

# アゾ蛋白質の遅発型皮膚反応 じゃつ起原性について

金沢大学結核研究所病態生理部（主任：西東利男教授）

越 沢 みち子 谷 口 恭 子

中 川 茂 一 柳 兵 藏

（受付：昭和40年11月9日）

## 緒 言

抗原を Freund's complete adjuvant (FCA) あるいは Freund's incomplete adjuvant (FIA) とともに注射されたモルモットでは、いずれも数日の潜伏期を経て当該抗原に対する遅発型皮膚反応 (DHS) が発現し、更にある期間の後、即時型皮膚反応 (IHS) が出現することは周知のことである。1,2,3,4) ところで IHS 出現後、感作に用いた抗原そのものをもってしては皮膚反応部位で明確に DHS を鑑別判読するのに困難なことがある。すなわち先行する IHS のため隠ぺいされて見逃がされたり、あるいは IHS が DHS の発現を阻止するようなことがあるかもしれないからである。このような、考えられる悪条件を克服して IHS 出現後の DHS 存在の有無を明確には握する方法が見

出されるならば DHS および IHS の発生機序、両者の相互関係などの解明に一步前進することは確かである。ここにおいて著者らは当研究所において創製された o-aminophenol azo-tuberculo-protein は, tuberculo-protein に比べて、いろいろの面で抗原性が低下しているにもかかわらず DHS じゃつ起原性だけは劣らないという成績<sup>5)</sup> に暗示をえて、haptens-carrying protein を皮膚反応に用いることにより carrier protein に対しては出現する IHS を軽減し、DHS が存在すればこれを確認しうるのではないかと期待した。よって卵白アルブミン (HEA) 感作動物について 2, 3 の azo-HEA で検討したところ予期の結果が得られた。以下はその成績の概要である。

## 実験材料ならびに実験方法

### I 実験材料

A) 動物：一定期間一定条件下に飼育したモルモットで体重 400gm 前後のものを使用した。

### B) 抗原

i) 感作用抗原；Cole の緒方変法<sup>6)</sup> により再結晶を繰り返して作製した精製ニワトリ卵白アルブミン (HEA) を用いた。

ii) 皮膚反応用抗原；

a) HEA

b) o-aminophenol azo-HEA (OM-HEA)<sup>7)</sup>；  
o-aminophenol 8.0gm を N-HCl 220ml に溶解し、これに10% (W/V) NaNO<sub>2</sub> 溶液を氷

冷下 (0°~2°C) で徐々に滴下し (沃化カリウムでん紛紙を青変しない)、更に同量の冷純水を加えて15分間放置する。こうしてえられた diazonium 塩を 500ml の 0.5% HEA と 175ml の N-NaOH の混合溶液に加えよくかく拌して一夜氷室に放置する。

次いで N-HCl で pH 4.4 に調整、生じた沈殿を遠心分離液 500ml の生食水で4回洗浄した後、pH 9.0 に修正した生食水 500ml に溶解、ろ過後 N/5-HCl で pH 4.8~5.0 とし沈殿させる。これを 250ml の生食水と N/2-NaOH で溶解、1000ml の70%冷 alcohol を加

えて pH 4.8~5.0 とし氷水中でしばらく放置後, 遠心分離する。更に溶解アルコール沈殿をもう一度繰り返す, pH 8.0 の phosphate buffer で透析後凍結乾燥し保存した。

- c) atoxyl azo-HEA (AT-HEA) ; Sodium arsanilate 1.26gm に N-HCl 14ml および純水 7ml を加えて溶解後 0°~2°C に水冷し。これに絶えず振とうしながら N-NaNO<sub>2</sub> 溶液 3.4ml を徐々に滴下する (沃化カリウムでん粉紙を青変しない), 滴下終了後も低温に保ち, 10分後に 2N-NaOH で pH 9.5 に修正し, 冷純水 50ml 追加した。かくしてえられた diazonium 塩を, 同じく水冷した 2% HEA (0.2M phosphate buffer solution, pH 9.5) 100ml に加え, 1時間 stirrer でかく拌後氷室に一夜放置すした。

次いでこれに同量の飽和硫酸溶液を加え N-HCl で pH 4.0 とし, 折出した沈殿を遠心分離後 2N-NaOH と純水で溶解 (pH 6.5—7.5) ろ過後再び N-HCl で沈殿させる。以後同様に溶解, 沈殿を2回繰り返した後, 純水で透析し, 凍結乾燥して保存する。

- d) p-aminobenzoic acid azo-HEA (PABA-HEA) この標品は2種とし, 一定量の HEA に加える diazonium 塩の量の多少によってそれぞれ高アゾ化標品と低アゾ化標品をえた。

