



Title	卵白リゾチーム感作ホルモットのマクロファージ遊走阻止試験
Author(s)	水野, 佑亮; MIZUNO, Yusuke; 黒野, 憲二 他
Description	
Citation	結核の研究, 33, 10-13
Issue Date	1973
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26822
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_P10-13.pdf



卵白リゾチーム感作モルモットの マクロファージ遊走阻止試験

水野 佑亮 黒野 憲二 塩川 洋之

(北海道大学結核研究所生化学部)

(昭和47年9月30日受付)

1932年, Rich, Lewis¹⁾によってツベルクリン感受性のモルモットの末梢白血球や脾臓細胞の *in vitro* での遊走がツベルクリンによって阻止される事が見出された。その後多くの研究者により^{2)~4)}, ツベルクリン感受性の動物だけでなく, 一般に遅延型アレルギーに感作された動物のマクロファージの遊走が感作抗原によって特異的に阻止される事が明らかにされた。さらに, この現象の機構の研究から感作リンパ球が抗原に刺激されて, マクロファージ遊走阻止因子 (MIF) を生産遊離し, この物質は, 正常動物のマクロファージの遊走をも阻止する事が明らかにされた^{5), 6)}。

一方, 感作リンパ球が抗原の刺激によって, 遅延型反応の発現に関係があると思われるさまざまな生理活性を持つ多くの因子⁷⁾を遊離することが知られているが, その大部分はリンパ球培養上清にある活性としてとらえられているにすぎず, それら因子相互の関係は不明である。遅延型アレルギーの成立と発現の機構の解明の為に, これらの因子が単離されることが極めて重要と考えられ, 実際, MIF については部分的に精製され, 分子量数万の蛋白質と見なされている^{6), 8)}。我々も MIF を単離する事を目的として典型的な遅延型アレルギーを示す結核菌を抗原として実験を始めたが, 反応抗原である PPD には非特異的な遊走阻止活性があり, 又 PPD は未だ種々の物質の混合物であるため MIF 標品から抗原である PPD を除く事も困難であり, この実験には不相当と思われた。

そこで化学的に単一で非特異的阻止を示さない抗原を用いることとし, 先ずリゾチームによる感作を試みた。リゾチームは高純度の製品が簡単に得られ, 一次構造は勿論, 高次構造までも決定されているという利点があり, 体液性抗体の生産や抗原決定基に関してかなり詳細な研究がなされている^{9), 10)}。しかし遅延型アレルギーの抗原としてリゾチームを用いたという報告は見出されていない。そこで先ずリゾチームで感作されたモルモットの感作の状態を知る為に, 主としてマクロファージ遊走阻止

反応を指標として以下の実験を行なった。

材料及び方法

1) **動物**: 体重 600~800 g のモルモットを使用した。これらは約 18 カ月前に Complete Freund Adjuvant (CFA) で一度感作されたものである。

2) **抗原**: リゾチーム (Sigma, HL と略す) は卵白からとって 3 回再結晶したものである。

この標品のディスク電気泳動¹¹⁾ (pH 4.0, 15% アクリルアミドゲル) では main band より陰極側に 2~4 本の minor band 検出されたので, さらに精製する為に SE-sephadex カラムクロマトグラフィーを行なった。0.02M リン酸緩衝液 pH 7.2 で平衡化した SE-sephadex A-50 カラムに吸着させ, 同じ緩衝液に直線的に NaCl 濃度を増加して溶出, 分画した。各分画の 280 m μ の吸光度を測定すると NaCl の低濃度側に小さな肩をもつ一つのピークを示すクロマトグラムが得られた。この肩を含まない main ピークの中心を集め, 水に対して透析し, 凍結乾燥して抗原として用いた。この標品は 500 μ g という大量を直径 5 mm のアクリルアミドゲルのカラムにのせて電気泳動し, Coomassie brilliant blue で染色した場合においても main band のみが見られ minor band は検出されなかった。

