抗体動員物質“イノシン”の牛血清 γ -グロブリンの生合成に及ぼす影響 (1)

広 尾 哲 三

大阪学芸大学衛生学教室 (指導 榊原栄一教授)

[受付: 10月16日, 1965年]

私どもの研究室では抗体産生機作探究の一環として、抗元侵襲後実験動物の早期血流中に数時間に限って耐熱性の抗体動員並びに産生促進作用物質の出現されることを明らかにし^{1,4)}、またその物質の出現機作⁵⁻⁹⁾をも明らかにした。その本体についての探究において特に最近有効血清から抽出純化した要素は原血清の力価に及ばないが有効性を維持している物質としてイノシンが単離された⁴⁾。

血清 γ -グロブリンと血流中抗体とは特種な免疫現象を除いては両者を区別することは不可能で、抗体は γ -グロブリンが修飾された形であると考えられてきた。そこで抗体産生機作解明への一助として、先ず血清 γ -グロブリンの産生状況についてイノシンの作用を追及せんと試みた。血清 γ -グロブリンは正常血漿蛋白の一種で、その起源臓器については抗体と同様不明な点が多い。肝臓は血漿蛋白質産生臓器として重要なものであるが、Miller⁹⁾らの報告によれば灌流肝を用いてC¹⁴-グリシンの Incorporation による実験では γ -グロブリン以外の他のすべての血清蛋白質がC¹⁴でラベルされていた結果から、肝臓では血清 γ -グロブリンが産生されることを否定的に考えた。これに反してRanney ら¹⁰⁾、Keston ら¹¹⁾は免疫動物の脾、肝スライスをを用いた実験でC¹⁴-グリシンは抗体の中に吸収されることをみとめた。またPeters^{14,15)}ら、東ら¹⁶⁾、志村ら¹⁷⁾は血清免疫学的な定量的沈降反応を応用することにより血清蛋白質の中アルブミンの全部 α 、 β -グロブリンの大部分および γ -グロブリンの一部が肝で生成されることを報告している。この種研究は生合成の段階でアミノ酸の活性化、エネルギー供給等の問題に関して重要なことであるのに違いないが量的な問題に関してはそれだけで満足とは思われない欠点がある。とまれ現在の段階では肝臓での γ -グロブリン生合成には賛否両論であるが、Askonas ら^{12,13)}はモルモットの異種臓器からのスライスで抗体内に取込まれるラベルアミノ酸

を比較した実験から、抗体や γ -グロブリンに取込む組織の能力は抗体や γ -グロブリン合成能の尺度であると述べた。このような概念からすればやはり肝臓は γ -グロブリンの生合成に関係があると考えた方がよいのではなからうか。ことに東や志村らは直接的に生成物の証明を行っているのである。私どもも後者の見解に立つて定量的沈降反応を応用して牛肝からの血流中 γ -グロブリンの産生を実験し、同時に抗体動員作用を発揮する物質イノシンの影響を検討して興味ある成績がえられたので、ここにその概要を報告する。

実験方法と材料

Peters^{14,4)}、東ら¹⁶⁾の方法に準拠して定量的沈降反応を応用し、牛肝の湿重量1g当り2時間で産生される γ -グロブリン量を求めた。材料並びに定量的沈降反応は次の操作によった。

1) 抗元とその抗血清

正常牛血清 γ -グロブリン(牛血清 γ -グロブリン分画II)を用い、Tiseliusの電気泳動法、溶解度法などによりほぼ純粋であることを確め、これを生理的食塩水に0.5%、1%に溶解し、Seitzの濾過器を用いて無菌的濾過したものを抗元溶液として用いた。体重2kg前後の白色健康雄性ウサギ5羽に2日間隔で静脈内感作し、それぞれ1mlより始めて漸次増量し、各例とも全量150mgを限度として感作を終了した。最終感作1週間後にそれぞれ心臓穿刺により各々1ml採血し、分離非働化血清の沈降素価を測定したところ64倍(1羽)、128倍(2羽)、265倍(1羽)、512(1羽)であつた。さらに1週後全例頸動脈より全採血を行い、血清を分離して混合し、56°C、30分間非働化した後5°C前後の冷蔵庫に保存した。要時分取してErma蛋白計で測定し、2%になるように生理的食塩水で希釈して実験に供した。

