免疫体產生に及ぼす含硫黄物質の影響

第II報 Ferrous bis-cysteinate の凝集素吸着能について

芝 隆 夫

大阪学芸大学衛生学研究室 (指導 榊原栄一助教授)

〔受付: 7月25日1955年〕

緒 言

先に SH 化合物, 殊に Cysteine (R-SH) は免疫体產生臓器を直接刺激して免疫体(凝集素)を流血中に湧出せしめる作用(或は末梢性免疫体產生作用)の存在すること, 又免疫体の上昇は同時に血中還元 Glutathione (G-SH) が増加し, 減少すれば G-SH も減少する様に, 両者の間に密接な関係の存在することを報告した¹⁾。之れを要するに G-SH, R-SH は免疫体の產生と排泄に重要な役割を示すことがうかがわれる。R-SH は *in vitro* で重金属イオンをキレートしてメルカプチド形成を行い, 殊に遷移金属イオンの Ferrous ion との間に Ferrous bis-cysteinate を形成し, この際理論上2コの配位空所を有す。此の空所へ L. Michaelis²⁾ は酸素, 一酸化炭素の配位結合の可能性を論じ, 又榊原は軽金属化合物, 或は Tuberculin, Diphtherie toxin, Aneurinase 等の様な高分子化合物も ligand となり配位結合し, しかも此の場合には有毒性の物質が無毒化されることを報告している^{3) 5)}。私は G-SH, R-SH, が免疫体の動態と関係の深いところから, 之等有毒性物質における如く免疫体(凝集素)も Ferrous bis-cysteinate に配位結合するや否やを検討し, 之によつて体内獲得免疫体の運搬, 排泄経路の探究が出来れば幸であると考えた。

実験方法

Ferrous bis-cysteinate の製法は榊原³⁾の方法によつた。之に Sodium citrate を2倍モルの割合に配位した場合には還元性消失, chemiluminescence は陰性, 塩化鉄反応陰性である³⁾。使用した Cysteine は Na 塩でその M/10 溶液と, Ferrous chloride ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) の M/20 溶液を基準液とし, Ferrous bis-cysteinate 溶液としては各基準液々々 1.0cc 宛を混和して用いた。此の時の pH は 7.5~7.8 であつた。

Ferrous bis-cysteinate bis-citrate は Cysteine, Ferrous chloride はそのまま M/10 Sodium citrate

溶液を 1.0cc 用いた。従つて溶液量の統一を期するため注射量はすべて 3.0cc となし, 不足分は蒸留水で補充した。勿論, 蒸留水 3.0cc の注射により獲得免疫価の変動のないことを確めた。

尙対照実験の目的で Di-Na-E. D. T. A. (Ethylene Diamine Tetra-acetic Acid)⁶⁾ を使用した。即ち, E. D. T. A. はアルカリ土類から重金属に至る諸元素と所謂キレート化合物を作り, キレート化合物は水溶液でその元素をイオン化せしめない性質があり, 此の原理を応用して生体から好ましくない元素を洗い出したりする目的で Pb, Hg 中毒等の治療に应用せられる様になつてゐる。此のキレーションの現象を利用して, 先づ Ferrous ion を E. D. T. A. にキレートせしめて, その配位空所の反応性を比較する意味で用いた。亦家兎免疫方法, 並に凝集反応の術式はすべて第1報の方法に準じた。

実験成績

〔A〕 Ferrous bis-cysteinate の影響

Ferrous bis-cysteinate は理論的には〔a 図〕の如く2コの配位空所があるから, 若し榊原³⁾が分類している様に凝集素に OH 基, 或はその他配位可能な反応基が存在して, しかも活性を持つてゐるならば, Ferrous bis-cysteinate の ligand となり結合する可能性が生ずる。そこで腸チフスワクチンで免疫した家兎の獲得免疫にどのような態度をとるかを追求してみた。勿論, Ferrous bis-cysteinate を構成する個々の要素に就いてその状態を知る必要がある。第1報において詳しく報告した如く Cysteine は免疫価を急速に増加することは今回も全く

SHIBA Takao: The influences of the S-containing substances on the producing of the immune body. II. On the adsorbent ability of ferrous bis-cysteinate for agglutinin. The Hygienic Laboratory of the Osaka University of the Liberal Arts and Education. — Jap. J. of Bact., 11 (1), 59-62, 1956.

