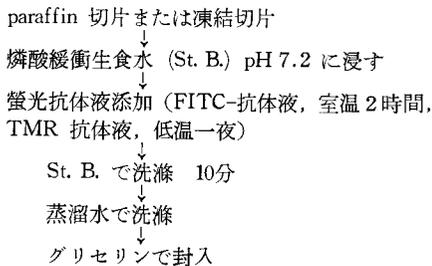
第Ⅲ実験：結核死菌感作兎及び正常兎の皮内に、TPt 250 r 又は FITC TPt 250 r を注射して、3, 24, 48, 72時間, 5, 7, 10及び14日後に反応皮膚を切除して凍結切片を作製して、螢光抗体法による抗原、抗体の追及及び hematoxylin-eosin 染色, methylgreen-pyronin 染色による組織学的検索をおこなった。

### 1. 螢光染色法

#### i. 抗原の証明(直接法)

抗原の証明は直接法により、次の様にして行なった。なお、螢光標識抗原で皮内反応した場合は、未処置の切片をグリセリンで封じて鏡検した。

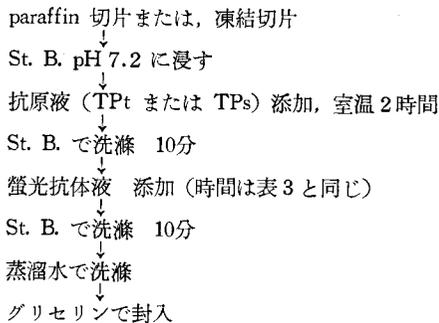
表3 抗原の証明法



#### ii. 抗体の証明(サンドイッチ法)

抗体の証明は4表に示すようにして行なった。

表4 抗体の証明



#### iii. 螢光抗体染色における対照

螢光染色法で染まった抗原又は抗体が特異的に染色されたものであることを証明するために、次の対照染色を同時に行なった。

- ① FITC Tbc  $\gamma$ -globulin で染色 (抗体染色の対照)
- ② in vitro であらかじめ特異抗原で吸収した FITC Tbc  $\gamma$ -globulin による染色
- ③ FITC Tbc  $\gamma$ -globulin で染色する前に、標識していない Tbc  $\gamma$ -globulin をあらかじめ作用させる抑制試験

- ④ TPt の代わりに、非特異的抗原である卵白アルブミンの使用
- ⑤ 非特異的抗原抗体系である卵白アルブミン系による染色
- ⑥ FITC-抗卵白アルブミン抗体による染色
- ⑦ 正常組織の染色

以上の対照染色が全部陰性の時にのみ陽性の染色成績とした。以下成績の記載は全く特異的染色態度のみを述べる。

### 3. 検鏡及び撮影

光源には千代田高圧水銀灯装置を用いた。フィルターは励起フィルター BV 吸収フィルターは Y の組合わせ、あるいは両フィルター共 UV を用いた。写真撮影は、フジカラー ASA 100 のフィルムを用い、1分乃至1分30秒露出で撮影した。

### 4. 血清抗体価の測定

屠殺時に採血した血清について、TPt を抗原として沈降反応 (重層法, 抗血清稀釈), Middlebrook-Dubos 血球凝集反応及び Boyden 血球凝集反応を行なって抗体価を測定した。

## 実験成績

### I. 結核菌再注射後の組織所見

#### 1. 家兎における成績

結核死菌感作兎耳静脈に、同死菌 5 mg を注射したあとの各経過日数後にみられる抗体保有細胞の所見を5表に示した。

脾では3日後すでに、濾胞周辺及び髄索内に多数の抗体保有細胞が光っているのがみられた。その細胞の分布を見ると濾胞では、辺縁にそって帯状乃至集団状に増殖しており、その他小血管を囲んで大量に光ってみられた。髄索には一般に瀰漫性に増殖していた。なお、胚中心には染まった細胞はみられなかった。これらの細胞は5日目に特に大量に出現し、7日以後はやや減少した。個々の細胞は円形で、細胞質が円形の核の周辺を細く囲んでいるものから、核が偏在して細胞質の豊富なもので種々の段階のものがみられ、何れもその細胞質が瀰漫性に螢光色素にそまっている。核は染まらなかった。methylgreen-pyronin 染色でこれらの細胞は何れも形質細胞に相当する。また、これらの他に、細胞質が粗な顆粒状に光る Russell body 型の形質細胞も多数みられた。Russell body は、前述の抗体保有細胞の中にばらばらと散在したり、あるいは、場所によってはこの型のみで集団をなしていたりするのがみとめられた。定型的な

