ON SEROREACTION OF LEPROSY WITH CARDIOLIPIN-KEPHALIN ANTIGEN (PART 2)

AMINO ACID COMPONENTS OF SERUM PROTEIN IN LEPROSY

HAJIME HONDA, KAZUMASA YOSHINO and SHIGEAKI KUWANO

Department of Dermatology, Osaka University Medical School (Chief: Prof. TANIMURA)

The result of our recent work that the antigen of cardiolipin-cholesterin-kephalin, especially Ethanol amine, Phosphatidyl serin and Phosphainositide raised the spcificity to leprosy serum enables us to conclude that the antigen-antibody-reaction should be combination of serine OH radical of polypeptid-chain in serum antibody and carboxyl radical of kephalin fraction. The antigen of sphingomyelin produced positive results in 40% of lepra nervosa.

Cardiolipin-Kephalin 抗原による 癩血清反応について (第2)

(附) 癩血清蛋白のアミノ酸組成 (ペーパークロマトグラフ法)

大阪大学医学部皮膚科泌尿器科教室 (主任 谷村教授)

本	多	一
吉	野	一
桑	野	重
		昭

は し が き

余等の行い来た Cardiolipin-Kephalin 抗原では Kephalin 単独では抗原性は全くなく、これに Cardiolipin および Cholesterin を加えることによつて結節、斑紋癩血清に対して特異性を獲得したが、これを Kephalin 分割面よりみれば Ethanol amine 以外の Phosphatidyl-serine 並に Phosphainositide においても認められる。然るに兩抗原に常に強弱の差こそあれ、抗補体作用により抗原としての価値を甚だしく低下しているので、この欠点を取除くためには Kephalin 分割より、それぞれ抗原性をもつものに種々の比率配合を行いその鋭敏度において比較検討の場合、Ethanolamine 単独抗原よりはむしろ抗原性のあることが明らかとなつた。余等はまた本実験とは別に血清蛋白のアミノ酸組成を検討するため、ペーパークロマトグラフの二次元法を

試み、これを長期間に渉り観察の結果、健康者、梅毒患者兩者において何ら差異を認めないが、結節癩では Glycine, Serine の発色量の増加を見た。茲において余等の本抗原抗体に関する反応構想が Haurowitz 説によつて説明せられ、本説に対する実験的裏付ともなれば、余等は本説を肯定すると共に一層興味あるものと考えに至つた。

他方神経癩では、その実験的成果は余り芳しからざる状態に陥つたが、最近従来用いられておつたモノアミノモノ磷脂質 (Kephalin) に2種の塩基をもつジアミノモノ磷脂質即ちスフィンゴミエリンを種々の組合せにより Cardiolipin, Cholesterin に配合して行つた結果、従来よりは稍々高率 (40%) なる成果を挙げ得た。但しその実験例数はなお僅少で未だ決定的結論を得るまでには至っていない。以下実験方法並びに実験成績を述べることにする。

第1章 Kephalin 分割抗原による諸実験

イ) 1% Ethanol amine 1% Phosphatidyl serine または 1% Diphosphainositide の各エーテル溶液中の Phosphatidyl serine と Ethanol amine との割合に就て抗補体作用阻止限界を求め、この限界度の抗原比を最適比とみなし、Ethanol amine 単独抗原と比較実験を行った。

ロ) Diphosphainositide および Ethanol amine においても前試験同様、抗補体作用の阻止限界を求め、Inositide 単独抗原並に Ethanol amine 単独抗原との比較試験により抗原性の増減を検討した。

ハ) 一定の 0.2% Cardiolipin, 1% Cholesterin, 1% Ethanol amine に抗補体阻止限界の Phosphatidyl serine および Phosphainositide の最適量を求め、これが混合後の抗原促進状態を検討した。

実験成績

イ) 上記実験成績は Ethanol amine 単独のものより Phosphatidyl serine は微量即ち 0.01cc 混合抗原において補体結合反応を結節凝混合血清に就て行つた場合、抗原性が稍々増強する点を実験證明し得た。(第1表)

