

甲状腺細胞質膜系抗原の免疫学的研究*

金沢大学大学院医学研究科第二病理学講座（主任：石川大刀雄教授）

金沢大学結核研究所病態生理部（研究指導：倉田自章教授）

岡 田 収 司

（受付：昭和42年1月10日）

緒 言

自己免疫疾患としての甲状腺炎に関する研究は、橋本氏甲状腺炎を中心に行われ、その患者血清中には種々の抗甲状腺抗体の出現することが知られている。対応する抗原としてコロイド成分のサイログロブリン、 CA_2 成分（コロイド第二成分）、ろ胞上皮成分のマイクロソーム因子と核成分が知られており、抗サイログロブリン抗体は沈降反応¹⁾²⁾、タンニン酸処理感作血球凝集反応³⁾、蛍光抗体法⁴⁾、皮膚反応⁵⁾で、抗 CA_2 抗体は蛍光抗体法⁶⁾、抗マイクロソーム因子抗体は補体結合反応⁷⁻⁹⁾、蛍光抗体法¹⁰⁾、組織培養法¹¹⁾で、また抗核抗体は蛍光抗体法¹²⁾で、それぞれ証明されている。

実験的には、甲状腺ホモジネートとくにサイログロブリンを Freund's complete adjuvant とともに動物に投与することによって、抗サイログロブリン抗体が生じ、甲状腺炎の発症する

ことが見いだされた¹³⁻¹⁵⁾。しかし、抗サイログロブリン抗体の細胞障害性は乏しく、甲状腺炎の発生における同抗体の意義は低いものとみなされ²⁾、いわゆるマイクロソーム因子の関与の方がより重視されつつある。しかしマイクロソーム分画の抗原組成は一般に著しく複雑であり、たとえば肝臓などのマイクロソームには10~15の可溶性抗原蛋白が区別されている¹⁶⁾。甲状腺の場合、マイクロソーム分画の抗原分析はこれまでほとんどなされていないし、この分画で動物に甲状腺炎をつくる試みも成功していない。筆者は甲状腺ろ胞上皮の細胞質膜系の不溶性リポ蛋白(LP)について主に免疫学的な抗原分析を行い、これが実験的甲状腺炎、ヒト甲状腺炎などの発生病理に意義をもつことを明らかにしようとして試みた。得られた結果をここに報告する。

実験材料および実験方法

1. 抗原のつくり方

1) 実験材料

ヒト、ウシ、ウサギ、モルモットの甲状腺を材料とした。これらはできるだけ周囲の脂肪組織、結合組織を取り除き、 -18°C に凍結保存した。これらの甲状腺から抗原として三種の方法で、細胞質膜系の不溶性リポ蛋白分画を抽出し、それぞれLP-I、LP-II、LP-IIIと呼ぶことにした。また甲状腺エキスあるいはサイログロブリン（以下TGと略記）および甲状腺の場合と同様の方法で抽出した他臓器からのリポ蛋白分画を対照抗原とした。

2) 抗原の抽出方法

LP-I：高沢法¹⁷⁾に多少の改変を加え、つぎのように行った。 -18°C に凍結保存した甲状腺を細切し、0.05M酢酸ソーダ溶液を4倍量加え、Waring blenderで約10分間砕く。ガーゼ2枚でろ過し、4000 r. p. m., 20分間遠心し、上清部分を氷酢酸でpH 4.5に調整し約12時間放置する。その後4000 r. p. m., 20分間遠心し、その沈澱に5~10倍量の0.2M磷酸緩衝液(pH 7.6)を加え、20分間 magnetic stirrer で攪拌する。9000 r. p. m., 30分間遠心し、沈澱をとる。同様の攪拌・遠心操作をもう2回行い、得た沈澱に倍量の蒸留水を加

*本論文の要旨は第55回日本病理学会（1966）および第15回日本アレルギー学会（1965）において発表した。

え, カセイソーダ溶液で pH 12.0 とし, 2時間攪拌すると, 沈澱の大部分は黄褐色半透明状に溶解する。3000 r. p. m., 20分間遠心して, 上清部分をとり, 稀酢酸で pH 7.4 にすると濁濁を生ずる。3000 r. p. m., 20分間遠心で沈澱を集め, 凍結またはデシケーターで減圧乾燥して冷暗所に保存する。抽出操作はすべて 0°~4°C で行った。

LP-II: Smith らの方法¹⁸⁾ に改変を加えて以下のように行った。凍結甲状腺を細切し, 2倍量の Solution I¹⁸⁾ (KCl 11.93gm/l, モノヨード酢酸 186mg/l, クエン酸ソーダ 5gm/l) を加え, Waring blender で約5分間砕く。ガーゼ2枚, 4枚, 8枚でつぎつぎにろ過し, ろ液を9000 r. p. m., 30分間遠心する。沈澱に5倍量の Solution I を加え, ガラスホモジナイザーで15分間砕く。後9000 r. p. m., 30分間遠心し, その沈澱に Solution III¹⁸⁾ (KCl 74.5gm/l, モノヨード酢酸 186mg/l, クエン酸ソーダ 10gm/l, HCl で pH 4.5 にする) を5倍量加え, ガラスホモジナイザーで15分間砕く。同様の操作を Solution II を用いて7~8回繰り返し, 上清のオルシン反応による RNA 試験及びトリクロル酢酸による蛋白反応が陰性であることを確かめ, その沈澱を凍結または乾燥して保存した。全操作は0°~4°C の冷室で行った。

LP-III: LP-II に数倍量の蒸留水を加え, カセイソーダ溶液で pH 12.0 にする。この溶液を冷凍室で2時間攪拌し, 3000 r. p. m., 20分間遠心して, 上清をとり, 氷酢酸を加えて pH 7.4 とする。生じた白色の膜様物を 3000 r. p. m., 20分間遠心して集め, 凍結または減圧乾燥して保存する。これらの操作はすべて0°~4°C で行う。

甲状腺エキス: 甲状腺を細切し, 2倍量の0°~4°C に冷した0.85% 生理食塩水を加え, magnetic stirrer を用い, 一夜冷室で攪拌した後, 4000 r. p. m., 15分間遠心して得た上清を, 甲状腺エキスとして使用時まで -18°C に保存した。

サイログロブリン (TG): ウシ TG は Nutritional Biochemical Corp. (Cleveland, Ohio) より入手し, ウサギ TG は Ui and Tarutani 法¹⁹⁾ でウサギ甲状腺より抽出した。

3) 甲状腺 I¹³¹ · LP-I のつくり方^{17,20,25)}

新鮮甲状腺 LP-I 沈澱物の湿量 1.0gm に, 0.1M 燐酸緩衝液 (pH 7.4) を 5~10 ml 加え, 室温にて NaI¹³¹ (Dinabot) の 1 mc をまざる。37°C, 50分間インキュベートし, 20% thiosulfate 0.5ml 加えて冷却する。遠心後, 0.1M 燐酸緩衝液 (pH 7.4) を用

