《原 著》

オーストラリア抗原の染色性に関する研究 (第 1 報)

志 方 俊 夫 鷗 沢 輝 子 吉 原 な み 子 赤 塚 俊 隆*

はじめに

オーストラリア抗原 (Au 抗原) の組織, 細胞内局在に関しては, これまで蛍光抗体法, あるいはペルオキシダーゼ抗体法などを用いての検索が進められて来た¹⁻³⁾. しかし Au 抗原は異常ナリポ蛋白であり, この異常ナリポ蛋白が蛍光抗体法で示されるように, かなりな量細胞質内に存在すれば, その部分の形態学的な変化あるいはその染色性の変化がおこりうるであろうことは当然考えられることである. しかし, 少なくとも普通の Hematoxylin-Eosin 染色では, そのような特別の構造を認めることはできなかった. 私どもはたまたま蛍光抗体法による Au 抗原の形と分布を, paraffin 切片と比較して検討していた際に, Elastica van Gieson 染色標本において蛍光抗体法で染まる Au 抗原の分布, 形とはほぼ一致して肝細胞およびその一部が淡く黒褐色に染まっていることを見出した. Resorcin-fuchsin の単染色を行うと, これは resorcin-fuchsin によって染まることが明らかになった. そこでよりよい染色法を探したところ, 酸性にした orcein また Gomori の aldehyde-fuchsin 法により, より明瞭に染色されることがわかった⁴⁾. この染色の特異性は, 蛍光抗体法で Au 抗原を染めた標本を再び orcein で染めて比較すること, 電気泳動で寒天上に分散した Au 抗原を orcein で染色することにより確かめられた.

このように paraffin 切片において色素で Au 抗原を染色できる可能性があることがわかりさえすれば, あとはいろいろな染色法, たとえばリポ蛋白の染色, 核酸の染色, Au 抗原に多いと思われる tryptophan の染色, SH-, または -S-S- 基の染色など試みてみようと考えてことはきわめて容易なことであった.

また formalin 固定の paraffin 切片で Au 抗原を染めうるということは, 凍結切片による蛍光抗体法とこと

なり, 細胞の微細な変化と Au 抗原との関係を知りうることになる. ここで Au 抗原の集りが, 細胞質内に封入体を作っていることにもすぐ気がついたのである.

あとは種々な染色法を試みることに, いろいろな症例を染めて見ることに過ぎない. したがってできた範囲から, 報告をかさねていきたいと思っている.

材料および方法

材料は東大病理学教室の剖検例の肝臓で, Au 陽性の肝炎, 肝硬変, hepatom, Au-carrier の症例である. 対象として Au 陰性の種々の疾患の肝臓を用いた. 材料はごく普通の方法で, formalin 固定の paraffin 切片を用いた. 蛍光抗体法と対比するために, また凍結切片でなくては染まらない染色のために, 一部の症例はクリオスタットの切片を用いた. また蛍光抗体法で Au 抗原を染めたのちに再び formalin 固定して染色を行った症例もある.

寒天上での Au 抗原の染色は, 北里研究所の高橋博士からいただいた精製 Au 抗原, Au 陽性の患者および carrier の血清を電気泳動で展開し, またオクタロニー法で沈降線を作ってこれを染色した. もちろん対象には種々の血清蛋白を用いた.

染色法は今まで行ったものは次のとおりであるが, 詳しい方法は成績の中で述べる. 1) Orcein 染色 2) Gomori の aldehyde-fuchsin 染色 3) Adams & Sloper の alcian blue 染色 4) Tryptophane のための DMAB 亜硝酸法 (Adams) 5) Weigert の resorsin-fuchsin 染色 6) Verhoeff の hematoxylin による弾性線維染色 7) Unna-Pappenheim の methylgreen-pyronin 染色 8) acridine orange 染色 9) DNA のための Feulgen 染色 10) Luxol fast blue 染色 11) PAM 染色 12) lipofuscin のための Schmorl 反応.

なお, 寒天上では主として orcein 染色を行ったが, 対比染色として ponceau fuchsin による染色または orcein と ponceau fuchsin の重染色を行った.