ロ) Diphosphainositide および Ethanol amine に就ても同様 Ethanol amine, Diphosphainositide の各単独抗原よりも Diphosphainositide の 0.1cc を含む混合抗原において、前試験成績同様抗原性の増強を実證出来た。(第2表)

ハ) 5種の組成による混合抗原 1cc の40倍抗原を以て前試験使用の混合結節凝血清に就て、補体結合反応を行つた場合、前記諸実験より更に抗原性ある反応を得た。(第3表)

以上の各実験により 0.2% Cardiolipin 0.1cc, 1% Cholesterin 0.3cc, 1% Diphosphainositide 0.1cc, 1% Ethanol amine 0.29cc, 1% Phosphatidyl serine 0.01cc を含む混合抗原において最高の抗原性をかち得た点は Inositide, Serine の存在が如何に意義あるかが伺われる。これは兩者の構造式中の OH 基の添加による抗原性の増強と考えるに至つた。

第2章 癩血清蛋白のアミノ酸濾紙分配クロマトグラフィー

イ) 二次元法術式

先ず資料の癩血清並びに対照実験として梅毒、健康血清の各々を茄子型コルベンに 1.0cc 宛採り、20% HCl 15

cc を加え還流冷却器を附し 7~9 時間直火により (110°~120°C) 加熱加水分解する。これを冷却後、重湯煎上において 1.0cc に濃縮し試料とする。

次に第一次溶媒は局方石炭酸を 180°~181°C で蒸溜し、その重量の 4 に当る蒸留水を混じ、これに全量の 4~5% に当るアンモニアを添加し 80% Phenol として用いる。

第二次溶媒は市販の Lutidine, Collidine を精製して使用する。前者は b.p. 155°~157°C, 後者は 171°~173°C の溜分を取り、展開に当つては 10% Aniline 含有の Lutidine, 10% Diethylamine 含有の Collidine および Lutidine, Collidine 同量混合物に何れも水を 5 倍飽和または全飽和して使用する。特に余等は Leucine より分離不明な Phenylalanine が Diethylamine の添加により良好なる分離を認めたので、各溶媒に 1~10% の割合に Diethylamine を添加せるものを用いた。

ロ) ペーパーは東洋濾紙 No. 131 (40×40) を用い、試料 0.005cc をつけ、二次元法は上記溶媒にて展開したる後、風乾し、0.2% ニンヒドリン、ブチールアルコール溶液を霧吹きで吹きかけて加温乾燥せしめると、各アミノ酸が赤紫色の斑点となつて現われる。これを試料点から斑点の中心までの距離を標準として Rf を求めた。

ハ) 今回使用した各型癩血清並びに健康血清、梅毒血清の游離アミノ酸の有無に関しては試料の量からみて全く杞憂に過ぎぬことが予備実験により判明した。

実験成績

アミノ酸分布に就て健康者患者血清間の差異を比較検討した。但しアミノ酸個々の相違は発色濃度、面積等による定性試験的なもので、試験成績は対照に用いた健康者血清並に梅毒患者血清は何ら相違は認められず、結節癩血清において Glycine, Serine に相違あるを見た。

以上の実験成績より Kephalin 分層中の Phosphatidyl serine のカルボキシル基と血清抗体中のポリペプチド鎖中の Serine 水酸基との間に Haurowitz 説に

抗原抗体特異的結合基構造模型圖

よる双極子間の結合を推定される点に甚だ興味があると思われる。

第3章 神経癩に対する Sphingomyelin 抗原

余等は永年に渉り Kephalin, Cardiolipin, Cholesterin 等を用い、結節癩、斑紋癩血清に就て研究を続け、相当の成果を得たものと思われるが、神経癩に対しては甚だ残念ながら抗原性ある抗原は未だ得るに至つておらない。然るに最近実験に用いた2種の塩基を持つジアミノモノ磷脂質即ち Sphingomyelin に Cardiolipin, Cholesterin, Kephalin (熊本) を組入れた混合抗原を以て神経癩血清反応を行つたところ少々高率な陽性率を得た。