いて洗う。この洗滌操作を3回くり返して, 遊離の I¹³¹ を除く。得た沈澱 (I¹³¹ · LP-I) は直ちに使用する。

4) DOC 及び Triton 可溶性抗原

乾燥 LP 抗原 10mg を 0.2% DOC (デオキシコール酸ソーダ) 溶液 (または 5% Triton X-100 溶液) 2 ml と乳鉢内でよくすり, 3000 r. p. m., 5分間遠心する。上清に10倍量のアセトンを加え, -18°C に2時間冷却すると白色沈澱が生ずる。これを3000 r. p. m., 5分間遠心して沈澱をとり, 生理食塩水 0.5ml にとかしたものを DOC (または Triton) 可溶性分画とした。一方, 最初の遠心で生じた不溶性沈澱を 0.2% DOC 溶液 (または 5% Triton 溶液) で数回洗い, ついで生理食塩水で洗って, 3000 r. p. m., 5分間遠心して生ずる沈澱に生理食塩水 0.5ml を加えて, 乳鉢ですってけん濁液としたものを, DOC (または Triton) 不溶性分画とした。

2. 抗血清のつくり方

1) 動物の免疫及び処置

モルモット (体重450~650 gm) と白色ウサギ (体重2.0~2.5 kg) を用い, 蒸留水でけん濁液とした 1~5 mg/ml の抗原液を, 同量の Freund's complete adjuvant (流動パラフィン 8.5 ml, Arlacel 1.5ml, BCG 菌 1 mg の割合を含む) とともにエマルジョンとして, 筋内, 皮下または皮内に注射した。用いた抗原の種類, 免疫動物, 免疫回数, 経過等は第1表に示す通りである。免疫動物について屠殺2日前に, 各種抗原で皮膚反応を行なった。採血はモルモットでは心臓穿刺により, ウサギでは総頸動脈から行なった。分離した血清は -18°C に凍結保存した。免疫による病理組織学的変化をみるために, 全採血後, 甲状腺及びその他の主臓器を10%ホルマリン水溶液で固定し, パラフィン包埋, ヘマトキシリン・エオジン染色標本とした。

2) 患者血清

組織学的に診断の明らかな橋本氏甲状腺炎血清12例と亜急性甲状腺炎 (de Quervain's thyroiditis) 血清4例を集め, -18°C に保存し, 使用時融解した。血清の凍結, 融解をくり返さないように留意した。

3. 免疫学的検査方法

1) 皮膚反応

免疫モルモット, ウサギの背部の毛をあらかじめ取り取り, 正中線より約2cmの部位に, 3cm以上間隔をおいて抗原を皮内に投与した。抗原は甲状腺 LP-I, II, III, 甲状腺以外の臓器の LP 及び TG を用い, 1

第1表 動物の甲状腺免疫

| 免疫動物及び群 | 匹数 | 免疫抗原 | 抗原量(1回) | 免疫回数 | 経過 |
|---------|----|--------------|-----------|------|-----|
| モルモット | 1 | ウ シ LP- I | 1 mg(乾燥量) | 1回 | 1ヵ月 |
| | 2 | LP- II | 1 (") | 1 | 1 |
| | 3 | LP-III | 1 (") | 1 | 1 |
| | 4 | TG* | 1 (") | 1 | 1 |
| | 5 | ウ サ ギ TG | 1 (") | 1 | 1 |
| | 6 | ヒ ト LP- II | 5 (") | 5 | 2 |
| | 7 | モルモット LP-III | 35 (湿量) | 1 | 2 |
| ウ サ ギ | 1 | ウ シ LP- I | 3 (乾燥量) | 1 | 1 |
| | 2 | LP- I | 5 (") | 3 | 2 |
| | 3 | ウ サ ギ LP- I | 3 (") | 1 | 1 |
| | 4 | LP- I | 5 (") | 2 | 2 |
| | 5 | LP- II | 5 (") | 5 | 2 |
| | 6 | LP- II | 35 (湿量) | 6 | 3 |
| | 7 | LP- II | 35 (") | 19 | 6 |

注：抗原の乾燥量1mgは湿量の約7mgに相当する。

*サイログロブリン。

カ所0.1ml(抗原30 μ g)を投与した。なおLP標本の場合は生理食塩水と乳鉢で充分にすり、けん濁液として用いている。2, 4, 24, 48時間後の経過を観察し、発赤の直径を測定した。

2) 寒天内拡散法(Ouchterlony法)²¹⁾

4%精製寒天ブロック30gm, 1mg/mlのEDTAと1.7%にNaClを含む0.05M磷酸緩衝液(pH7.6, イオン強度0.12)45ml, 0.1%マーズン液9ml, 蒸留水6mlをませ加熱溶解し, この20mlを水平に保った8cm \times 12cmのガラス板に流し, 冷却後使用した。抗原抗体孔は, 直径8mm, 間隔4mmを繁用したが, 必要に応じ適当に変化させた。抗原は0.2%DOC溶液1mlにつき, 乾燥抗原量5~10mgの割合で, 乳鉢を用いて充分すりけん濁液とした。抗血清は無稀釈で用いた。反応は20 $^{\circ}$ C湿状態で行なわせ, 4~5日間毎日観察し, 写真撮影後, 生理食塩水で充分洗って乾燥し, 必要に応じ0.3%thiazine red 2%酢酸溶液またはSudan black B 60%アルコール飽和溶液などで染色し, 最終判定を行なった。

3) 寒天内免疫電気泳動法²²⁾

4%精製寒天ブロック30gm, ベロナール緩衝液(pH8.3, イオン強度0.1)22.5ml, 0.1%マーズン液9mlと蒸留水28.5mlをませ, 加熱溶解し, 水平に保った8cm \times 12cmの透明ガラス板に10ml流し, 冷却後中央部に3mm \times 5mmの抗血清孔をつくった。両端にろ紙をのせ, 緩衝液槽に浸した。電極は白

金線, 緩衝液はベロナール緩衝液(pH8.3, イオン強度0.05)を用いた。抗血清を孔に入れ, 15mA, 80V, 1時間泳動し, 直ちに泳動方向に平行な巾2mm \times 長さ7cmの抗原槽を抗血清孔から5mm離してつくり, 0.2%DOC溶液でけん濁液とした抗原液を入れ, 20 $^{\circ}$ C湿状態で反応させた。

4) 螢光抗体法

体重550gmのモルモットに, 他のモルモットから集めて抽出した甲状腺LP-IIIを, 湿量35mg, 1回, Freund's complete adjuvant法にて投与し, 50日後, 採血して得られた血清から, Riggsらの方法²³⁾によりfluorescein isothiocyanateで螢光抗体をつくり, Sephadex G-25のカラムを通して遊離色素を除き, ポリビニールピロリドンに対する透析で濃縮し, 終濃度約1%になるようにした。抗体をつくらせたモルモット及び他の個体のモルモット甲状腺を-80 $^{\circ}$ Cで凍結し, 使用時まで-20 $^{\circ}$ Cに保存したものをcryostatで切片とし, 染色を行なった。

5) Immune adherence hemagglutination test

西岡法²⁴⁾に準じ, つぎのように行なった。抗原は甲状腺LP1~2mg/mlの生理食塩水けん濁液とし, 4 $^{-0}$, 4 $^{-1}$, 4 $^{-2}$, 4 $^{-3}$, 4 $^{-4}$ 倍に稀釈, 抗血清は4 $^{-1}$, 4 $^{-2}$, 4 $^{-3}$, 4 $^{-4}$ 倍に稀釈した。補体は新鮮モルモット血清または乾燥市販補体を, ヒト血球はO型血球を生理食塩水及び緩衝液で洗滌して, 2%けん濁液としたものを用いた。反応は, まず各稀釈抗原0.2mlに各稀

積抗血清 0.2ml を加え, 37°C, 30分間ふり, 0°C に冷却し, 50倍稀釈補液 0.5ml 加え, 37°C, 15分間

振とう. 2%赤血球けん濁液 0.1ml を加え, 37°C, 1時間静置後, 観察した.

