

細胞膜系副腎特異抗原の・分離・精製とその性質に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4593

細胞膜系副腎特異抗原の分離・精製と その性質に関する研究

金沢大学がん研究所病態生理部(主任：倉田自章教授)

金沢大学大学院医学研究科外科学第1講座(主任：岩 喬教授)

神 本 正 憲

(昭和49年10月3日受付)

異種・同種あるいは自己の副腎エキスを Freund 完全アジュバントとともにモルモット、ウサギ、ラットなどに注射すると自己抗体が生じ、アレルギー性副腎炎の発生することが、以前からよく知られており^{1)~10)}、ヒトの特異性副腎萎縮のモデルとされている。このような実験の大部分は副腎ホモジネートまたは粗エキスによって行われ、有効抗原の分析はほとんど行われていない。副腎が幾つかの特異性自己抗原を含むことは Witebsky 一門によりよく調べられ^{4)11)~13)}、その1つは精製されているが¹⁴⁾、これらはいずれも副腎の可溶画分から得られたものである。

筆者は種々の臓器について細胞膜系不溶性リポ蛋白画分に組織特異抗原が存在するという報告^{15)~23)}に基づき、副腎の同画分における特異抗原の存在・その分離精製法・性質などの検討を行った。

実験材料と方法

I. 抗原材料

ウシ副腎・肝・脾その他の臓器は金沢市屠場より御患与をうけた。成熟牛屠殺時に摘出した臓器を氷冷して実験室に運び、副腎は被膜周囲の脂肪織を除き、厚さ約3mmのスライスにして皮質・髓質を切りわけてブールした。モルモットの副腎は成熟雌雄のものをブールした。いずれも使用時まで -20°C に保存した。

II. 抗原の抽出方法

1. 膜抗原LPfr 2の抽出：まず、Smith ら²³⁾の方法の倉田・岡田らの変法^{16)~19)}に準じて不溶性リポ蛋白画分(LP)を抽出する。即ち、保存材料を融解させ、Sol. I²³⁾を溶媒としてユニバーサルホモジナイザー(日本精機)でホモジネートをつくり、ガーゼ

1, 2, 4, 8枚を順に通してから遠心して沈渣を集める。Sol. I を加え、テフロンホモジナイザーに約5分かけて均質液とする。遠心沈渣に Sol. II²³⁾を加え、約5分磨砕後、遠心して沈渣を得る。Sol. II による磨砕と遠心をさらに10回くりかえして沈渣“LP”を得る。全操作は $0\sim 4^{\circ}\text{C}$ で行う。遠心はすべて冷凍遠心器により10,000rpm30分とする。

湿量約10gのLPにデスオキシコール酸ソーダ(Difco)の0.2%溶液約50mlを加えてホモジナイズした後、1夜冷室でマグネチックスターラーで攪拌する。遠心して沈渣をとり、再び同様な抽出操作を2回くり返す、3回の抽出上清を集め、約10倍容量の冷アセトンを加えて沈澱を得る。同沈澱を少量の蒸溜水にとかして遠心し、上清“LPSol”を得る¹⁹⁾。セファローズ4Bによるゲル濾過を行って、retainする第2のピーク“LPfr 2”を得る¹⁹⁾。

2. 副腎特異抗原の分離(アフィニティークロマトグラフィー)：ウシ肝および脾より上述と同様の方法でつくったLP(湿量各100mg、合計200mg)に1mlの Freund 完全アジュバント(後述)を加えてエマルジョンとし、ウサギ肩甲下腔に注射する。60日間に5回(毎週4回、2週おいて1回)免疫を行って抗血清をとる。試験管内吸収によって、ウシ副腎LPfr 2画分中の共通抗原が除去できることをゲル内拡散法で確めた後、この抗血清を以下のようにしてアフィニティークロマトグラフィーに用いた。抗血清70mlに生理食塩水70mlを加え、 4°C 以下で攪拌しながら飽和硫酸140mlを滴下し、30分後に遠心してグロブリン沈澱をとる。この沈澱を0.5M食塩加0.1M重炭酸ソーダ液(pH8.2)150mlにとかし、同液に対して1夜透析

Studies on the Purification of an Adrenal-Specific Membrane-Bound Antigen and its Properties. Masanori Kamimoto, Department of Pathophysiology (Director : Prof. Y. Kurata), Cancer Research Institute, Kanazawa University. Department of Surgery (I) (Director : Prof. T. Iwa), School of Medicine, Kanazawa University.

後、同液で10mg/mlに稀釈する(グロブリン総量約1.6g)。臭化シアン活性化セファローズ4B (Pharmacia) 45gを冷脱イオン水500mlで1時間膨潤させ、ガラスフィルター(151G3, 柴田科学)上におき軽く吸引しながら0.001M HCl 5 lを約30分かけて通し、ついで脱イオン水5 l, 0.1M重炭酸ソーダ液5 lを通した後、直ちに0.5M食塩加0.1M重炭酸ソーダ液200mlに懸濁する。この懸濁液に上記グロブリン溶液145mlを加え、ロータリーエバポレーターを利用して24時間回転攪拌する(1分間26回転)。ゲルをガラスフィルター上におき、1M食塩加酢酸塩緩衝液(pH4.0) 1 lにつき0.5M食塩加0.1M重炭酸ソーダ液(pH8.2) 1 lによる洗滌を、交互に5回行う。後者の液に懸濁して1.5×140cmのカラムにつめて、ウシ副腎LPfr 2 (8 mg/ml溶液10ml)をチャージし、同食塩加重炭酸ソーダ溶液で溶出する。溶出速度は約3 ml/1時間とし、フラクションコレクターで3 mlづつ流出液を集めた。以上の操作はすべて冷室(4~7°C)内で行った。なお一部の実験は臭化シアンでセファローズ4Bを活性化処理²⁴⁾したものを使用した。

3. 特異抗原のSubunit (P₂)のつくり方: Day & Levy 法²⁵⁾で特異抗原画分の脱脂を行い、0.05M Tris 緩衝液(pH8.0)に懸濁し、β-メルカプトエタノールを0.5Mに加えて密栓し、攪拌しながら室温2週間以上還元を行う。限外濾過膜(UM-2, Amicon)と標準攪拌セルを用い、時々蒸溜水を加えながら限外濾過を行ってメルカプトエタノールを除いたのち、セファデックスG-100カラムにかけ第2のピーク“P₂”をとった²¹⁾。

Ⅲ. 物理化学的分析方法

1. 抗原量: 抗原量はすべて乾燥重量で示した。充分量の抗原が得られた場合には一定量を秤量瓶にとり、恒重量になるまで、減圧下80°Cに保った。通常約1週間を要した。抗原量の乏しい場合にはウシ血清アルブミンを基準にしてマイクロビューレット法(Itzhaki & Gill法²⁶⁾)またはLowry 法²⁷⁾によって比色定量し換算した。前者は乾燥重量に一致し、後者では得られた値を2.2倍すると実重量に等しくなる。

2. ディスク電気泳動: LPfr 2 標品については7.5%, pH8.9のポリアクリルアミドゲルによる分析用ディスク電気泳動を行った。0.5×10cmのガラス管を用い、各管4mAで約1時間泳動し、7%酢酸で10分間固定、1%アミド黒10B-7%酢酸液で30分間染色、7%酢酸で脱色を行った。

