

Formalin に依る抗原変性, 殊に反応強化に就て

岡山大学医学部衛生学教室 (指導: 緒方益雄教授)

専攻生 大塚 信夫

〔昭和32年3月12日受稿〕

緒 言

蛋白抗原を物理的に或は化学的に処理する時は、もとの生蛋白による抗体に対する反応を減弱し、遂には全く別の反応を示すに至る。特に化学薬品を抗原或は抗体に作用せしめてその種属特異性、状態特異性の変化を検索した業績は多く、その中でも Formalin は皮膚に過敏症を起させる作用があり、更に蛋白溶液の防腐剤として用いられた関係上、その血清学的反応に及ぼす影響についても相当研究せられているが、その殆んどに於て反応の減弱を報告しており¹⁾²⁾、僅かに濃度又は作用時間等の関係により差を認めた報告を見るのみである³⁾⁴⁾。然しながらそれ等の報告の多くは Formalin の作用により変性せしめた蛋白を抗原として用い、これによつて免疫された抗体ともとの蛋白、Formalin 変性蛋白との関係を見たもので、その結果に基いて種属特異性或は状態特異性の変化より Formalin の蛋白抗原性に及ぼす影響を論じている⁴⁾⁵⁾。最近に至り生蛋白によつて免疫した正常抗体と Formalin 変性蛋白との反応について興味がむけられて来たが未だその例は少く、又相当高濃度の Formalin を用いたものがその殆んどであり⁵⁾、又その反応も沈降反応に限られている⁶⁾。私は教室に於ける従来⁷⁾の業績等⁴⁾⁷⁾よりして、Formalin の各種の濃度を用い、Uhlenhuth 氏沈降反応 (以下U氏法と略す)、緒方氏抗体稀釈沈降反応⁸⁾、過敏症等一連の実験を行い、Formalin の蛋白抗原性に及ぼす影響を検索してみた。

実験方法及び材料

抗原は主として正常人血清とし、Keckwick

の方法によつて脱水芒硝で3回結晶した卵白 Albumin⁹⁾ も用い、実験に使用する度に新しく調製した。

Formalin は日本薬局方 Formalin 液 (37%) を用い、之を基準として生理的食塩水にて稀釈し10%、1%以下各濃度の稀釈溶液を調製した。従来⁷⁾の報告は殆んど37% Formalin を便宜上100%とし之を基準にして稀釈しているが、私はそれに従わず37%から稀釈した。

Formalin の作用はその濃度、時間、温度に関係すること多く¹⁰⁾、その作用を一定せしめるため各濃度の Formalin を抗原と等量混合し、一定時間孵卵器中にて37°Cで作用せしめたる後使用した。

免疫方法並びに各血清学的反応の手技は何れも教室慣行の方法に従つた。

その他詳細は各実験項目に於て記述する。

実 験 成 績

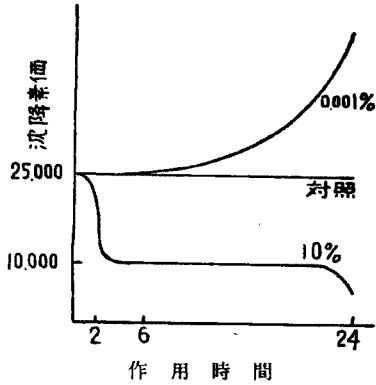
1) Formalin の作用時間の関係に就て

抗原は正常人血清を用い、之に各種濃度の Formalin 即ち37%を基準として10%、1%以下10倍稀釈にて0.0001%迄の生理的食塩水稀釈液をそれぞれ等量混合したものを30分、2時間、6時間、12時間、24時間37°Cの孵卵器中にて作用せしめ、取出したものを直にU氏法により抗人血清家兔血清を用いてその沈降素価の変化を検した。対照として Formalin の代りに生理的食塩水を混合した。

その結果第一図に代表的濃度の曲線を示したが、Formalin 濃度の高い所では作用時間に比例して沈降素価の減弱を見る。これに反し濃度の低い部分に於ては沈降素価は減弱せず0.001%に於てはむしろ増強の傾向を示し、