表 5 組織の螢光抗体染色所見

動物種類	動物記号	抗原		再注射後日数	螢光の強さ ( ) Russell Body			血清抗体価			
		感 作	再 注 射		脾	リンパ節	肺	沈 降 反 応	MD 反 応	Boyd 反 応	
兎	g T	加熱死菌	死菌死菌	3	++(+)	±	-	32	640	160	
	n T	〃	〃	〃	+	卅	-	8	80	<10	
	f T	〃	〃	5	卅(卅)	-	-				
	j T	〃	〃	〃	卅(卅)	+	-	16	160	20	
	g A	Egg alb. + acetone 死 菌	acetone 死 菌	7	卅(卅)	++(+)					
	a T	acetone 死 菌	〃	〃	+(+)	+	++				
	b T	〃	〃	〃	-	+	卅				
	e T	加熱死菌	加熱死菌	〃	++(+)	+	-	16	160	80	
	k T	〃	〃	〃	+	-	±	32	80	10	
	c T	TP t	TP t	〃	-	-	-				
	d T	〃	〃	〃	±(+)	+	+	16	640	80	
	i T	加熱死菌	加熱死菌	10	卅	+	+				
モルモット	o T	〃	〃	3	+	卅	-	1	<10	<10	
	l T	〃	〃(皮下)	5	+	-	-	1			
	g T	〃	〃	〃	±	±	-	-	<10	<10	
	m T	〃	〃(皮下)	7	+	+	-	8	<10	<10	

Marscharko 型形質細胞及び Russell body は螢光度が非常に高く強くそまった。methylgreen-pyronin 染色では、この様な脾の濾胞周辺及び髓索内に多数の形質細胞の増殖があり、これらの細胞が螢光色素に染まっている様に見える。しかし、methylgreen-pyronin 染色では、細胞質が Pyronin 好性に染まる細胞は、核が円型で大きく、細胞質のわりあい少ないものから、定型的な形質細胞迄、種々の段階のものがみられるが、螢光染色では、これらの細胞全部が光ってみえるのではなく、細胞の形に関係なく、その1部の細胞だけが抗体染色陽性を示した。

リンパ節は、脾より抗体保有細胞の出現は不定であり、また、あまり多くはなかった。その出現場所は濾胞周辺と髓索内であるが、脾に比し髓索内の増殖が強く、より瀰漫性にみられた。その細胞の形は脾と同様な円形細胞で、Russell body は少なかった。そのような抗体産生細胞の豊富なリンパ節では、methylgreen-pyronin 染色で、髓索内の細胞が殆んど pyronin 好性細胞におき代わられた様にみられた。

肺では、抗体保有細胞は7日以後に始めてみられ、

その出現場所は、気管支リンパ節内に1, 2個づつ散在性に、あるいは、結核結節の周辺に集団をなしてみられた。リンパ節内にみられた細胞は形質細胞の形をしていたが、結核結節の部分では、形質細胞の形をとるもの他に、細胞外に存在する不定型のものが多数染色された。これは、細胞の大きさより小さく、かなりよく光っており、抗体産生細胞のこわれた1部であるか、あるいは、分泌された抗体の塊であるかは判定が困難であった。

以上の実験動物の感作抗原は、殆んど加熱あるいは acetone 死菌を用いたが、cT, dT の2羽の兎だけは TPt で感作し、再静注も TPt を用いた。cT は全く抗体保有細胞がみられず、dT には僅かにみられた。これは TPt の感作が弱かった為と思われる。

以上の螢光所見による抗体保有細胞の量と、血清抗体価を比較すると、何れの血清反応においても平行関係はみられなかった。

## 2. モルモットにおける成績

兎と同様に、加熱死菌感作モルモットに、同じ死菌 0.5 mg を皮下又は静脈内に接種したあとの各臓器の

所見を5表に示した。

脾では濾胞周辺、髄索内あるいは洞内に抗体保有細胞がみられるが、兎に比し光度が弱く、又、数も少なかった。しかし、その形態は兎にみられたものと同様であった。又、再注射の経路が皮下でも静脈内でも変わりがなかった。

リンパ節の染色成績は不定であるが、3日後に屠殺した oT が非常に大量の抗体保有細胞の増殖を示していた。その分布は、兎と同様に濾胞周辺と髄索内で瀰漫性にびっしりと増殖していた。Russell body はみられず、殆んどが核の偏在する形質細胞の形を示していた。このリンパ節の methylgreen-pyronin 染色では、pyronin 好性細胞の瀰漫性の強い増殖がみられた。