PABA 0.75gm に N-HCl 12.5ml および純水 16ml を加え, 加熱溶解後水冷 (0°—2°C) する。

これに絶えず振とうしながら N-NaNO<sub>2</sub> 5.5ml を徐々に滴下し (沃化カリウムでん粉紙を青変しない), 引続き時々振とうして, 0°~2°C に約10分間保つ。次いで 2N-NaOH で pH 7.0—7.5 に修正し, 更に冷純水を加えて 50ml とする。これを低アゾ化標品 (No. 2) の作製にあてる。上記 diazotization に用いる材料をすべて4培量として得られた diazonium 塩を高アゾ化標品 No. 116 の作製にあてる。

すなわち冷 2% HEA (0.2M phosphate

buffer solution, pH 7.6) 100ml に上記冷 diazonium 塩溶液を加え1時間 stirrer でかく拌後氷室に一夜放置する。

次に反応液を N-HCl で pH 3.9 にしてえられた赤褐色の PABA-HEA の沈殿を遠心分離する。沈査を純水と 2N-NaOH 溶解し (略 pH 7.0), ろ過して不溶物を除き, N-HCl で pH 4.1 とし再沈殿する。この操作を更に2回繰り返した後, 純水で1週間透析し, 凍結乾燥して保存する。

- e) ツベルクリン蛋白 (PF) およびツベルクリン多糖体 (CF); ヒト型結核菌 H<sub>37</sub>Rv 株の Sauton 培地8時間培養ろ液を常法に準じて 1/10 に濃縮し, これに 0.5% の割に石炭酸を加えてツベルクリン原液とする。この原液から浅見ら<sup>8)</sup> の方法に従って分画した。

- f) o-aminophenol azo-PF (OM-PF) 全く b) の方法に準じ, 0.5% HEA のかわりに 0.5% PF とし作製する。

- g) HEA に対する免疫抗体

- i) ウサギに HEA (10mg) in FCA を1週間隔で3回大腿部および臀部皮下に注射し, 初回注射6週間後より HEA (10mg) 生食水溶液を3—4日間隔で3回大腿部皮下に注射し最終注射より1週後抗体価を検した後全採血した。

- ii) モルモットに HEA (100μg) in FCA を足蹠内に注射し, 2週後 HEA (100μg) 生食水溶液を大腿部に注射しその1週後全採血した。

### C) 実験方法

- i) 免疫方法  
ii) 皮膚反応  
iii) 沈降反応  
iv) PCA  
v) Schultz-Dale 反応はいずれも谷口<sup>9)</sup> に準じて行なった。  
vi) Cornea test は, Raffel<sup>10)</sup> に従って行った。

## 実験成績

### I 各 azo-HEA の沈降反応原性について

anti-HEA ウサギ血清と各抗原とでいずれも総合的に重層沈降反応を行って抗原価および抗体価を求め表 I にまとめた。これによると azo-

HEA は HEA に比べて抗原価が低下し, 低下度はアゾ化の高いものほどつよい。抗体価も HEA に対して最も高く, アゾ化の強い azo-HEA に対するものほど低い。

Table 1. In vitro antigenicity of HEA and azo-HEAs

Preparation	Antibody titer Antigen titer by ring test	
	HEA	1024
OM-HEA	16	2
AT-HEA	16	64
PABA-HEA (No. 2)	512	128
PABA-HEA (No. 116)	1>	1>

antiserum : diluted from 1 : 1

antigen : diluted from 1mg/ml

## II IHS と DHS が共存する場合の皮膚局所の反応について

皮内注射を行って2—3時間以内に浮腫，出

血，壊死などがあらわれたいわゆる IHS 局所で，24時間以後に DHS を判読出来るかどうかを検討することはアレルギー学において一つの重要な研究課題である。ここでは疑う余地のない IHS と DHS の存在下で，この検討を行った。すなわち anti-HEA モルモット血清で被動性の，FCA で活動性の両感作をうけた個々のモルモットに HEA と PF の混合液を皮内注射して，そこに現われる反応を経過を追って観察した。表2はその概要を示したものであって，anti-HEA 1ml ずつ1日1回10日間連続腹腔内に注射し，最終注射の翌日 (Group 1 では FCA 投与後7日目，Group 2 では FCA 投与後14日目) に皮内反応を行ったものである。すなわち HEA に対しては著名な IHS が認められ，DHS は被動性感作であって存在しないとしなければならない。この HEA に対する局所反応の推移を IHS のみで DHS のないものとして，その他の皮膚反応の対照とした。

Table 2. Evaluation of delayed skin reaction under the existence of immediate skin reaction in one test site