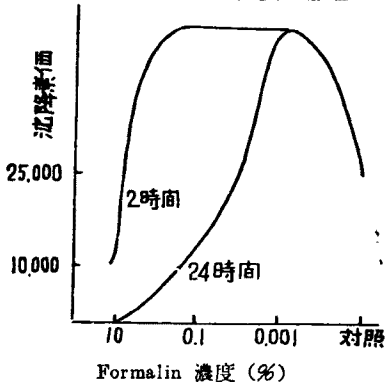
その増強の程度は作用時間と比例しているように思われる。

第一図 Formalin 作用時間の影響



更に抗原として人血清、結晶卵白 Albumin を用い、前項と同じく各種濃度の Formalin を 37°C 2 時間及び 24 時間作用せしめた場合を U 氏法で比較してみると、いずれも同じ傾向を示し、第二図の如く作用時間の長さに比例して抑制作用が著明となつて来るが、0.001% ではその作用を見ず、その沈降素価は対照よりも増強し、24 時間でも同じように保たれている。

第二図 Formalin 濃度の影響



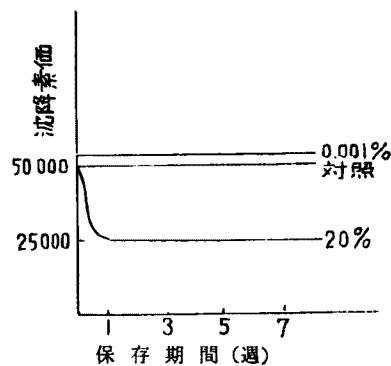
2) Formalin 抗原と保存期間との関係に就て

抗原としての蛋白質をその抗原性を失わしむることなく長期に互り保存することはなかなか困難であり、又それを試みた成績もあるが¹¹⁾、Formalin は牛血清その他を屠殺場に於て採取したあと防腐剤として用いられるこ

と多く、これを保存した場合 Formalin の存在が沈降反応に如何なる影響を及ぼすかについて検してみた。即ち前項の場合と同じく各種濃度の Formalin を正常人血清と等量混合し、孵卵器中に 37°C 2 時間作用せしめ、以後これを氷室に保存、1 週間毎に U 氏法により沈降素価の変化を見た。

第三図に代表的濃度の曲線を掲げたが、この場合作用時間が短いため濃度による影響はそれ程明らかでなく、高濃度に於て僅かに反応の抑制が見られ、低濃度に於ては僅かに対照より増強している。保存期間によつて沈降素価の異動はそれ程顕著でなく、低濃度の部分ではむしろ増強しているが、この成績は大体に於て先人の例と一致している⁶⁾。

第三図 保存期間の影響



3) 稀釈法並びに混合法

以上の結果よりして 0.001% Formalin を 37°C 24 時間作用せしめた場合の沈降反応増強は明らかに認められるため、之を用いて稀釈法により対照との比較を行つてみた。即ち沈降反応に於ては U 氏法より以上に稀釈法に於ける沈降素価、結合帯の変化は興味ある所であり、教室の従来業績よりしても大いに意義を認められると考えるからである⁴⁾。

抗原として正常人血清を用い、0.001% Formalin を等量混合、対照として生理的食塩水を等量混合したものを孵卵器中に保存、 37°C 24 時間後稀釈法を実施した所、第一表の如く対照に於ては沈降素価 500、結合帯 500 であつたものが、Formalin 抗原に於ては沈

降素価 1000, 結合帯 250 となり結合帯の移動と沈降素価の上昇とを認めた。

第一表 稀釈法

抗体稀釈		50	100	250	500	1000
100	C	+++	+++	++	++	-
	F	+++	+++	+++	++	-
250	C	+++	+++	++	++	-
	F	+++	+++	+++	++	++
500	C	+++	+++	++	++	-
	F	+++	+++	+++	++	-
1000	C	+++	+++	++	-	-
	F	+++	+++	++	-	-
2500	C	+++	++	++	-	-
	F	+++	+++	++	-	-

(C = 対照, F = Formalin 混合)

同様の意味に於て同じ材料で混合法を実施したが, その結果は第二表に示す如く, 結合帯の移動が認められた。

第二表 混合法

抗体稀釈		50	100	250	500	1000
25	C	++	++	±	-	-
	F	++	++	±	-	-
50	C	++	++	+	-	-
	F	++	++	+	±	-
100	C	++	++	±	-	-
	F	++	++	++	+	-
250	C	++	++	++	+	-
	F	++	++	+	±	-
500	C	++	++	++	±	-
	F	++	++	+	±	-