〔a 図〕 Ferrous bis-cysteinate の構造

同様であつた。

(a) 獲得凝集価に及ぼす影響 (in vivo)

1) Cysteine 単独の場合

獲得凝集価 1600 倍, 1600 倍, 3200 倍の免疫家兎に夫々 M/10 Cysteine 溶液 (Na 塩) 1.0cc + 蒸溜水 2.0cc 計 3.0cc を耳静脈内に注射し, 2 時間後, 5 時間後, 24 時間後における凝集価の動揺を検べた。その結果, 各例共に凝集価は 2~8 倍に上昇し, 24 時間後も 尚注射前の値よりも高値を示した (図 1 参照)。

図 1 Cysteine (Na 塩) の免疫効果

2) Ferrous chloride ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) 単独の場合

獲得凝集価は夫々 1600 倍, 1600 倍, 3200 倍の免疫家兎の耳静脈内に夫々 M/20 Ferrous chloride 溶液 1.0cc + 蒸溜水 2.0cc 計 3.0cc を注射し, 前例同様時間毎に凝集価を測定した。その結果獲得凝集価 3200 倍のものは変化無く, 他の 2 例は 2 時間目に 2 倍に上昇するも 5 時間, 24 時間目には注射前の値に復歸するもの, 5 時間目に 2 倍になるも 24 時間目には注射前の値に復歸するもの等, その成績は一定ではないが前者の様に著明に増加作用を呈するものはなかつた。斯様に Cysteine も Ferrous chloride も共に獲得凝集価を減少せしめる作用は現われなかつた (図 2 参照)。

図 2 Ferrous chloride の免疫効果

3) Ferrous bis-cysteinate の場合

獲得凝集価夫々 1600 倍, 3200 倍, 6400 倍の腸チフスワクチンによる免疫家兎の耳静脈内に M/10 Cysteine 及び M/20 Ferrous chloride 溶液を混和し (1.0cc + 1.0cc

+ 蒸溜水 1.0cc) 計 3.0cc を注射すると, 図 3 で示した如く何れの場合においても凝集価は時間の経過と共に低下し, 殊に 5 時間目には獲得凝集価の 1/4 の力価となつた。

然し 24 時間後には 3 例の中 2 例までが注射前の値に復歸した (図 3 参照)。

図 3 Ferrous bis-cysteinate の免疫効果

4) Ferrous bis-cysteinate bis-citrate の場合

前項の現象から一応凝集素は Ferrous bis-cysteinate の ligand となり得ることが想定されるが, 之を確かめるため in vitro であきらかな ligand の Sodium citrate を配位結合せしめたる型を注射してみた。即ち, 3) 項に用いた免疫家兎 3 例を用い, 此の耳静脈内に M/10¹ Cysteine, M/20 Ferrous chloride 及び M/10 Sodium citrate 溶液を各 1.0cc 宛混和して Ferrous bis-cysteinate bis-citrate を作り, 之を注射すると凝集価はむしろ上昇の傾向を呈した。此のことは明かに Ferrous bis-cysteinate の作用と異なることを物語るものである (図 4 参照)。

図 4 Ferrous bis-cysteinate bis-citrate の免疫効果

(b) 凝集反応に及ぼす影響 (in vitro)

1) Ferrous bis-cysteinate の影響

腸チフスワクチン免疫による獲得凝集価各々 1600 倍, 3200 倍, 6400 倍の免疫家兎血清を 0.2cc 採り, 0.9% の生理的食塩水 2.3cc を加え 2.5cc となし (12.5 倍) 此の 1.0cc を駒込ピペットにて取出し, あらかじめ 0.9% 生理的食塩水 1.0cc 宛を分注してある試験管に順次倍數稀釈を行つた。(25×50×...)。

次いで Ferrous chloride 0.25cc + M/10 Cysteine 0.25cc + 0.9% 生理的食塩水 1.5cc 計 2.0cc 宛を前記稀釈を行つた各試験管に分注し (75×150×...) 各試験管より 1.0cc 宛を取り出し別の新しい試験管に入り替え, 各試験管に腸チフスワクチン 1.0cc を分注し (150×

300×・・・) 37°C の孵卵器に2時間納め、取り出して翌日成績を判定した。その結果は全く陰性であった。勿論, Ferrous chloride, Cysteine (Na 塩) 単独の場合は同一稀釈において認むべき変化を観察することは出来なかつた (図5参照)。

図5 凝集反応に及ぼす Ferrous bis-cysteinate の影響 (in vitro) No. 69

添加物	150	300	600	1200	2400	4800	9600	19200	38400	76800
—	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
Ferrous chloride	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
Cysteine (Na 塩)	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
F. B. C.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

註: No. 70, No. 71 の血清も同様結果
F.B.C. とは Ferrous bis-cysteinate

2) Ferrous bis-cysteinate bis-citrate の影響

Ferrous bis-cysteinate の2つの配位空所に, Sodium citrate を配位せしめて配位空所を充填した後, 前者同様の実験を行った。その結果, Ferrous bis-cysteinate bis-citrate を倍数稀釈した各試験管に添加して得た成績は殆んど対照並びに Sodium citrate 単独添加の場合と区別することは出来なかつた (図6及びb図参照)。

図6 凝集反応に及ぼす F.B.C. bis-citrate の影響 (in vitro) No. 74

添加物	150	300	600	1200	2400	4800	9600	19200	38400	76800
—	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
Sodium citrate	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
F.B.C bis-citrate	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—

註: No. 72, No. 73 の血清も同様結果
F.B.C bis-citrate とは Ferrous bis-cysteinate bis-citrate

[b 図]

Ferrous bis-cysteinate bis-citrate (錯体による)