* T. Shikata, T. Uzawa: 東京大学 病理; N. Yoshiwara: 東大病院輸血部; T. Akatsuka: 東京大学医学部学生.

図 1, 2. Hepatoma を伴う肝硬変の非癌部の Au 抗原, 図 1 は右上のわずかの肝細胞を除いてほとんどの肝細胞が Au 抗原をもっている. 図 2 は左下の部分の肝細胞が Au 抗原をもっており右上には Au 抗原の集りが一個の封入体として見える. Au 抗原は肝細胞の静脈洞側に多く顆粒状または泡窩状に見える. 核内には Au 抗原は存在しない. (Paraffin 切片, Orcein 染色).

図 3.

図 4.

図 5.

図 3. この部分では Au 抗原をもった肝細胞が肝細胞索の中に散在している。Hepatom の症例の非癌部。

図 4. 図 3 の強拡大, Au 抗原は多く細胞内封入体として存在するが, 時により 1 個の肝細胞全体を占める所もある。封入体をもつていても細胞には変化はない。

図 5. 慢性肝炎. この症例では Au 抗原は核に似た形の細胞質内封入体として存在する。

(以上いずれも formalin 固定, paraffin 切片, orcein 染色)。

図 6.

図 7.

図 6, 7. 種々の形の細胞質内封入体として Au 抗原の集りがある。核には Au 抗原は存在しない。Kupffer 星細胞に貪食されている Au 抗原のかたまりもある。(Paraffin 切片, Orcein 染色。図 7 は図 6 の強拡大.)

染色法の多くは文献6を参照した。

成 績

1. Au 抗原の染色性

1) Orcein 染色による Au 抗原の染色: orcein 1g を 70% アルコール 100 ml と局方塩酸 1 ml にとかした染色液を使用した。pH は1か2である。標本をこの染色液で2~3時間染色した後、種々な pH の水、70% アルコール、純アルコール等で分別した。結果は pH 10 位の水で数秒分別するのが一番よいコントラストを得た。orcein 染色液を pH 13, pH 7 にした液も使用したが、結果はよくない。また染色の時間はやや長めにしてよく分別した方がよい結果が得られた。Au 抗原は紫色をおびた褐色に染まる。細胞質もうすく染まるかその色は分別の液の pH により若干異なり、中性だと褐色であるがアルカリ性だと青味が強くなる。核は褐色に染まる。肝細胞中に封入体として存在する Au 抗原の集りはかなり明瞭に染まるが、細胞質内にびまん性にある場合は、細胞質自体がうすく染まるので鑑別がやや困難である。この点、次に述べる染色の方がよい。

この染色が Au 抗原にかなり特異的であることの証明は次の三つの方法で行った。

蛍光抗体法での Au 抗原の肝組織内の分布、その形は症例によって異なる。そこで特徴的な分布を示す若干の症例、たとえば一部の小葉、また偽小葉のほとんどの肝細胞が Au 抗原を持っている症例、また肝細胞索内に散在性に Au 抗原を持った細胞がある例——この後者は多くの場合、Au 抗原は円形ないし楕円形のかたまりとして見られ、以前私はこれは好酸性小体であると考えていた——を選び、orcein 染色の標本と比較しまったく同じような分布また形を示すことを知った。

第2に凍結切片を蛍光抗体法で Au 抗原を染め、その分布および形をスケッチおよび写真撮影で記録し、この切片を再び formalin 固定をして orcein で染色した。これによっても蛍光抗体法で光る部分が orcein で染まることが明らかになった。ただ凍結切片は paraffin 切片より染色性が悪く、細胞質内にびまん性に Au 抗原が存在するものは orcein 染色では判別が困難である。

第3に精製 Au 抗原、またこれを健康人血清にまぜたもの、Au 陽性血清を電気泳動で寒天上に展開し、これに orcein 染色を行い、また ponceau fuchsin 染色との対比、および重染色を行った。これにより Au 抗原がかなり特異的に染まることがわかった。かなり特異的とい