実験結果

1. 抗原の性状

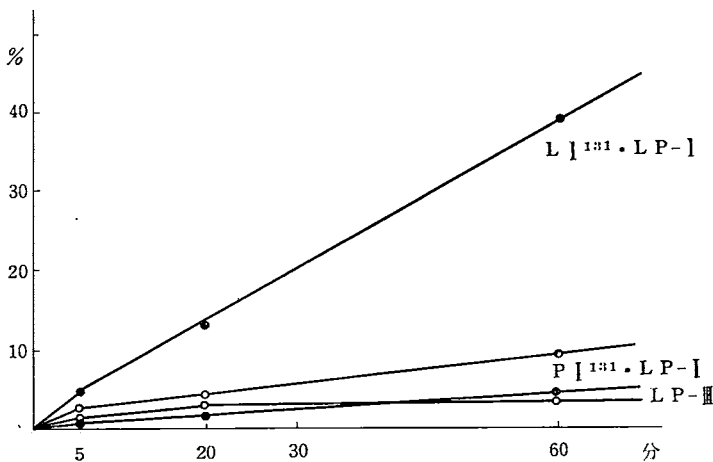
甲状腺 LP 標本は乾燥すると黄褐色アメ状になる. 室温に保存した場合, 抗原性は約 1~2 カ月保たれる. 牛甲状腺 LP-I, II, III について窒素を Kjeldahl 法, 糖質を Dubois らの方法²⁶⁾, 脂質を n-Buthanol で抽出後, 重量法で測定した結果, LP 標本の lot により多少の差はあるが, 窒素約 8%, 糖質約 1%, 脂質は約 40% であった.

ウシ甲状腺の I^{131} -LP から n-Buthanol で抽出した I^{131} 結合脂質を, シリカゲル G を支持体とし, クロロホルム:メタノール:水 (85:35:5) を溶媒として薄層クロマトで 10cm 展開し, X線フィルムでラジオオートグラフィーを行うと, 約 12 個のスポットを認めた. この I^{131} 結合粗脂質を クロロホルム・メタノール混合液を溶媒としてシリカゲルカラムを通し, クロロホルム:メタノール (8:2) のステップで, 最も強いカウントを示す分画を集め, 濃縮し, 薄層クロマトで展開すると, $R_f=0.5$ の 2~3 個のスポットが認められた. ただしこの

物質の同定はまだ行っていない.

つぎにウシ甲状腺 LP-I の I^{131} とりこみを, 高沢¹⁷⁾, Degroot²⁰⁾ の方法に準じて時間的にしらべた. 新鮮甲状腺 LP-I 標本 (湿状態, 約 1 gm) に蒸溜水 1.9ml, 0.1N 磷酸緩衝液 (pH 7.4) 0.1ml をませ, $Na I^{131}$ の $1 \mu\text{C}/0.1\text{ml}$ (磷酸緩衝液) を加え, 37°C にインキュベートする. 5, 20, 60 分後, その 0.2ml をとり, 10%チオ硫酸ソーダ液を 1 滴加えて反応を止め, ペーパークロマト用ろ紙 (東洋ろ紙 No. 51) の原点に, 試料を 4~5 回ぬり, 乾燥する. n-Buthanol : Dioxane : 2N-NH₄OH 液 (4 : 1 : 2) の混合液を溶媒として, 上昇法で 12 時間展開し, 乾燥後, 原点の I^{131} -蛋白, 溶媒先端に流れる I^{131} -脂質のカウント数を, ろ紙全体のカウント数に対する比で表わした. 新鮮 LP のヨードとりこみ能は高いが, LP の加熱によって活性は失われた. なお LP-III の I^{131} とりこみもしらべたが, その活性は微弱であった (第 1 図).

つぎに甲状腺 LP-III の形態を電子顕微鏡で



第 1 図 ウシ甲状腺 LP-I, LP-III の I^{131} とりこみの時間的経過

- 脂質結合 I^{131} (LP-I 又は III)
- 蛋白結合 I^{131} (LP-I 又は III)

しらべた。新鮮甲状腺LP-III(湿状態)を0.6%過マンガン酸カリ・ペロナール緩衝液で15分間、4°Cで固定し、段階的濃度のエタノールで脱水後、eponに包埋した。写真1が示すように、電子密度の高い厚さ約20Åの2枚の膜が、電子密度の低い約40Åの中間層をはさむ厚さ約80Åの二重膜構造が見られた。

ついで、ろ紙電気泳動による各LP標本の比較をこころみたが、この場合試料は中性域では溶けないので、Sørensenのグリココール・食塩・カセイソーダ緩衝液pH12.0(イオン強度0.1)で溶解したウシ甲状腺LP-I, II, III, ヒト甲状腺LP-I, ウシ肝臓LP-I等を一定量ろ紙にぬり、同緩衝液を溶媒として、10V/cm, 2時間泳動した。写真2に見られるように各LP標本は、いずれも泳動度の等しい一個

のスポットを示した。

2. 免疫学的実験結果

1) 皮膚反応の成績

速時型反応はほとんど認められず、24時間後の遅延型反応発赤が最も明瞭であった。第2表のように、ウシ甲状腺で免疫したモルモットは、ウシ甲状腺LPに対し反応し、LP-I, II, IIIの間には抗原としての差異は認められなかった。なお注目されることはウシTGも反応陽性に出る点である。これは当然LP標本中のTG混入を疑わせたが、以後の検索では、この点はほぼ否定された。即ち、LP標本はいずれも寒天内拡散法で抗TG抗体と沈降線を作らず、また抗TG血清を用いたPCA反応によっても陰性であった。即ち、抗ウシTGモルモット血

第2表 遅延型皮膚反応(モルモット)

Freund's complete adjuvant を用いて各免疫抗原1mgをモルモットに1回投与し、28日目に行なった各試験抗原30μgに対する皮膚反応を24時間後の発赤の平均直径で表わした。

| 試験抗原 免疫抗原 及びモルモット番号 | | ウシ | ウシ甲状腺 | | |
|---------------------------|---|-------|-------|-------|--------|
| | | TG* | LP-I | LP-II | LP-III |
| ウシ甲状腺 LP-I | 1 | 1.8cm | 1.6 | | |
| | 2 | 1.7 | 1.6 | | |
| | 3 | 2.0 | 1.5 | | |
| | 4 | 2.1 | 1.8 | | |
| ウシ甲状腺 LP-II | 1 | 2.2 | 1.5 | 1.2 | 1.5 |
| | 2 | 2.0 | 1.7 | 1.8 | 1.6 |
| | 3 | 2.3 | 1.3 | 1.6 | 1.8 |
| | 4 | 1.1 | 0.8 | 1.0 | 0.7 |
| ウシ甲状腺 LP-III | 1 | | 1.7 | 1.7 | 1.7 |
| | 2 | | 1.1 | 1.1 | 1.2 |
| | 3 | | 1.2 | 1.2 | 1.2 |
| | 4 | | 1.7 | 1.4 | 1.8 |
| ウシ TG | 1 | 2.3 | 1.0 | | |
| | 2 | 2.5 | 1.0 | | |
| | 3 | 2.5 | 1.0 | | |
| | 4 | 1.5 | 0.7 | | |
| 対照 Adjuvantのみ | 1 | 1.0 | 0.8 | 0.8 | 0.7 |
| | 2 | 0.8 | 0.7 | 0.7 | 0.4 |
| | 3 | 0.6 | 0.5 | 0.7 | 0.5 |

