血清のレンニン凝固抑制作用に関する研究 (第1報)

前野正久・島村靖三

(北海道大學農學部)

On the repressive action of blood serums for rennin coagulation for cow's milk.

M. MAENO, Y. SIMAMURA

(Faculty of Agriculture, Hokkaido University)

緒言

牛乳のレンニン凝固及その抑制又は促進に就ては從來數多くの實驗研究が試みられているが今日尙不明の點が頗る多い。血清の Rennin coagulation 抑制に就ては 1887 年 RÖDEN⁽¹⁾ の研究がある。然し此の研究にては馬及豚血清は抑制力強く牛は弱く兎は殆んど無く血清が Rennin を變性せしめるという推論を行つてゐる以外未だ判然としていないのである。仍つて茲に著者等は血清の抑制物質究明と惹いては牛乳蛋白の膠狀性究明の一助として本研究を行つた。

1. 實驗材料並に方法

供試牛乳は本學第二農場のホルスタイン種乳及その脱脂乳を使用し酸度は乳酸の稀釋液で總て 0.18% とした。

血清は主として馬血清を使用し當學科家畜病院の外科輕症患馬の頸靜脈より採血 35°C で血球と分離した。

Rennin は鹽藏犢胃より鹽化石灰法⁽²⁾にて抽出原液を調製し實驗の都度稀釋しこの 1 c.c. が供試乳を約 1 分間で凝固せしめ得る様調節した。牛豚は酪農協同會社の屠場で脱纖維した血液を遠心分離により血清を分離した。人血は著者の腕より採取した。兎は北大醫學部細菌學教室より山羊は農場より得た。尙實驗結果は三回の平均値を採つた。

2. 實驗結果

第1表の如く豚血清、馬血清は抑制力は強いが牛及人は著しく弱く、山羊、兎は殆んど抑制力は見られない。従つて採血に便利な馬血清を爾後の實驗に供した。次で馬の個體による差を測定した。

第2表の如く個體に依つて馬血清の抑制力には差異がある。従つて單に血清中の既知の蛋白と考える事には既に疑問が生ずる。

次に血清中の如何なる部分が抑制力を有するかに就て實驗した。先ずグロブリンを對照としたが之等の沈澱に

第1表 各動物血清の抑制力比較
(凝固に要した秒數)

動物名	添加量 c.c.	0 0.02 0.04 0.06					0.06 c.c. 添加凝固 遅延秒數	血清 蛋白 全量%
		0	0.02	0.04	0.06			
豚	No. 1	68	89	108	137	69	6.8	
	No. 2	68	87	108	135	67		
馬	No. 1	68	73	87	101	33	7.1	
	No. 2	68	73	88	101	33		
	No. 3	69	79	90	105	36		
牛	No. 1	68	73	76	75	7	7.3	
	No. 2	68	72	75	75	7		
人	No. 1	69	69	72	73	4	7.1	
山羊	No. 1	69	69	67	69	0	—	
家兎	No. 1	69	69	69	72	3	—	

第2表 馬血清の個體による抑制力比較

供試馬	添加量	0 0.02 0.04 0.06				0.04 c.c. 添加凝固 遅延(秒)
		0	0.02	0.04	0.06	
A		57	68	79	94	22
B		58	66	76	90	18
C		69	85	105	145	36
D		69	100	131	240	62
E		54	—	77	—	23
F		54	—	75	—	21
G		54	—	84	—	30
H		54	—	87	—	33

使用する鹽類に依る影響を試験し第3表の如き結果を得た。

以上の如く重金屬及 Mg 鹽は一般に凝固を促進するが硫酸ソーダ鹽、磷酸鹽は遅延する。勿論 pH を嚴密に測定する必要はあるが促進は首肯し得るにしても遅延に就ては判然としない點が多い。然し兎も角硫酸 $\frac{1}{2}$ 飽和、全飽和に依つてグロブリン次にアルブミンを沈澱せしめその濾液を以て次の試験を行つたのである。

第3表 蛋白沈澱鹽類飽和液の抑制力に及ぼす影響

添加量 c.c.	0	0.02	0.04	0.06
鹽 類				
(NH ₄) ₂ SO ₄	69	90	103	111
Na ₂ SO ₄	71	86	94	100
K ₂ SO ₄	70	74	71	74
KCl	70	—	71	72
MgSO ₄	70	70	68	63
MgCl ₂	70	48	43	47
FeSO ₄	77	70	52	49
Fe ₂ (SO ₄) ₃	77	43	32	21
Na ₂ HSO ₄	64	67	69	70
Na ₃ PO ₄	64	72	84	92
隣タングステ ン酸ソーダ	65	225	—	—