P₂標品については30%, pH8.9のポリアクリルアミドゲルにより各管1mAで8時間泳動し、7%酢酸-30

%メタノール液で4時間固定後、1%アミド黒10B(7%酢酸-30%メタノールを含む)で24時間染色し、7%酢酸で脱色した。

3. 分子量測定法: LPfr 2については膜渗透圧計(Knauer)とDavison 法²⁸⁾によるセファローズ6Bゲル濾過で分子量測定を行った。マーカーとしてブルーデキストラン(分子量: 2,000,000, Pharmacia), アポフェリチン(分子量: 480,000, Mann), キモトリプシノーゲン(分子量: 24,000, Mann), チトクロームC(分子量: 1,357, 和光)などを用いた。P₂についてはセファデックスG-25を用い、Davison 法²⁸⁾に準じて行った。

4. 赤外吸収: 試料液を窓板(KRS-5)上にひろげ減圧デシケーター中で室温乾燥し、赤外分光光度計(IRA-2, 日本分光)で測定した。重水素化は乾燥試料をつけた上記窓板を金属性湿度調節セルに装着し、塩化ナトリウム飽和D₂O (Merk)をセル内に入れ、室温1時間放置して行った。

5. 円偏光二色性: 自記旋光分散計(J-20, 日本分光)によりN₂気流中で測定した。

6. *Tert*-butylhypochlorite (TBH)による塩素化: TBH (関東化学)を用い、Matsushima ら²⁹⁾の方法に従った。

7. 薄層クロマトグラフィー(リピン分析): レプレート26(ヤマト), シリカゲル60プレート(厚さ0.25 mm, 5×20cmおよび20×20cm, ガラス, Merk製)を用いた。発色には50%硫酸(全脂質), ニンヒドリンアセトン溶液(アミノ基), 過ヨウ素酸-ベンチデン(糖), Zinzadze 試薬(リン)などを繁用し、レゾルシン試薬(シアル酸), Dragendorff 試薬(コリン)なども用いた。

Ⅳ. 免疫方法および免疫学的分析法その他

1. 免疫方法: 抗原量に等量の Freund 完全アジュバント(パラフィン油8.5ml, Arlacel A 1.5ml, BCG 乾燥死菌10mg)を加えて乳化し、1回1mlを健康成熟モルモット(雑系, 体重400~500g)の肩甲下腔域, 足趾などに注射した。なお一部の動物では補助アジュバントとして百日咳ワクチン(武田薬品の3種混合ワクチンを生理食塩水で3回洗い, 沈渣を稀釈して1匹あたり菌数200億個)を同時に皮内注射した。最終注射後7日目に Thorn テストを行い、ついで心臓採血して、血清を-20°Cに保存した。

2. ゲル内拡散法: 二重拡散法を用いた。寒天板の厚さ1.5~2.5mm, 抗原・抗体孔の直径8mm, 孔の間隔4~5mm, 抗原は蛋白濃度1~12mg/ml, 抗血清は稀釈せずに用いた。

3. 免疫電気泳動: Grabar 法³⁰⁾ によった。
4. タンニン酸処理赤血球凝集反応: Boyden 法³¹⁾ によった。反応条件は小西の報告²⁰⁾に等しい。
5. 皮内反応: 最終免疫注射後1週間目のモルモット背部皮内に抗原60 μ g (0.1ml)を注射し、24時間目の反応を検査した。
6. 蛍光抗体法: Riggs の方法³²⁾ でFITC (BB L) をカップルし、Curtain法³³⁾ で精製した標識抗体による直接法と16倍稀釈抗血清と抗モルモット γ -グロブリン標識血清 (MBL) を用いた間接法を行った。未固定副腎を-80°Cで凍結して作ったクリオシュタット切片を用いた。
7. Thorn テスト: 好酸球数は、血液を HinkeImann 液で約1時間染色した後 Tatai 計算室に

よる直接算定法を行って測定した。ACTH (H.P. Acthar Gel, 田辺製薬) 0.5単位/体重500gを注射して8時間後の好酸球減少率が40%以上のものを陰性とした。

8. 血清移入: ミリポアフィルターを通した血清0.5mlまたは1mlを健常モルモットの心臓腔内にゆくり注入した。24時間目に Thorn テストを行い、48時間目に臓器をとりだした。

V. 病理組織学的検査法

臓器はいずれも10%ホルマリン固定、パラフィン切片、ヘマトキシリン・エオジン染色標本として検鏡した。

実験成績

I. LPfr2の性質

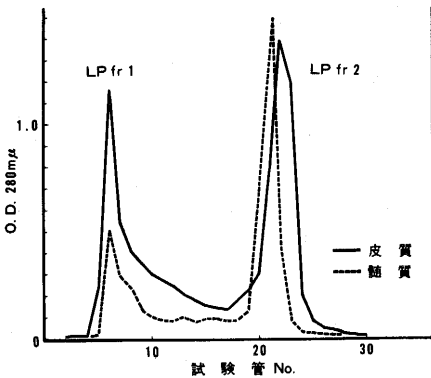
ウシ副腎LPSolのセファロース4Bゲル濾過は図1のようなパターンを示す。LPfr2画分をとりディスク電気泳動を行うと図2のように2本のバンドが認められる。抗LPfr2モルモット抗血清を用いゲル内拡散法を行うと、多数の沈降線が得られる。最も多くの沈降線を示したものでは8本が認められた(図3)。

共通抗原をウシ肝およびウシ脾LPで吸収して除くと、通常1本の強い沈降線が認められるが、抗皮質LPfr2抗体の中には稀にかすかなもう1本の沈降線を示す例もあった。強い沈降線は皮質・髓質の各LPfr2画分で完全一致像を示した(図4)。皮・髓抗原の一致性は相互の抗原による吸収によっても確かめられた。

II. 副腎特異抗原の性質

副腎LPfr2は化学的にも免疫学的にも単一ではなく、多数の臓器共通抗原を含むので、抗肝・脾LP抗体を結合させた臭化シアン活性化セファロース4Bでアフィニティークロマトグラフィーを行い、共通抗原

図1 ウシ副腎 LP sol のセファロース4B ゲル濾過パターン



セファロース4B カラム: 1.5×45cm, 負荷量: LP sol 各65mg, 溶出液: 蒸留水, 溶出速度: 7ml/hr, 採取液量: 5ml/試験管。

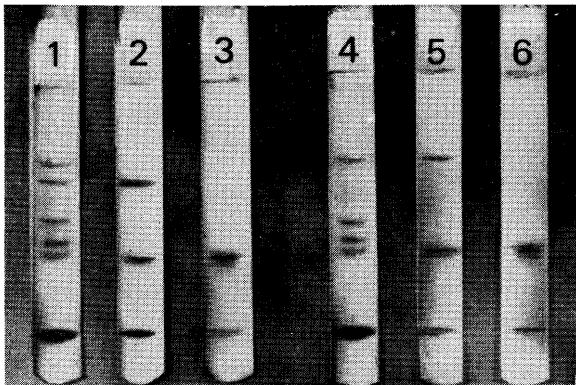


図2 disc 電気泳動パターン

1. ウシ副腎皮質 LP Sol.
2. ウシ副腎皮質 LP fr 2.
3. ウシ副腎皮質 Aaf 3.
4. ウシ副腎髓質 LP Sol.
5. ウシ副腎髓質 LP fr 2.
6. ウシ副腎髓質 Aaf 2.