(C = 対照, F = Formalin 混合)

4) 補体結合反応

沈降反応の結果 Formalin を抗原蛋白に作用せしめる場合 0.001% 37°C 24時間の抗原に於てU氏法, 稀釈法ともに最も抗原性の高まることを認めたので, 更にこの抗原を用いて補体結合反応を行い対照と比較した。

即ち抗原は正常人血清を用い, 0.001%

Formalin を等量混合, 対照として生理的食塩水を等量混合したものを孵卵器に 37°C 24時間保存し補体結合反応を行つた。

その結果第三表の如く対照に於ては補体結合価 1000, 結合帯 250, 之に対し Formalin 抗原に於ては補体結合価 1000, 結合帯 1000 となり結合帯の移動と抗原高稀釈部に於ける反応増強とを認めた。

第三表 補体結合反応

抗体稀釈		50	100	250	500	1000	2500
100	C	+++	+++	+++	++	+	-
	F	+++	+++	+++	++	+	-
250	C	+++	+++	+++	++	++	-
	F	+++	+++	+++	++	++	-
500	C	+++	+++	+++	++	+	-
	F	+++	+++	+++	++	++	-
1000	C	+++	+++	+++	++	+	-
	F	+++	+++	+++	++	++	-
5000	C	+++	+++	+++	±	-	-
	F	+++	+++	+++	++	+	-
食塩水		+++	++	-	-	-	-

(C = 対照, F = Formalin 混合, 補体1.3単位使用)
(抗原対照 C 100(-), F 100(-), 溶血素+補体(-), 溶血素(++), 補体(++))

5) 過敏症

以上の如き関係を生体の過敏症反応に於て証明し得たならば更に興味あるものと考え本実験を行つた。血清抗体による過敏症は教室従米の多数の成績¹²⁾により, 感作量 25~20単位/血液 1 cc, 再注射は潜伏期 24時間の後結合帯相当量を以て行えば過敏症死を起すことが明らかである。

抗原には正常人血清を用い之に 0.001% Formalin を等量混合, 対照として生理的食塩水を等量混合せるものを孵卵器に 37°C 24時間保存せるものを使用, 抗体は抗人血清家兔血清を用いた。なお実験に当つては, 発作前後の血液を採血保存して補体価と沈降素価とを檢し, 更に体温, 肺の状態も檢した。

その実験結果は第四表に示す如くであるが,

先ず Formalin 変性抗原により稀釈沈降反応を行い、稀釈沈降素価1000、結合帯 250 を測定し、之を基準として感作単位及び再注射抗原量を規正した場合に、対照の稀釈沈降素価

500、結合帯 500 を基準として規正した同じ感作単位及び再注射量を用いた場合と同様の過敏症を惹起することを認めた。

第 4 表 過 敏 症

モ ル モ ツ ト 号	沈 降 素 価 / 結 合 帯	体 重 gr.	感 作 量		再 注 射 量			潜 伏 期 (時 間)	体 温 °C	転 帰	沈降素価 (F. 抗原)	補体価 10×
			単 位	cc	抗 原	Zone	cc 10×					
1	500/500	240	25	0.93	C	Z	0.38	24	38.3~0	3分20秒死		
2	1000/250	240	25	0.47	F	Z	0.74	"	40.4~0	3分 死		
3	500/600	290	20	0.89	C	Z	0.44	"	39.3~0	2分30秒死	20~0(40~10)	0.3~(-)
4	1000/250	270	20	0.42	F	Z	0.83	"	39.2~0	2分58秒死	10~0(20~10)	0.5~0.9
5	500/600	260	20	0.80	C	½ Z	0.20	"	38.5~0	2分20秒死		
6	1000/250	300	20	0.46	F	½ Z	0.46	"	39.0~0	8分30秒死	10~0(20~10)	0.3~(-)
7	500/500	310	10	0.48	C	Z	0.48	"	38.5~37.2	生	10~5(20~ 5)	0.3~0.9
8	500/600	250	10	0.38	C	2 Z	0.77	"	38.9~36.7	生	10~5(20~ 5)	0.4~0.8
9	1000/250	310	10	0.24	F	Z	0.95	"	38.9~37.1	生		0.5~0.9
10	1000/250	320	10	0.24	F	½ Z	0.49	"	38.0~37.0	生	5~0(10~ 0)	0.3~0.9