うのは、正常血清の一部がきわめてわずかに陽性に染まるように見える。これがなんであるかはまだよくわからない。精製 Au 抗原は北里研究所の高橋博士からいただいたのを使用した。精製した α および β -リポ蛋白は orcein では染まらない。また寒天上で orcein で染まるためには Au 抗原のある濃度が必要である。蛋白量として4%の Au 抗原を含んだ液を倍数稀釈して行き電気泳動で展開して染めると——どの位展開されるかが問題であるが——32倍の稀釈まで染まった。Au 陽性血清をそのまま電気泳動して orcein で染めてもその Au 分画は染まらない。しかしオククロニー法で沈降線を作らせると、この沈降線は orcein で染まる。つまり、ある程度濃度が高ければ染まり、また抗体と抗原抗体複合物を作っているとも染まるということである。

以上の三つの証明法で Au 抗原以外のものも若干染まるものがあるかもしれないが、少なくとも Au 抗原はかなり特異的に orcein で染まることが明らかになった。また以下述べる orcein 以外の染色の特異性は、orcein で染色された標本をスタンダードにした。

2) Gomori の aldehyde-fuchsin による染色: この染色法はもともと弾力線維の染色のために開発されたものであるが、脳下垂体の塩基好性細胞も染まるといわれる。この染色で肝臓で Au 抗原はかなり特異的に染まる。orcein 染色と異なり核、細胞質はまったく染まらないので、肝細胞中にある微量の Au 抗原も検出可能である。現在のところ、この染色方法が一番感度がよいように思える。しかし、肝細胞内および Kupffer 星細胞の消耗色素と思われる顆粒が同時に若干染まるが、これは形および分布の上から明らかに区別がつく。赤色の色素でうすく核および細胞質の対照染色をするとい。

3) Adams & Sloper の alcian blue による染色: cystine や cysteine の染色法として発表されたものである。Au 抗原はうすく染まる。しかし Kupffer 星細胞の顆粒が、よりこく染まるためあまりよくない。

4) Adams の tryptophan のための DMAB 亜硝酸法: Au 抗原に tryptophan が多いということから本法をクリオスタットによる凍結切片に試みた。濃塩酸を使用するので組織がかなりこわれるが Au 抗原の封入体は染まる。細胞質内にびまん性に Au 抗原があるものは、まったく Au 抗原のないものと染まり方の程度の差のためはつきりしない。

5) Weigert の resorsin-fuchsin 染色: これは普通 van Gieson 染色とともにルーチンに使用されているも

のである。Au 抗原は淡い黒色に染まる。もともと Au 抗原が formalin 固定の paraffin 切片で染まることを見出したのは蛍光抗体法の標本と elastica-van Gieson 染色を比較していたとき見出したのである。しかし染まり方はきわめてうすい。

6) Verhoeff の hematoxylin による弾力線維染色法: Au 抗原も染まるが細胞質も染まってしまうコントラストがよくない。

7) Unna-Pappenheim の methylgreen-pyronin 染色: Au 抗原に核酸があるかないか知るために行った。ホルマリン固定の材料で行ったが、methylgreen でも pyronin でも染まらなかった。今後さらに検討する予定である。

8) Acridine orange 染色: クリオスタットの凍結切片で行ったが、Au 抗原の部位の判断がむずかしく今後検討を要するか、少なくとも封入体に RNA は染まらないようである。

9) DNA のための Feulgen 反応: Au 抗原は染まらない。

10) Luxol fast blue 染色: 髄鞘染色として用いられるものであるが、Au 抗原カリポ蛋白ということで試みた。Au 抗原自体は染まらないが、Au 抗原を持って退行変性に陥っている細胞の細胞質の一部が染まる。