ツベルクリン蛋白 (PPD): 加熱しない結核菌 (H37Rv) 培養濾液から 0.5 飽和硫酸¹²⁾ で沈殿した部分を水に対し透析し凍結乾燥した。

3) **感作**: HL 1 mg/ml, H37Rv 加熱死菌 5 mg/ml を含む生理食塩水と Arlacel 1: Drakeol 9 の adjuvant を等量混合し, その 0.2 ml をモルモットの 4 足蹠に分けて注射した。注射後 1 週おきに, 2 匹づつを細胞遊走阻止試験に用い, 別の 2 匹づつで皮内反応を見た。結果は 2 匹の平均値で表わした。皮内反応を見るのに使用したモルモットは初感作後 12 週後に初感作と同様に HL/CFA で再び感作した。

4) **細胞遊走阻止試験**: David⁴⁾らの方法にしたがっ

た。Drakeol をモルモットの腹腔に注射し 4 日後に心臓から採血し屠殺、1 unit/ml のヘパリンを含む Hanks 液で腹腔内を洗滌し、洗滌液を遠心して細胞を集める。Hanks 液で 3 回洗滌後、pack した細胞の約 10 倍量の Eagle MEM (Gibco, F-11) 5: 馬血清 (千葉血清) 1 の培養液に浮遊させる。これを一端を封じたヘマクリット用毛細管に吸引し、1,000 rpm、1 分間遠心して細胞をつめる。細胞と培養液の境界面で管を切り、これを Sykes-Moore tissue culture chamber の底のガラスにシリコングリースではりつける。容量約 1 ml の chamber 1 個当り 2 本の毛細管をはりつけ、上記培養液と、その 1/19 量の抗原溶液又は生理食塩水 (対照として) とを注入する。1 試料につき 2 個の chamber で行なう。この chamber を 37°C、10% 炭酸ガス下で培養し、24 時間、48 時間後に細胞の遊走面積を測定する。測定は倒立顕微鏡の stage 上の副尺つき目盛で遊走部分の縦横の直径の積をとり、2 つの chamber つまり 4 本の毛細管の平均値を出す。この値を遊走面積として遊走阻止率を次の様に計算する。

遊走阻止率

$$= 100 \left(1 - \frac{\text{抗原を含んだ培養液中での遊走面積}}{\text{対照の培養液中での遊走面積}} \right)$$

5) 皮内反応: モルモットの背部の毛をバリカンで剃毛し、生理食塩水に溶かした抗原を 0.1 ml 皮内に注射し、3, 6, 24, 48 時間後に主として発赤の縦横の直径を測定し、その平均値をとった。同時に硬結の程度も観察した。

6) 間接血球凝集反応: Stavitsky の方法¹³⁾ にならって抗原感作血球を作り、microtiter¹⁴⁾ (Cooke) を使って凝集反応を行なった。簡単に記述すると、2 ml の 2.5% 羊赤血球浮遊液に 2 ml の 0.05 mg/ml のタンニン酸を加え、37°C で 10 分間インキュベートし、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) pH 7.2 で洗った後 2 ml の生理食塩水に浮遊させる。4 ml の PBS pH 6.4, 1 ml の HL (2 mg/ml), 1 ml のタンニン酸処理血球をこの順序でまぜ、室温で 10 分間放置する。対照として HL 溶液の代りに生理食塩水を使用して同様に処理する。PBS pH 7.2 で 2 回洗った後、1% の正常モルモット血清 (NGPS) を含む生理食塩水で浮遊させ、1% 浮遊液とする。なお NGPS 及び被検血清はあらかじめ 56°C、30 分加熱して非働化し、同量の羊赤血球と混ぜて 10 分間吸収しておく。microplate (0.05 ml) 上に 1 被検血清につき 2 列の 2 倍希釈系列 (0.025 ml) を、1% NGPS-生理食塩水でつくり、第 1 列に 1% HL 感作赤血球を 0.025 ml 加え、第 2 列には 1% 対照赤血球を同量加える。振盪した後、室温に 2 時間お

き判定する。結果は凝集した最高希釈倍数で表わす。

結 果

1. 初感作群

a) 腹腔細胞遊走阻止試験 (図 1)

初感作後 2 週目に HL 10 µg/ml で 51%、100 µg/ml で 82% という強い阻止が見られたが、3 週、4 週後には阻止率が急速に低下した。0 週つまり HL 非感作のモルモットの細胞及び、感作後 1 週目の細胞の遊走はむしろやや促進された。