2) 沈降反応の実施操作

Peters、東らの方法に準拠し、えられた沈降物をFolinの方法により、650m μ の吸光度を測定して血清 γ -グロブリン量を測定した。

本論文は大阪学芸大学衛生学教室における“抗体動員物質の本体に関する研究”(6)である。

10 ml の画線付遠心管に可検試料 1 ml と上記操作により調製した抗血清 0.5 ml をとり、それに生理的食塩水 3.5 ml を混入し、よく混和した後 37°C で 2 時間培養、培養後直ちに 4°C~5°C の冷蔵庫に約 20 時間放置して反応を完了させた。ついでそれを 5°C で 3000 rpm 15 分間の冷却遠心によつて沈降物を分離し、氷冷食塩水で 2~3 回洗滌と遠心をくりかえし、次に 0.1 N の Na_2CO_3 溶液 5 ml, 0.1 N HCl 1 ml, 0.1 g/dl CuSO_4 溶液 1 ml を順次添加してよく混和し、37°C 1 時間、孵卵器に入れる。室温にとり出した後、これに Folin のフェノール試薬（4 倍希釈液）1 ml と蒸留水を加えて正確に 10 ml となし、混和 20 分後の発色を試薬のみの盲検と比色定量した。比色定量は日立の EUP 2 A 型光電光度計を用い 650 m μ の吸光度で抗血清のみ、試料のみを同様の操作を施したものの値を差引いて、図 1 の如く血清 γ -グロブリンの検量曲線を求めた。

図 1 γ -グロブリンの検量曲線

3) 牛肝切片

正常牛の肝を氷冷下に Slicer で厚さ約 5 mm 以下の薄片となし、含有血液をできるだけ取り除くため冷却した Ringer 液で 5 回洗滌した後、濾紙上で水を切り、Torsion balance でその湿重量を測定して実験に供した。

この牛肝は実験当日屠殺場で得られたもので屠殺後 3 時間以内に切片にされ、処置が終えられた。出来るだけ繊維性の部分は除去され、切片処理後の湿重量は処理前の約 70 % 相当量であつた。

4) 培地

Peters ら¹⁴⁾¹⁵⁾、東ら¹⁶⁾の実験にみられる無機イオン培地の培地 A, Krebs-Ringer の重曹およびリン酸緩衝液、並びに食塩水などを比較して Krebs-Ringer の重曹緩衝液（以下 K-R 液と略称する）を主として用いた。

5) 培養の方法

前条 500 mg 前後の切片を 10 ml の K-R 液を入れた 6 分 10 cm の試験管に浮遊させ、(試験供材を入れる場合には K-R 液を 9 ml とし、K-R 液に溶解した供材を

図 2 測定全操作過程

1 ml 混入した) 37°C のフラン器で 2 時間空気相下に培養した。切片ではアミノ酸 Incorporation が 3~5 時間はほぼ一定に保たれるとされるが、本実験操作は完全な無菌条件下で行われていないので諸種の影響を可及的に除去する目的で 2 時間の培養に統一した。東ら¹⁰⁾の実験でも 2 時間以上の培養は生成率や再現性において必ずしもよい結果がえられないことを指摘していることも参照した。

6) γ -グロブリンの生成量の測定

培養後直ちに 5°C 以下に冷却し, Potter-Elvehjem の硝子ホモゲナイザーに移し, 冷却を継続しながらホモゲナイズし, ついで 14000×g, 15 分間遠心した上清について含有 γ -グロブリン量を前掲の方法により測定した。そして培養前後の差を生成 γ -グロブリン量として取扱った。

実験結果

1) γ -グロブリンの生成量

実験方法 5 項における培養後 2 時間で培地と切片を分離した後, 切片を 10 ml の K-R 液に浮かべ, Potter-Elvehjem の硝子ホモゲナイザーでホモゲナイズしてえた上清と別々に操作して得られた Net-production の和と培養後直ちにホモゲナイズして得た上清の Net-production の差は近似を示し, 表 1 に示したように多少の相違はあつたが, 操作簡便のため後者を用いた成績をのべる。

全 10 例の実験について 正常牛肝切片における 2 時間

後の γ -グロブリン Net-production は肝湿重量 1 g 当り $115 \pm 24.15 \text{ ug}$ であり, 明らかに γ -グロブリンの生成が認められる。対照として所定の K-R 液に投じた非培養切片を 4°~5°C, 2 時間冷蔵庫に静置した後測定した場合を非培養対照, すなわち培養前値として取扱った。個々の実験測定値は常に 4°~5°C の冷室に 2 時間放置し非培養対照を実施して比較した。

