SERUM PROTEIN FRACTIONS OF MICE INFECTED WITH MURINE LEPROSY

Kiyo SUSHIDA

(Tokyo Women's Medical College)

Mice were inoculated with murine leprosy bacilli (Hawaiian strain) and the protein, lipoprotein and polysaccharide fractions of the serum studied by paper electrophoresis. The following results were obtained.

1) Serum protein fraction: From about the 16th week after infection, β -globulin increased and albumin decreased. When divided into the leproma group and the ulcer formation group this finding was more marked in the latter. In the group in which leproma could not be observed macroscopically, that is, the "spontaneous cure" group, the values were close to normal. From about 10 months after infection, an increase in α -globulin was found and there was a marked increase in the ulcer group at 12.5 months.

2) Serum lipoprotein fraction: A marked increase in α -lipoprotein was found in both liproma and ulcer groups but the pattern differed slightly between the two. This finding is present 10 months after infection.

3) Serum protein-bound polysaccharide fraction: A marked increase in α -polysaccharide was found after 7 months in the ulcer group but there was no marked increase in the leproma group.

鼠癩感染マウスの血清蛋白分割について

須 子 田 キ ヨ

東京女子医科大学細菌学教室 (主任 平野憲正教授)

(1958 年 7 月 28 日 受稿)

先に須子田は鼠癩マウスの治療実験¹⁾及び鼠癩死菌ワクチンによる発症阻止実験²⁾の際のこれら被検動物の血清蛋白分割について報告した。これらの実験の結果、対照として用いられた無処置の鼠癩マウスの血清蛋白像は感染後の時期によつて、又接種部の症状によつて差異のあることが認められたので、本実験においては、鼠癩菌をマウスに接種し、逐日的に又他方には感染後、同一時期において、症状の異なるものを大別して、それぞれの血清蛋白分割を行い、又同一血清については、糖質及び脂質の各分割を濾紙電気泳動法によつて検討し、鼠癩マウスの血清蛋白分割の基礎的実験を行った。

実 験 方 法

体重20 g 前後のdd系マウスに、鼠癩マウス(ハワイ株)結節の100倍乳剤を0.2 ccずつ、右胸部皮下に接種し、初期には3~5週目毎に後には2~3ヵ月毎に、12.5ヵ月の間、心臓穿刺によつて採血して実験に用いた。感染後16週目までは感染群はすべて結節を有し、潰瘍は未だ形成されていなかった。これらの内より結節の大きさのほぼ相等しいものを集めて一つ一つの群とした。その内第10週目の感染群は大凡、小豆大の結節を有し、第16週目のものは大豆大以上、母指頭大に及ぶものであつた。

第20週目の感染群には小潰瘍を形成するものが認められたので、これらは別に一群として潰瘍群とした。第25週以後に於ては潰瘍の大きさも次第に増大したので、ほぼ同じ程度のものを集めて一群とした。第10カ月目にこれら感染群の中に、殆ど結節を触診し得ないマウスが4匹存在したので、これらは一応“自然治癒”群として扱った。対照としては年令の差異による血清蛋白分割の変動をさけるため²²⁾同時購入の未接種の健康マウスの血清が用いられた。各群の血清はいずれも採血後直ちに分離され、前回までの実験と同様に、泳動直前に、同一群数匹のマウスの0.1 cc ずつの血清が混合されて用いられた。

血清蛋白分割のための濾紙電気泳動法は、前回までと同様であつたので省略する。

血清蛋白結合糖質の泳動法としては、第10カ月目までのものは、濾紙巾2 cmに0.01 cc ずつの血清を塗布したが、12.5カ月目のものでは、分割像をより明瞭にする目的で、0.03 cc ずつを塗布した。その他の泳動条件は前と同様であつて、呈色法としてはすべて Schiff の試薬を用いた。