PPD による阻止率は 1 週後 (82%) から 2 週後で最大となり、その後 HL による阻止率とは対照的にきわめてゆるやかに減少した。図 1 は細胞を 24 時間遊走させて測定した阻止率を表わしたものであるが、さらに培養をつづけ 48 時間後に測定すると PPD による阻止率は 24 時間の測定値と余り変わらないが、HL による阻止率は非常に小さくなった。

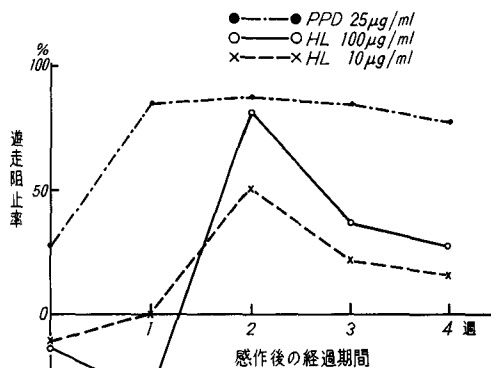


図 1 リゾチーム感作モルモットのマクロファージ遊走阻止試験 (初感作群)

b) 皮内反応 (図 2)

抗原の皮内注射後 3 時間の測定では (上図)、いずれも弱い反応がみられるのみであるが、HL 100 µg 注射の場合、3 週、4 週と日を追って強くなる傾向が見られた。又、3 週及び 4 週の動物には HL の注射後まもなく (15 分程) に発赤を生ずるものもあった。24 時間の測定値 (中図) も HL による発赤は感作後 2 週までは小さく、3 週、4 週後に著明に大きくなった。48 時間の測定では (下図) 2 週までは非常に弱く、3 週後に最大に達し、4 週後に少し下がる傾向が見られた。

PPD による皮内反応は 0 週 (CFA のみによる感作後 18 カ月経過) から強く、24 時間の測定では 3 週、4 週後にやや下がる傾向が見られたが、48 時間の測定では一定

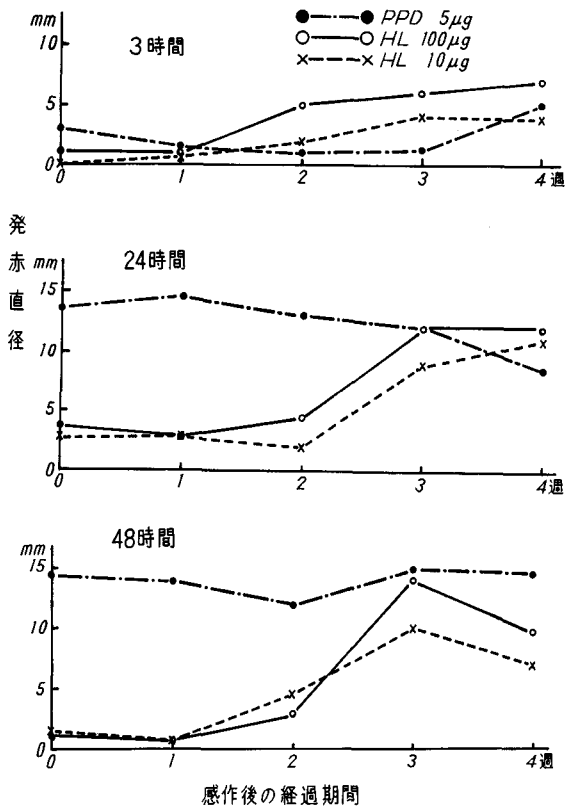


図2 リゾチーム感作モルモットの皮肉反応(初感作群)

して強い反応を示した。なお、PPDによる陽性反応は硬結をともなっていたが、HLでは硬結はほとんどみられず、発赤の大きさのみを測定した。

c) 血中抗体量

HLに対する血中抗体の存在を二つの方法で検討した。間接血球凝集反応で3週までは検出されず、4週目のモルモット2匹のうち1匹だけにわずかの抗体(titer: 16)を認めた。microouchterlony法¹⁴⁾では、どの動物の血清を用いても沈降線は認められなかった。

2. 再感作群

a) 腹腔細胞遊走阻止反応

初感作後1~4週後に皮内反応を見たモルモットを初感作後12週後に再感作し、その後1週おきにその動物の腹腔細胞遊走の抗原による阻止をみた。(図3)再感作以前に半数のモルモットが死んだので(図3)の結果は1週につき1匹のモルモットについて得られたものである。

