プロペルデインの分画的追求

日本製薬販売株式会社

柴 田 泰 生

STUDY ON THE FRACTIONATION OF PROPERDIN FROM HUMAN PLASMA.

by

Yasuo SHIBATA

(Nihon Seiyaku Hanbai Co. Ltd)

Abstract

There are several reports on the properties and the methods for separating and estimating properdin, and attempts have been made to obtain it in highest activity. However, the separation methods heretofor employed, such as zymosan absorption method and ethanol fractionation method, are small scale methods and the raw materials used have been limited to fresh sera or plasma of bovine and human blood, and large scale fractionation of properdin has not been reported up to date.

The author made an attempt to obtain properdin from the by-products in the commercial production of γ -globulin by methods 6 and 9 of Cohn, and made the assays of these fractions.

The method of assays used for this purpose follows the Pillemer's zymosan assay method and is almost the same as the Isliker's modified method.

As to the results of these assays, the author found that, in solubility, properdin was similar to prothrombin which was concentrated from PII+III, via PIII, to the SIII₂ in method 9, but properdin appearing in SIII₂ is only a small part, larger part going into PI of method 6.

By ammonium sulphate subfractionation from PI, properdin appears in the 1/4-1/3 saturated fractions only. This fraction has a titer of about 7 times that of fresh serum.

1953年 Pillemer らは、補体第3成分分離の途上、はからずもプロペルデイン系を発見した。補体各成分とマグネシウムイオンの存在下に、多くの細菌、ビールスを殺菌、中和する能力を持つこのプロペルデインは、個体の先天免疫の大きな因子として漸次注目を浴びて来た。そのザイモザンとの作用から推して、プロペルデインはある範囲の微生物に共通なあるいは類似の細胞膜ポリサッカライドと相互作用を持つものと考えられ、いわば非特異的抗体様物質としてその臨床効果も期待されている¹⁾。

プロペルデインが電気泳動的に β -ないし γ -グロブリンに相当する易動度を持ち、Deutsche の分画法で F-III に濃縮されるオイグロブリンであることは既に Pillemer の報告するところである。またプロペルデインの濃縮については、Pillemer および R.B. Pennell ら²⁾ はザイモザンによる吸着法により、牛および人血漿から高度の精製をおこなった。さらに F. Miya ら³⁾ は Cohn のエタノール分画法を使用し、血清より直ちに P-III 分離に相当する分画を得、中性緩衝液中での溶解性を利用して精製する方法を最近報告し、これまたよい結果を得ている。

これら精製法はいずれも新鮮な血漿あるいは血清からの小規模なものであるが、著者はプロペル

ディンの大量分画を企図し、人血漿からの γ -グロブリン分画過程の副産物である諸分画のプロベルディン含量を追求してみた。以下にその実験方法と結果を報告する。

実験材料

実験材料および方法はいずれも Pillemer のザイモーザンによる検査法⁴⁾ならびに Isliker の修正法⁵⁾に準ずる。

a. 血清 前日夕ないし当日朝 5 人以上の供血者より採血した人血液を自然凝固させ、その上清のプールする。

b. ザイモーザン 市販生イーストを 5 倍容の水に浮遊し、トリプシン 0.05%, pH 8.0 で 37°C 16 日間消化した残渣を水およびアルコールで充分洗って用いる。

c. 緩衝液 おのおの $10^{-4}M$ の濃度に Mg^{++} と Ca^{++} を加え、食塩によりイオン強度を 0.15 とした pH 7.4, $1/20M$ のバルビタール緩衝液を用いる。

d. 感作血球液 Alsever 液に保存した羊血球を使用直前生理食塩液で洗い、生理食塩液に 5% に浮遊し、それと等容の 4~8 単位ヘモリジン液に混ずる。

e. RP (プロベルディン欠如血清)
血清 10 容に対して、緩衝液に 100mg/ml の割に浮遊させたザイモーザン 1 容を混合し、 $17 \pm 1^{\circ}C$ に 1.5 時間ときどき攪拌しながら孵置し、のち遠心した上清。その時の沈渣が PZ (プロベルディン-ザイモーザン複合物) である。

「付」RP 検定
RP おのおの 10 容を 3 本とり、そのおのおのにそれぞれ 1 容の①緩衝液、②新たなザイモーザン浮游液、③ザイモーザンと等濃度の PZ 浮游液を混ぜ、37°C 1 時間ときどき攪拌孵置したのち遠心分離する。この各上清の通倍稀釈液にそれぞれ倍量の感作血球液を添加してさらに 37°C 1 時間孵置、のち 50% 溶血部位を肉眼的に判定して各検体の溶血価を検する。

この 50% 溶血呈色液は蒸留水で 3 倍に稀釈し蒸留水を対照として 550m μ のフィルターを用い光電比色計で比色した場合吸光度 0.2 を与える

表 1 RP 検定の 1 例

検 体	50% 溶血	
	稀釈倍数	補体単位
血 清	32×	160
① RP + 緩衝液	16×	80
② γ + ザイモーザン	16×	80
③ γ + PZ	0	0
③ + 非働化補体*	32×	160