の吸着除去を試みた。結合した抗肝・脾LP抗血清グロブリン画分の1/20以下の蛋白量の副腎LPfr2をチャージして溶出を行うと図5のようなパターンが得られた。

各ピークAaf1, Aaf2, Aaf3についてディスク電気泳動を行うといずれも1本のバンドを示し(図2), ゲル内二重拡散法でも活性の高い抗LPfr2抗体に対していずれも1本の沈降線(図6)を生じ, 互に完全一致した。またAaf3を免疫して得た抗血清は monospecific で副腎LPfr2に対して1本の沈降線を示す(図7)。

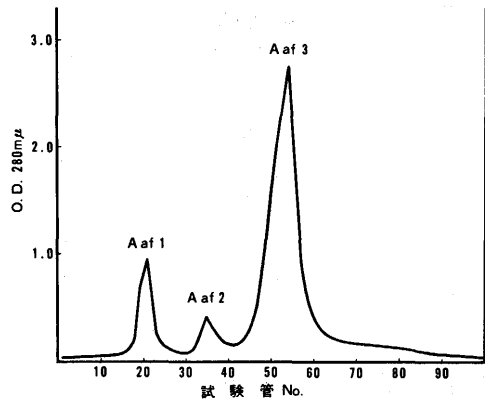
Aaf3は免疫電気泳動では α -グロブリン位に泳動する(図8)。

Aaf3を抗原としてタンニン酸処理赤血球凝集反

応を行うと, 抗副腎LPfr2抗血清では 2^{17} 稀釈まで陽性であったが抗肝・脾抗血清や他臓器抗血清では 2^{1-4} であった。

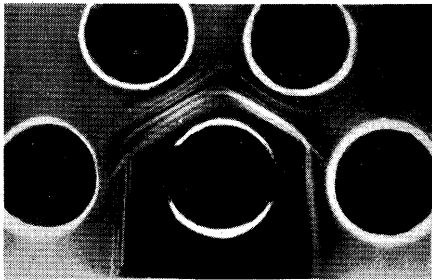
Aaf3抗原0.8mgを1週間隔で2回注射したモルモットについて1週後に遅延型皮内反応をテストした。対照には肝, 脾, 甲状腺, 睾丸のLPfr2を用いた。副腎Aaf3は発赤 28×25 mm, 肝, 脾, 甲状腺, 睾丸のLPfr2はいずれも 9×8 mm以下であった。

図5 ウシ副腎特異抗原の溶出パターン (アフィニティークロマトグラフィー)



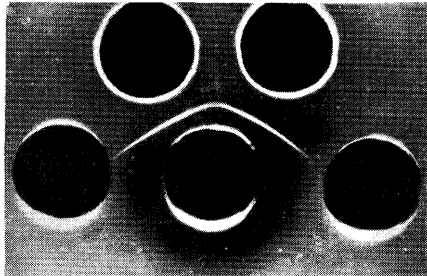
カラム: 臭化シアン活性化セファローズ 4B (抗ウシ肝・脾 LP 抗血清グロブリン 1.6g 結合), 1.5×140 cm, 溶出液: 0.5M 食塩加 0.1M 重炭酸ソーダ溶液, 溶出速度: 3ml/hr, 採取液量: 3ml/試験管。

図3 ウシ副腎 LP fr 2 のゲル内二重拡散



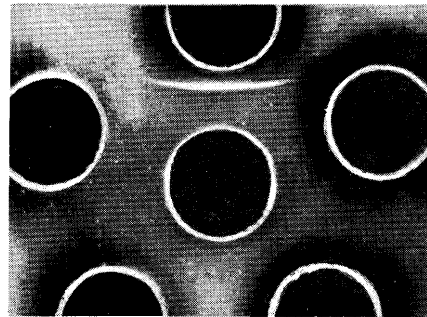
左上: ウシ副腎皮質 LP fr 2.
右上: ウシ副腎髄質 LP fr 2.
中央: 抗ウシ副腎皮質 LP fr 2 抗血清。
左下: ウシ肝 LP fr 2。
右下: ウシ脾 LP fr 2。

図4 ウシ副腎 LP fr 2 の特異抗原, ゲル内二重拡散



左上: ウシ副腎皮質 LP fr 2.
右上: ウシ副腎髄質 LP fr 2.
中央: 抗ウシ副腎皮質 LP fr 2 抗血清 (ウシ肝・脾 LP で3回試験管内吸収)
左下: ウシ肝 LP fr 2。
右下: ウシ脾 LP fr 2。

図6 ウシ副腎 A af 3 の臓器特異性, ゲル内二重拡散



上: 抗ウシ副腎 LP fr 2 抗血清
中央: ウシ副腎 A af 3.
左上: 抗ウシ肝 LP 抗血清
右上: 抗ウシ脾 LP 抗血清
左下: 抗ウシ肝・脾 LP 抗血清
右下: 抗ウシ甲状腺 LP 抗血清

なお副腎Aaf3は膿疱を形成した(図9)。

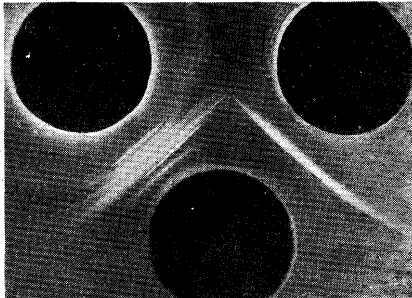
Aaf3について、膜渗透圧法による分子量測定を行い、46,000、Davison法³³⁾では47,000の値が得られた。

110°Cで恒温になるまで乾燥したAaf3についてクロロホルム・メタノールで十分に脂質を抽出して乾燥し、重量法で測定した結果、脂質量はAaf3の4.4%であった。

Aaf3の赤外スペクトルはスフィンゴ糖脂質のそれに近いパターンを示す。窓板をクロロホルム・メタノール(2:1)で室温1時間処理すると、その特徴は失われるが、アミドV領域³⁴⁾で620、650、690 cm^{-1} の3つの吸収が認められ、重水素化を行うとこれらの吸収はほとんど消失した(図10)。

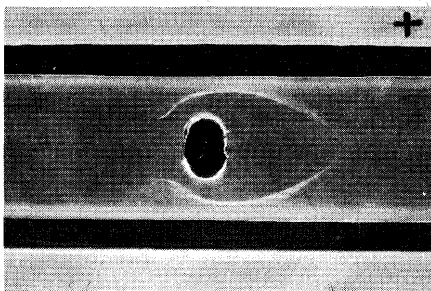
Aaf3の10 μM 溶液の円偏光二色性は図11のようであった。この曲線は α -ヘリックス、 β -構造、ランダムコイル構造の混在を暗示する。

図7 抗ウシ副腎 A af 3 抗血清の反応



左上：抗ウシ副腎 LP fr 2 抗血清
右上：抗ウシ副腎 A af 3 抗血清
下：ウシ副腎 LP fr 2

図8 ウシ副腎 A af 3 の免疫電気泳動

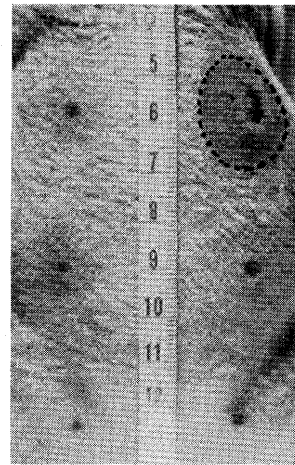


上槽：抗ウシ副腎皮質 LP fr 2 抗血清
抗原孔：ウシ副腎 A af 3
下槽：抗ウシ副腎髄質 LP fr 2 抗血清

Tert-butylhypochlorite による塩素化反応では図12のようにTBH12mMあたりで反応は完結する。即ち、Aaf3分子中のイミノ基の約19%はすみやかに塩素化される。この値はAaf3分子中のランダムコイル含有量に近いものと推定できる³⁵⁾。

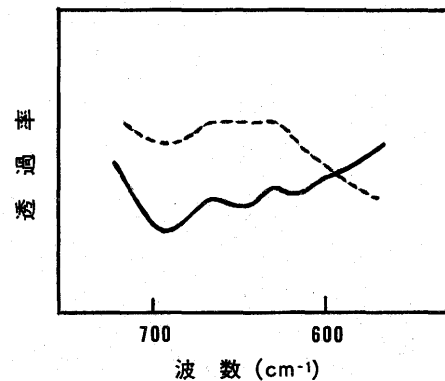
1%酢酸ウランでネガティブ染色してAaf3を電顕的にしらべると、抗原粒子の大きさとコントラスト