*サイログロブリン。

第3表 遅延型皮膚反応 (ウサギ)

Freund's complete adjuvant を用いて, 各免疫抗原 3mg をウサギに1回投与し, 27日目に行なった各試験抗原 30 μ g に対する皮膚反応を24時間後の発赤の平均直径で表わした.

| 試験抗原 免疫抗原 及びウサギ番号 | | ウシ甲状腺 | | ウサギ 甲状腺 | モルモット 肝臓 |
|-------------------------|---|-------|-------|------------|-------------|
| | | LP-I | LP-II | LP-I | LP-I |
| ウサギ甲状腺 LP-I | 1 | 0.3cm | 0.3 | 1.3 | 0.3 |
| | 2 | 0.5 | 0.6 | 1.5 | 0.5 |
| ウシ甲状腺 LP-I | 1 | 0.8 | 1.0 | 1.1 | 0.4 |
| | 2 | 1.0 | 1.0 | 1.0 | 0.4 |

清 0.1ml を正常モルモットの皮内に注射し, 4時間後 1% Evans blue 液 0.1ml (LP 1mg) と TG 液 0.1ml (TG 0.05~0.5mg) をそれぞれの部位の皮膚に注射した. 1時間後, 皮膚をはがして裏面から反応をしらべたが, 抗ウシ TG モルモット血清はウシ TG と反応し, ウシ甲状腺 LP とは反応せず, 抗ウサギ TG モルモット血清は, ウサギ TG と反応するが, ウサギ甲状腺 LP と反応しなかった. 従って, 甲状腺 LP 標本への TG の混入は少くとも PCA の鋭敏度では否定出来ることになる.

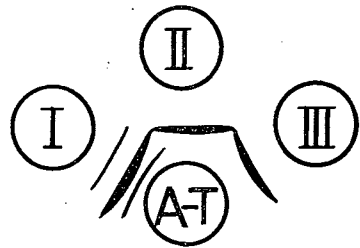
またウシ甲状腺 LP で免疫したウサギは, ウシ甲状腺 LP, ウサギ甲状腺 LP, ウサギ TG と遅延型皮膚反応を示し, ウサギ甲状腺 LP を免疫したウサギは, ウサギ甲状腺 LP, ウサギ TG, ヒト甲状腺 LP と反応したが, ウシ甲状腺 LP, ウサギ肝臓 LP, モルモット肝臓 LP とは反応しなかった (第3表).

2) 寒天内拡散法の成績

LP 標本を 0.2% DOC 溶液または生理食塩水にけん濁して抗原とし, 無稀釈抗血清との間に寒天内拡散法で沈降反応を行い, つぎのような結果を得た.

i) 異種甲状腺 LP 免疫血清の反応

抗ウシ甲状腺 LP-I, II, III モルモット血清はウシ甲状腺 LP-I, II, III とそれぞれ1本の沈降線で連なり (第2図), その抗血清をウシ甲状腺 LP のいずれかで吸収すると, 沈降線は生じなくなり各甲状腺 LP 間に質的な差は



第2図 寒天内拡散法

- I : 甲状腺 LP-I
- II : 甲状腺 LP-II
- III : 甲状腺 LP-III
- A-T : 抗甲状腺 LP 抗体

認められなかった. LP-I との反応では上記沈降線以外に 1~2本の弱い沈降線を示すことがあるが, I¹³¹-LP-I を抗原として沈降線を出し, ラジオオートグラフィーを行うと, 主沈降線だけが放射能を示した. 前述のごとく, LP から分離した脂質は前記沈降線に対するハプテン阻害を示した.

一方, 抗ヒト甲状腺 LP-II モルモット血清はヒト甲状腺 LP-II とは勿論 (写真3, 5), モルモット甲状腺 LP-II 及び自己の甲状腺ホモジネート (0.2% DOC 溶液による 20%けん濁液) と反応し (写真4, Sudan black B 染色陽性), ウサギ甲状腺 LP-II, 牛甲状腺 LP-II とは反応せず (写真3), またヒト脳 LP-II, ヒト肝臓 LP-II, ヒト副腎 LP-II とも反応しなかった (写真5). LP の種属特異性は抗ウシ甲状腺 LP-I モルモット血清とウサギ甲状

第5表 Immune adherence hemagglutination test.

抗血清 1. 抗ウシ甲状腺 LP-I モルモット血清
2. 抗ウシ甲状腺 LP-I ウサギ血清

表現は4 (完全溶血) ~ 0 (完全凝集) の間を5段階に分け, 2以上を陽性とした。

| 抗 原 | 抗 血 清 | 1 | | | | | 2 | | | | | 緩 衝 液 |
|----------------------------|----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-------|
| | | 4-1 | 4-2 | 4-3 | 4-4 | 4-5 | 4-1 | 4-2 | 4-3 | 4-4 | 4-5 | |
| ウシ甲状腺 LP-I (原液・2mg/ml) | 2 ⁰ | 1 | 3 | 2 | 1 | 1' | 4 | 4 | 3 | 2 | 2 | 1' |
| | 2-1 | 1' | 3 | 2 | 1' | 0 | 0 | 1 | 1' | 1 | 1' | 0 |
| | 2-2 | 1 | 3 | 2 | 0 | 0 | 1' | 1 | 1 | 1' | 0 | 0 |
| ウシ甲状腺 LP-II (原液・2mg/ml) | 2 ⁰ | 1 | 3 | 3 | 3 | 2 | 3 | 4 | 4 | 4 | 4 | 2 |
| | 2-1 | 1' | 3 | 3 | 0 | 1 | 1 | 3 | 4 | 3 | 2 | 1 |
| | 2-2 | 0 | 0 | 2 | 0 | 0 | 0 | 3 | 3 | 3 | 0 | 0 |
| ウシ甲状腺脂質 (原液・2mg/ml) | 2 ⁰ | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| | 2-1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 緩 衝 液 (対照) | | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |

ルモット血清についての成績は第5表のよう
で, ウシ甲状腺LP-I (原液2mg/ml) に対
し, 血清256倍稀釈, ウシ甲状腺LP-II (原液
2mg/ml) に対し1024倍稀釈まで陽性であ
った。ウシ甲状腺LPの遊離脂質(原液2mg/ml)
に対しては, 全く反応が認められなかった。非
働化抗ウシ甲状腺LP-Iウサギ血清も, ウシ
甲状腺LP-I及びLP-II (原液2mg/ml) に対
し1024倍稀釈まで陽性を示し, ウシ甲状腺脂
質(原液2mg/ml) に対しては陰性であった。