註: Cys. = Cysteine

[B] Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid, (E.D.T.A) の影響

Di-Na-E.D.T.A.⁶⁾ は金属元素を中心とする一種の分

子内錯塩形成能がある。そこで E.D.T.A. の中心金属元素として Ferrous ion を用いて E.D.T.A. との間に分子内錯塩を構成した。

理論的には [c 図] に示すように2つの配位座空所が出来るわけであるから, Ferrous bis-cysteinate と同様の作用を呈するものであろうか否か疑問の存する所である。

そこで Ferrous ion (Fe^{2+}) を配位せしめて前者と同様の実験を試みたが, 図7に示すように凝集価の変動を認めることが出来なかつた (図7及びc図参照)。

図7 凝集反応に及ぼす E.D.T.A. の影響 (in vitro) No. 72

添加物	150	300	600	1200	2400	4800	9600	19200	38400	76800
—	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
Ferrous Di-Na EDTA	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—

註: No. 73, No. 74 の血清も同様結果

[c 図]

E.D.T.A. Ethylenediaminetetra acetic acid

総括並に考察

以上の実験成績により, 腸チフスワクチン免疫感作により産生せられた家兎の獲得免疫体(凝集素)は in vivo において Cysteine, Ferrous chloride により前者は急速な湧出作用(動員作用), 後者は前者の如く顕著ではないが増加作用を有するのであるが, Ferrous bis-cysteinate では此の構成因子の Cysteine, Ferrous chloride 個々の作用と全く異り, 顕著な減少作用が発揮せられた。此の現象は in vitro において一層著明に発現せられ, 過剰の Ferrous bis-cysteinate は完全に凝集素を吸着する (in vitro で白色乃至微黄色沈澱を生ずるから敢て吸着と言う)。このため濾液は凝集反応陰性になった (d 図)。

Ferrous bis-cysteinate の ligand の Sodium citrate を理論量 Ferrous bis-cysteinate に配位せしめて in vitro 並に in vivo の凝集反応に及ぼす影響を観察するに Ferrous bis-cysteinate における如き吸着現象は全

[d 図]

[e 図]

く現れない。即ち凝集反応の力価には全く無影響の成績を得た(e 図)。

即ち, Sodium citrate は凝集素よりも Ferrous bis-cysteinate に強く配位していることを物語り, 凝集素は影響を受けないことが予想される。Ferrous bis-cysteinate と凝集素との結合割合を検討するに, 榊原の実験にも明かな如く Sodium citrate 及び Sodium arsenite のような比較的構造の簡単な物質は2モル配位をするが, Diphtherie toxin の如き高分子の物質は Sodium citrate の1分子の存在にかゝらず同量配位である所から, 多分 Diphtherie toxin は1分子配位(分子量は不明であるが)であろうと考えているが, 私の実験の場合も同様な塩化鉄反応であるからやはり凝集素は図に示した如く1モル配位であろうと考えられる。

G-SH も Fe^{2+} と Ferrous bis-glutathionate を構成するから体内, 殊に免疫体が之と配位することも予想される。同時に錯塩の特性から斯様な分子内錯塩は条件の相違, 或は強力配位子の出現により可逆性があり, 体液内免疫体の運搬, 排出の様相を予想することが出来る。

一方 Ferroudi Di-Na-E.D.T.A. は理論上の配位空所が存在するにも拘らず凝集素は配位しない。之は中心金属の Fe^{2+} の交換性, 酸化, 或は Di-Na-E.D.T.A. の立体構造上配位間隙の小なるため凝集素の結合不能となるためであろう。此の状態に関しては更に探究中である。

結 論

1) 第一鉄システイン錯塩 (Ferrous bis-cysteinate) は凝集素を *in vivo* 及び *in vitro* で吸着し, 殊に *in vitro* では不溶性塩を形成する。即ち, 凝集素は Ferrous bis-cysteinate の ligand となる。

2) 第一鉄エチレンジアミン四醋酸錯塩 (Ferrous Ethylen Diamine Tetra-acetic Acid) は *in vitro*, *in vivo* で凝集素を吸着しない。

(本論文の要旨は昭和29年10月第8回日本細菌学会, 近畿地方会において発表した)。

(摺筆するに当り榊原助教授の御懇切なる御指導, 御鞭撻と御校閲を深謝し, 恩師富士教授の御校閲並びに上林助手の御助言に深甚なる謝意を表す)。

引用文献

- 1) 芝隆夫: 免疫体産生に及ぼす含硫黄物質の影響, 第1報 SH 化合物の影響, 日本細菌学会雑誌10 (12), 1035-1041, 第8回日本細菌学会, 近畿地方会発表。
- 2) Barron: "Thiol group of Biological Importance" *adv.* XI. 30, 201-266 (1951)。
- 3) 榊原栄一: 大阪学芸大学紀要, 第3号(B)昭29。
- 4) 榊原栄一: 第26回日本細菌学会総会発表, 昭28, 4。
- 5) 榊原栄一: 第27回日本細菌学会総会発表, 昭29, 4。
- 6) 勝沼晴雄: (医学のあゆみ), 第17巻, 第6号401, 昭29, 6。