図9 ウシ副腎 A af 3 免疫モルモットの皮内反応



右上より、ウシ副腎 A af 3、ウシ脾 LP fr 2、ウシ睾丸 LP fr 2。
左上より、ウシ肝 LP fr 2、ウシ甲状腺 LP fr 2、生理食塩水

図10 ウシ副腎 A af 3 の赤外吸収スペクトル (アミドV領域)



実線—A af 3, 点線---重水素化物

図11 ウシ副腎 A af 3 の円偏光二色性

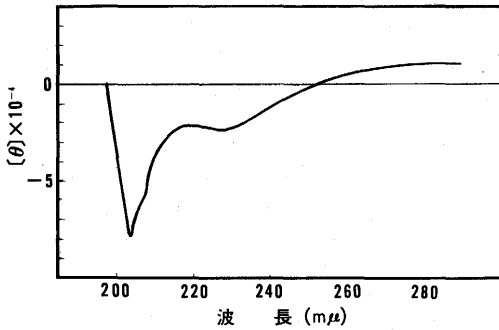


図12 ウシ副腎 A af 3 の塩素化反応

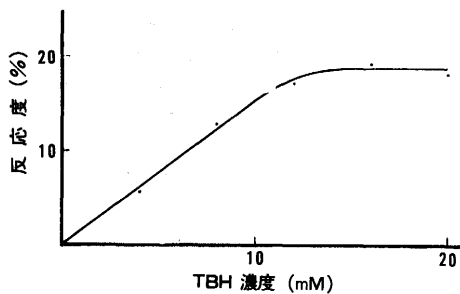
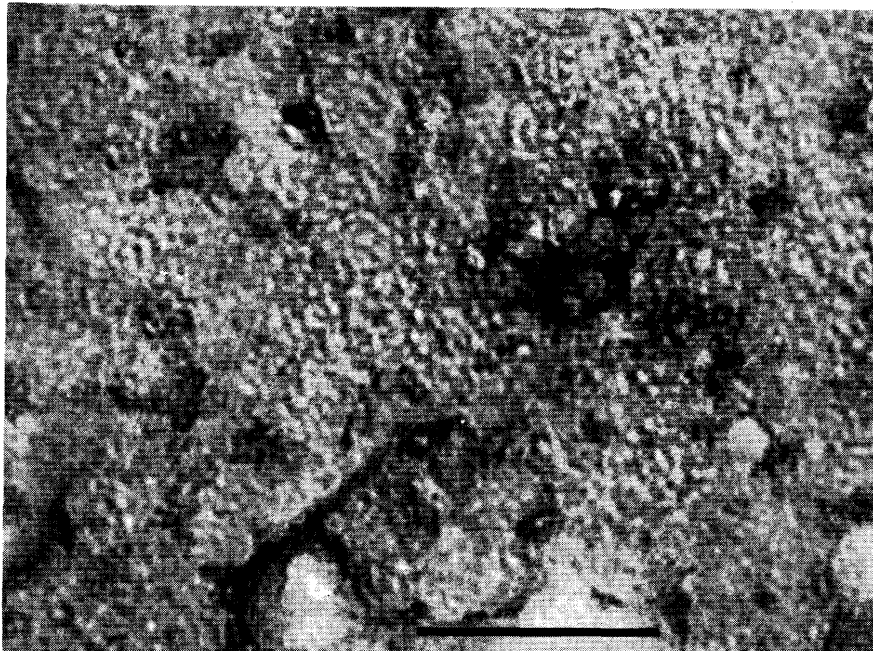


図13 ウシ副腎 A af 3 の電顕像、酢酸ウランでネガタイプ染色 (スケールは 100mμ)



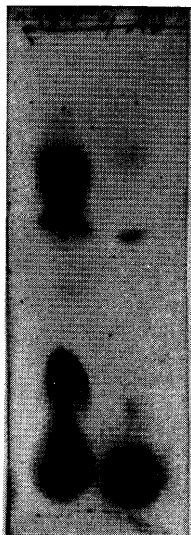
の上から、きれいな像を得ることは非常に困難であるが、繰返し観察を行って図13のような像が得られた。長さ約 80\AA 、幅 40\AA 程度の棒状粒子が多くみられる。写真の繰返し反転を行ってS/N比をあげると粒子像はかなりはっきりする。

Day & Levy 法²⁵⁾によってAaf 3画分から抽出したリピン画分を減圧乾固し、少量のクロロホルム・メタノール(2:1)で再抽出したものを再び減圧乾固して、薄層クロマトグラフィーを行った。中性脂肪、コレステロール、脂肪酸などは痕跡しか存在せず(図14)。二次元ペーパークロマトグラフィーを行うとグロボソドIが主成分で、リン脂質もほとんど含まれないことが明らかになった(図15)。なお、シリカゲル(関東化学):Hyflo Super-Cel(和光)=2:1の硅胶カラムクロマトグラフィーではクロロホルム・メタノール(60:40)のステップで溶出される。

Ⅲ. サブユニット(P₂)の性質

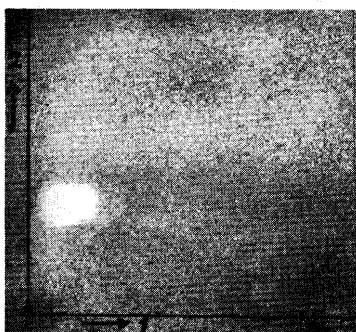
ウシ副腎特異抗原Aaf 3画分を還元処理した後、セファデックスG-100でゲル濾過を行うと図16のようなパターンが得られる。第2のピーク(P₂)画分は30%アクリルアミドゲルディスク電気泳動では10数本のバンドを示す(図17)。Davison 法²⁸⁾では分子量 $3,550 \pm 150$ であった。

図14 ウシ副腎 LP fr 2, A af 3 の脂質薄層クロマトグラム



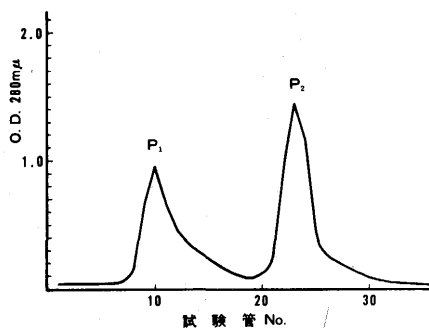
左 : LP fr 2 脂質,
 右 : A af 3 脂質, レプレート26 (ヤマト),
 溶媒 : n-ヘキサン-エーテル-酢酸(80 : 20 : 1)
 50%硫酸による発色

図15 ウシ副腎 A af 3 脂質の二次元ペーパークロマトグラム



Whatman SG-81 使用.
 溶媒, 第1次: クロロホルム-メタノール-ジ
 イソブチルケトン-酢酸-水 (23 : 10 : 45 : 25 :
 4), 第2次: クロロホルム-メタノール-ジ
 イソブチルケトン-ピリジン-0.5M 塩化アンモ
 ニウム (pH 10.4) 緩衝液 (30 : 17.5 : 25 : 35
 : 6), 発色剤: 過ヨウ素酸-ベンチゼン

図16 ウシ副腎 P₂ の溶出パターン



カラム: セファデックス G-100 1.5×45cm, 溶
 出液: 蒸留水, 溶出速度: 5ml/hr, 採取液量:
 3ml/試験管.