血清蛋白結合脂質の分割の為には、第10カ月目までは濾紙巾2 cmに0.02~0.025cc ずつの血清を塗布し、Sudan 黒の60%エタノール飽和液の2倍稀釈液で3時間染色を行い、水洗には、初めの1~2回は50%エタノールで、後に流水で数時間洗った。又餌付は120°Cの高温で行つたが、いずれも分割が不明瞭であつた。それ故12.5カ月目のものでは、血清の量は0.04 cc/2 cm、染色液の濃度も稀釈せず飽和液のままを用いた。又水洗も、アルコールによる脂質の溶出を防ぐため流水のみとし、更に餌付けも高温をさせて、パラフィンの温度を90°Cとして濾紙標本を作製した。

なお、鼠癩感染マウスと健康マウスとの血清蛋白分割値の差異がこれら両群の血清蛋白の総蛋白量、及び血清の溶血の程度の差異によつて影響を受けることがあるかも知れないと考え、総蛋白量は蛋白屈折計により、溶血の程度の差異は肉眼的に計測して参考とした。

実 験 成 績

鼠癩菌をマウスに接種した後、3、6、10、16、20、25週と、7.5カ月、10カ月、12.5カ月目に採血し、これらの分離血清について濾紙電気泳動法を行つた。その結果次のような成績を得た。

血清蛋白分割の成績：

表及び図 I-1₃ に示すように、鼠癩マウスにおいては、感染後、16週目頃より、Albuminは減少し、ほぼ同時期

Table Electrophoretic distribution of serum protein of leprous mice

Weeks months	Number of animal	Serum Protein fraction (%)					Total protein	hemolyses
		Al	α 1	α 2	β	γ		
3 W normal	7	46.2	8.5	8.6	19.5	20.5		
	7	41.0	9.3	10.3	18.6	20.0		
6 W normal	6	50.0	9.5	8.2	17.2	16.3	5.8—6.8	±
	5	49.0	8.1	8.5	16.5	16.9	5.2—5.8	±
10W normal	6	53.0	8.3	7.5	18.4	12.8	5.4—6.0	±
	8	52.0	8.7	7.8	17.0	14.2	5.8—6.8	±
16W normal	8	47.2	7.4	7.0	24.1	17.1	6.8	±
	8	53.0	7.1	6.7	18.8	14.2	6.8	±
20W T U normal	4	51.0	10.7	7.8	17.0	9.3	6.5	—
	4	51.0	11.0	7.7	21.5	8.6	6.2	±
	4	51.5	10.5	7.9	18.5	12.1	6.5	±
25W T U normal	7	41.1	6.1	5.9	20.0	20.9		
	3	39.0	8.0	8.7	26.2	18.0		
	3	52.0	11.3	5.0	14.4	15.3		
7.5m T U normal	5	40.5	9.1	7.4	24.8	18.0	6.8	±
	8	34.5	8.3	9.9	27.8	19.3	6.8	±
	6	47.7	8.9	7.8	17.9	17.9	7.0	±
10m T U sp. cure. normal	7	37.2	8.3	10.8	23.3	20.7	6.5	+
	4	35.5	10.2	7.7	30.0	16.7	6.5	±
	4	42.5	7.2	7.2	18.9	24.0	6.5	+
	8	46.0	5.3	5.6	20.0	23.0	7.0	±
12.5m T U normal	1	32.0	7.8	10.0	21.5	27.5		±
	1	25.2	6.5	16.6	26.2	26.3		±
	2	38.0	9.7	8.7	21.3	22.0		+

より、 β -globulin の増加が認められた。第20週以後結節群と潰瘍群に分けて観察したものでは、潰瘍群の方に、常により著明に β -globuli の増加が認められた。 α_1 -、及び α_2 -globulin の増加は、感染後、約10カ月以後に、結節群及び潰瘍群の双方に認められた。12.5カ月目の潰瘍群においては、 α_2 -globulin の増加が特に著明であつた。 γ -globulin においては感染後、時期を異にしても、また症状別に観察しても著明な変化は証明されなかつた。

