馬C3多型の検出法

芝田 猛・阿部 恒夫

九州東海大学農学部, 熊本県阿蘇郡 869-14

Detection of electrophoretic polymorphism of equine C3

Takeshi Shibata and Tsuneo Abe

Faculty of Agriculture, Kyushu Tokai University, Aso-gun, Kumamoto 869-14

人および実験動物の補体系蛋白質の遺伝的多型については、かなり研究が進み、人ではC2, C3, C4, C6およびFactorB, モルモットではC2, C4, FactorB, マウスではC2, C3, C6, FactorB, 兎ではC3, C6の多型が報告されている。しかし家畜では馬, 緬羊, 山羊のC3多型が報告されているに過ぎない。

一般に補体の多型の検出には免疫固定法が用いられるため、各成分に対する特異的抗血清が必須である。そこで本試験は、田村ら(1977)の方法を応用して抗馬C3を作製し、それを用いて寒天ゲル電気泳動による馬C3多型を検出したので、その方法について述べる。

材料と準備

血清試験：免疫原調整用の血清は、サラブレッド種1頭より100ml採血し、血清分離後直ちに-30℃に凍結保存した。C3多型検出の試料は、すべてEDTA-2Na, 5ml真空採血管で採取し、遠心分離した血漿を-30℃凍結保存したものを用いた。

Zymosan：市販のものを乳鉢に入れ細碎し、0.1gを0.01M EDTA生理食塩水20mlに浮遊し、湯槽中で2時間煮沸加熱したものを冷蔵庫に保存した。

0.01M EDTA生理食塩水：0.1M EDTA-Na₃溶液100mlと0.9%生理的食塩水900mlを加えて作製した。0.1M EDTA-Na₃溶液は、EDTA-Na₃ 37.23gに蒸留水700mlを加える。次にNaOH 4gを100mlに溶かしたものを作り、これをEDTA-Na₃溶液に加える。さらに1N NaOHでpH7.5に補正後に全量を1,000mlとする。

免疫動物：山羊ザーネン種成雌1頭

電気泳動装置：1000V, 150mA程度の直流発生装置、冷却水還流装置付の電気泳動槽。

ガラス板：260×140×1mm

電極用緩衝液：

Tris	22.53g
Glycine	39.79g
Na Barbiturale	6.39g
Barbitric acid	1.03g (pH8.8)

上記のものを蒸留水1,000mlにメスアップした。

寒天ゲル用緩衝液：

電極用緩衝液	25ml
蒸留水	75ml
EDTA	0.74g

上記溶液55mlにアガロースGP-42 0.41gを加え加熱溶解後、0.7%寒天ゲル板を作る。

染色液：	メタノール	225ml
	蒸留水	225ml
	酢酸	50ml
	Coomassie Brilliant Blue R-250	1g

上記のものを、良く混和溶解させる。

脱色液：	エタノール	350ml
	酢酸	100ml
	蒸留水	500ml

方 法

[抗馬C3血清の作り方]

a) 保存しておいたZymosan浮遊液20mlをとり、生理食塩水で3回以上遠心分離(2,000rpm, 10分)により洗浄する。次にZymosan沈渣に新鮮馬血清を加え、37℃, 15分間反応させてから低温で遠心する。この段階で血清中のC3分画はZymosanに結合する。さらに氷冷した0.01M EDTA生理食塩水で6回以上遠心洗浄し、余分な血清成分を除去する。

b) 洗浄後の沈渣を4mlの0.01M EDTA生理食塩

水に浮遊させ、これを37℃、2時間、よく混和させながら加温し、結合したC3を解離させ、最後に遠心分離して上清を採取し、これを抗原液として用いる。

c) 抗原液 2.5mlとFreund's Complete adjuvant (Defco製) 2.5mlをよく混和しエマルジョンとして、山羊の背腰部数ヶ所に皮下注射する。

免疫は、その後3週と5週目の計3回行なった。採血は、3週後以降、週1回数回にわたって100ml~200ml宛行なった。分離血清は56℃、30分加熱、非働化後、窒化ナトリウムを0.1%の割合に加え保存する。