第4表 脱グロブリン及脱アルブミン馬血清の抑制力

添加量 c.c.	0	0.02	0.04	0.06	0.08	0.12	0.04添 加抑制 c.c. 差
供試液							
正 常 血 清	55	—	80	—	—	—	25
脱グロブリン血清	54	65	77	87	96	—	23
1/2 飽和硫安液	54	64	73	80	86	—	19
脱グロブリン及 アルブミン血清	70	87	104	126	—	—	34
硫安飽和液	70	89	107	126	—	—	37

上表の如く硫安の抑制力の影響を差引けば脱グロブリン血清は凝固抑制力は尙存し硫酸による影響を考えると大差は認め難い。脱グロブリン及アルブミン血清は全く抑制力を失っている事を知り得る。

依つて次に血清グロブリン及アルブミンを鹽析により精製した後稀鹽類に同濃度に溶解した溶液で次の試験を試みた。

以上の如く透析による精製グロブリン及アルブミンは共に全く抑制力を示さなかつた。

然しアルブミンは精製によつて變性した疑も持てる爲血清を Chamberland L₅ にて限外濾過を行い更に次の

第5表 精製グロブリン及アルブミンの抑制力(秒)

添加量 c.c.	0	0.02	0.04	0.06
供 試 液				
Globulin 10% KCl 溶液	49	—	49	50
10% KCl	57	—	—	60
Globulin 0.9% NaCl 溶液	47	47	49	46
0.9% NaCl	47	47	48	47
Albumin 溶液	47	50	49	48

第6表 各種處理血清の抑制力 (三試験平均値秒)

添加量 c.c.	0	0.02	0.04	0.06
供試血清				
限濾外過 { 正 常 血 清	47	58	70	94
限濾外過 { 限外濾過血清	47	57	70	94
加 熱 { 正 常 血 清	69	88	100	115
加 熱 { 63°C. 30 分	68	76	88	96
加 熱 { 85°C. 50 分	68	69	—	70
加 熱 { 加熱濾過血清	66	81	105	126
室内放置 { 當 日 血 清	66	83	100	131
室内放置 { 1 日 後 "	66	82	100	130
室内放置 { 2 日 後 "	69	87	95	115
乾燥 { 乾 燥 血 清	69	82	96	121
乾燥 { 正 常 血 清	69	88	100	115
振盪 { 30 分 振盪血清	69	89	98	116
振盪 { 1 時間 振盪血清	69	82	100	130
稀釋 { 正 常 血 清	47	58	70	94
稀釋 { 10 倍 稀 釋	47	—	—	54
凍結 { 正 常 血 清	57	64	69	75
凍結 { 凍 結 馬 血 清	57	64	69	75
超音波處理 { 正 常 血 清	62	73	90	110
超音波處理 { 15 分 照 射	62	—	93	—
超音波處理 { 20 分 照 射	62	73	92	110
フォリマリン處理 { 正 常 血 清	69	89	109	150
フォリマリン處理 { 4 % 添 加	69	70	72	74
フォリマリン處理 { 10 % 添 加	69	74	70	72
酒精處理 { 正 常 血 清	60	82	—	132
酒精處理 { 50 % 添 加	60	61	60	61
酒精處理 { 濁 濁 液	60	61	64	62
酒精處理 { 濾 液	60	60	58	58
酒精處理 { 溶 解 液	60	59	60	60
フェノール處理 { 正 常 血 清	68	81	100	141
フェノール處理 { 1 % 溶 液	68	67	67	67
フェノール處理 { 添 加 1 % 血 清	68	68	68	68
フェノール處理 { 添 加 0.4 % 血 清	68	82	90	105
HgCl ₂ 處理 { 正 常 血 清	59	66	83	97
HgCl ₂ 處理 { 1000 倍 溶 液	59	60	59	59
HgCl ₂ 處理 { " 同量添加血清	59	65	68	76
硼酸處理 { 正 常 血 清	68	86	128	260
硼酸處理 { 飽 和 液	68	89	119	258
硼酸處理 { 2 % 添 加 血 清	68	90	128	265
蔗糖處理 { 正 常 血 清	70	85	98	120
蔗糖處理 { 50 % 添 加	70	83	92	105

備考 乾燥は常温風力乾燥；酒精は99%酒精同量添加で蛋白の沈澱を來す；濁濁液はそのまゝを用いる；溶解液と稱するのは可及的少量の酒精で濁濁沈澱を生ぜしめ濾過しそれを乾燥後水に再溶解せるもの；稀釋及蔗糖添加は何れも原液に換算せず；超音波は100V, 10A, 波長55M.