* 新鮮モルモット血清 (補体単位 320) を非働化し、生理食塩液に 20 単位に懸濁させたもの

著者の調製使用する RP は普通表 1 のような結果を示し、RP には原血清の補体各成分が 50% 以上存在し、ザイモーザンとの 37°C 第 2 段処理ではもはやどの補体成分も減少せず、すなわち RP には既にプロベルディンはほぼ完全に除去されており、一方それら RP 中の補体のある成分は PZ との 37°C 処理で完全に消滅する。その補体成分は耐熱性すなわち第 3 あるいは第 4 成分であるという RP 系が確認できる。

また第 1 表第 3 欄の補体単位は、等容の 1% 感作血球液に混じた場合、その 50% 溶血をもたらし検体の稀釈倍数で表わされる。この場合第 3 成分以外の補体各成分を充分に含むことが確實ならば、その補体単位をもつて C'3 単位とみなす⁴⁾。著者の RP 検定では Pillemer と同様に検体の 5 倍の血球液を用いているので稀釈倍数をさらに 5 倍して補体単位を算出した。

f. 検体 イ) 低温エタノール法分画 人血漿低温低イオン強度エタノール分画法第 6 法および第 9 法⁶⁾ に従って製造分離した各過程産物分画の比較的新しいものを凍結乾燥し、検定時におおの蛋白濃度約 2% に生理食塩液に浮遊、pH 7 とする。

ロ) PI 細分画 上記エタノール法の分画 PI を 5% 蒸留水浮遊とし、37°C 飽和硫酸アンモニウム溶液を添加して、硫酸アンモニウム 25, 33, 40, 50% 各飽和の沈澱を順次に分離し、おのおの生理食塩液に浮遊、透析する。

実験方法および結果

検体のプロベルディン含量検定は Isliker の法に準じ、ザイモーザン存在下検体による RP 中 C'3 不活の大小によつて検する。

すなわち上記f.の検体を緩衝液で適倍希釈し、おのおのの希釈検体に等容のRPを加えた試験管別を各検体ごとに2列つくり、その一方にRPと等容の20mg/ml ザイモーザン浮遊を、他の1列には同容の緩衝液を加え、後者は対照として、それぞれ37℃ 1.5時間ときどき攪拌静置、のち直接各管にRPの倍量の感作血球液を加えて、さらに37℃静置1時間にて溶血の程度を検する。

判定は補体結合反応に準じ、溶血マイナスの場合は抗補体もしくはプロベルディンの存在を意味する。RP補体単位の判定と同じく溶血50%の管を終点とし、それより検体蛋白濃度1%当りの補体不活量を補体単位で以て表わす。

プロベルディン1単位は、ザイモーザン共在下等容のRPのC'3単位を120±30不活させる最小量とPillemerによつて定義されているので、それに従い、ザイモーザン共在列と対照列との補体不活程度の差からプロベルディン単位を算出する。

表2は検体イ)のプロベルディン追求量であり、参考のために図1に低温エタノール法分画過程を图示する。

表2 低温エタノール法分画のプロベルディン含量

蛋白濃度1%当り		不活C'3補体単位		プロベルディン単位
		ザイモーザン共在	対 照	
分	S II + III	<10	<10	0
	S II + III - W	<60	<60	0
	S III	3400	3400	0
	P I	1300	640	5.3
画	P II + III	130	30	0.8
	P II + III - W	250	60	1.5
	P III	360	40	2.6
	P III ₁	400	<200	1.7
	S III ₂	1050	250	6.8
	P III ₃	800	400	3.3
	対 照 血 清	120	<15	1.0

こゝに掲げた検定値は比較的新鮮な原料血漿から分離した新らしい分画のものであつて、この他に陳旧原料血漿から分離した各過程分画についていくつかの同様な検定を行つたが、陳旧分画では一般にプロベルディンの活性度は微弱であり、な

図1 低温エタノール法分画過程と各分画収率6)

() 内は血漿の蛋白量を 100とした収率

かには全然見られないものもあつた。
使用RPはプロベルディン検定と並行して同時に行つた補体価検定で表1に準ずる補体価をもつものであり、また対照として掲げた血清は著者より採血したものであつて、大体常に同じ値を示した。

なお図1に血漿総蛋白を100とした各分画の平均収率を掲げたが、対照血清のプロベルディン値と分画収率から見て、各分画のプロベルディン検定値は相当に低い。これは原料血漿の保管中および分画過程での損失から来るものと思われるが、その点を一応保留して質的に見るならば、プロベルディンは先ずP Iに集まり、残部がP II + III → P II + III - W → P IIIと推移し、β-グロブリンと並行して濃縮される可言えよう。P IIIの細分画では画然と分離し得ないが、主としてS III₂分画に集まると見られる。

この様にエタノール分画でプロベルディンは量的にはP Iに集まるところから、次にP Iの細分画を硫酸アンモニウム塩析法で試みた。即ち検体口)の追求結果を表3に掲げる。