肺では抗体保有細胞が証明されなかった。

モルモットの血清抗体価は非常に低いために、蛍光所見と比較できないが、oT のようにリンパ節に大量の抗体保有細胞のある例でも血清抗体価は低かった。

## II. 蛍光染色陽性抗原抗体系の吟味

蛍光染色でそまる抗体は、抗原に用いた TPt すなわち、ツベルクリン蛋白に対する抗体であるか、あるいは TPt の中に約2% (Anthrone 法, glucose に換算) に含まれる多糖体に対する抗体を示すものかを種々の方法で吟味した。染色した切片は、主に jT の脾と oT のリンパ節を用いた。

### 1. ツベルクリン多糖体 (TPs80) による反応

TPs80 は、生ツベルクリンから蛋白と、40% methanol 飽和でおちる多糖体を除いたあとに、80% methanol 飽和でおちる多糖体であり、沈降反応抗原性が非常に高い。この 0.1 mg/ml の濃度のものを蛍光染色サンドイッチ法の抗原として用いると、TPt を抗原として用いたと同様に、強く且つ多数の抗体保有細胞を証明することが出来た。両者の方法で染まる細胞は同じ形態であり、又、同じ位置に出現していた。

更に同一切片を用いて、最初に TPt を抗原として染色し、その写真撮影をしたあと、今度は TPs を抗原として二重に染色して前と同じ部を撮影して比較すると、染色されるのは両写真全く同じ細胞で、TPs 抗原で新たに染色された細胞はみられなかった。又、TPs 抗原で先に染めて、あとで TPt 抗原で染めた場合も全く同じで、両抗原のうちの何れかで単独に染められる細胞はみつけることができなかった。

### 2. 蛋白分解酵素による抗原の消化試験

蛋白分解酵素 pronase を TPt 量の 1/100 量加えて 37°C に 1 日おいてから 80°C 10 分加熱して酵素作用を非活性化

した後、抗原として蛍光染色に用いた。この処置により蛋白成分は約50%消化された。これを抗原として染色すると、消化前の TPt を抗原とした時と同程度か、むしろ光度が強くなる成績がえられた。すなわち、蛋白濃度が50%減少しても染色所見には全く影響を与えなかった。

同じく TPs80 を pronase で同様処置して抗原として用いた場合も、蛍光抗体染色性は、消化しないものと全く変化がなかった。

更に、消化した TPt を抗原として染色したあと、未消化 TPt 又は TPs80 で染色したもの、あるいは消化 TPs80 で先に染色したあと、未消化 TPs80 又は TPt で染色したものの相互の写真の比較では、何れも全く同一の細胞が染色されており、後染色時に新しい抗体細胞を証明することが出来なかった。

## III 皮内反応における抗原抗体の追及

成績は表6にまとめた。

表6 ツベルクリン反応部の抗原及び抗体の追及

皮内反 抗 動物 証明 経過 時間	非 螢 光 TPt				螢 光 TPt	
	結 核 兎		正 常 兎		結核兎	正常兎
	抗原	抗体	抗原	抗体	抗原	抗体
3 時 間	+++	-	++	-	+++	+++
24 "	+++	-	+	-	+++	++
48 "	+++	-	+	-	+++	++
72 "	+++	-	+	-	++	++
5 日	+	+	+	-	+	++
7 "	±	++	+	-	+	++
10 "	±	++	+	-	-	+
14 "	-	++	+	-	-	-

### 1. 抗原の追及

螢光色素 FITC で標識した TPt による反応の場合も、TPt を注射して直接法で抗原を追及した場合も同様な成績であった。

結核兎皮内反応部においては、注入抗原を最初にしらべた3時間目から72時間目まで、皮膚中間層及び深層の結合織間に大量にみられ、特に中間層の浮腫の強い所に多くみられた。抗原は集塊状になり、TPt 注射3時間後では浮腫液の中に、沈降物を形成しているのがみられた。その他組織球にとられて顆粒状に光る抗原物質が、

浮腫部に特に強く、皮膚表層から深層まで散在してみられた。5日以後次第に抗原量が減少し、組織球にとられたものが、その特有の色調を失ないつつ減少していき、10日目以後殆んどみられなかった。しかし、表層の組織球にとられたものは最後まで残っていた。

正常兎皮内注射部では、接種抗原は3時間後は結合繊維の周囲に線状乃至網目状に瀰漫性に入りこんでいた。その他に組織球にとられて表層及び深層に僅かにみられた。その後も大部分が組織球にとられた形で全層にわたり様に散在していたが、結核兎のように集塊状をなすことはなく、又、量も少なかった。しかし、組織球にとられた形で、その特有の螢光色調を保持したまま特に深層に長くみとめられ、TPt注射部には14日目も組織球内に僅かながら残っているのがみとめられた。