HLによる阻止は0週、即ち初感後12週目では、ほとんど無く、1週後に最大(70%)となり、その後、初感作群よりはゆるやかであるが阻止率は低下した。

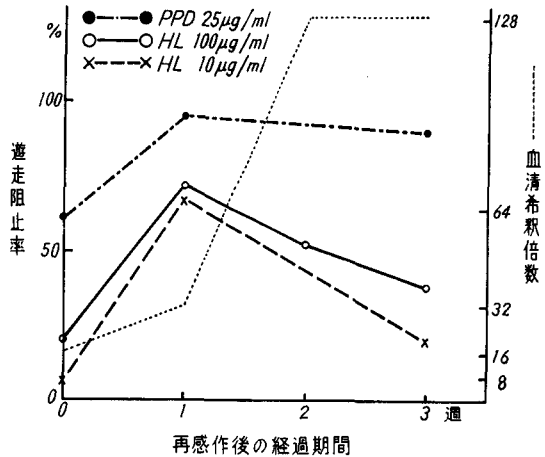


図3 リゾチーム感作モルモットのマクロファージ遊走阻止試験と抗HL間接血球凝集反応(再感作群)

PPDによる阻止率は0週でも60%を示したが、再感作1週後にさらに強い阻止(95%)が見られ、3週後でもほとんど変わらず強い阻止を示した。

b) 血中抗体量(図3)

間接血球凝集反応では、0週、1週後の動物の血清はHLでcoatした羊血球に対し小さなtiterを示し、2週、3週の動物の血清は大きいtiterを示した。microouchterlony法では、2週と3週の動物の血清のみがHLとの沈降線を生じた。

考 察

蛋白抗原に対する遅延型アレルギーの発現の過程は、一般に3つの時期に分けられる¹⁵⁾。1) 潜伏期、2) 遅延型過敏症の時期で血流抗体は検出されない、3) conventional antibodyによるアナフィラキシー及びアルツス型反応の時期。

今回のリゾチーム感作モルモットもほぼこの過程をとったものと考えられる。即ち感作後1~2週間が潜伏期、2週から4週までが遅延型の時期、4週以後が血中抗体の出現する時期と分けられる。

しかし、細胞遊走阻止試験では初感作後2週目にピークがあるが(図1)、皮内反応で見ると(図2)24時間及び48時間の値とも2週目は非常に小さく、3週、4週目で最大値が得られた。文献には単純蛋白質で感作後、皮内反応と細胞遊走阻止を同時に日を追ってしらべた例は少ないが、H7G¹⁶⁾(ヒトγ-グロブリン)の場合は皮内反応の方が早期にピークに達したという報告がある。この違いは現在説明することは困難であるが、HLによる皮内反

応は 100 μ g 注射の場合, 3 時間でもわずかながら発赤が見られ, 又 4 週目の動物には血中抗体が検出されるものもあったので, PPD にみられる様な典型的な遅延型反応ではないという可能性も考えられる。又細胞遊走阻止反応も再感作群 (図 3) では血中抗体の出現後にピークを示し, やはり“純粋”¹⁵⁾の (即ち, 血中抗体が存在しない個体で示される) 遅延型アレルギーの指標とはいえない。

次に PPD による遊走阻止反応と比較してみると, 初感作群 (図 1), 再感作群 (図 3) 共に, PPD による遊走阻止は強く, しかも感作後長期間にわたって持続するが, HL では一時的には PPD に近い阻止率を示すが, その後急速に減少するという違いがみられた。又, 前述した様に, 細胞の遊走の為の培養開始後 48 時間に測定すると PPD による阻止率は 24 時間の測定値と変わらないが HL による阻止率は非常に小さくなり, 対照とほとんど変わらなくなった。このような違いは, HL という単一な蛋白と PPD という複雑な物質の混合物で, しかも多分抗原としての働きだけでなく, 非特異的な生物活性をもった物との質的な違いが表われたのであろうと考えている。