鼠癩マウスの血清の総蛋白量は、感染後、7カ月半以後においては正常マウスのそれに比べてやや低下するようであるが、この範囲の差異では有意とは思われない。
(表)

Fig. I-1 Electrophoretic change of serum albumin in mice after infection

Fig I-2

Fig. I-3

また本実験においては高度の溶血を示したものをすべて除外したので、表に示すような軽い溶血の程度の範囲では、血清分割、特に β -globulin の変化に何ら影響を及ぼしてはいない。

また12.5カ月目の被検動物数は、感染群では夫々1匹ずつであつた。小動物の血清蛋白分割は個人差が甚しいという報告³⁾もあるが、感染後10カ月までの被検動物数はすべて3~8匹でそれ等のマウスの血清をpoolしたものが濾紙泳動に用いられ、その分割成績と、感染後12.5カ月目のマウス血清のそれとを比較すると、各分割の変化はほぼ同様の傾向を示し、 α -globulin 及び β -globulin の増加は10カ月目より引続き認められた。(図Ⅱ 1-2)

感染後10カ月目に実験された“自然治癒”群には肉眼的には癰結節は認められなかつたが、皮下組織、筋肉等の塗抹染色には少数ではあつたが、定型的な globi を含む癰菌が認められた。これらの血清蛋白分割像は健康マウスのそれとほぼ近い値を示した。

血清蛋白結合脂質分割の成績：

図Ⅲは感染後10カ月目及び12.5カ月の脂質の分割像であつて、その内、後者のものについてみると、結節群に

Fig II-1 Paper-electrophoretic patterns of serum proteins of leprous mice
(12.5 months after infection)

Fig II-2 Paper-electrophoretic patterns of serum proteins of leprous mice
(10 months after infection)

Fig III Paper-electrophoretic patterns of serum lipoprotein of leprous mice

においても、潰瘍群においても、共に α -globulin の著明な増加が認められる。しかし両群の山の高まりはやや異なり、結節群においてはやや低く、広がりを持ち、 β -globulin 側が高くなっているが、潰瘍群では高まりは鋭く Albumin 側に片寄っている。但し両者の α -lipoprotein の計測値はほぼ等しく、大凡32.5%であつた。これに反して、健康マウスのそれは（図Ⅲ左上）17.9%であつたから、鼠類マウスにおける α -lipoprotein の増加は著明であると思う。しかしながらこの脂質の変化の出現する時期については、前に述べた如く、血清の量が少量であつたこと、及びその他の理由で鮮明な分割像を得ることが出来ず、図Ⅲ右側に示したように感染後10カ月目のものでは潰瘍群においては、 α -lipoprotein の高まりを認めることが出来るが平坦な広がりを示した結節群では、全く不明瞭であつた。しかしながら少なくとも10カ月頃には脂質の増加は出現するものと考えられる。

血清蛋白結合糖質分割の成績：

図Ⅳは感染後10カ月目及び12.5カ月目の泳動図であつて、結節群における血清蛋白結合糖質は健康マウスのそれに比べて殆ど変化を示さなかつたが、潰瘍群においては、 α -polysaccharide の増加が著明であつて、かかる増

Fig IV Paper-electrophoretic patterns of serum polysaccharide of leprous mice

加の傾向は7カ月頃より明らかに出現しているのが認められた。

考 案

本研究においては、鼠癩菌（ハワイ株）をマウスに接種し、これらの鼠癩マウスの血清蛋白、脂質、糖質について感染後の日数の差異による変化及び症状による差異を観察した。

人の結節癩においては、 α -globulin の増加が著明に認められる事が多くの学者によつて報告されている。（石原⁴⁻⁷）、坂口⁸）、河野⁹）、難波¹⁰）、高橋¹¹）、福代¹²）、真山¹³）、及び Seibert¹⁴）これらの報告によると、重症例程、著明に増加し、また β -globulin の増加（坂口、難波、谷奥、河野）するものもあるという。