これら細分画中、0~25飽和分画にP I中の殆ど全部のフィブリノーゲンが沈澱し、プロスロン

表3 P I 細分画のプロペルディン含量

蛋白濃度1%当り		不活C'3補体単位		プロペ ルディ ン単位
		ザイモー ザン共在	対 照	
硫酸 アン モニ ウム	濃度			
	0~25%飽和	0	0	0
	25~33%	980	110	7.2
	33~40%	1500	1500	0
	40~50%	0	0	0

ビン作用は25~33%飽和分画に、また同種凝集作用は33~40%飽和分画に最も多く認められた。従つてこの検定でもプロペルディンはプロスロンビンと併存する結果になる。

またこの硫酸アンモニウム25~33%飽和分画の電気泳動分析の1例では、 γ -グロブリン74%、 β -グロブリン21.8%、 α -グロブリン4.2%の結果を得ている。 γ -グロブリンが相当量を占めているが、必ずしもこれにプロペルディンが含まれているとは言えず、検体イ)の追求と照し合わせ、むしろ β -グロブリン部分に存すると思われる。

考 察

検体イ), ロ)の両実験結果から、プロペルディンはプロスロンビンと同一条件で分画されと言えよう。すなわちCohnのエタノール法で血漿プロスロンビンを最も多く含むのはSIII₂であり、またP Iの硫酸アンモニウム細分画によればプロスロンビン作用の最も強いのは25~33%硫酸アンモニウム飽和沈澱部分である。電気泳動的には未だ確認し得ないが、SIII₂および硫酸アンモニウムによる血漿塩析分画の泳動値⁷⁾から見て、おそらくプロスロンビン同様、 β -グロブリンの易動度を有すると見られる。

プロペルディンとプロスロンビンが行動を共にする点は、血漿分画によるプロペルディン分画の臨床的使用を考えると致命的な副作用となるであろうが、現在のところアルミ・ゲル吸着法、塩化亜鉛塩析法などによつても両者の分離に成功していない。

プロペルディンの精製後力価が非常に低い点は、原料保存およびエタノール分画過程での蛋白変性によるものと思われる。Pillemer らによる新

鮮血清のザイモーザン吸着法のプロペルディン収量が採血後1, 2日という僅かの日数で激減するのは、おそらく共存補体量に左右されるところからであると思われ、プロペルディン自体は保存条件さえよければそう早期に消滅するものではなからう。因みに著者の検体ロ)のプロペルディン分画は-15℃凍結2週間で力価の減少が見られなかつた。

次にプロペルディン検査法についてであるが、Pillemer の原法は、検体の1, 2, 4倍各积液3本についてそれぞれRP, ザイモーザン処理を行い、それらの遠心上清をそれぞれさらに稀釈し溶血反応を3通りに見るという正確ではあるが複雑に過ぎる方法であり、著者はその簡便法として、第1段のみの検体1~64倍稀釈で行い、溶血系も遠心を省いて直接添加したが、この方法はたまたまIslikerの修正法と合致し、彼はその検査法について詳細な比較検討を行なつていたので、少くとも著者の方法で著者の目的とするプロペルディンの追求には充分であると考ええる。

またPillemerの方法では、補体単位をC'3単位とみなすために溶血系にR3(プロペルディンおよびC'3を欠いた血清)を添加することになつている。これは新鮮血清の検定にはぜひ必要であるが、著者のRPでは非働化モルモット血清の添加によつてRPの補体 limiting componentがC'3であることが推定されるので、一般には必ずしも必要と考えない。

またザイモーザンについても、Pillemerは原料であるイーストの株によつてプロペルディンとの相互作用に差異があるといつているが、著者が数株の市販イーストで試したところではその様なブレードの違いは判らず、1株以外はいずれもプロペルディンとの相互作用に欠けていた。著者の使用ザイモーザンはすべてこのたゞ1つの有効株から消化調製したものである。たゞRP調製時のC'3の損失がPillemerによれば25%以下がよいとされている点で劣り、50%の損失はまぬがれなかつた。これはザイモーザンの再使用、すなわちPZの高イオン強度洗滌残渣を使用してのRP調

製や検定でも同じであつた。

結 論

血漿諸分画のザイモーザンによる検定により、プロペルディンはプロスロンビンと溶解性を同じくすることが判つた。プロペルディンの精製度、収量については更に大いに検討を必要とする。

終りに、御校閲をいただいた東京大学医学部松橋助教授、生化学長谷川福市氏に対し、また実験上の便宜を供与された日本製薬販売株式会社社長に深甚の謝意を表する。

文 献

- 1) L. Pillemer: Science., 120 : 279, '54 ; 121 : 732, '55 ; 122 : 545, '55 ; J. Exp. Med., 103 : 553, '56 ; 103 : 823, '56 ; 104 : 383, '56 ; 106 : 157.
 - 2) R.B. Pennell et al.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 96 : 272, '57.
 - 3) F. Miya: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 99 : 247, '58.
 - 4) L. Pillemer: Federation Proc., 14 : 480, '55.
 - 5) H.C. Isliker: Vox Sanguinis 3 : 23, '58.
 - 6) E.J. Cohn: J. Am. Chem. Soc., 68 : 459, '46.
 - 7) 平井秀松 : 電気泳動法, 共立出版K K, '55.
-