## 2. 抗体の証明

抗体はサンドイッチ法で染色したが、螢光標識 TPt による反応部では、抗原物質と重なり合って鑑別がむずかしいので、非標識 TPt 注射部についてのみ検索した。

正常兎では14日目になっても全く抗体及び抗体保有細胞をみとめることが出来なかった。

結核兎では、抗原の減少し始めた5日目に突然全層の結合繊維周囲が線状に光る形で抗体が証明されるようになり、日数の経過と共に次第に量を増してくるのがみられた。その間、抗体保有細胞は認めることが出来なかった。

## 総括及び考按

結核感染時に、組織細胞（主に単核細胞と考えられている）自体が免疫され、何らかの変化を来しているということは、それらの細胞によってのみ passive transfer が可能であることから明らかである。その変化ということは、その細胞が抗体産生能力を持っているということか、抗体を単に保持している状態なのか、あるいは一般の抗体という概念とは異なる細胞のある変調を来したということなのかは未だ説明されてはいない。そこでわれ

われは、一応細胞が抗体を産生している、あるいは保持しているという状態を想定して、これを螢光抗体法を利用して証明しようと試みたのである。

結核を離れて、螢光抗体法による抗体の証明に関する多くの報告をみると、先ず Coons 一門の仕事がとり上げられるであろう。彼らは抗原の体内分布の研究のあとに1953年からサンドイッチ法の考案<sup>6)</sup>により、抗体証明にそのほこ先を転じている。その抗原としては、卵白アルブミン、人血清  $\gamma$ -globulin, diphtheria toxoid のような異種蛋白を用いて、兎又はモルモットの各臓器内の抗体産生細胞を追及している<sup>7,8,9,10)</sup>。その後、わが国においても浜島を中心として活発な仕事が行なわれるようになり、抗原の追及について抗体産生細胞の証明がなされている<sup>11,12,13)</sup>。これら両者の報告による成績は殆んど一致しており、何れも脾、リンパ節の髄質及び濾胞周辺に集団性又は散在性に抗体産生細胞が出現することを報告している。その他肝あるいは腸のリンパ装置内に陽性細胞をみとめている。これらの陽性細胞は、形質細胞であるということは一致した所見であり、White<sup>14)</sup>は *Proteus vulgaris* を抗原として、マウスの脾に定型的な形質細胞の他に Russell body 型の形質細胞をみとめ、この Russell body の主成分は抗体であることを報告している。

以上の報告の異種蛋白感作動物の臓器にみられたと同様な所見が、われわれの結核死菌感作動物においてもみられている。再注射は静脈内に行なったために、われわれのしらべた範囲内では脾が一番強い反応を示し、抗体保有細胞は脾濾胞周辺に集団状又は、散在性に多数みとめられ、その他髄索内にも同様に出現する。特に小血管の周囲をとり囲んで増殖しているのがしばしばみられている。抗原静注のせいか、リンパ節は脾のように全例一定した強さではなく、抗体保有細胞の増殖の強い例と僅かしかみとめられない例があるが、その出現場所は髄索に強く、濾胞周辺にはやや弱くみられている。抗体反応の程度は初感作より再感作の方が強く<sup>7)</sup>、その出現時間は再感作時は2日後からすでに抗体陽性細胞が出現すると

6) Coons, A. H., Leduc, E. H. & Connolly, J. M. : Fed Proc., **12**, 439 (1953).

7) Coons, A. H., Leduc, E. H. & Connolly, J. M. : Science, **118**, 569 (1953).

8) Coons, A. H. & Connolly, J. M. : J. Exp. Med., **102**, 49 (1955).

9) Leduc, E. H., Coons, A. H. & Connolly, J. M. : J. Exp. Med., **102**, 61 (1955).

10) White, R. G., Coons, A. H. & Connolly, J. M. : J. Exp. Med., **102**, 73 (1955).

11) 浜島・京極・平松・吉田・中島：日病会誌，**45**，375（昭31）。

12) 中島・吉田・平松・京極・浜島：日病会誌，**46**，424（昭32）。

13) 中島：日本体質学雑誌，**25**，515（昭35）。

14) White, R. G. : Brit. J. Exp. Path., **35**, 365 (1954).