しかしながら鼠癩についての報告は少なく、鼠癩感染ラットについて重松¹⁵、西村¹⁶、の報告があるが、いずれも著変を認めていない。西村¹⁷は更にこれに関連して鼠癩では血清反応も陰性であると述べている。鼠癩マウスについての血清蛋白分割の実験は、先に著者等が報告した如く¹¹、鼠癩感染マウスにおいては β -globulin の増加が著明で、これらのマウスは比較的早期に化学療法を開始して治癒せしめると、殆ど正常マウスの値にもどるけれども、重症例においては化学療法によつて、軽快せしめ得たものでも、これらの血清蛋白分割値についてみると、 β -globulin は正常マウスのそれよりは高いが、未治療の鼠癩マウスのよれより減少を示し、他方 γ -globulin が僅かながら上昇する傾向を示していた。

また加熱、オリーブ油、或いは流動パラフィンによつて鼠癩菌の死菌ワクチンを作つて、マウスに接種して疫疫し、これに感染試験を行つた場合に、最も発症阻止の顕著であつたもの程、 α -、及び β -globulin の増加することが認められた²¹。

本実験においては鼠癩マウスについての基礎的研究として、血清蛋白分割を行うと共に、之ら複合蛋白分割の変化に影響を与えと考えられる血清蛋白結合脂質及び糖質の分割を試みたが、上に述べた実験成績から、鼠癩マウスは、鼠癩感染ラット及び人癩とは異つた血清蛋白像を示すことが明らかとなつた。

結核症の場合の血清蛋白分割についての報告を参考とすると、本症においては、 γ -globulin が増加するという報告が多く（五味¹⁸、金山¹⁹、乾²⁰、Kautzsch²¹、Sher²²及び Seibert²³）、 β -globulin の増加は、臨床的には Kautzsch によると、合併症を伴うような場合に認められるという。又実験的には Seibert はウサギの結核症で、Sher はモルモットにおいてこれを認めている。 α -globulin は Shaw²⁴）によると結核その他の悪性疾患において増加す

るといふ。Kautzsch は進行性結核に特に増加すると述べている。

以上のように癩或いは結核のような慢性疾患においては γ -globulin の増加が著明であつて（Sunderman²⁵）、 β -globulin、或いは α -globulin は一般に悪性のものに増加するようである。

本実験の結果によると、鼠癩マウスにおいては、感染後、比較的早い時期より、 β -globulin の増加が出現し、潰瘍を形成するものでは、より一層その変化が著明であつた。 α -globulin は時期的にはこれより遙かに遅れて、感染後約10カ月より増加を示し潰瘍群の方が著明に変化した。

之ら α -、及び β -globulin の増加の一因として、 β -globulin は lipoprotein の（荒木²⁶）、藤田²⁷）、幾島²⁸）、及び LLoyd²⁹）、 α -globulin は polysaccharide の増加によるものである（荒木、藤田）と考えられている。

しかしながら、真山¹³）は人癩血清について β -globulin の高値は認められないにも拘らず、 β -結合脂質は増加し、また藤田は β -lipoprotein の増加を伴わぬ β -globulin の増加のある事（肝炎、シモンズ氏病）を認めている。

本実験においてもまた感染後、16週目頃から β -globulin の増加は認められたが、 β -lipoprotein の増加が認められず、むしろ α -lipoprotein の増加が認められた。結節群と潰瘍群における α -lipoprotein はほぼ相等しい値をもつて、双方共に増加を示したが、泳動距離は両者共にほぼ同じでありながら、前に述べたように山の型は異つていた。