2) 諸種培地による γ -グロブリン生成比

表示したような培地に切片を前記のように培養して γ -グロブリン Net-production を比較したが, いずれの場合にも大差が認められなかった。

表 2 培地の相違による γ -グロブリン産生量の比較

培 地	γ -グロブリンの産生比 (%)
Peters の Medium A*	100
Krebs-Ringer 重曹緩衝溶液	100
Krebs-Ringer 磷酸緩衝溶液	100
生 理 的 食 塩 水	80

* Medium A における産生量を 100 とする

Medium A の組成: NaCl 105 m mol/L, NaHCO₃ 30 m mol/L

KHCO₃ 10 m mol/L, CaCl₂ 10 m mol/L

3) イノシンの γ -グロブリン生成に及ぼす影響

表示したようにイノシンを K-R 液に添加し, これに 0.5 g の肝スライスを投じ, 37°C, 2 時間培養した後の γ -グロブリンの産生量を測定し, Net-production を求め

表 1 牛肝における γ -グロブリン生成量 (湿重量 1 g 当り)

材料	培養前の γ -G 含有量	培養後の γ -G 量			産 生 量 (Net production)	培養後の 全 γ -G	産 生 量 (Net production)
		K-R 培地	切片	合計			
1	740	800	75	875	135	855	115
2	440	490	95	585	145	565	125
3	620	670	75	745	125	740	120
4	605	650	50	700	95	695	90
5	430	480	100	580	150	575	135
					平均 130 ± 19.49		平均 117 ± 15.3
6	335					475	140
7	450					545	95
8	550					690	140
9	510					580	75
10	360					485	125
							平均 115 ± 24.15

表 3 イノシンの γ -グロブリン生成に及ぼす影響 (湿重量 g 当り)

イノシン添加量 ug (終 濃 度)	実験群	γ -グロブリン量		産 生 量 (Net production)	増 加 率
		培養前	培養後		
2.5×10^{-3} M	I		660	260	1.73
	II		770	270	3.85
	III		690	320	2.46
2.5×10^{-4} M	I		760	360	2.40
	II		680	180	2.59
	III		690	320	2.46
2.5×10^{-5} M	I		660	260	1.73
	II		630	130	1.71
	III		600	230	1.77
培 養 対 照	I		550	150	1.00
	II		570	70	1.00
	III		500	130	1.00
非 培 養 対 照	I	400			
	II	500			
	III	370			

- 註： (1) 実験群別は屠殺牛肝の違いを示す。
 (2) 非培養対照にはスライスを秤量し、これを2時間冷蔵庫に放置した後測定した。培養対照とはスライスを2時間 37°C で培養したものである。
 (3) 増加率とは培養対照から非培養対照を引いた産生量、所謂 Net production をイノシン添加培養 Net production より引き、その値の産生量を所謂 Net production で割った値。

たものである。イノシンの添加は γ -グロブリンの産生を著しく促進していることがうかがえる。対照に比してイノシンが 2.5×10^{-5} M 濃度に添加されている場合には1.73倍、 2.5×10^{-4} M の場合には2.45倍、 2.5×10^{-3} M の場合には2.68倍の増強促進効果がみられた。

この結果は稲垣¹³⁾が孵化鶏卵の肝、脾の組織培養において、その時には不明であったが、抗体産生促進並びに動員促進効果を有する物質を含む血清あるいは粗抽出物を用いて行つた促進効果とよく一致するところである。

4) 代謝関連物質の γ -グロブリン産生に及ぼす影響

イノシンは生体内で ATP の代謝系列と核酸形成のプリン塩基体の一つとして重要な物質であることは周知のことである。そこで前者に関連する各段階の物質が入手できたのでイノシンの有効濃度にならつて各供材 2.5×10^{-4} M、 2.5×10^{-5} M の2種類の添加の場合について比較実験を試みた。表示したように、ATP、ADP、アデノシンは有効に働き、ヒポキサンチン、アデニン、は無効、AMP、GMP は僅かに影響を与えた。ことにアデノシンの場合には培養前値が著しく小さかつたけれども増加率