図17 ウシ副腎 P₂ の disc 電気泳動パターン

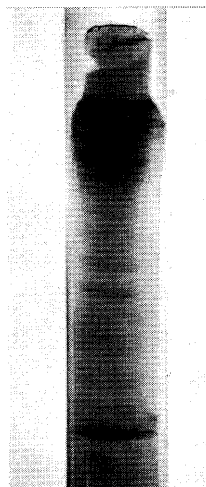
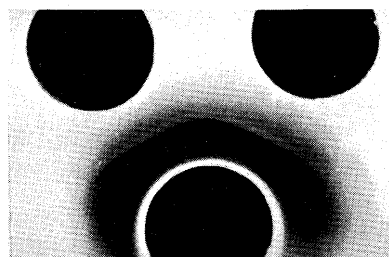


図18 抗ウシ副腎 A af 3 抗血清の A af 3 および P₂ との反応



左上: ウシ副腎 A af 3 (3mg/ml)
 右上: ウシ副腎 P₂ (12mg/ml)
 下 : 抗ウシ副腎 A af 3 抗血清

P₂は抗Aaf 3抗体との反応で1本の沈降線を示し、Aaf 3の沈降線と完全一致を示した(図18)。また抗Aaf 3抗体をP₂で吸収すると沈降線は完全に消失する。

IV. LP, LPfr 2, Aaf 3による免疫

LP, LPfr 2, Aaf 3を抗原とし、Freund 完全アジュバントとともにモルモットを免疫した結果は表1のようである。異種の抗LP, 抗LPfr 2, 抗Aaf 3抗体はLPfr 2やAaf 3とは勿論、免疫動物自身の副腎(0.2%デスオキシコル酸ソーダによるホモジネート上清)とも反応できる(図19)。また同種の抗LPfr 2抗体もLPfr 2と反応して沈降線を示す(図20)。

抗Aaf 3抗血清を用い、蛍光抗体法により抗原の

組織局在を調べた結果、皮質細胞・髄質細胞の細胞質がびまん性に染まり、核は陰性であった(図21)。

免疫モルモットの体重に対する副腎の重量比は抗原投与群の方がアジュバント対照群に比して低い傾向がみられる(表1)。

Thorn テストはアジュバント対照群でも注射回数が増し期間が長びけば陽性例が出現するが、全般に抗原投与群の方が陽性率が高い(表1)。

副腎は免疫各群の皮質束状層の髄質側1/2以上が細胞質均質となり好エオジン性を増している。しばしば網状層と束状層の一部の細胞が解離し、萎縮、円形化して細胞索の配列が乱れ、核にも消失、破壊を示すものが多い(図22~26)。しかし、程度は軽度なものが(図27)多いけれども同様な変化はしばしばアジュ

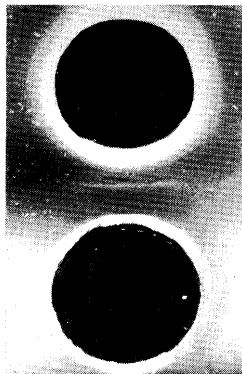
表1 異種・同種副腎抗原免疫

動物 No.	抗 原	抗原量 (mg)	免 疫 回数	免 疫 期間 (週)	副腎重量/体重 ×10 ³ (平均)	Thorn テスト (陽性率)
	異種免疫 (ウシ副腎)					
1, 2	皮質 LP	50**	5	6	0.87	2/2
5~9	皮質 LPfr 2	3	5	6	0.85	3/3
21~24 40~43*	皮質 LPfr 2	13	5	6	0.70	5/8
72, 73*	Aaf 3	0.8	6	10	0.87	
60~63*	Aaf 3	1.7	6	10	0.86	3/4
3, 4	髄質 LP	50**	5	6	1.09	2/2
10~12	髄質 LPfr 2	3	5	6	1.06	2/3
27~30 46~49*	髄質 LPfr 2	13	5	6	0.75	6/8
	同種免疫 (モルモット副腎)					
16, 17	LPfr 2	3	5	6	0.90	1/2
66~69*	LPfr 2	1.5	6	10	0.96	3/4
13~15 25, 26 44, 45*	アジュバント 対 照		5	6	1.10	0/7
64, 65* 74, 75* 70, 71*	アジュバント 対 照		6	10	0.99	2/6

* 補助アジュバントとして百日咳死菌を同時注射した

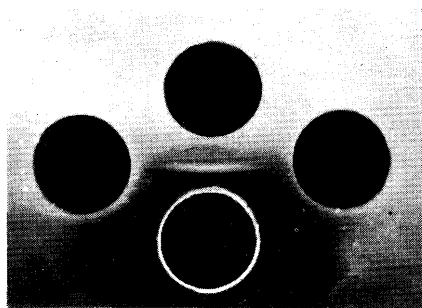
** 湿 量

図19 ウシ副腎 A af 3 免疫モルモットの
自己抗体



上：抗ウシ副腎 A af 3 抗血清
下：ウシ副腎 A af 3 免疫モルモットの自己副腎ホモジネート

図20 モルモット副腎 LP fr 2 の特異抗原，ゲル内二重拡散



上：モルモット副腎 LP fr 2
下：抗モルモット副腎 LP fr 2 抗血清（モルモット肝・脾 LP で3回試験管内吸収）
左：モルモット肝 LP fr 2
右：モルモット脾 LP fr 2

バント対照群の副腎においても認められる（図28）。円形細胞浸潤はアジュバント対照群にはほとんどみられないが、免疫各群では大多数例に認められた。しかし極軽度～軽度のもが多く、やや著明なものは半数例以下であった。浸潤部位は多少網状層に波及することはあるがほとんど髄質に限られた。皮質に巣状の出血を認めた例が、皮質LPfr2、髄質LPfr2免疫群に各2例（No.23, 24, 28, 30）あった。皮髄界層の細血管は全般に拡張し、内皮細胞は肥大してヘモジリン沈着があるが、これらの変化も免疫群と対照群の間に著明な差がない。

他臓器ではLP、LPfr2免疫群に睾丸萎縮および

図21 抗ウシ副腎 A af 3 標識抗血清（No. 60）によるウシ副腎の蛍光直接染色、（右が髄質）



甲状腺のコロイド消失と円形細胞軽度浸潤がアジュバント対照群に比し多く認められたが、Aaf3群にはそれらの臓器に著変はなかった。肝・腎・脾・肺・脾・脳などには対照群との間に有意な差はなかった。

V. 抗血清の移入

異種抗Aaf3抗血清移入群では皮質細胞の解離・好エオジン化が強く壊死に陥ったものが多い（図29, 30）。1例（No.97）では著明な出血巣が皮質にあり（図31）、同部の皮質細胞は壊死に陥っている。髄質を主として好エオジン球を混ざる円形細胞浸潤が抗血清移入群には2例（No.81, 98）ある。アジュバント対照血清移入群では、皮質細胞の軽い好エオジン化・解離などが見られたが、核変化は乏しく、出血、細胞浸潤などもない（図32、表2）。

同種抗LPfr2抗血清移入では皮質の好エオジン化、核変化などが認められ、髄質細胞の一部には空胞変性像を認めた（図33）。アジュバント対照血清移入群ではそのような変化は乏しい。

考 察

種々の臓器の不溶性リポ蛋白画分には狭義の組織特異抗原の存在することが知られつつあり、倉田ら¹⁹⁾の方法で可溶性画分としてとりだすことができる。甲状腺や睾丸ではその方法で抽出したLPfr2とよばれる画分がすでにディスク電気泳動や免疫ゲル内拡散で単一であることが示されたが^{21,36)}、副腎について同方法を試みたところでは、特異抗原以外に多数の臓器共通抗原の含まれていることがわかった。