いわれている<sup>6)</sup>。われわれの再感作の実験では3日後から観察を始めたのであるが、脾、リンパ節に既に陽性細胞の出現をみ、5日目更に光度と量をました最高の反応がみられ、以後次第に減少を示すようであった。

その抗体陽性細胞の種類は、Coons及び浜島らと同様に、pyronin好性の細胞質をもち、核の偏在した定型的な形質細胞とみなされるものが光度も強く数も多い。その他に、初期には細胞質が少なく、核が中心性で大きく、光度の弱いものが多く、これはpyronin好性の細胞質をもち形質芽細胞とみなされうる。又、特に脾に多くみられたが、Whiteが*Proteus vulgaris*で述べたと同様な多数のRussell bodyの出現が殆んど例にみられたことも、これらの陽性細胞が形質細胞であることを示していると考えられる。肺においては抗体陽性細胞は他の2臓器に比しはるかに少なく、その陽性例は7日目頃、即ち、結核結節の形をなした病巣の周辺に、形質細胞の形態をとるものが染色されている。その他に、気管支周囲のリンパ節内に時に1、2個みられるものがある。田中<sup>15)</sup>がマウスに*Salmonella enteritidis*を注射してその肉芽腫細胞の中に抗体保有細胞を証明し、ある特定の状況下においては大食細胞や、リンパ球も抗体を産生するといっている。チフス肉芽腫における陽性細胞も大食細胞であるといっているが、われわれの脾、リンパ節の例でも、又、肺の結節の例においても、陽性細胞はその形態及び染色所見より形質細胞に属すると考えられ、リンパ球あるいは大食細胞と思われるものは染色されなかった。

形質細胞は血清抗体特にIgG(7S  $\gamma$ -globulin)を産生するというのが定説であるが、血清抗体産生の非常に弱いモルモットにおいてはどうかということは興味のあることである。われわれの例においては、脾には陽性細胞が少なかったが、1例においてリンパ節に非常に沢山の形質細胞の増殖を示し、この細胞が抗体陽性であることをみとめたが、沈降反応抗体価は血清原液でやっと陽性を示す程度であった。勿論、抗体産生場としては骨髄が最も重要であると思われることから、兎の例におけるように抗体価と脾あるいはリンパ節の抗体保有細胞の量の間に関係がなくてもよいと考えられるが、モルモ

ットのように血清内抗体の少ない動物で、このような大量の抗体保有細胞のみられることは何らかの意義がありそうである。なお、Miller<sup>16)</sup>は、結核菌体蛋白を腹腔内に注射して、大網に多数の形質細胞が出現してくることを報告しているが、われわれのTPt感作例では、脾内の形質細胞は結核死菌再注射例に比し非常に少なかった。これは、TPtによる感作状態の弱いことによるのであろう。結核においても、異種蛋白感作と同様に、抗体産生乃至保有細胞は形質細胞であるということは興味のあることである。これについては後に考按したい。

次にツベルクリン皮内反応部の抗原と抗体の追及であるが、今回の実験に用いた抗原量が250 $\mu$ gとやや大量であったため、結核兎は勿論正常兎においても、初期には皮膚深層及び中間層に強い浮腫と多形核白血球の浸潤がみられた。しかし、それらの抗原の分布の状態には著明な差があり、結核兎の反応部特に浮腫部に初期に抗原抗体沈降物様の蛍光陽性のものが形成され、又正常兎より大量に、集塊状をなして局所に保留されているが目立っている。しかも、正常兎では組織球にとられた状態に特有の螢光色調を保持したまま長く局所に残っているのに反し、結核兎では5日目以後急激に減少消失を示している。この消失時期と一致して結核兎にのみ線維束周辺に抗体を証明することが出来る。これらの所見は、結核兎においては注射されたTPtが、先ず局所において体液性抗体と結合してその場に沈降し、抗原としての活性を失ない、一方組織球にとられた抗原も速やかに細胞内で処理されることを示している。そして、抗原と結合しているために、組織内に証明出来なかった抗体が5日目からは大半の抗原が局所から消失することにより初めて過量となった抗体が染色されるようになると思われる。この皮内反応経過は、浜島ら<sup>17)</sup>及びKyogoku<sup>18)</sup>の報告した卵白アルブミンを抗原としたArthus現象と全く一致した所見である。ツベルクリン反応は遅延型反応の代表とみなされているが、その抗原物質の中に速時型反応をおこす物質もかなりあり<sup>19), 20)</sup>、当然その反応は両反応の混合型を示すことになる。従って螢光抗体法で速時型と同じような抗原抗体の推移がみられても不思議ではないが、そこに何らかの差異がみとめられることを期待