(C=対照, F=0.001% Formalin 混合)

即ち第五表に示す如く、20単位感作、結合帯相当量の半量の抗原再注射により、正常抗原、Formalin 変性抗原共に強度過敏症の結果海狸の死亡を認め、10単位感作、結合帯相当量の抗原再注射では、両者共軽度過敏症で海狸の生存するを認めた。ここに注目すべきは、同じ20単位の感作ではあるが、Formalin

変性抗原に於てはその稀釈沈降素価の変化により、実際には正常抗原の10単位に相当する感作しか行われていないことである。従つてこの事より、感作単位及び再注射量の基準となつた稀釈法の沈降素価、結合帯は、過敏症の面からも正しいものと考えられる。

第 5 表 過 敏 症 (感作単位を等しくした場合の比較)

モ ル モ ツ ト 号	沈 降 素 価 / 結 合 帯	体 重 gr.	感 作 量		再 注 射 量			潜 伏 期 (時 間)	体 温 °C	転 帰
			単 位	cc	抗 原	Zone	cc 10×			
5	500/500	260	20	0.80	C	½ Z	0.20	24	38.5~0	2分20秒死
6	1000/250	300	20 ※	0.46	F	½ Z	0.46	"	39.0~0	8分30秒死
7	500/500	310	10	0.48	C	Z	0.48	"	38.5~37.2	生
9	1000/250	310	10	0.24	F	Z	0.95	"	38.9~37.1	生

(C=対照, F=0.001% Formalin 混合, ※=対照を基準にした場合の10単位に相当)

更に Formalin 変性抗原と正常抗原との差を見るため、感作量の絶対量を等しくし、再注射抗原の絶対量も等しくした場合を比較するに、第六表に示す如く、対照に於ては軽度過敏症で海狸が生存するに対し、Formalin 変性抗原再注射では過敏症死を起し、明らかに

Formalin 変性抗原の過敏症発症力が増強していることを認めた。

なお高濃度の Formalin を抗原に作用せしめた場合、沈降反応に於て抑制作用が認められたので、之が過敏症に於て如何に現われるかを検した。即ち第七表に示す如く、正常抗

第6表 過敏症(感作, 再注射の絶対量を等しくした場合の比較)

モ 番 ル モ ツ ト 号	沈 降 素 価 / 結 合 帯	体 重 gr.	感 作 量		再 注 射 量			潜 伏 期 (時間)	体 温 °C	転 帰
			単 位	cc	抗 原	Zone	cc 10×			
7	500/500	310	10	0.48	C	Z	0.48	24	38.5~37.2	生
6	1000/250	300	20 △	0.46	F	½ Z	0.46	"	39.0~0	8分30秒死

(C=対照, F=0.001% Formalin 混合, △=対照を基準にした場合の10単位に相当)

原の20単位に相当する感作を行つた海狸に, 正常抗原再注射量の2倍に当る1% Formalin 添加抗原を再注射したが, 極めて軽度の過敏症症状を認めたにすぎなかつた. 更に Formalin 自体の毒性を検査するため, 感作しない海狸に, 前記と同量の1% Formalin 添加抗原

を注射してみたが, 殆んど認むべき症状をあらわさなかつた. よつて高濃度の Formalin が抗原に作用した場合, 沈降反応に於て認められた反応抑制作用は, 過敏症に於ても証明され, Formalin の抗原に及ぼす影響は, その濃度が大なる関係を持つことが認められる.

第7表 過敏症(1% Formalin 添加抗原使用)

モ 番 ル モ ツ ト 号	沈 降 素 価 / 結 合 帯	体 重 gr.	感 作 量		再 注 射 量			潜 伏 期 (時間)	体 温 °C	転 帰
			単 位	cc	抗 原	Zone	cc 10×			
3	500/500	290	20	0.89	C	Z	0.44	24	39.3~0	2分30秒死
11	/	260	/	0.80	1% F	/	0.80	"	39.1~37.2	生
12	/	260	/	/	1% F	/	0.80	/	39.2~37.8	生

(C=対照, 1% F=1% Formalin 混合)

総括及び考按

Formalin はその化学的性状より或は消毒に用いられ, 又人体に対し皮膚の過敏症を起し¹³⁾, 更には蛋白の保存に防腐剤として用いられる点等よりして, 他の化学薬品と同様蛋白に作用してその血清学的反応に影響を及ぼすこと大であらうと想像され, 従来その方面の検索が行われて来たが, その多くは Formalin の作用により蛋白の抗原性を減ずるとするものであり, 更には蛋白に Formalin を加えて変性せしめ, その変性蛋白を用いて得たる抗体を以て状態特異性或は種属特異性を論じたものが殆んどであつた.