はほぼイノシンと同等であつた。これに反してアデニンは全く作用のなかつたことは興味ある結果といえよう。

総括並びに考察

以上の実験成績によつて、牛血清 γ -グロブリンの肝内生成に関してはさきにもふれたように賛否両論ではあるが、この実験の範囲においては明らかに生成が確認されたといえる。もつとも牛血清 γ -グロブリンでウサギを免疫してえられた抗血清に反応しえる正常 γ -グロブリンという範囲においてである。抗体過剰域における定量的沈降反応は逆の場合に較べて難点は少いが検量曲線からもわかるように、血清 γ -グロブリン量がほぼ 10 ug から 50 ug の範囲は直線的関係がえられて充分比較検討できる感度である。また用いた抗血清も免疫電気泳動で検定して γ -グロブリン以外の牛血清蛋白質との間に交叉反応は起らなかつた。また沈降反応生成物は発色度から考えて抗体比は1:4の程度であつたと推定され、比較的一定組成の蛋白質を定量することになり、特定のアミノ酸に基く比色法でも充分批判にたえるものと考えられる。し

表 4 イノシン関連物質の γ -グロブリン生成に及ぼす影響

供 材	対 照		実 験 群		産 生 量			実験群増加率	
	培養前	培養後	$2.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-5} \text{M}$	対照*	$2.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-5} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-4} \text{M}$	$2.5 \times 10^{-5} \text{M}$
A T P	400	500	580	540	100	180	140	1.80	1.40
A D P	330	470	570	520	140	240	190	1.71	1.35
A M P	450	550	600	550	100	150	100	1.50	1.00
Hypoxanthine	380	550	570	550	170	190	170	1.12	1.00
Adenosine	240	320	410	380	60	170	140	2.83	2.33
Adenine	410	550	550	550	140	140	140	1.00	1.00
5'GMP-Na	435	560	600	600	125	165	165	1.32	1.32

註 * は供材も添加しない対照の培養2時間値から培養前値を引いた値。実験群の Net production は供材添加培養2時間値から培養前値を引いた値。実験群増加率は実験群の Net production を*の値で割ったもの。

かしながら沈降物の定量法に Micro-Kjeldahl 法や, Peters¹⁴⁾ らの Dichromate 還元法を用いてみたが, 東¹⁶⁾ が指摘しているように追試した限りでは満足な結果はえられなかった。この実験で牛肝より血漿蛋白質中の γ -グロブリンの生成が確認され, 2時間の培養成熟牛湿肝重量1g 当り $115 \pm 24.15 \text{ ug}$ の割合で γ -グロブリンの生成されることが認められた。この平均生成量が2時間培養による細胞内のミトコンドリアやミクロゾームのような Particulate fraction からの単なる release によるものであるか否かについてはなお議論があろうが, 東¹⁶⁾, Peters^{14, 15, 19)}, Askonas²⁰⁾ の見解に徴して新たに生成されたものと理解して支障なからう。

さてイノシンが抗体の産生や動員促進効果を発揮することは詳述^{9, 14)} されているが, 細心な注意の下に実施した本実験において γ -グロブリンの生成促進効果を確認することができた。その効果は極めて著しいもので $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 濃度で非添加対照の2.45倍の効果を発揮した。そこで生体内イノシンの代謝系列である ATP, ADP, AMP (IMP), ヒポキサンチン, アデニン, アデノシン, GMP などの相関性を観察してみるとアデノシン, ATP, ADP の順に生成促進効果を発揮し, その他の物質には殆んど有効性が認められなかった。 γ -グロブリンのような蛋白質合成にエネルギーの必要なことはすでに明らかにされており, この重要性は論議の対象にならないことであるが, この系列で最もエネルギー供与の大きな ATP, ADP の効果に比し, イノシン, アデノシンが著明に大きな効果を発揮したことは高エネルギー磷酸化合物の関与¹⁰⁾ 以外の問題として特筆すべきことであろう。この問題に関しては教室において目下の鋭意探究中であるから間もなく解明されることであろう。

結 論

1) 正常牛肝切片を2時間培養し, 肝湿重量1g 当り $115 \pm 24.5 \text{ ug}$ の牛血清 γ -グロブリンの Net production を測定した。

2) 抗体産生並びに動員効果を発揮する要素イノシンは $2.5 \times 10^{-4} \text{ M}$ 終濃度においては対照に比し約2.5倍の牛血清 γ -グロブリンの産生促進効果を発揮した。