Seibert³⁰）は α_2 -polysaccharide は結核その他進行性の疾患において増加を示すと述べ、Sher³¹）もまた実験的結核のモルモットにおいて、 α -globulin の Carbohydrate がやや増加するが、 γ -globulin の増加に拘らず、 γ -globulin の Carbohydrate は低下すると報告している。

本実験において、 α -globulin は潰瘍群においても、結節群においても共に増加し、 α -polysaccharide は潰瘍群において著明に増加し、結節群においてはあまり著明でなかつた。 α -polysaccharide の増加は組織の崩壊（荒木²⁵）、Seibert³⁰）によつて起ると考えられていることと一致するように思われる。従つて鼠癩マウスの血清蛋白分割における β -globulin の増加は lipoprotein の増加を伴わぬ “pure” protein のみの増加であると思われる。（図 II 右側）

人癩抗体においては β -globulin に特異抗体が含まれる（緒方³²⁻³³）と報告されているが、鼠癩マウスにおいては、 β -globulin が増加しても β -lipoprotein の増加

を伴わない。従つて結節のみを有するものより潰瘍を形成したものの方に β -globulin の著明な増加が認められ、またさきに報加したように、ワクチンによる感染防禦試験においては、Olive 油ワクチンの効果が最も優れていたが、この場合においても、 β -globulin が、他のワクチンを接種したものよりも高い値を示したので、これ等の場合における β -globulin の増加は、鼠癩抗体の増加のみとは思われない。

潰瘍群における α -globulin の増加は結節群のそれより著明であつたことは、 α -polysaccharide 及び α -lipoprotein の両者の増加の影響と考えられ、結節群における α -globulin の増加は、 α -polysaccharide の増加が、それ程著明でなかつたので、 α -lipoprotein の増加のみの影響と思われる。

結 論

マウスに鼠癩菌を感染せしめてから、一方には逐日的に他方には症状別に、これら鼠癩マウスの血清蛋白、脂質、糖質の分割を行つた。

その結果次のような成績を得た。

1) 血清蛋白分割においては感染後約 16 週目より β -globulin の増加が出現し、Albumin は減少を示した。結節群と潰瘍形成群とに分けて観察すると、後者の方がこれらの変化は著明であつた。又肉眼的には結節を認められなかつた“自然治癒”群はほぼ正常マウスのそれに近い値を示した。感染後約 10 カ月以後において、 α -globulin の増加が認められ、12.5 カ月目の潰瘍群においては、より著明な増加が証明された。

2) 血清蛋白結合脂質分割においては、結節群及び潰瘍群共、ほぼ同じ程度に、 α -lipoprotein の増加が著明に認められたが、Pattern には両者にやや相異があつた。これらの変化は感染後 10 カ月目にすでに出現した。

3) 血清蛋白結合糖質については、潰瘍群においては、大凡感染後 7 カ月頃より α -polysaccharide の著明な増加が認められたが結節群においてはあまり著明に増加しなかつた。