1) 材料及び予備実験

牛腦より抽出せる Sphingomyelin (日新) の1%クロ、ホルム加抗原を0.4cc, 1% Kephalin (熊本) 0.7cc, 1% Cholesterin 0.3cc, 0.2% Cardiolipin 0.1cc の混合抗原1cc を40倍に稀釋したものを直ちに使用した。これ等の比に関してはこれまでいくつかの予備試験に用いた血清並に抗原に就ては抗補体作用のないものを選んだ。(第5表)

2) 実験成績

今回は大島青松園入院患者15例中結節癩7例、斑紋癩3例、神経癩5例に就て在来抗原と比較検討した処、本抗原にては結節43%, 神経40%, 在来抗原では結節43% 神経27%の陽性率を示した。(第6表)

Sphingomyelin 構造式

以上の成績から本抗原に Sphingomyelin を組入ることによつて神経癩において少なくとも、特異性を増すものと思われる。これに就ては抗原の比率の決定をあらゆる角度から追求し、てみたいと思う。

総 括

Cardiolipin 組成に Kephalin を組入ることが如何に癩疾患に対する血清診断上価値あるかを考慮しておつたが、実験の結果結節癩、斑紋癩には少々高率に反応す

るが神経癩では甚だ低率のため、診断的価値は少なく失望せざるを得ぬ状態であつた。Sphingomyelin の組入れによつて少々希望を抱くようになった。しかし近時行われている血球凝集反応に本抗原を用いた場合を考えれば更に今後の研究に期待する処が大きい。

次に結節癩血清蛋白のアミノ酸組成に就て特に Glycine, Serine の有り方および抗原中の Kephalin 分割内の Diphosphatidyl serine 並に OH との兩者関係が余等の実験により Haurowitz 説の反證をなし得たと思われるに至つた。これによつて本研究の理論的裏付を行うことが出来れば癩抗原抗体反応学説に対する一進歩と云わなければならない。

結 論

1) Kephalin, Cardiolipin, Cholesterin 組成に Sphingomyelin を組入れることによつて神経癩に対する補体結合反応が40%の陽性率を示した。

2) 抗原 Kephalin 分割より Diphosphatidyl serine のカルボキシル基 (COOH) の OH とアミノ酸分布による Serine, Glycine のポリペプチド鎖の OH による結合證明の外 Phosphatidyl の量的関係による抗原性の増強においても OH 結合ならんと思うに至る。

(終りに臨み本研究に資材提供下さいました大島青松園大島、高橋医官並に日新化学の松井学士に感謝す)

参 考 文 献

- 1) D.L.Clegg : Anal. Chem. 22 (1950) 48
- 2) P.A.Levine : J. Biol. Chem. 15(1913), 153; 18 (1914)453; 24, (1916), 69
- 3) G.Agnen dT. Nilsson : Acta chemica Scandinavica 3 (1949) 525
- 4) 江上, 八木 : 免疫化学
- 5) 佐竹一夫 : 化学領域 3 (1949) 246
- 6) 佐竹一夫 : 有機化学の進歩 8 (1949) 363
- 7) 本多, 吉野 : レブラ誌第21巻第4号128頁
- 8) 黒屋政彦 : 最新医学誌第7巻第4号26頁
- 9) F. Haurowitz : Chemistrig and Biologg of Proteins (1950)

(第1表) Kephalin 抗原

結節癩混合血清稀釈

対 照 試 験

0.2%C.L. : 1%Ch ^{1%} : Phosphatidyl Serine ^{1%} : Ethanol amine ^{1%}	原	2×	4×	8×	16×	32×	血清 対照	抗原 対照	梅毒反応 陽性血清	健康血清 対照
0.1 : 0.3 : — : 0.3	O	O	d	jc	jc	C	C	C	C	C
〃 : 〃 : 0.01 : 0.29	O	O	tr	jc	jc	C	C	C	C	C
〃 : 〃 : 0.02 : 0.28	O	O	tr	jc	jc	jc	C	jc		
〃 : 〃 : 0.03 : 0.27	O	O	tr	jc	jc	jc	C	jc		
〃 : 〃 : 0.05 : 0.25	O	O	tr	jc	jc	jc	C	jc		
〃 : 〃 : 0.1 : 0.2	O	O	tr	jc	jc	jc	C	ac		
〃 : 〃 : 0.15 : 0.15	O	O	tr	jc	jc	jc	C	ac		
〃 : 〃 : 0.2 : 0.1	O	O	tr	jc	jc	jc	C	ac		
〃 : 〃 : 0.25 : 0.05	O	O	tr	jc	jc	jc	C	ac		
〃 : 〃 : 0.28 : 0.02	O	O	ftr	m	ac	jc	C	ac		