3. 甲状腺の組織学的変化

1) 能動免疫の場合

モルモット, ウサギに対する異種及び同種の
甲状腺LP免疫により, 甲状腺に i) 間質への
集ぞく性または散在性リンパ球浸潤, ii) ろ
胞の縮小と大小不同化, iii) ろ胞上皮細胞の肥
大と脱落ならびに空胞変性, iv) コロイドの減
少あるいは消失, 等の組織変化を認めた。モ
ルモットでもウサギでも1回の免疫抗原量, 免疫
回数が多い程, リンパ球浸潤, ろ胞上皮細胞障

害性変化は強かったが, 同種, 異種抗原免疫に
かかわらず, ウサギよりモルモットの方が変化
が強く, ウサギは全般にリンパ球浸潤が弱か
った。モルモットをウシ甲状腺LPあるいはウシ
TGで免疫した場合を比較すると, 後者ではリ
ンパ球浸潤は起すが, 前者より細胞障害性変化
は弱い傾向が認められた。なお対照例では甲状
腺に, ほとんど組織学的変化は認めなかった。
(写真10~15)。

他臓器の関係ではモルモットに同種または異
種甲状腺を免疫すると, あるものでは, その動
物の副腎髄質にリンパ球浸潤と軽度の細胞変性
を認め, またモルモット副腎LPをモルモット
に免疫すると, ある例では甲状腺にプラズマ細
胞を主とする細胞浸潤, ろ胞の縮小を認めた。

2) passive transfer について

同種, 異種甲状腺LP免疫血清の passive
transfer により甲状腺に組織学的変化が起るか
否かをしらべた。体重400~500gmの正常モ
ルモットから2ml採血後, 体温にまで温めた下
記各群の抗甲状腺LPモルモット血清2mlを

その心臓内に注入した。

I群：抗モルモット甲状腺LP-IIIモルモット血清注入群，II群：抗ウシ甲状腺LP-IIモルモット血清注入群，III群：抗ヒト甲状腺LP-Iモルモット血清注入群。

各群2匹ずつ用い、抗血清注入48時間後屠殺し、甲状腺及び他の主臓器（肝、腎、肺、脾、副腎等）を組織学的に検索した。結果は各群と

も甲状腺では i) 間質への散在性リンパ球浸潤，ii) 胞の縮小，大小不同化，iii) 胞上皮の肥大と脱落が認められ（写真16, 17），I群の組織変化は全体にII群，III群より強く，後者では血管拡張，出血性炎症の像を認めた。またこれら3群の甲状腺以外の主臓器には，ほとんど組織学的変化を認めなかった。

考 察

甲状腺から抽出したりポ蛋白のうちLP-Iはヨードとり込み能が著しく高く，ヨードイオンとインキュベートするだけで容易に前者は酸化され I_2 となってLPの脂質に結合する。ヨード化LP-Iから分離したヨード化脂質をしらべてみると，強いヨード親和性脂質群がある。このような機能をもつりポ蛋白の存在が，甲状腺ろ胞上皮のミクロソームの高いヨードとり込み能を結果すると考えられる。従って，LP-Iはおそらくミクロソームをも含む細胞質膜系由来のものであろう。LP-IIも抽出方法からみると細胞質膜成分で，細胞膜，ミクロソーム膜，ミトコンドリア膜，核膜等を含むと考えられるが，甲状腺においては，寒天内拡散法による分析で一本の沈降線を生ずるのみで，化学的組成や抗原性はほぼLP-Iの主抗原に一致する。またLP-II標本から作った再構成膜であるLP-IIIも，LP-I, IIに等しい性質をもち，その微細構造はRobertson (1959)²⁷⁾のいわゆる „unit membrane“ によく一致する。なお私どもが抗ラット肝ミクロソーム及びミトコンドリアウサギ血清を用いてしらべたところ，ラット肝LP-II標本は両者に対し完全一致を示す3本の共通沈降線を示したし，Takeuchi and Terayama法²⁸⁾，Emmelot法²⁹⁾で作った細胞膜分画とも抗原性が全く同じであった。甲状腺や肝臓についてのこれらの実験成績は，臓器細胞のghostリポ蛋白が，細胞質膜系を構成している単位膜の構造リポ蛋白に，少なくとも抗原構造の上では一致していることを物語る。

これらの性質をもつ甲状腺リポ蛋白を抗原としてウサギ，モルモットなどを異種免疫すると，

全例に遅延型の皮膚反応が陽性になる（抗原のLP-I, II, IIIの間の差は認められない）。また同種免疫の場合も結果は同じである。即時型の皮膚反応はこれらの動物では微弱であったが，血中沈降抗体がほぼ全ての例に証明出来た。そこでこの流血抗体を用いて抗原分析を行ったが，まず寒天内拡散法ではLP-I, II, IIIの間に抗原性の差異は全く見いだされなかった。このことは吸収実験でも確められた。なおLP-抗LP系の沈降線は，蛋白染色及びSudan black Bによる脂質染色により染まり，後者で全く染まらないTG-抗TG系の沈降線とは，はっきり区別出来た。甲状腺LP標本が種属及び臓器特異性をもつことは異種免疫によって容易に確められたが，この場合，抗異種甲状腺LP抗体は同種甲状腺LP標本とも交叉反応性を示したし，抗同種甲状腺LP抗体は，同種甲状腺LPのみならず異種甲状腺LPとも交叉反応を示した。また，いずれの場合も抗甲状腺LP抗体は，自己の甲状腺と反応し得ることが螢光抗体法及び寒天内拡散法で確められた。従って，これらの抗体は，Witebskyの定義する自己抗体に相当する。

また，甲状腺LPを免疫した動物の血液には，抗LP抗体の他に抗TG抗体の生じている例があり，逆にTGで免疫した場合，同時に抗LP抗体の生じていることがある。またこのような現象は遅延型皮膚反応についても認められた。ただ，これらの場合，重要な問題となることは，抗原としてのLP標本中にTGが混入している危険性である。しかし，既述のようにPCA，寒天内拡散法の結果はこのことを否

定している。従って実験的甲状腺炎の成立には、TG-抗TG系の反応とともに、LP-抗LP系反応も深く関与するものと考えることができよう。この二つの系の検索には、immune adherence hemagglutination test は非常に有効な手段となった。この方法ではLP-抗LP系は、補体結合反応を示さないTG-抗TG系と明瞭に区別出来るからである。そしておそらく、甲状腺炎の自己免疫疾患の成り立ちには甲状腺ろ胞上皮の破壊とその結果としての抗細胞質膜系抗体の産生が、TG漏出及び抗TG抗体の形成に先行するのではないであろうか。抗TGよりも抗細胞質膜系抗体の方が、当然甲状腺ろ胞にとってより破壊的に作用するのであろう。その結果としてTG-抗TG系が加わり、悪循環的に甲状腺の破壊が進行して、慢性甲状腺炎が完成するのであろう。

では、ヒトの甲状腺炎の場合は同様な機構が考えられるであろうか。このことを明らかにすることは材料上の制約から私どもには困難であった。そこでヒト甲状腺炎の血清に抗LP抗体が出現し得るか否かのみを調べてみた。橋本氏甲状腺炎血清ではヒト甲状腺LPに対し、補体結合反応は12例中8例に4~1024倍稀釈で陽性、そのうち6例にSudan black B可染性の沈降線を寒天内拡散法で認め、亜急性甲状腺炎(de Quervain's thyroiditis)血清では4例中全例に沈降線を認めた。このような反応は甲状