終りに、平野憲正教授の御指導御校閲を深謝し、併せて種々御教示下さつた東京医科歯科大学小林茂三郎助教授に謝意を表すると共に研究生落合章雄氏の御援助を感謝します。

文 献

1. 須子田キヨ：I N A H 及び誘導体で治療した鼠癩マウスの濾紙電気泳動法による血清蛋白分割について、レブラ, **26**, 249—254 (1957)
2. 須子田キヨ, 山田昇：鼠癩の免疫に関する実験的研究, II 鼠癩死菌ワクチンで免疫したマウスにおける感染防禦効果とその血清蛋白分割像との関係について、レブラ, **27**, 263—270 (1958)
3. 平井秀松：血漿蛋白分割法, 最新医学, **10**, 105—122 (1955)
4. 石原重徳：癩の血清蛋白質に関する研究 (第 1 報) レブラ, **19**, (7) 3—11 (1950)
5. 同上：同上 (第 2 報), レブラ, **19**, (7) 12—18 (1950)
6. 同上：同上 (第 3 報), レブラ, **19**, (6) 7—10 (1950)
7. 同上：癩の臨床検査 レブラ, **23**, 163—164 (1954)
8. 坂口 弘：癩患者血清白皆電気泳動図及び心電図について、レブラ, **20**, 60—61 (1951)
9. 河野通之, 他 2：癩性結節性紅斑の血清蛋白組成並びに白血球百分比について、レブラ, **21**, 98—102 (1952)
10. 難波政士, 他 1：癩の血清蛋白電気泳動分層像に関する研究, レブラ, **21**, 237—239 (1952)
11. 高橋竹代：癩患者の赤血球沉降反応に関する研究 (5) レブラ, **23**, 256—259 (1954)
12. 福代良一, 他 4：皮膚疾患と血清蛋白質, レブラ, **23**, 215—225 (1954)
13. 真山 旭：人類及び実験鼠癩における血清蛋白結合脂質について、レブラ, **26**, 160—165 (1957)
14. Seibert, B. F., et al: Electrophoresis of serum, Am. Rev. Tub, **47**, 66—77 (1943)
15. 重松 俊, 他 1：鼠癩の発症とその血清分割との関係, レブラ, **20**, 201—202 (1951)
16. 西村真二, 他 1：鼠癩の血清蛋白組成について、レブラ, **21**, 103—107 (1952)
17. 西村真二, 他 2：鼠癩における血清蛋白組成と血清反応の関連について、レブラ, **22**, 327—328 (1953)
18. 五味 二郎, 他：結核症と血漿蛋白質, 生物物理化学, **1**, 149—160 (1953)
19. 金山晴夫：肺結核と血清蛋白, 生物物理化学, **1**, 171—184 (1953)
20. 乾成美, 他 1：濾紙電気泳動法による肺結核の蛋白像について, 結核, **31**, (特別号) **30** (1956)
21. Kautzsch, E.: Filterpapierelektrophorese bei Lungentuberkulose, Münchner Med. Wochenschrift,

- 98, 186—189 (1956)
22. Sher, C. B., et al: Serum protein change in experimental tuberculosis. *Am. Rev. Tub.* **77**, 120—133 (1958)
23. Seibert F. B., al: Electrophoretic study of the blood protein response in tuberculosis.
J. Biol. Chem. **143**, 29 (1942)
24. Shaw B. D., et, al: an Electrophoretic study of serum and pleural fluid proteins in chest diseases,
J. clin. path., **9**, 251—254 (1956)
25. Sunderman W. F., et al: clinical application of the fractionation of the serum protein by paper electrophoresis, *Am. J. clin. path.*, **27**, 125—158, (1957)
26. 荒木 仁: 血清蛋白分層, 特に γ -gl. 分層に対する考察, *最新医学*, **10**, 148—159 (1955)
27. 藤田伝太郎, 他 3: 血清 proteino-lipidoglycogram について, *生物物理化学*, **3**, 163—166 (1956)
28. 幾島 明: 内科疾患の血漿蛋白質
最新医学, **10**, 189—201 (1955)
29. LLoyd A. G., et al: Electrophoretic partition of β -globulins in human sera by a non-ionic detergent,
J. clin. path., **9**, 248—250 (1956)
30. Seibert B. F., et al: Variation in protein and polysaccharide content of sera in the chronic diseases, Tuberculosis, sarcoidosis and carcinoma.
J. clin. Invest., **26**, 90—102 (1947)
31. Sher C. B., et al: Serum peoteiu-bound carbohydrates and lipids in experimental tuberculosis, *Proc. Soc. Exp. Biol and Med.*, **93**, 578—581 (1956)
32. 緒方富雄, 他: 瀾血清反応における抗体の諸性質,
レブラ, **23**, 221 (1954)
33. 緒方富雄, 他: 瀾血清の新しい血清学的反応 (第 4 報) *日新医学*, **43**, 207—217 (1956)