(第2表)

抗 原 組 成

結節癩混合血清稀釈

0.2% Cardiolipin : 1% Cholesterin ^{1%} : Diphospha ^{1%} : Ethanol ^{1%} inositide ^{1%} : amine ^{1%}	原	2×	4×	8×	16×	32×	64×	血清 対照	抗原 対照
0.1 : 0.3 : 0.1 : 0.2	O	O	ftr	m	ac	jc	jc	C	C
〃 : 〃 : 0.15 : 0.15	O	O	ftr	m	ac	jc	jc	C	jc
〃 : 〃 : 0.2 : 0.1	O	O	ftr	m	vm	ac	ac	C	ac
〃 : 〃 : 0.3 : —	ftr	d	m	jc	C	C	C	C	C
〃 : 〃 : — : 0.3	O	O	d	jc	jc	C	C	C	C

(第3表)

0.2%C.L. : 1%Ch ^{1%} : Diphospha ^{1%} : Ethanol ^{1%} : Phosphatidyl inositide ^{1%} : amine ^{1%} : Serine ^{1%}	原	2×	4×	8×	16×	32×	64×	血清 対照	抗原 対照
0.1 : 0.3 : 0.1 : 0.29 : 0.01	O	O	O	O	d	jc	jc	C	C-jc

(第4表) 血清蛋白アミノ酸組成及濃度

	健康血清					梅毒血清(卅)			癩血清(結斑神)				
Cystine	+	+	±	±	±	+	+	+	t ±	t +	M ±	M +	N ±
Asparatic acid	卅(+)	卅	±	±	±	+	+	+	±	+	±	+	±
Glutanic acid	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	卅	卅
◎Glycine	±	+	卅	卅	±	卅	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅
◎Serine	+	卅	+	卅	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+
Threonine	+	+	+	+	±	+	卅	+	+	+	+	卅	+
Alanine	卅(卅)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Valine	卅(+)	卅	卅	卅	+	卅	+	+	+	+	±	+	卅
Histidine	±	±	/	+	/	/	/	卅	/	卅	/	卅	/
Lysine	±	±	卅	+	±	+	+	+	/	+	±	/	±
				Hyd.		Hyd.		Hyd.		Hyd.	Hyd.		
Methionine	/	/	±	±	±	+	卅	+	+	+	卅	卅	±
Arginine	±	±	/	+	±	+	+	+	/	±	/	/	±
Proline	/	+	/	/	±	+	+	+	±	/	±	/	±
Leucine	卅(卅)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	/	卅	卅	卅
Tsoleucine	卅(卅)	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	/	卅	卅	卅
Phenylalanine	±	±	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	/	卅	卅	卅
Tyrosine	±	±	/	+	+	/	+	+	/	+	+	+	/

(第5表) 抗原組成

1% Sphingomyelin	1 % Cholestesin	0.2% Cardiolipin	熊 本 1 % Kephalin
0.3	0.3	0.1	0.8
0.4	0.3	0.1	0.7
0.5	0.3	0.1	0.6

(第6表) 青松園入院患者血清反應比較

病 型	Sphingomyelin 加抗原検査数	陽性数	陽 性 率	在来抗原 検査数	陽性数	陽 性 率	備 考
T	7	4	57%	7	3	43%	(Sphingoimyeelin 抗原) 1 % Sphingomyelin 0.4
M	3	0	0%	3	0	0%	0.2% Cardiolipin 0.1
N	5	2	40%	5	1	20%	1 % Cholestorin 0.3
各 型	15	6	40%	15	4	27%	1 % Kephalin 0.7