3) イノシンの代謝関連系列, ATP, ADP, AMP (IMP), ヒポキサンチン, アデニン, アデノシン, GMP, などによる γ -グロブリン産生促進効果を比較検討した結果, アデノシンはイノシンに近く, ATP, ADP はそれらに比し可なり弱いが促進効果はみとめられた。他の物質は殆んど無効であった。

これらの結果は γ -グロブリンの生合成に高エネルギー供給以外の問題を暗示するものである。

終りに榊原栄一教授の御指導, 御校閲に対し深甚なる感謝の意を捧げる。また本研究の一部は昭和36年度文部省科学研究費(各個研究)の援助を得たことを深く感謝する。なお本論文の一部は昭和37年秋の日本アレルギー学会総会の席上で報告された。

引用文献

- 1) 榊原栄一: 綜合臨床, 9, 3 (1960).
- 2) 吉田貞一: 日本細菌学雑誌, 13, 1 (1958); 13, 8 (1958).
- 3) 榊原栄一ら: 日本細菌学雑誌, 14, 10 (1959); 15, 1 (1960); 15, 2 (1960); 15, 3 (1960).
- 4) 榊原栄一ら: 日本細菌学雑誌, 17, 6 (1962).
- 5) 塩谷茂: 日本細菌学雑誌, 12, 10 (1957); 仁泉医学, 8, 2 (1958).
- 6) 神田隆吉: 日本細菌学雑誌, 14, 3; 14, 4 (1959).
- 7) 松山和子: 東京女子医科大雑誌, 28, 10 (1958);

- 29, 3 (1959).
- 8) 高田親 : 日本細菌学雑誌, 14, 2 ; 14, 3 (1959)
 - 9) Miller, L. L., Bly, D. G., Waston, M. L. and Bale, W. F. : J. Exptl. Med. 94, 43 (1951) ; 99, 125 (1954).
 - 10) Ranney, H. and London, I. : Fed. Proc. 10, 562 (1951).
 - 11) Keston, A. and Dreyfus, J. : Fed. Proc. 10, 206 (1951).
 - 12) Askonas, B. A. and Humphrey, J. H. : Biochem. J. 60, X (1955).
 - 13) Askonas, B. A. and White, R. G. : Brit. J. exp. Path. 37, 61 (1956).
 - 14) Peters, T. Jr. and Anfinsen, C. B. : J. Biol. Chem. 186, 805 (1950).
 - 15) Peters, T., Jr. : J. Biol. Chem. 200, 461 (1953)
 - 16) 東真彦 : 生化学, 30, 6 (1958) ; 30, 12 (1958)
 - 17) 志村憲助, 紺野邦夫, 赤堀四郎編 : 酸素研究法, 3, 500 (1957).
 - 18) 稲垣延員 : 日本細菌学雑誌, 14, 6 ; 14, 8 (1959)
 - 19) Peters, T., Jr. : J. Biol. Chem. 229, 659 (1957)
 - 20) Askonas, B. A. and Humphrey, J. H. : J. Biol. 68, 252 (1958).

Studies on the Bio-synthesis of Bovine Serum Gamma Globulin of Antibody Promoting Factor "Inosine", in Vitro (1)

Tetsuzo HIROO

Department of Hygiene, Osaka Gakugei University

Antibody promoting factor which flowed out into peripheral circulating blood during several hours in early stage after the intravenous invasion of antigen, in rabbits, was separated and identified with "inosine" by Dr. E. SAKAKIBARA et al.

In the present paper, the action of inosine was discussed about the net-production of bovine serum gamma globulin which was synthesized in the basic media, instead of measuring antibody which was formed in it during 2 hours after the start of liver slices incubation. The net-production was measured by the quantitative precipitating method.

(1) Normal bovine liver slices formed 115 ± 24.15 ug/gr. w. w. of bovine serum gamma globulin as net-production, but when inosine was added to 2.5×10^{-4} M as a final concentration into the basic media, it was increased about 2.5 times as compared with normal bovine liver slices.

(2) Several substances related to inosine, i. e. ATP, ADP, AMP, IMP, GMP, hypoxanthine, adenosine and adenine etc., were compared with the activating effect of inosine on the net-production of bovine serum gamma globulin. Adenosine displayed an increasing effect as well as inosine, ATP and ADP much less than adenosine, but on the contrary, hypoxanthine, adenine, AMP, IMP and GMP etc. had a little or no effect on the action.