11) Lipofuscin のための Schmorl 反応: これもカリポ蛋白ということで試みたが染まらない。

2. Au 抗原の分布と形態

このような formalin 固定 paraffin 切片での染色は蛍光抗体法に比較して、Au 抗原の組織細胞内での形態をより明確に知る手掛りを与える。肝組織内での分布は蛍光抗体法で見たものと完全に一致する¹⁾。しかし、従来蛍光抗体法で単細胞性に Au 抗原を持った肝細胞が散在し、その肝細胞はやや円味をおびて退行変性に陥っていると私が述べて来たものは^{1,2)}、実はその多くはそうではなく、肝細胞内に円形ないし楕円形の細胞内封入体が存在するのであることが、この新しい方法で明らかにされた。つまりヒトの血清肝炎と伝染性肝炎では、従来封入体は存在しないといわれていたが、実ははっきりした細胞質内封入体が存在するのである。これらは細胞質の一部に円形、楕円形、ときに三ヶ月形、また不整形の封入体として存在する、またときに核の周囲に核をとりかこんで存在することも多い。これらの封入体を持った肝細胞は多くは退行変性を認めない。また細胞全体に Au 抗原があり、やや円くなって好酸性小体に近いものもある。

また封入体が肝細胞から放出されて Kupffer 星細胞に貪食されているものもある。

これらの封入体は、以前私がペルオキシダーゼ抗体法で電顕レベルで見えており、その中に 200 Å の粒子が無数にある²⁾。これらの細胞質内封入体は Au 陽性の肝炎、肝硬変の症例の肝細胞に認められた。細胞質中にび慢性に Au 抗原を持った肝細胞では、むしろ細胞の静脈洞よりに Au 抗原が多く、細顆粒状に見える。核には Au 抗原はまったく証明されない。

考 案

Formalin 固定の paraffin 切片で、しかも色素で Au 抗原を染めようなどということは世界中で誰も夢にも考えなかったことである。私ももったく偶然の機会から、paraffin 切片で Au 抗原が染まることを見出した。それも一種の染色でなく、かなりいろいろの染色でかなり特異的に染まることがわかった。もちろん特異的といっても色素による染色のことであるから、完全に特異的というわけにはいかない。

この Au 抗原の染色の特異性は、Au 抗原の性質によると思われる。たとえば Au 抗原に -S-S- 結合が多いことがおそらく Gomori の aldehyde-fuchsin 法、Adams & Sloper の alcian blue 法で染まる原因であろう。Orcein また resorcin-fuchsin でなぜ染まるかわからない。しかし、とにかく Au 抗原は弾力線維とかなり似た染色態度を示す。これがなにによるかわからない。Tryptophan が多いためかも知れない。Orcein では弾力線維と同様に染色液を pH 1 程度にしないと染まらない。核酸が染まるかどうかは今後さらに慎重に検討するつもりである。

これらの染色法が Au 抗原にかなり特異的であることは、その染まるものの分布、形を蛍光抗体法で Au 抗原を染めたものと対比することによりほぼ明らかであったが、さらに蛍光抗体法で染めたものを、あとから色素で染め、同一部分が染まること、Au 抗原を他の血清蛋白と寒天上に電気泳動で展開したものを染めると Au 抗原が特異的に染まることでたしかめた。

また、paraffin 切片で Au 抗原を染めることによりかなり微細な変化が読み取れ、今まで封入体がないと思われていたのに Au-associate の肝炎、肝硬変に細胞質内封入体があることが明かになり、また核内には Au 抗原が存在しないことも明らかになった。

この方法の発見が、Au 抗原の研究に対し大きな飛躍

を与えるものと信ずる。

おわりに

私どもは formalin 固定の paraffin 切片で、また寒天上で Au 抗原を特異的に染色するいくつかの方法を見出した。この方法は 2, 3 の根拠から Au 抗原にかなり特異的であることが証明された。さらに paraffin 切片で Au 抗原を染めうることは微細な細胞の変化を知る手掛りを与え、Au-associate の肝炎、肝硬変に細胞質内封入体が存在すること、核内には Au 抗原が存在しないことを明らかにした。