以上述べた如く, リゾチーム感作モルモットは“純粋”の遅延型アレルギーとは言えない可能性もあり, 又, 感作後細胞の遊走が抗原で阻止され得る期間が短かく, 遊走阻止率が小さいという難点はあるが, 序論で述べた利点もあり, 少なくとも MIF を単離するという目的にはかなっていると考えている。しかし現在までに, ある種の蛋白質 (牛 γ -グロブリン¹⁷⁾, 卵白アルブミン¹⁸⁾, セラチン¹⁷⁾, タバコモザイクウイルス蛋白¹⁹⁾, 等) や合成ポリペプチド²⁰⁾ でかなり持続する遅延型アレルギーに感作する方法が考案されており, 感作方法を検討する余地があると思われる。

再感作群については間接法による遊走阻止率の測定も行なった。間接法ではリゾチーム感作モルモットの脾臓又はリンパ節の細胞を抗原存在下で培養し, その上清をとり, 正常モルモットの腹腔細胞の遊走用培養液に加えて遊走阻止率を測定した。その結果, リンパ節細胞の培養上清は阻止せず, 脾臓細胞の培養上清に阻止活性が見られたが, 直接法に較べると阻止率が小さく, 又, 安定した値が得られなかったので現在さらに検討中である。

総 括

モルモットをリゾチームで感作した後, その感作状態を 1 週おきに 4 週後まで調べた。腹腔細胞遊走阻止試験では 2 週間後に最大の阻止が見られ, その後急速に弱くなった。皮内反応は 3 週, 4 週間後が最大となった。間

接血球凝集反応では 4 週間後の一匹のみがわずかの抗体価を示した。

12 週間後に再感作されたモルモットでは, 腹腔細胞遊走阻止試験では 1 週間後に最大の阻止が見られ, 血中抗体は 1 週から 2 週にかけて著明に増大した。

以上の結果から MIF を単離する為に抗原としてリゾチームを使用する事の可能性が示唆された。

終りにのぞみ, 結核菌を培養して戴いた本研究所予防部の方々及び細胞遊走試験につき御教示戴いた病理部の方々に感謝の意を表します。

文 献

- 1) Rich, A. R. and Lewis, M. R.: Bull. Hophins Hosp. **50**, 115 (1932).
- 2) Gearge, M. and Vaughan, J. H.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **111**, 514 (1962).
- 3) Carpenter, R. R.: J. Immun. **91**, 803 (1963).
- 4) David, J. R., Al-Askari, S., Lawrence, H. S. and Thomas, L.: J. Immun. **93**, 264 (1964).
- 5) David, J. R.: Pro. N. A. S., **56**, 72 (1966).
- 6) Bennett, B. and Bloom, B. R.: Proc. N. A. S., **59**, 756 (1968).
- 7) Clausen, J. E.: J. Immun. **108**, 453 (1972).
- 8) Remold, H. G., Katz, A. B., Haber, E. and David, J. R.: Cell. Immun., **1**, 133 (1970).
- 9) Fujio, H., Sakato, N. and Amano, T.: Biken J., **14**, 395 (1971).
- 10) Maron, E., Shiozawa, C., Arnon, R. and Sela, M.: Biochemistry. **10**, 763 (1971).
- 11) 永井 裕: 蛋白質核酸酵素, **11**, 818 (1966).
- 12) 奥山春枝・太田明彦・森川和雄: 結核の研究, **20**, 19 (1964).
- 13) Stavitsky, A. B.: J. Immun., **72**, 360 (1954).
- 14) 松橋 直・白井美津子・成内秀雄: 化学と生物, **9**, 396 (1971).
- 15) Vassalli, P. and McCluskey, R. T.: "Inflammation immunity and hypersensitivity" ed. by Movat, H. Z., Harper and Row, New York.
- 16) Ferraresi, R. W., Dedrick, C. T., Raffel, S. and Gohman-Yahr, M.: J. Immun. **102**, 852 (1969).
- 17) Benacerraf, B. and Gell, P. G. H.: Immunology, **2**, 53 (1959).
- 18) Uhr, J. W., Salvin, S. B. and Pappenheimer, A. M.: J. Expt. Med. **105**, 11 (1957).
- 19) Spitler, L., Benjamini, E., Young, J. D., Kaplan, H. and Fudenberg, H. H.: J. Expt. Med., **131**, 133 (1969).
- 20) Stupp, Y., Borek, F. and Sela, M.: Immunology, **11**, 561 (1966).