筆者は共通抗原を、共通抗原に対する抗体を用い吸収除去することによって特異抗原の単離を行おうと試

表2 抗ウシ副腎 Aaf 3 抗血清移入実験

動物 No.	移入血清 No.	移入量 ml	Thorn テスト	副腎障害* 皮質変性・出血・細胞浸潤		
	抗血清					
80	62	1	+	++	+	-
81	72	1	+	++	-	+
82	60	1	+	+	-	-
84	73	1	+	+	-	-
96	60	0.5	+	+	-	-
97	62	0.5	+	++	++	-
98	63	0.5	+	+	-	+
	アジュバンド 対照血清					
85	64	1	-	±	-	-
86	65	1	-	-	-	±
92	70	1	-	-	-	-
99	64	0.5	-	±	-	-
100	65	0.5	-	-	-	-

*.障害の程度は±, +, ++の順に強くなる

みた。同様な考えによる肝特異抗原の単離を小西²⁰⁾が試み、吸収を試験管内で行ったのち、QAEセファデックスで特異抗原を分離する方法をとっているが、収量は低く、単離抗原の分析は不完全であった。そこでアフィニティークロマトグラフィーによる副腎特異抗原の単離を試みた結果良い成績を得ることができた。得られた3つの画分(Aaf 1, Aaf 2, Aaf 3)はディスク電気泳動でも免疫ゲル内拡散でも単一で、しかも沈降線は完全一致する。恐らくAaf 1, Aaf 2はAaf 3のルーズな凝集物なのであろう。Aaf 3を濃縮すれば常に重合体得られるからである。そこでAaf 3の性質を種々の面からしらべてみた。

Aaf 3は膜透過圧法でも Davison 法²⁸⁾によるカラムクロマトグラフィーでも分子量は46,000~47,000で、細胞膜系特異抗原についてこれまで得られている分子量²¹⁾²²⁾³⁶⁾にはほぼ一致する。約4.4%の糖脂質(主にグロボソドI)を含むリポ蛋白で、抗原活性は蛋白部分にあると考えられる。蛋白部分は赤外スペクトル、円偏光二色性の測定成績からみて、 α -ヘリックス、 β -構造、ランダムコイル構造のすべてを含んでおり、TBHによる塩素化反応からみるとランダムコイル構

造は全体の20%を越えない程度と推定される。

電顕的には軸比約2:1の棒状粒子で、甲状腺¹⁸⁾や睾丸²¹⁾などで見られた粒子構造とほぼ等しいものが観察された。倉田ら¹⁹⁾³⁶⁾はこのような粒子が細胞膜系即ち細胞膜および細胞内膜(ミクロソーム膜・ミトコンドリア膜・核膜)を構成する構造リポ蛋白粒子であると考えている。もしそうならば、副腎の場合その細胞膜系は特異抗原粒子並びに臓器共通抗原粒子のモザイクからできていることになる。もっとも膜構造モデルとして Fluid Mosaic Theory³⁷⁾の立場をとるならば、この粒子はリピン膜中に浮遊する蛋白粒子そのものであるかもしれない。その場合はモザイクといっても、蛋白粒子間相互の接触はないことになる。

特異抗原粒子が細胞内膜系にも分布していることは小西²⁰⁾、岡田³⁶⁾が電顕 Peroxidase 抗体法で認めているが、筆者は monospecific な抗Aaf 3抗体による蛍光抗体法で副腎細胞質がびまん性に染まり核が陰性で、甲状腺³⁶⁾、睾丸²¹⁾その他¹⁷⁾²⁰⁾²²⁾でみられた蛍光抗体染色像に近いことを確めた。

特異抗原粒子画分をメルカプトエタノールで長時間還元してサブユニット画分(P₂)を得たが、その分子

量は3,400~3,700で、30%アクリルアミドゲルディスク電気泳動では10数本のバンドになる。このことはサブユニットが分子量は等しいが荷電の異なる、即ち1次構造の異なる幾つかのペプチドから成ることを暗示する。分子量から計算すれば1つのAaf 3粒子は12個のサブユニットから成ることになる。

Aaf 3は脂質としてはほとんどグロボシド I のみを含むことは興味深い。代謝回転の遅い糖脂質の1つが、表面活性剤による膜成分処理に抵抗して最後まで残ることの意味はなんであろう。糖脂質は膜構造維持の上に必要なのではないかと考えられてもいるが、筆者もグロボシド I がユニット粒子の分散に関係する因子ではないかと考えている。サブユニットはなお抗原活性をもっている。その活性はペプチドの1次構造に基づくであろうが、活性部分の解析にはまだ困難が多い。

副腎からつくったLP, LPfr2あるいはアフィニティークロマトグラフィーで抽出した特異抗原画分(Aaf 3)を Freund 完全アジュバントとともにモルモットに投与すると血中に自己抗体が生じ、遅延型皮内反応が陽性になる。副腎重量/体重の比が低下し、Thorn テストで副腎機能の低下が推定される。形態学的には副腎皮質束・網状層の細胞の解離と好エオジン化⁷⁾、稀に壊死、出血、髄質を主とする細胞浸潤などが現われるが、出血を除けば程度は低いにせよ同様な変化がアジュバント対照群にも認められるから、それらにあまり大きな意味を求めるわけにはいかない。しかし抗血清を他の個体に移入すると、Thorn テストは陽性化し、副腎組織障害が起り、アジュバント対照群との差は明らかになる。副腎以外の臓器では、能動免疫における睾丸の萎縮と甲状腺のコロイド消失および軽度の細胞浸潤がアジュバント対照群に比し多く認められるが、これらの変化は副腎LPfr2画分に含まれる共通抗原によるものと考えられる。それらを除いたAaf 3による免疫ではそのような変化はおこらないからである。副腎障害を能動免疫でもつくるためには感受性の高い動物と非特異的な臓器障害をおこさないようなアジュバントを選ぶ必要があるであろう。

筆者の副腎特異抗原は従来 Witebsky ら^{4)11)~14)}によって見いだされている種々の副腎抗原とは異なるものであるが、このような抗原がヒトの特異性副腎萎縮症の発生にどのように関与するかという問題が今後に残る。

結 論

副腎の可溶画分に従来いくつかの副腎特異抗原の存在が認められているが、筆者は副腎の不溶性画分から副腎特異抗原を分離した。

まず、ウシ副腎の不溶性リポ蛋白画分をデソキシコール酸ソーダ処理で可溶化し、セファローズ4Bゲル濾過で特異抗原を含む画分(LPfr2)を得た。同画分は臓器共通抗原も含み、ディスク電気泳動でも単一でないで、ウシの肝・脾不溶性リポ蛋白画分に対する抗血清グロブリンを臭化シアン活性化セファローズ4Bにカップルさせ、カラムに副腎LPfr2画分を通して、副腎特異抗原粒子画分を分離した。

この画分は免疫ゲル内拡散でもディスク電気泳動でも単一で、分子量46,000~47,000の棒状粒子であり、約4.4%のグロボシド I を含む、蛋白部分は二次構造として α -ヘリックス、 β -構造、ランダムコイル構造を含んでいる。

脱リピン後メルカプトエタノール処理を長時日行い、分子量3,550 \pm 150の抗原活性をもったサブユニットが得られた。サブユニットはディスク電気泳動でも単一でない。

副腎特異抗原粒子画分に Freund 完全アジュバントを加えて、モルモットを免疫すると副腎の体重あたりの重量比と機能の低下(Thornテスト陽性化)がおこるが、副腎の病変はアジュバント対照群と大きな差がない。しかし抗血清を他の個体に移入すればThorn テストは陽性化し、副腎に有意な病変が生ずる。アジュバント対照血清では Thorn テストは陰性で、副腎病変も弱い。

終りに御指導戴いた金大がん研究所病態生理部倉田自章教授、御校閲を戴いた本学第1外科学教室岩高教授に深甚な謝意を表します。種々御協力戴いたがん研究所病態生理部松田知夫助教授、岡田収司博士、教室員各位に深く感謝致します。なお、円二色性測定に際し本学第1生化学教室長井雅子氏に御尽力戴きました。種々御援助を賜った本学第1外科学教室山本恵一講師にあわせて厚くお礼申しあげます。