腺組織の破壊像の強い例によく出る傾向があった。しかし一般に血中抗体の存在は臓器変化と必ずしも平行しないから、直ちにこの抗体の病因的意義に言及することは危険である。しかし動物実験的には甲状腺LPで免疫を行えば、甲状腺にかなりの形態学的変化を起させ得るし、passive transferによって抗甲状腺LP血清のろ胞上皮障害性を証明することも出来るから、やはりヒト甲状腺炎の成立においても、ろ胞上皮細胞質膜系の意義は無視出来ないであろう。

この細胞質膜系は一般に不溶性であり、そのままの形では抗体産生系細胞と接触する機会は乏しいと考えられる。ことに甲状腺のような胎生早期に完成、隔離される臓器では、コロイド中のTGと同様、ろ胞上皮の細胞質膜系も早くから隔離されてしまうであろう。従って、生後の個体にとって、それは「自己」であるという認識が充分出来上がっていないのであろう。

勿論、このような考え方で、甲状腺炎発生の全ての機作を説明出来るというわけではない。この疾患の一次的な原因、年齢と性の特異性、遺伝上の問題など多くの因子を考え合わせる必要があることは言うまでもない。しかし、自己免疫現象あるいは疾患の解析には、まず抗体の分析と共に抗原分析を進めることが、それらの発生病理に対するアプローチのよい手段となるであろう。

総 括

1) 甲状腺から抽出した三種類のリポ蛋白LP-I (ヨードとりこみリポ蛋白), II (不溶性リポ蛋白), III (LP-IIよりの再構成膜系)は主抗原の構造が等しく、ろ胞上皮の細胞質膜系を形成する構造リポ蛋白に一致すると考えられる。

2) 異種及び同種の甲状腺細胞質膜系リポ蛋白を、Freund's complete adjuvantとともに動物に投与すると、皮膚反応、寒天内拡散法、補体結合反応、螢光抗体法で証明出来る抗甲状腺LP抗体が産生される。

3) 動物を甲状腺LPで免疫すると、抗LP

抗体と共に抗TG抗体も同時につくられる場合が多く、逆にTGで免疫した場合、抗TG抗体と同時に抗LP抗体の生ずる例が見られた。この現象はLP標本のTGによる汚染では説明されなかった。

4) 甲状腺LP標本は種属特異性及び臓器特異性をもち、抗異種甲状腺LP抗体は同種甲状腺LP及び自己の甲状腺LPと交叉反応がおこる。また抗同種甲状腺LP抗体は、同種甲状腺LPのみならず異種甲状腺LP、自己の甲状腺LPと交叉反応がおこる。

5) 亜急性肉芽性甲状腺炎(de Quervain's

thyroiditis), 橋本氏甲状腺炎の血清には, ヒト甲状腺LPあるいは異種の甲状腺LPと反応する抗体が寒天内拡散法, 補体結合反応で認められた。

6) 異種及び同種甲状腺LPで免疫した動物及び抗甲状腺LP抗体の passive transfer をうけた動物の甲状腺には, 以下のような組織学的変化を認めた。

- i) ろ胞の縮小, 大小不同化, 増生.
- ii) ろ胞上皮細胞の肥大, 変性.
- iii) ろ胞上皮細胞のろ胞腔内への脱落.
- iv) コロイドの減少ないし消失.
- v) 間質におけるリンパ球, プラズマ細胞の

浸潤.

以上の実験成績は, 甲状腺線ろ胞上皮の細胞質膜系を構成しているリポ蛋白が, 甲状腺炎の発生病理に重要な役割をはたしていることを物語る。

稿を終るにあたり, 御懇篤なる御指導を賜った石川大刀雄教授, 倉田自章教授に深謝いたします。なお材料の提供を仰ぎました武川昭男講師, 東京伊藤病院伊藤国彦博士, 電子顕微鏡について御教示下さいました梶川欽一郎助教授(第一病理学教室), さらに実験に多大な御援助下さいました福田鎮雄助手, 種村明夫氏, 並びに教室の諸兄に厚く謝意を表します。

文

- 1) Roitt, I. M. : Biochem. J. 63, 248, 1958.
- 2) Roitt, I. M. and Doniach, D. : Lancet, i, 1927, 1958.
- 3) Witebsky, E. and Rose, N. R. : J. Immunol, 76, 408~416, 1956.
- 4) White, R. G. : Proc. Roy. Soc. Med., 50, 953, 1957.
- 5) Buchanan, W. W., Anderson, J. R., Goudie, R. B. and Gray, K. G. : Lancet, ii, 928, 1958.
- 6) Balfour, B. M., Doniach, D. and Roitt, I. M. : Brit. J. Exp. Path., 42, 307, 1962.
- 7) Anderson, J. R., Goudie, R. B. and Gray, K. G. : Scot. med. J., 4, 64, 1959.
- 8) Belyavin, G. and Trotter, W. R. : Lancet, i, 648, 1959.
- 9) Trotter, W. R., Belyavin, G. and Wadhams, A. : Proc. roy. Soc. Med., 50, 961, 1957.
- 10) Holborow, E. J., Brown, P. C., Roitt, I. M., and Doniach, D. : Brit. J. exp. Path., 40, 583, 1959.
- 11) Pulvertaft, R. J. V., Doniach, D., Roitt, I. M. and Hudson, R. V. : Lancet, ii, 214, 1959.
- 12) White, R. G. : Exper. Cell Reseach, Supp., 7, 263, 1959.
- 13) Witebsky, E., Rose, N. R. and Shulman, S. : J. Immunol., 75, 269, 1955.

献

- 14) Rose, N. R. and Witebsky, E. : J. Immunol., 75, 282, 1955.
- 15) Terplan, K. L., Witebesky, E., Rose, N. R., Paine, J. R. and Egan, R. W. : Amer. J. Path., 36, 213, 1960.
- 16) D' Amelio, V. and Perlmann, P. : Exp. Cell Res., 19, 383, 1960.
- 17) Takazawa, Y. : J. Juzen med. Soc., 66, 393, 1960.
- 18) Smith, J. T., Funcckes, A. J., Barak, A. J. and Thomas, L. E. : Exp. Cell Res., 13, 96, 1957.
- 19) Ui, N. and Tarutani, O. : J. Biochem., Tokyo, 50, 508, 1961.
- 20) Degroot, L. J. and Carvalho, E. : J. Biol. Chem., 235, 1390, 1960.
- 21) Ouchterlony, Ó. : Progr. Allergy, vol. 5, p. 1 (Karger, Basel/New York, 1958)
- 22) Grabar, P. and Williams, C. A. : Biochem. Biophys. Acta, 17, 67, 1955.
- 23) Riggs, J. L., Seiwald, R. J., Burckhalter, J., Downs, C. M. and Metcalf. T. G. : Amer. J. Path., 34, 1081, 1958.
- 24) Nishioka, K. : J. Immunol., 90, 86, 1963.
- 25) Suzuki, M., Nagashima, M. and Yamamoto, K. : Gener. comp. Endocr., 1, 103, 1961.
- 26) Dubois, M., Gilles, K. A. Hanetus, J. K., Rebens, P. A. and Smith, F. : Analy.

- Chemistry, 28, 356, 1956.
- 27) **Robertson, J. D.** : Biochem. Soc. Sym., 16, 3, 1959.
- 28) **Takeuchi, M. and Terayama, H.** : Exp. Cell Res., 40, 32, 1965.
- 29) **Emmelot, P., Bos, C. J., Benedetti, E. L. and Riimke, P. W.** : Bioch. Biophys. Acta, 90, 126, 1964.