如き種々の刺激を血清に與えてその抑制力に及ぼす影響を實驗した。

上表の如く加熱にも相當の抵抗力があり補體とは考えられないし振盪、凍結、乾燥には強く、酒精、Formalin等に弱い所からやはり蛋白質である事が考えられる。又稀釋によつて大體比例的に抑制力の減少する事から觸媒的或は酵素様のものではなく又血清中の主要蛋白でない事も大體推察し得る。然し之も尙判然としない。

依つて血清學的に次の如き檢索を試みた。即ち馬血清を 3 c.c. 宛 3 日置きに兎に注射し抗體を生成せしめた兎血清の抑制力を測定した。次でその抗體含有兎血清と抗原馬血清とを混合充分に凝集反應を生ぜしめ 36°C. に 30 分加温し食鹽にて鹽析し測定した。

第 7 表 血清學的處理馬血清の抑制力

供試液	添加量 c.c.	正常兎血清	含抗體兎血清	抗原馬血清	食鹽水	凝固時間 (秒)
		c.c.	c.c.	c.c.	c.c.	
No. I	混合液	0.02	—	0.02	1	99
	反應濾液	—	0.02	0.02	1	96
No. II	混合液	0.02	—	0.04	1	105
	反應濾液	—	0.02	0.04	1	90
No. III	混合液	0.04	—	0.02	1	135
	反應濾液	—	0.04	0.02	1	113
No. IV	混合液	0.04	—	0.04	1	138
	反應濾液	—	0.04	0.04	1	119
対 照 試 験		0	—	—	—	62
		0.06	—	—	—	65
		—	—	0.06	—	110
		—	0.06	—	—	64

第 8 表 抗原抗體凝集沈澱溶液の抑制力

供試溶液	添加量	0	0.02	0.04	0.06
I	N/100 NaOH	43	—	44	—
	N/100 NaOH 溶解液	43	45	46	47
II	N/100 NaOH	62	—	—	69
	N/100 NaOH 溶解液	62	—	—	69

上の二表で明かな様に馬血清は兎に免疫を生ぜしめる事を得るが抗體を含有した兎血清も正常兎血清の抑制力と何等變化はない。従つて抑制物質は兎の獲得した抗體でない事は明かである。然し抗原馬血清は兎血清中の抗體に會えば抑制力は明かに減少する。従つて抑制物質は抗原となり得る物質である事は略々明かである。但しこの反應を定量的に完全に行う事は困難と思われる。依つて抑制物質は、今日の血清學的領域から觀て、蛋白質であり且被免疫動物の體蛋白以外の蛋白である事は略確實

である。従つて各動物血清中にある含量を異にする未知の蛋白であることが推察されて來る。然し反應沈澱物をアルカリで分離しても既に變性し無効のものとなるらしい。

次に抑制物質が牛乳中の Casein micelles に對し如何なる變性をなすものか又 Rennin に直接作用するかに就て實驗を試みた。

第 9 表 酸、アルコールに依る乳蛋白凝固に對する馬血清の抑制力

供試乳	牛乳 5 c.c. を凝固せしむるに要する N/10 HCl 量 c.c.	供試乳	牛乳 5 c.c. を凝固せしむるに要する 99% 酒精量 c.c.
正常牛乳	0.72	正常牛乳	1.9
血清 0.1 c.c. 添加牛乳	0.80	血清 0.2 c.c. 添加牛乳	2.2
正常牛乳	0.76	正常牛乳	1.95
血清 0.1 c.c. 添加牛乳	0.86	血清 0.2 c.c. 添加牛乳	2.25

第 10 表 枸橼酸ソーダ添加馬血清のレンニン凝固抑制力

供試料	血清添加量 c.c.		
	0	0.02	0.04
正 常 血 清	70	85	98
10% Cit. 溶 液	71	78	86
Cit. 血清等量混合液	71	—	92

上表の如く石灰を分離して沈澱するカゼインの凝固には血清は抑制的に作用せず石灰を結合して沈澱する酒精凝固には抑制的に行動する。又遊離の石灰を減少せしめ Rennin coagulation を抑制する枸橼酸は血清と何等拮抗的に作用せず兩者の抑制力の和となつて作用する。

3. 考察論議

各種の動物によつて又個體によつて差異のあるその血清の牛乳のレンニン凝固抑制作用は蛋白變性劑及加熱等物理的處理で大體比例的に作用を失う事、及抑制物質は抗體を產生し得る抗原たり得る事等から蛋白質類似物と考えられる。而して血清内の既知のグロブリンではなく且アルブミンでもないと考えられる事は動物又は個體及日によつて大差のある事とアルブミンを除去すれば無力となるが之等の精製物には全く抑制力の見られない事からの推察である。然し之も各種動物血清アルブミン間の差によるものであるという事の否定にはならない。何となれば硫酸によつてアルブミンはその膠狀を變性しているかも知れぬからである。然しこの抑制物がアルブミンに類似した蛋白であろう事は略推察し得る。