- 15) Tanaka, N., Yamaguchi, H., Nishimura, Y. & Yoshiyuki, T. : Jap J. Microb, 4, 434 (1960).
- 16) Miller, F. R. : J. Exp. Med., 54, 333 (1931).
- 17) 浜島・林・高橋・京極 : アレルギ- , 4, 162 (1955).
- 18) Kyogoku, M. : Acta Schol. Med. Univ. in Kyoto, Jap., 38, 71 (1962).
- 19) 奥山・太田・森川 : 結核の研究, 北大, 15, 45 (昭 36).
- 20) 奥山・太田・森川 : 結核の研究, 北大, 17/18, 7 (昭 38).
- 21) 奥山・太田・森川 : 結核の研究, 北大, 20, 19 (1964).
- 22) White, R. G. : Nature, 182, 1383 (1958).

したが、今回の方法ではみつけることが出来なかった。

なお標識 TPt と非標識 TPt を皮内反応に用いた場合に若干の差異が認められた。その原因の一つとして組織あるいは細胞内で FITC と蛋白質との分離が起る可能性が考えられる。蛍光陽性物質は FITC であって決して蛋白そのものでないということを常に念頭においておかねばならない。これはひとり蛍光抗体実験に限らず、同位元素実験でも同様であろう。この問題については別報で取り上げる予定である。

最後に、蛍光抗体法で証明された抗体は、ツベルクリン蛋白のいかなる成分に対する抗体であるかが問題となる。ツベルクリン反応抗原は蛋白成分であることは、Seibert の研究以来、またわれわれもすでに報告<sup>20)</sup>したように明らかなことである。しかし、われわれの抗原として使った TPt の中には、大部分の蛋白成分の他に約 2% の多糖体が含まれている<sup>21)</sup>。このような混入多糖体量は PPD その他の従来のツベルクリン蛋白画分に比べて決して多いものではない。しかしこの多糖体成分はツベルクリン反応時に速時型の反応をおこし、また血清反応においても高い抗原性があることから、蛍光抗体法の抗原として、実際に反応の場にあずかっている可能性がある。これを解明するために、TPt の蛋白分解酵素による消化試験や、White<sup>22)</sup> の報告にならって二重染色試験を試みた。これによると、TPt を無処置のまま抗原として用いた際と、多糖体を抗原としたり、あるいは TPt の蛋白画分を大部分不活性化したものを用いても、同一切片上で全く同じ細胞が染色された。そのことは、TPt を抗原として証明された抗体は、その中に含まれる少量の多糖体が抗原として作用しているであろうことを推定させる。抗原として用いた TPt は 2mg/ml の濃度であるが、実際に TPs 80 即ち 80% methanol 処理で沈降する多糖体は 10 $\mu$ g/ml 即ち TPt の 200 分の 1 量を用いても、抗体染色は同様に陽性であることからこの事を強く示唆している。

遅延型反応に関与する抗体を組織の中に証明しようというのがわれわれの最初の目的であったが、最後の特異性の吟味の成績より、われわれが証明した抗体保有細胞は、結核においても産生される血清内抗体を産生する細

胞を証明したことになるようである。そのことはまた、われわれの成績が多くの異種蛋白を抗原とした実験の成績と一致することからもうなずけるのである。しかし、前報で述べたがわれわれの多糖体画分は感作原性が低いし、また同一血清について蛋白画分と沈降反応原性を比べて見ると多糖体抗原では抗原価は高いが抗体価は若干低い。更に分画成分を見ると蛋白と多糖体とは不可分の結合を示しているようである。また両画分それぞれに抽出段階における変性の問題も考えねばならない。今回の抗原抗体反応系が多糖体系であるらしいと推定するのも飽迄も多糖体系に近いという意味である。ゲル内沈降反応では蛋白画分に少くも 7 本の異った沈降線の出現を見ている。生物学的活性を減少させないで蛋白や多糖体を純粋にとり出すことは現状では不可能に近い。

この報告はこのような複雑抗原による免疫反応系という宿命を背負って行なわれた実験であるだけに、若干の危慮の念を抱かざるをえない。更により純化した抗原による研究が残されているのは当然である。