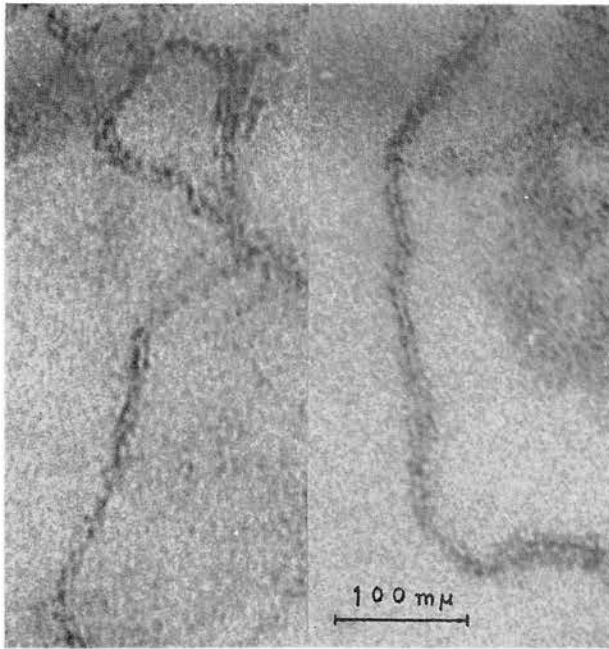


写真1 ウシ甲状腺LP-IIIの電子顕微鏡写真
厚さ約80Åの二重膜構造を示す

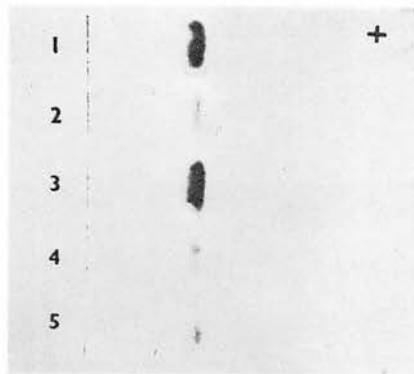


写真2 各LP標本のろ紙電気泳動像

- | | |
|-----------------|----------------|
| 1 : ウシ甲状腺LP-I | 2 : ウシ甲状腺LP-II |
| 3 : ウシ甲状腺LP-III | 4 : ヒト甲状腺LP-I |
| 5 : ウシ肝臓LP-I | |

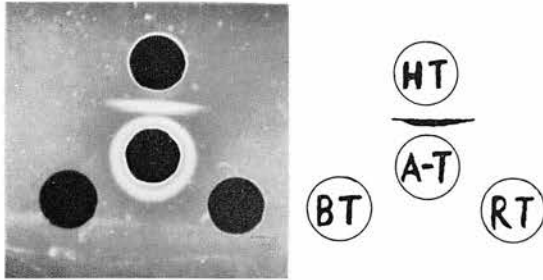


写真3 HT: ヒト甲状腺L P-II
 BT: ウシ甲状腺L P-II
 RT: ウサギ甲状腺L P-II
 A-T: 抗ヒト甲状腺L P-II モルモット血清

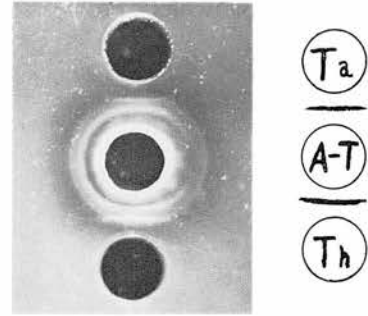


写真4 Ta: 自己モルモット甲状腺ホモジネート
 Th: 同種モルモット甲状腺ホモジネート
 A-T: 抗ヒト甲状腺L P-II モルモット血清
 (Sudan black B 染色陽性)

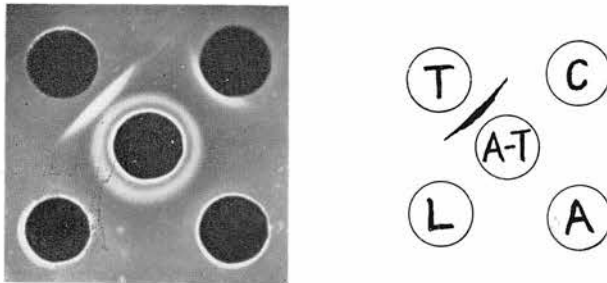


写真5 T: ヒト甲状腺L P-II
 L: ヒト肝臓L P-II
 A: ヒト副腎L P-II
 C: ヒト脳L P-II
 A-T: 抗ヒト甲状腺L P-II モルモット血清

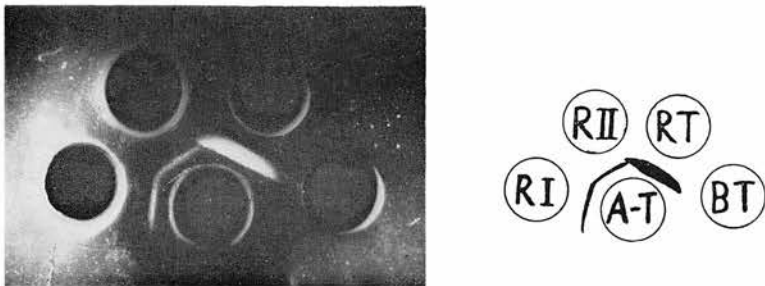


写真6 RI: ウサギ甲状腺L P-I
 RII: ウサギ甲状腺L P-II
 RT: ウサギサイログロブリン
 BT: ウシサイログロブリン
 A-T: 抗ウシ甲状腺L P-II ウサギ血清

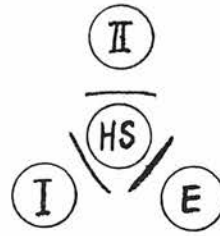
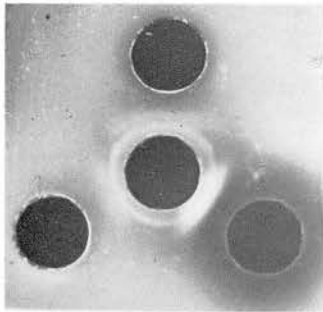


写真7 I : ヒト甲状腺LP-I
 II : ヒト甲状腺LP-II
 E : ヒト甲状腺エキス
 HS : ヒト甲状腺炎血清

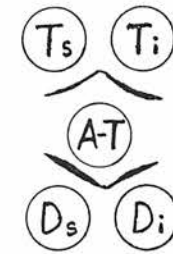
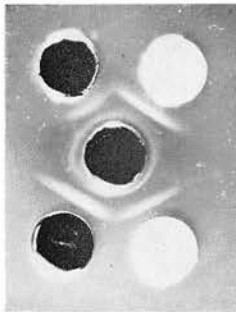


写真8 Ts : ヒト甲状腺LP-II Triton 可溶性分画
 Ti : Triton 不溶性分画
 A-T : 抗ヒト甲状腺LP-II モルモット血清
 Ds : DOC可溶性分画
 Di : DOC不溶性分画