次に RÖDEN の稱する如く血清はレンニンに直接作用するものか牛乳中のカゼインに作用するかに對する考察である。

RÖDEN の推論はレンニンの酒精沈澱物は凝固力を有するが一度血清と混じたレンニンの酒精沈澱物は凝固力を有しないという事實に根據を有する。然しレンニンはその溶液中に混在する如何なる蛋白の沈澱によつてもその作用を激減するものであり酒精による血清蛋白の脱水沈澱で血液中の抑制物質が共に沈澱するという事に對する反證にはならない。

寧ろ血清中の抑制物質は牛乳中のカゼインミセルに對し直接作用するものとも考えられる。本實驗は血清中のレンニン凝固抑制物質に就ての概括的探究であつて今後その本態と行爲に關し更に研究を進めた時更に判然とし惹いては牛乳中のカゼインミセルの膠狀性に對しても何等かの曙光を與えるものと思われる。

本實驗實施に當り種々の御援助と御助言を與えられた傳研長野教授、北大家畜衛生學教官平戸教授及北大細菌教室植竹氏に對し深謝の意を表する。(昭 23.4.18.受付)

文 献

- (1) RÖDEN (1887): Jahres Bericht die Fortschritts der Tcerchemie 17, 160 (1887)
- (2) 前 野 (1943): レンネットの抽出並保存 日本畜産學會報第 15 卷第 4 號

Résumé

We have experimented on the repressive action of blood serums for rennin coagulation of cow's milk.

1. Repressive power is the largest in pig and horse, human and cow is very weak, Rabbit have no this power.

2. Horse-serums power are different from the time and individual bodies.

3. Acid salts and heavy metals repress, on the contrary $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, sodium salts and phosphorus salts keep down on rennin coagulation.

4. Blood-serum globulin have no this power.

5. Dialysed blood-albumin, ammonium sulphate ppt. acts not entirely.

6. Heating serum 80°C vanish this action.

7. Ultra-filtration, freezing, ultra-sound-wave exposure, drying in room temperature or drying, in low temperature Boric acid and succharose addition for blood-serum have no influence on this power.

8. Formaldehyde alcohol phenol and sublimate addition vanish this power.

9. This repressive substance in horse's blood serum become antigen which is able to produce antibodies in blood of rabbit.

10. From above experiments we can consider that this substance is protein and perhaps unknown albumin-like protein.

講演要旨

無角和種の能力について 石原盛衛・大川忠男 (畜試中國支場) 山内美氣男・吉田武紀

無角和種改良の基礎資料を得んとして先ず本種の能力について調査して、黒毛和種のそれと比較した。

イ、早熟性。舍飼いで育成された場合には無角和種は生後 18 カ月迄に黒毛和種よりも 3,4 カ月早熟である。併し放牧に對する抵抗力が弱い爲に、放牧して育成した場合には成熟率が 90% に達する迄の月齡に於いて黒毛和種よりも 1~2 カ月早い程度であり、又幼若な時期に放牧と運動とを強く課すると、無角和種の方が却つて黒毛和種よりも發育が悪い。即ち無角和種は黒毛和種よりも早熟であるが、それには舍飼的飼養法が前提をなす。

ロ、蕃殖能力。牝牛に於ける初産の月齡と連産性、牡牛に於ける蕃殖供用開始月齡、廢用月齡及び蕃殖供用期間は無角和種と普通の黒毛和種との間に差が認められない。

ハ、泌乳能力。農家に於ける無角和種の泌乳量は 180 日間の推算 1 日平均 4.40 疋、1 日最高泌乳量記録は 13.5 疋 (犢哺乳による成績)であつて、黒毛和種中最右翼のものに匹敵して一般黒毛和種よりも高く、その乳質は全く黒毛和種に於けると同様である。

ニ、役用能力。農用索引能力檢定の結果、黒毛和種は 66.7~84.6% の合格率を示したに反して、無角和種は僅かに 16.7% の合格に過ぎないが、索引抵抗を所定の抵抗量よりも低く (50 疋) として索引せしめると總べて合格するのであつて、無角和種は黒毛和種よりも索引力は劣るが重粘土質ならざる地帯での農耕には充分使役し得る。又その性質に於いては憶病なものは無角和種に多く、性質良好なものは黒毛和種に多く、跛癖のものは兩種同率であつた。

(昭 23. 4. 18.)