Schedule of sensitization and skin test	Reaction	Skin test with											
		PF		HEA (100)* +	OM-HEA (100)* +								
		*100, 110, 1,	*100,	PF	PF								
		*100, 10, 1, 0,	*100,	*100, 10, 1, 0,	*100, 10, 1, 0,								
Group 1 ↑ 0 1 2 3 ← FCA 4 5 6 7 8 9 10 ← Skin test ↓	Im. R.	-	-	-	-	###	###	###	###	-	-	-	-
	Del. R.	###	##	-	+	+	±	-	-	###	##	-	-
Group 2 ↑ -3 ← FCA -2 -1 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 ← Skin test ↓	Im. R.	+	+	-	-	###	###	###	###	+	+	-	-
	Del. R.	###	##	-	##	+	+	-	-	###	##	-	-

PT: Passive transfer (daily injection of anti-HEA guinea pig serum for 10 days intraperitoneally

\* : Numeral shows test dose of antigens

Im. R: Immediate skin reaction

Del. R: Delayed skin reaction

Table 3. Skin reaction by various azo-HEAs

Sensitization (S)	Day tested after S.	Animal No.	Skin test with								Cornea test with		
			HEA		OM-HEA		AT-HEA		PABA-HEA (No. 2)		PABA-HEA (No. 116)		HEA
			Im. R.	Del. R.	Im. R.	Del. R.	Im. R.	Del. R.	Im. R.	Del. R.	Im. R.	Del. R.	
HEA in FCA into hind foot pads	4	1 2 3	-	++	-	+	-	+	-	+	-	##	-
	7	4 5 6	-	##	-	+	-	+	-	##	-	+	-
	10	7 8 9	##	##	-	+	-	+	##	##	-	+	-
	14	10 11 12	++	##	-	+	-	+	++	##	-	+	+
HEA in FIA into hind foot pads	4	1 2 3	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	7	4 5 6	-	##	-	+	-	+	-	+	-	+	-
	10	7 8 9	+	##	-	-	-	-	##	+	-	-	-
	14	10 11 12	##	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Daily injection of 1ml of anti-HEA guinea-pig serum for 10 days intra- peritoneally	1 day after last inj.	1 2 3	##	-	-	-	-	##	-	-	-	-	-

さてこの対照と比較すると HEA+PF 混合液で反応を行った場合、PF が高濃度であると先行した IHS の浮腫の軽減した所で、出血壊死のあるときはその周囲に軽度ながら発赤硬結が認められ、この様な反応は対照では出現しない。しかしながら PF が低濃度であると対照と同様な反応しか呈しない。また HEA のかわりに OM-HEA を用いてこれに各濃度に PF を加えての反応では IHS が抑制され DHS の存在は明瞭となる。かくして一試験部位で、条件によっては IHS 存在下に DHS を推定しうる可能性のあることがわかった。しかしここでは IHS と DHS がそれぞれ異なる抗原によって起こされているのであって、HEA に対して両反応が一部位で時を異にして認められるかどうかはまた別のことに属すると思われるが、これと関連して次の点は注目に値する。すなわち FCA 投与1週後では PF によって DHS のみで IHS は認められない。しかし2週後では軽度ながら IHS も認められるが、この場合 OM-PF を用いると DHS のみ明確に観察される。このように同一抗原に対しても IHS が弱ければ DHS の存在を看過させることがなく、かつ azo-抗原を用いれば IHS を顕現させないで DHS の存在を確実に知る事ができる可能性が示された。しかしこの条件下では PF に対する IHS は弱いので次のごとく強い IHS の存在下での実験を行った。

### Ⅲ 活動性あるいは被動性感作を受けた動物における皮膚反応

HEA in FCA あるいは HEA in FIA をモルモットの両後足臑内に注射し、その4, 7, 10, あるいは14日後に、また動物に anti-HEA モルモット血清を1日1回1ml ずつ10日間腹腔内に注射し終わった翌日に各種抗原(いずれも100 $\mu$ g)で皮膚反応を行った成績を表3に示した。これで見るとまず第1に HEA に対する反応であるが HEA in FIA 投与によって4日後には明らかに、7日後ではこれより強い DHS の発現が認められる。10日後には軽度の、14日後には強い IHS が出現し、それぞれ DHS 存在の有無の判定は困難である。HEA in FCA

投与でも HEA in FIA 投与時とほぼ同じ経過をとって DHS および IHS の発現が認められるが、IHS 出現後は反応24時間後の局所変化が被動感作群および HEA in FIA 投与の場合といささか異っていて、出血、壊死のまわりに軽度ながら発赤、硬結が存在するようである。

第2に各種 azo-HEA に対する反応であるが、低アゾ化の PABA-HEA(No. 2)を除くと被動感作群、HEA in FIA および HEA in FIA 投与の3群においてともにほぼ IHS のじゃっ起が認めれず、かつ PABA-HEA(No. 2)による反応も HEA のそれより弱い。これに反して DHS はすべての試みられた azo-HEA でじゃっ起されたが、HEA によるものと比べると平均して PABA-HEA(No. 2), AT-HEA, OM-HEA および PABA-HEA (No. 116) によるものの順に漸次弱くなるようであって、弱い DHS は見逃される可能性の存在することを看過しえないと思われる。そこで次の実験を行った。