## 結 論

1. 結核死菌感作兔に同死菌を再静注後、日を追って脾、リンパ節及び肺の標本を作り、ツベルクリン蛋白を抗原として、蛍光抗体法のサンドイッチ法で、その組織内に抗体保有細胞を証明した。また同様処置したモルモットにおいても同じ所見をえた。
2. 脾及びリンパ節では濾胞周辺及び髓索内に集団状あるいは散在性に抗体染色陽性の多数の細胞を認めた。これらの細胞は形質細胞に属し、Russell body も多数認められた。
3. ツベルクリン蛋白あるいはそれを蛍光色素で標識した抗原を用いて皮内反応を行ない、その反応皮膚内の抗原及び抗体を追及した。抗原は結核兔では正常兔より局所に強く限局化し、しかも早く消失し、5日目より抗体の出現をみた。正常兔では抗体は証明されなかった。
4. 本実験で証明された抗体は、ツベルクリン蛋白の蛋白成分に対するものではなく、その中に少量に含まれる多糖体成分に対する抗体である可能性が高いことを証明した。

## 写真説明

**写真 1.** 死菌再静注後7日目の結核兎の脾。濾胞周辺に出来た抗体保有細胞の集団。(サンドイッチ法)

**写真 2.** 死菌再静注後5日目の結核兎の脾。形質細胞にまざって定型的な Russell body が多数混在している。(サンドイッチ法)

**写真 3.** 死菌再静注後3日目の結核兎リンパ節。髄索内に瀰漫性に抗体保有細胞が散在している。大多数は定型的な形質細胞の形をとっている。(サンドイッチ法, 弱拡大)

**写真 4.** 死菌再静注後7日目の結核兎の肺。結核結節内抗体保有細胞。定型的な形質細胞の他に, 不定型な抗体染色陽性物質が散在している。(サンドイッチ法)

**写真 5.** 死菌皮下再接種後5日目のモルモットの脾。洞内に1個の抗体保有細胞がみられる。(サンドイッチ法)

**写真 6.** 死菌再静注後3日目のモルモットのリンパ節。髄索内に瀰漫性に大量の抗体保有細胞がみられる。大半は定型的な形質細胞の形をしている。(サンドイッチ法)

**写真 7.** 死菌再静注後5日目の結核兎の脾。