さらにこの方法の発見が Au 抗原の核酸の証明など、Au 抗原の研究に大きな飛躍を与えることを期待する。

最後に本研究に種々の助言を与えてくれた北里研究所 高橋博士、九大の大河内教授、自治大 真弓助教授、後藤博士、東大医科研 青山教授、斉藤教授、東北大、石田教授、阪大 宮地教授、国立がんセンター 西岡部長、関根博士はじめ日本の Au 抗原研究グループの多くの方々に感謝の意を捧げる。また材料の集収や論文の作製などに努力された秘書の武田やす子嬢に感謝する。

文 献 1) 志方俊夫, 大河内一雄, 真弓忠, 柳原耕子, 吉崎千穂: オーストラリア抗原の組織, 細胞内分布とその形態, 肝臓 **13**: 29-39, 1972. 2) Shikata, T.: Australia antigen in liver tissue—An immunofluorescent and immunoelectron microscopic study—Jap. J. Exp. Med. **43**: 227-233, 1973. 3) Nowoslawski, A., Krawczynski, K., Brzosko, W.J. & Madalinski, K.: Tissue localization of Australia antigen immune complexes in acute and chronic hepatitis and liver cirrhosis. Am. J. Path. **68**: 31-55, 1972. 4) 志方俊夫: ウィルス性肝炎に於ける細胞内封入体, 医学のあゆみ (投稿中). 5) 志方俊夫, 鶴沢輝子, 吉原なみ子, 赤塚俊隆: Au 抗原の染色性 (第1報), 医学のあゆみ (投稿中). 6) 佐野豊: 組織学研究法 (第4版), 南山堂, 東京, 1972. 7) 志方俊夫: 肝臓の免疫病理学的背景, 臨床科学 **9**: 335-346, 1973. 8) 石田名香雄: オーストラリア抗原の性状, 臨床科学 **9**: 324-334, 1973.

追補: この論文を投稿してからさらに急速に新しい事実が明らかになった。あらためて別の論文を書くつもりではあるが重要な点を略記する。

1. 染色法について。Orcein 染色はあらかじめ過マンガン酸カリによる酸化を行うことにより核および細胞質の染色性を下げ、きわめてよいコントラストを得ることができ、微量の Au 抗原を検出できる。この際分別は純アルコールで充分である。Orcein 色素は製造会社により Au 抗原の染色性にかなり差があることに注意しなければならない。aldehyde-fuchsin 法は -S-S- 結合をスルホン酸にして染めていることがあきらかになった。スルホン酸をメチルエステルにすると染まらなくなる。aldehyde-fuchsin 法ではときにグリコーゲンが染まってしまう。殊に生検肝ではグリコーゲンをあらかじめ消化した方がよい。Orcein 法, aldehyde-fuchsin 法とともに aldehyde-thionine 法も Au 抗原の染色によい。いずれの染色も固定は formalin が一番よい。

2. 剖検例および生検肝をこれらの方法で染めた所、剖検例では死亡時血清中に Au 抗原が出ていた例ではほぼ 100% 肝臓に Au 抗原が染まった。死亡前 2~3 カ月に Au 抗原が出ており死亡時血清中には Au 抗原が検出できなかった例では、肝臓に染まる例と染まらない例があった。生検肝では血清中の Au 陽性例の 50% 弱に Au 抗原が染まった。生検肝で検出率が少ないのは Au 抗原の分布が不規則のためのサンプリングの問題である。剖検、生検とも Au 陰性の症例では一例もこの染色で肝臓に Au 抗原は染まらなかった。Au に associate しない肝炎でも同様な封入体が染まるという期待は裏切られた。

3. 肝細胞での Au 抗原の産生と放出が明らかになった。Au 抗原は小葉または偽小葉の一部のすべての肝細胞で作りはじめられる(第一期)。このとき Au 抗原は肝細胞の静脈洞よりかなりび慢性に存在する。次に Au 抗原が放出され残ったものは集って細胞質内封入体を作りはじめる(第二期)。ほとんどすべての Au 抗原が放出され残った Au 抗原は肝細胞素の中に散在性に核周囲に封入体を作る(第三期)。Au-carrier では封入体は認められないようである。これは封入体形成に免疫反応が関与しているためかもしれない。