私は正常蛋白によつて免疫して得たる抗体と, 各種濃度の Formalin を作用せしめた抗原とを用いて一連の血清学的反応を行つたのであるが, Formalin の高濃度の部分に於てはその反応抑制作用が明らかであり, 更に作

用時間の延長に伴いその傾向は著明となることを認めた. 然るに低濃度の部分に於ては, 従来成績とは逆に反応の増強作用を認め, その作用は0.001% Formalin を37°C 24時間作用せしめた場合に最も強く, その増強作用はU氏沈降反応, 緒方氏抗体稀釈法, 補体結合反応, 更には生体に於ける過敏症によつても明らかに認められた.

惟うに Formalin を蛋白に作用せしめた場合, 高濃度に於ては蛋白変性も高度であるため血清学的反応の減弱を来し, 漸次濃度の低下に伴つてその抑制作用は弱くなり遂には対照と等しくなるのであるが, 0.001%の部分に於ては蛋白が対照に比して或程度の変性を受け, その変性の度は反応を増強せしむるに適した程度であらうと考えられる.

結 論

- 1) Formalin を抗原蛋白に作用せしめて

沈降反応で検すると、高濃度に於ては反応抑制作用があらわれ、低濃度に於ては逆に反応増強作用をあらわす。その最適濃度は 0.001% であり、作用時間は 37°C 24 時間である。

2) 0.001% Formalin を 37°C 24 時間作用せしめた抗原は、緒方氏抗体稀釈法に於ても沈降素価を増強し更に結合帯を移動せしめる。混合法、補体結合反応に於ても略々同様の傾向を認めた。

3) 海狸を用いた過敏症実験に於ても Formalin 変性抗原は対照に比較して作用強く、20単位感作、結合帯相当量の半量の再注射に於ても強度の過敏症反応を起して動物を斃死せしめた。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導及び御校閲を賜った恩師緒方教授に深甚なる謝意を表す。

本論文要旨は第 467 回岡山医学会通常例会に発表した。

文 献

- 1) Eisenberg: Zentralbl. f. Bakt., Bd. 31, 1902.
- 2) 滝沢・日本微生物学会雑誌, 16 卷, 866 頁, 大正 11 年.
- 3) Landsteiner, K.: The specificity of serological reactions, c. c. Thomas, New York. Page 45, 1945.
- 4) 小泉: 岡医誌, 545 号, 1641 頁, 1935.
- 5) Frank L. Horsfall: J. of Immun., 553; 27, 1934.
- 6) Charles A. Leone: J. of Immun., 386; 70, 1953.
- 7) 須之内: 岡医誌, 41 年, 7 号, 1533 頁, 昭和 4 年.
- 8) 緒方・第 1 回衛生微生物寄生虫病学連合医学会講演, 昭和 2 年.
- 9) Keckwick, R. A., Cannan, R. K.: Biochem. J. 30; 232, 1936.
- 10) Braun: Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exp. Therapie, Bd. 78, S. 46, 1933.
- 11) 大岩: 岡医誌, 46 年, 9 号, 2287 頁, 昭和 9 年.
- 12) 大田原: 岡医誌, 51 年, 6 号, 1343 頁, 昭和 14 年.
- 13) Frank L. Horsfall: J. of Immun., 569; 27, 1934.

Effects of Formalin on Antigen, With a Special Reference to Increased Activity of Antigen

By

Nobuo Otsuka

Department of Hygiene, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. M. Ogata)

Activity of antigen were studied after different concentrations of formalin was added to antigen for various period of time. Experiments were performed with precipitin reactions, complement fixation tests, and anaphylaxis.

Following results were obtained.

There were found exaggerated reactions with increase of period during which time antigen was exposed to formalin.

Activity of antigen was reduced when concentrated formalin was used as experimental reagent, while increase of activity was noticed in the case of diluted formalin. A peak of activity of antigen was found when 0.001 per-cent formalin had been reacted to antigen at 37°C for 24 hours.