文 献

- 1) Colver, J. & Glynn, L. E. : Immunol., 1, 172 (1958).
- 2) Milcou, M., Pop, A., Lupulesco, A. & Taga, M. : Ann. Endocr., 20, 799 (1959).
- 3) Steiner, J. W., Langer, B., Schatz, D. L. & Volpe, R. : J. Exp. Med., 112, 187

- (1960).
- 4) **Witebsky, E. & Milgrom, F.** : *Immunol.*, 5, 67 (1962).
 - 5) **Terplan, K., Dumonde, D. C. & Glynn, L. E.** : *Arch. Path.*, 76, 333 (1963).
 - 6) **Barnett, E. V., Dumonde, D. C. & Glynn, L. E.** : *Immunol.*, 6, 382 (1963).
 - 7) **Andrada, J. A., Skelton, F. R., Andrada, E. C., Milgrom, F. & Witebsky, E.** : *Lab. Invest.*, 19, 460 (1968).
 - 8) **Iрино, T. & Gallman, A.** : *Metab.*, 17, 717 (1968).
 - 9) **Levine, S.** : *Endocr.*, 84, 469 (1969).
 - 10) **Werdelin, O. & Witebsky, E.** : *Lab. Invest.*, 23, 136 (1970).
 - 11) **Centeno, E. R.** : *Fed. Proc.*, 21, 42 (1962).
 - 12) **Shulman, S., Milgrom, F. & Witebsky, E.** : *Immunol.*, 7, 605 (1964).
 - 13) **Centeno, E. R., Shulman, S., Milgrom, F. & Witebsky, E.** : *Immunol.*, 8, 160 (1965).
 - 14) **Centeno, E. R. & Shulman, S.** : *Immunol.*, 24, 901 (1973).
 - 15) **Abelev, G. I.** : *Immunopathology*, V ed. by Grabar, P. & Miescher, P. A. p.41, Basel Stuttgart, Schwabe & Co. Publishers, 1965.
 - 16) **Kurata, Y. & Okada, S.** : *Int. Arch. Allergy*, 29, 495 (1966).
 - 17) **Kurata, Y., Watanabe, Y., Okada, S. & Fukuyama, Y.** : *Int. Arch. Allergy*, 35, 392 (1969).
 - 18) **Okada, S., Kurata, Y., Konishi, K. & Matsuda, T.** : *Int. Arch. Allergy*, 39, 6 (1970).
 - 19) **倉田自章・岡田収司** : 免疫実験操作法 (日本免疫学会編), 255, 金沢, 1971.
 - 20) **小西奎子** : *臨床免疫*, 3, 395 (1971).
 - 21) **郷倉 満** : *十全医会誌*, 83, 268 (1974).
 - 22) **三俣昌子** : *十全医会誌*, 83, 465 (1974).
 - 23) **Smith, J. T., Funckes, A. J., Barak, A. J. & Thomas, L. E.** : *Exp. Cell Res.*, 13, 96 (1957).
 - 24) **Kato, I. & Anfinsen, C. B.** : *J. Biol. Chem.*, 244, 5849 (1969).
 - 25) **Day, C. E. & Levy, R. S.** : *J. Lipid Res.*, 9, 789 (1968).
 - 26) **Itzhaki, R. F. & Gill, D. M.** : *Anal. Biochem.*, 9, 401 (1964).
 - 27) **Lowry, O. H. & Rosebrough, N. J.** : *J. Biol. Chem.*, 193, 265 (1951).
 - 28) **Davison, P. F.** : *Science*, 161, 906 (1968).
 - 29) **Matsushima, A., Yamazaki, S., Shibata, K. & Inada, Y.** : *Biochem. Biophys. Acta.*, 271, 243 (1972).
 - 30) **Grabar, P.** : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 69, 591 (1957).
 - 31) **Boyden, S. V.** : *J. Exp. Med.*, 93, 107 (1951).
 - 32) **Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J. H., Downs, C. M. & Metcalf, T. G.** : *Amer. J. Path.*, 34, 1081 (1958).
 - 33) **Curtain, C. C.** : *J. Histochem. Cytochem.*, 9, 484 (1961).
 - 34) **増田幸夫** : *高分子化学*, 20, 161, 166, 171, 206, 210 (1963).
 - 35) **Miyazawa, T., Fukushima, K., Sugano, S. & Masuda, Y.** : *Conformation of Biopolymers II* ed. by G. N. Ramachandran, p. 557, N. Y. Acad. Press, 1967.
 - 36) **Okada, S.** : *Acta. Path. Jap.*, 23, 249 (1973).
 - 37) **Singer, S. J.** : *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 195, 16 (1972).

Abstract

A lipoprotein fraction (LPfr2) was isolated from cellular insoluble lipoprotein fraction of bovine adrenal glands by treatment with desoxycholate and gel filtration through Sepharose 4B. This fraction contained an adrenal gland-specific antigen and common antigens. The latter was removed by affinity chromatography using anti-bovine liver LPfr2 and anti-bovine spleen LPfr2 antisera. The identical adrenal gland-specific antigen was obtained from the cortex and the medulla of adrenal glands.

The electron micrograph showed the purified fraction (Aaf3) to consist of rod-like particles. The particle contained about 4.4 per cent lipid (mainly globoside I). The molecular weight of the particle was determined to be 46,000~47,000. The circular dichroism spectra and the infrared absorption spectra showed the particle to contain α -helix, β -configuration and disordered coil. Chlorination of the particle with *tert*-butylhypochlorite suggested that the random coil was less than 20%. The subunit fraction (M.W. = 3,550 \pm 150) was obtained by prolonged reduction of delipidated Aaf3 and chromatography on Sephadex G-100. This fraction showed 10 or more components on disc electrophoregram.

Guinea pigs injected with bovine LP, LPfr2 or Aaf3 preparations incorporated in Freund complet adjuvant developed positive Thorn test, circulating autoantibody and adrenal lesions. But, the difference between histological lesions in these animals and in adjuvant control animals was not significant. Intravenous injection of sera from guinea pigs sensitized with LPfr2 or Aaf3 into normal guinea pigs gave positive Thorn test and severer adrenal lesions than those transferred with adjuvant control sera.

図22 No. 21 (皮質 LP fr2, 13mg, 5回, 6週)
網状層細胞の解離, 萎縮, 類壊死, 髓質細胞浸潤.

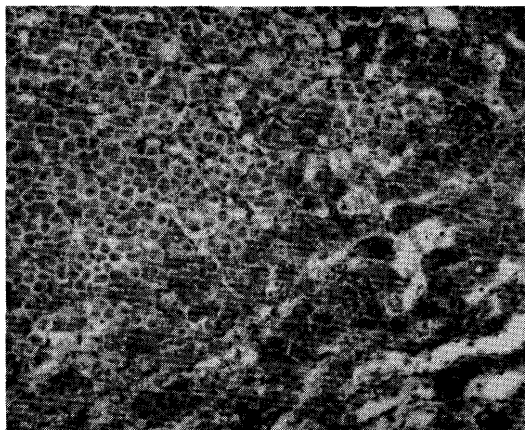


図25 No. 60 (A af 3, 1.7mg, 6回, 10週)
網状層の細胞解離, 萎縮, 変性.