TPt抗原と TMR 標識  $\gamma$ -globulin によるサンドイッチ法染色。形質細胞の形をした抗体保有細胞が染色されている。

**写真 8.** 写真7と同じ切片。pronase 消化 TPt と FITC 標識  $\gamma$ -globulin によるサンドイッチ法染色。写真7と全く同じ細胞が染色されている。

**写真 9.** FITC 標識 TPt 接種正常兎皮膚反応部。3時間目。抗原が結合織束間に瀰漫性に入りこんでいる。(無染色)

**写真 10.** 上記反応部。24時間目。抗原は皮膚深層の組織球にとられて光っている。

**写真 11.** FITC 標識 TPt 接種結核兎皮膚反応部。3時間目。抗原は結合織間に集塊状をなしている。

**写真 12.** TPt 接種結核兎皮膚反応部。5日目。結合織間に抗体が染色されている。(サンドイッチ法)

以上はカラースライドよりモノクロームに反転したために粒子の荒れが目立つ。

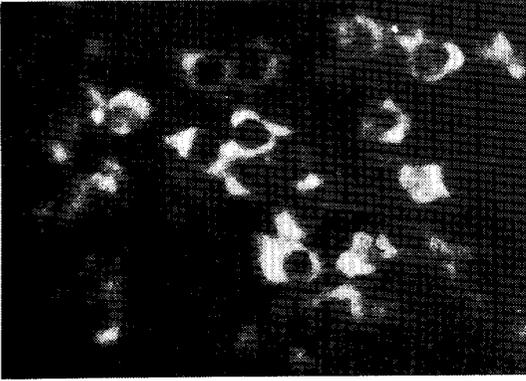


写真 1



写真 2

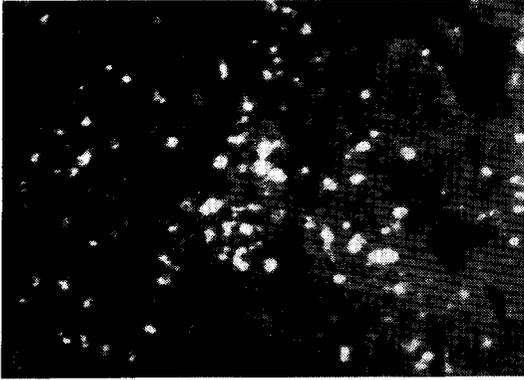


写真 3

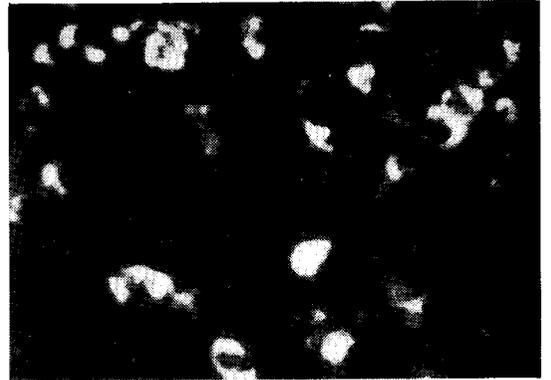


写真 4

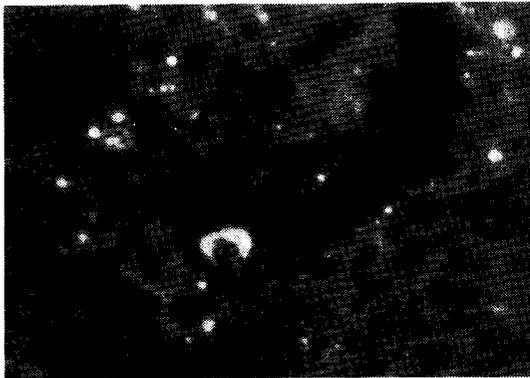


写真 5

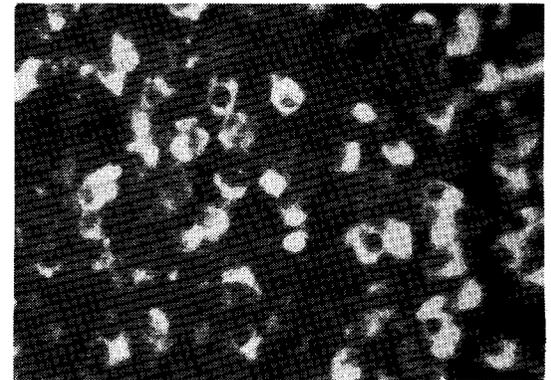


写真 6

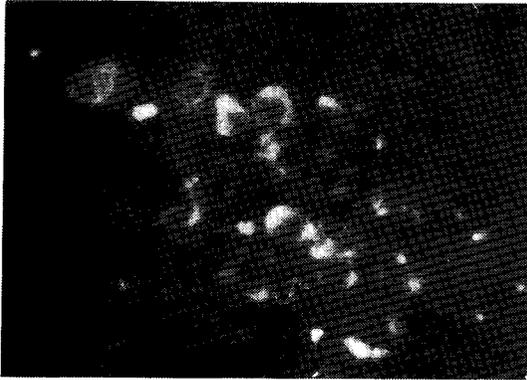


写真 7

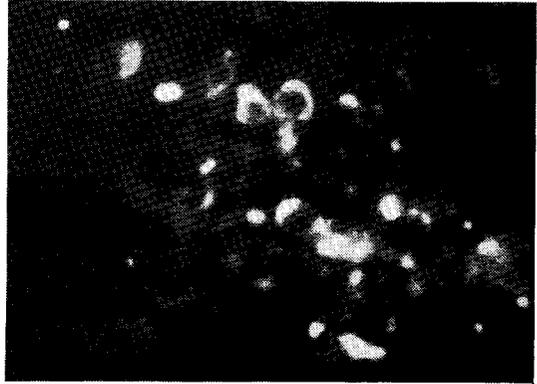


写真 8

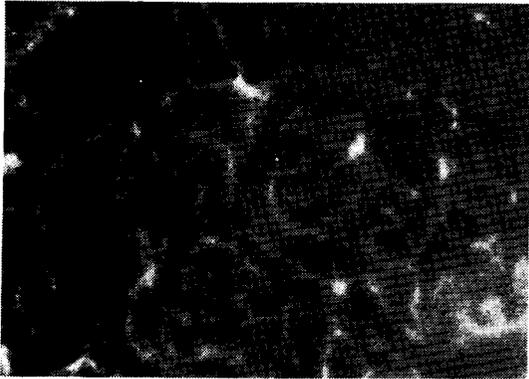


写真 9



写真 10



写真 11

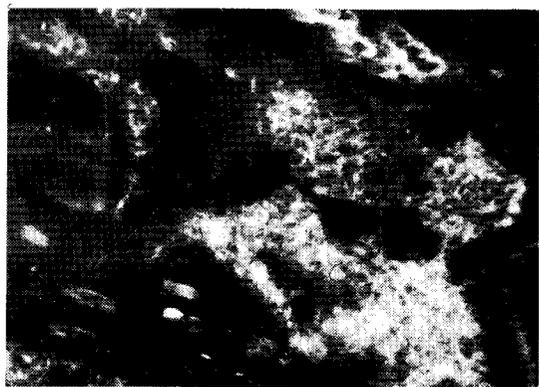


写真 12