[馬C3多型の検出法]

a) 寒天ゲル板の作り方：

ゲル用緩衝液55mlを三角フラスコに入れ、アガローズGP-42 0.4125gを加えて、湯槽に入れて加熱溶解後、あらかじめ水平に置いたガラス板に手早く流し、厚さ約1.5mmの0.75%寒天ゲル板を作る。寒天ゲル板は、乾燥しないよう湿箱に収めて冷蔵庫内に一晩放置したものを用いる。

b) 試料の添加：

寒天ゲルの片側より3cmの位置に7mm巾の切り込みを3mmの間隔をおいて12本つける。

各切り込みに7mm巾の濾紙片を挿入し余分の水分を吸い取った後に、マイクロシリンジを用いて2 μ lの血漿試料を添加する。なお、移動度のインディケーターとしてヒトヘモグロビン溶液を一側の切り込みに添加する。

c) 泳動条件：

冷却装置付の電気泳動槽にゲル板をのせ、ブリッジとして厚手濾紙4枚を重ねたものあるいはスポンジ片を

用いる。泳動は約8℃において、定電圧20V/cm、約3時間行ない、ヒトHbが原点より7cmに移動したときを目安として終了する。

d) 免疫固定・染色・脱色：

薄手濾紙(6×16cm)に2倍に希釈した抗馬C3 1mlを浸みこませたものを原点より陽極側のゲル板上に密着させてのせ、湿潤箱に入れ室温で一晩放置する。翌日に反応に関与しなかった血清蛋白質を除去するため、ゲル板を生理的食塩水に3日間浸けておく。この間食塩水は3~4回交換する。最後に塩分を除去するため30分程蒸留水に浸ける。次にゲル板に薄手濾紙をかぶせてから、乾燥させる。

乾燥した寒天ゲル板を15分間染色液に入れて染色したのち、脱色液に移して脱色する。

結 果

1. 抗血清の特異性

免疫後2週間目より抗体は産生され始め、4~7週の抗体価は4倍であった。バルビタール緩衝液(pH8.6)を用いた免疫電気泳動の結果、免疫初期(2~3週)の抗血清では β -globulin領域にC3と思われる濃い1本の沈降線が認められたが、免疫が進むにつれて他の沈降線も見られるようになった。

4週以降の抗血清については、1/20量の馬血清を加えることにより、抗C3以外の抗体は吸着除去することが出来た。

市販の抗馬C3(The Binding Site社)と比較した結果、前記の β -globulin域の沈降線は抗C3によるものであることが同定された。

Fig.1 Electrophoretic patterns of equine C3 demonstrated by immunofixation.

Table 1. Phenotype frequencies of equine C3

Breed	NO.	Phenotypes					
		1	2	3	1, 2	1, 3	2, 3
Tokara Horse	23	3	5				15
Tharoubred	12	6					6
Anglo-Arab	13	9					4
Quarter Horse	3				1	1	1
Pony	5	4			1

Fig.2 Changes in electrophoretic patterns of equine C3-1, 2 on EDTA plasma and serum during storage at 4°C.

2. 馬C3多型の検出

Fig. 1に、これまで調べたトカラ馬23頭、ポニー種5頭、サラブレッド種12頭、アングロアラブ種13頭、クォーター種3頭、計56頭において認められた5種の表現型の電気泳動像を示した。Kayら（1986）の報告と同様に移動度の異なる3本の濃いバンドが認められた。彼らの命名に従い、陰極側に近い方からC3-1、C3-2、C3-3と名付けた。これらのバンドの組合せから6種の表現型が考えられるが、これまで調べたものにおいてはC3-1型は認められていない。

Table 1に、5品種の表現型頻度を示したが、遺伝子頻度を推定するためにはさらに例数を増して調査する必要がある。

3. 試料保存の影響

C3は細菌表層のリポ多糖などにより活性されC3aとC3bに分解し、さらにC3bは血清中の蛋白分解酵素によりC3cに変化すること知られている。そこで、EDTA添加

血漿と未添加の血清を冷蔵庫内に保存したときの電気泳動像の変化を調べ、Fig. 2に示した。

その結果、血清（C3-1, 2型）では3日後からC3分解による新たなバンドが出現し、10日目には全て移動度の異なる新しいC3cバンドと思われるものに転換した。EDTA添加血漿においては、この変化は全く見られなかった。このことからC3多型の検出のためにはEDTA添加が安全であることが確認された。

最後に、トカラ馬血液を採取して送付頂いた鹿児島大学農学部 橋口 勉教授および関係者に深謝いたします。

文 献

- 田村 昇・中山秀英, 1977 免疫実験操作法, 1949-1952.
日本免疫学会編
Kay, P.H. & R.L. Dawkins, 1986 Anim. Genet.
17: 209-215.