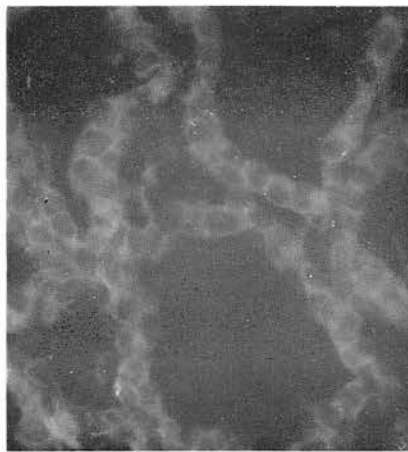


写真9 直接法によるモルモット
 甲状腺の蛍光抗体染色写真(×500)

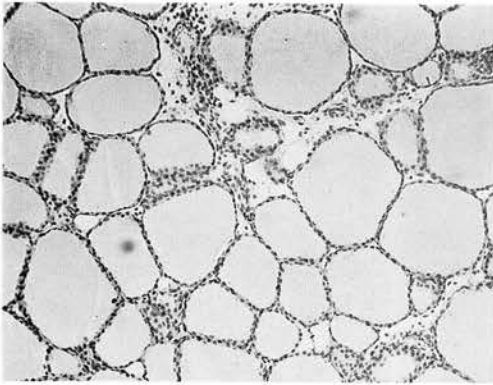


写真10 Freund's complete adjuvant のみ1回投与
後30日目のモルモット甲状腺 (×70)
(対照)

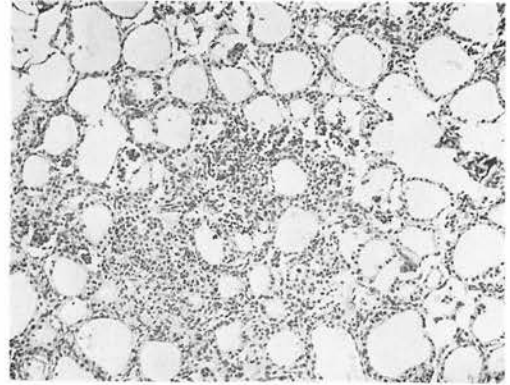


写真11 ウシ甲状腺LP-Iの1mg1回投与後30日目の
モルモット甲状腺 (×70)
リンパ球浸潤と胞上皮細胞の破壊

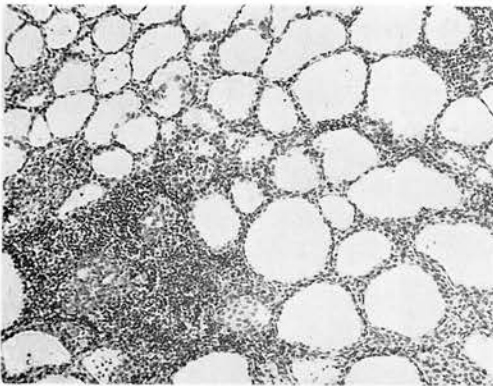


写真12 ウシ甲状腺LP-IIIの1mg1回投与後30日目の
モルモット甲状腺 (×70)
リンパ球浸潤

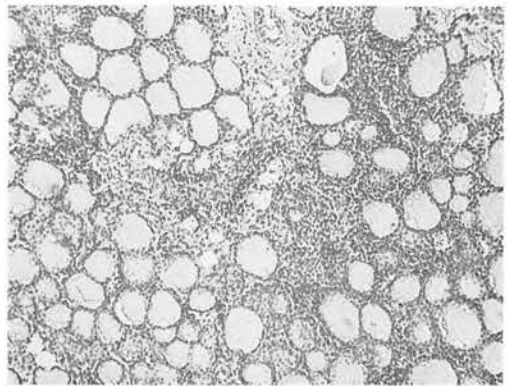


写真13 モルモット甲状腺LP-IIIの湿量35mg1回投
与後50日目のモルモット甲状腺 (×70)
リンパ球浸潤とろ胞の縮小

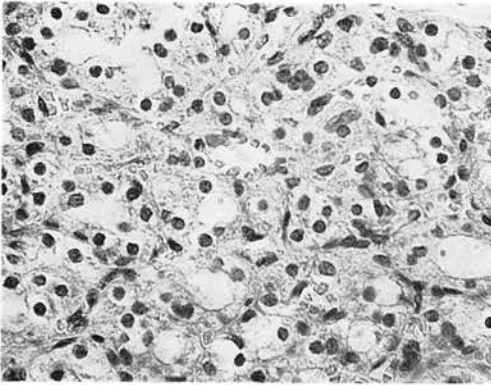


写真14 ウサギ甲状腺 L P-I 3 mg 1 回投与後30日目のウサギ甲状腺 (×300)
リンパ球浸潤と小ろ胞の増生

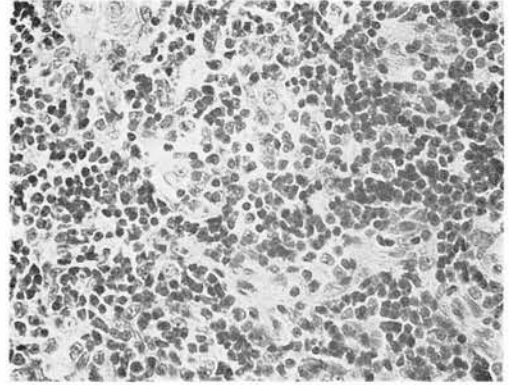


写真15 ウサギ甲状腺 L P-I 5 mg 投与後 34 日目に 5 mg 投与し、その20日後のウサギ甲状腺 (×300) 集ぞく性リンパ球浸潤とろ胞上皮細胞の増生を伴った限局性甲状腺炎像

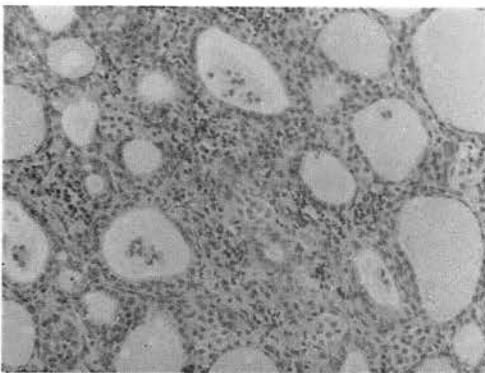


写真16 **passive transfer**
抗モルモット甲状腺 L P-III モルモット血清 2 ml の passive transfer をうけた48時間後のモルモット甲状腺 (×70)
ろ胞の縮小とリンパ球浸潤及びろ胞上皮細胞の腔内脱落

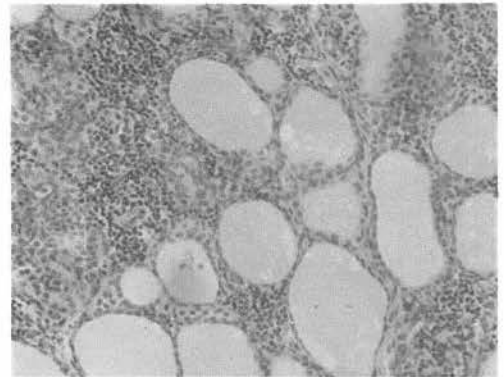


写真17 **passive transfer**
抗モルモット甲状腺 L P-III モルモット血清 2 ml の passive transfer をうけた48時間後のモルモット甲状腺 (×70)
リンパ球浸潤とろ胞の縮小