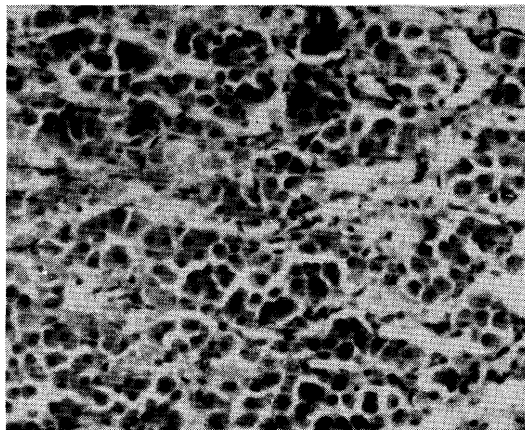


図23 No. 28 (髓質 LP fr2, 13mg, 5回, 6週)
網状層, 束状層一部の好エオジン化, 変性.



図26 No. 61 (A af 3, 1.7mg, 6回, 10週)
髓質細胞浸潤.

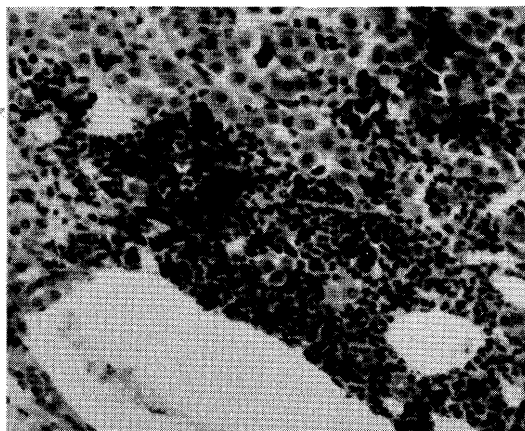


図24 No. 69 (同種 LP fr2, 1.5mg, 6回, 10週)
網状層細胞の解離, 萎縮, 変性.

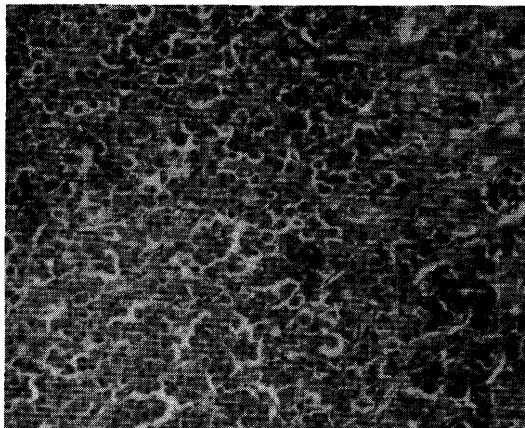


図27 No. 75 (アジュバント, 6回, 10週)
網状層の軽い変化.

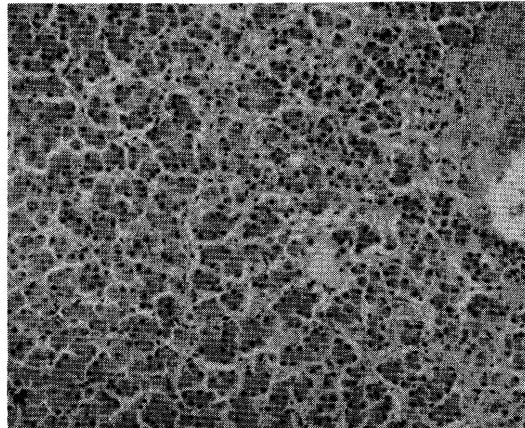


図28 No. 14 (アジュバント, 5回, 6週)
束・網状層の好エオジン化, 軽い変性.

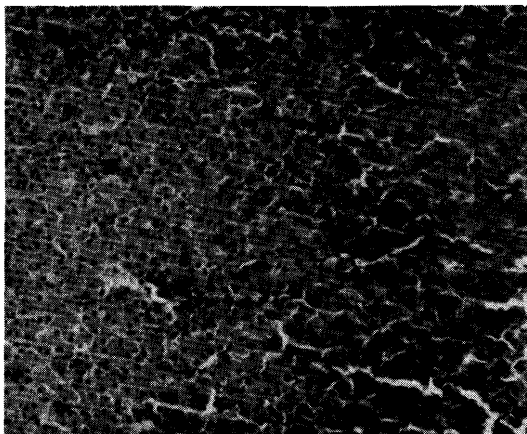


図31 No. 97 (抗 A af 3 抗血清移入)
網状層の出血巣.

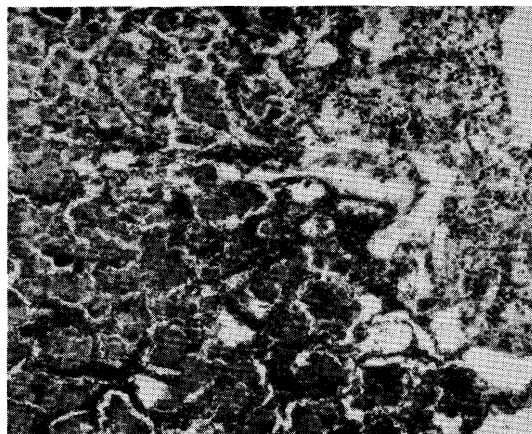


図29 No. 97 (抗 A af 3 抗血清移入)
網状層の変性・壊死.

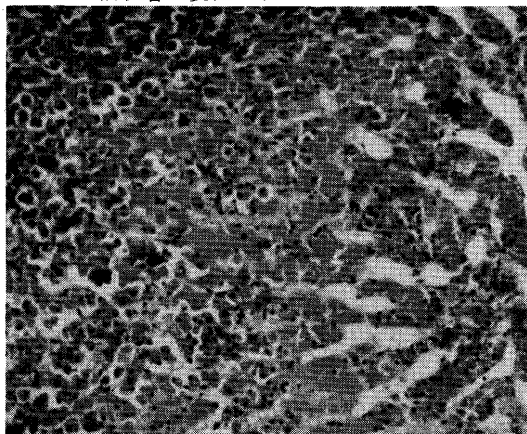


図32 No. 85 (アジュバント対照血清移入)
網状層に軽い変性.

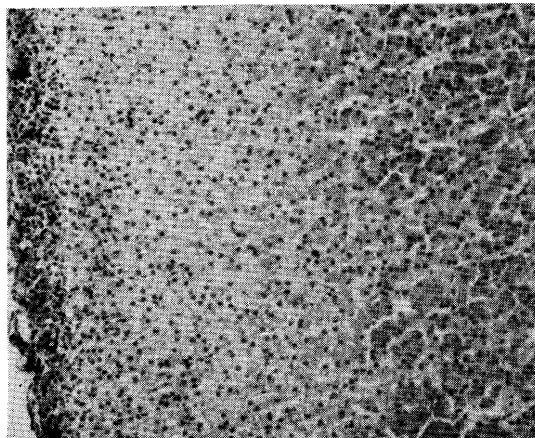


図30 No. 81 (抗 A af 3 抗血清移入)
束状層上部の壊死細胞.

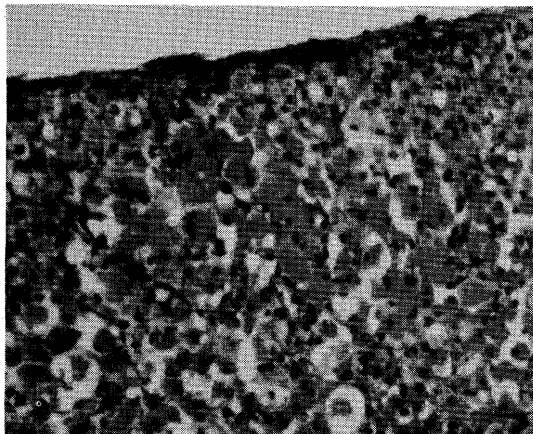


図33 No. 90 (抗同種 LP fr 2 抗血清移入)
髓質細胞の空胞変性.