### Ⅳ HEA と azo-HEA の皮膚反応じゃっ起能の比較

HEA in FCA 投与7日後 HEA (100 $\mu$ g) と各 azo-HEA (各種濃度)で皮膚反応を行い、HEA 100 $\mu$ g で認められる DHS とほぼ同程度の DHS をじゃっ起させるに要する各 azo-HEA の濃度を求め、これを100 $\mu$ g で割って Ratio を求めた。表4にこれを示した。すなわち

Table 4. Comparison of delayed type skin reaction causing activity between HEA and azo-HEAs

Preparation	Ratio
OM-HEA	5.0—7.5
AT-HEA	2.5—5.0
PABA-HEA (No. 2)	1.0—2.5
PABA-HEA (No. 116)	5.0—10.0

Ratio:  $\frac{\text{equivalent dose of azo-HEAs to } 100\mu\text{g of HEA}}{100\mu\text{g}}$

HEA 100 $\mu$ g と同程度の DHS を生ぜしめる各種 azo-HEA の濃度は 100 $\mu$ g $\times$ Ratio である。しかも PABA-HEA (No.116), OM-MEA ではこのような高濃度によっても IHS は認めら

れない。このようにして高濃度 azo-HEA を用いれば弱い DHS もほぼ確実に見出されることが実証された。

### 総括ならびに結論

HEA in FCA あるいは HEA in FIA を注射されたモルモットではいずれも数日の潜伏期を経て HEA に対する DHS が発現し、更に数日後より IHS が出現する。ところで両注射群を比べると IHS 出現後の皮膚反応に次のような異なる所見のあることが注目される。すなわち反応局所においてほぼ 24 時間を経ると先行した浮腫の軽減したあとに前者では軽度の発赤と硬結が認められることが多く、後者ではこのような現象はほとんど認められない。この差異は FCA を用いると IHS 出現後も DHS が存続しており、FIA では IHS 出現後 DHS は消失することによるのではないかと考えられる一方、先行する IHS が DHS を隠べいまたは抑制する結果、存在する DHS の強弱によって認められたり看過されたりすることも考えられる。

ところで著者らの研究室で十数年来ツベルクリン蛋白体とこの o-aminophenol の diazonium 塩を coupling してえられたアゾツベルクリン蛋白との皮膚反応原性を検討したところでは、後者が conventional antibody との反応原性を著しく低下しているにもかかわらず

DHS じゃっ起能をよく保留していることが実証されている。そこで azo-HEA においても HEA に比べて抗 HEA 血清との反応性が低下しており、おそらく HEA 感作動物で IHS の軽減が認められることは確実と考えられ、加うるに DHS 存在の有無を的確に示す可能性が推定されたので検討を試みた。すなわち HEA in FCA あるいは HFA in FIA 投与動物について HEA と azo-HEA を併用して皮膚反応の推移を観察した。その結果感作後 3—4 日目より azo-HEA も HEA 同様 DHS をじゃっ起し、更に数日後 HEA に対し IHS の出現がみられるようになると azo-HEA によっては前者では DHS の存在が、後者ではその不存在が明確に指摘された、このような現象は Salvin et al. 11) もまた認めている。なお azo-HEA による DHS が HEA による DHS 全体を表現しているか否かは残された論点であるが、azo-HEA が HEA 感作動物に対し、IHS じゃっ起原性に比べると強い DHS じゃっ起能を保留していることは確かであると思われる成績がえられた。

### 文

- 1) Landsteiner, K. and Chase, M. W. :  
J. Exp. Med., 71, 237, 1940.
- 2) Freund, J. and Mc Dermott, K. :  
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 49, 548, 1942.
- 3) Savlin, S. B. :  
J. Exp. Med., 107, 109, 1958.
- 4) Raffel, S. et al. :  
J. Exp. Med., 108, 823, 1958.
- 5) 蔵 尚之 :  
金大結研年報, 8 (下), 52, 1950.  
金大結研年報, 9 (上), 86, 1950.

### 献

- 7) 越村三郎 :  
金大結研年報, 9 (下), 1, 1951.
- 8) 浅見 望, 他 :  
日本細菌学雑誌, 9, 271, 1954.
- 9) 谷口恭子 :  
金大結研年報, 23(下), 147, 1966
- 10) Reffel, S. et al. :  
J. Exp. Med., 90, 53, 1949.
- 11) Salvin, S. B. et al. :  
J. Immunol., 93, 495, 1964.