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 (2)

広 尾 哲 三

大阪教育大学衛生学教室 (指導: 榊原栄一教授)

〔受付: 3月6日, 1968年〕

抗原侵襲早期のウサギ血流中には抗体動員並びに抗体産生促進効果を有する物質が出現する。その物質の一つがイノシンであることが、私共の研究室で明らかにされており⁹⁾⁻¹¹⁾, また本物質によつてウサギ血清中の γ -グロブリンの産生促進効果も明らかにされている⁷⁾⁻⁹⁾。

さて、血清 γ -グロブリンと血流中抗体は特殊の免疫現象を除いて両者を理化学的に区別することは不可能であり、また血流中抗体も血清 γ -グロブリンもともにイノシンの投与によつて急増する⁷⁾⁻¹¹⁾ことが明らかにされている。そこで血清 γ -グロブリンの産生促進効果は抗体産生促進に通ずるものとの考察の下に、前報⁹⁾で報告したように牛肝臓スライスやホモゲネートを用いて、 γ -グロブリン生合成の過程におけるイノシン効果を追及した。

その報告の中で牛肝臓においても東ら¹¹⁾⁻¹²⁾の馬肝臓におけると同様、ほぼ同傾向に牛血清 γ -グロブリンの生合成が行なわれること、またその過程でイノシンが著しい促進効果を発揮することを明らかにした。元来蛋白質の生合成には高エネルギーの供給が必須不可欠のものとされている。ところがイノシンはATPと異なつて、それ自身高エネルギーの直接的産生効果を発揮するものと考えられないから、イノシンのそのような顕著な促進効果には矛盾が感ぜられ、蛋白質の生合成におけるエネルギー供給源に矛盾を感じるものといえよう。

そこで第1報でえられたイノシン効果の特異性をさらに詳しく追及する目的で、前報に引続き、今回入手できたイノシンの代謝関連物質を求めて実験を行ない、いささか所見が得られたので報告する。

実験方法

実験方法並びに材料の取扱い方法はすべて前報に準じて行なつた。

本論文は大阪教育大学衛生学教室における“抗体動員物質の本態に関する研究”(7)とする。

1) 抗原とその抗血清

前報⁹⁾で記載したものと同一ロットの健康牛血清 γ -グロブリン (以下 BSG と略称) の純化標品を抗原として用いた。抗血清 (以下 Anti-BSG と略称) の製法は前報記載操作にしたがつて、新たに3羽のウサギを免疫して得たものである。沈降反応 (重層法, 抗血清希釈法) で沈降素量256倍, 256倍, 512倍の3羽のウサギから得られた抗血清を混合して用いた。

2) 定量的沈降反応

前報に詳述した方法によつた⁹⁾。

3) 培養材料は成熟牛肝臓で、これをスライスとして用いた。方法は前報に記載した⁹⁾。培地は主として Krebs-Ringer 溶液を用いた。

4) 供材の中、ADP, CMP, UMP, V. B₆ は武田薬工研究所の御好意により分与されたものであり、グアニン, アデノシン, イノシン, オロト酸, ビオチン, パントテン酸, タウリン, アドレナリンは市販のものを用いた。イノシンは当研究室で抽出純化したものを用いた。システインはその塩酸塩, またその誘導体のシステイン-S-スルホン酸塩, チアゾリドン-4-カルボン酸塩も用いたが、それらは当教室で純化した結晶性粉末である。

これらの供料はいずれも使用培地 Krebs-Ringer の重曹緩衝溶液 (以上 K. R 液と略称) に溶解して実験に供した⁹⁾。濃度は前報イノシンの濃度の有効濃度⁹⁾から、各供材とも培地中終濃度として $2.5 \times 10^{-3}M$, $2.5 \times 10^{-4}M$, $2.5 \times 10^{-5}M$ のいずれかを選んだ。

5) その他の条件は前報に準じた⁹⁾。

実験成績

1. BSG の生成に及ぼす各供剤の影響

前報⁹⁾で詳述したように、イノシンを中心としたプリン系の代謝関連物質アデノシン, ADP などが BSG の生合成促進効果を発揮したこと、またイノシンはアデノ

表 1 牛血清 γ -グロブリン (BSG) 産生に及ぼす影響

供 剤	培 地 中 終 濃 度				対 照 群		産 生 量	
	2.5×10 ⁻⁴ M		2.5×10 ⁻⁵ M					
	O.D.	実測値 μg/g	O.D.	実測値 μg/g	O.D.	実測値 μg/g	2.5×10 ⁻⁴ M μg/g	2.5×10 ⁻⁵ M μg/g
Inosine	0.275	690	0.2	500	0.14	370	320	230
XMP	0.19	480	0.18	460	0.19	480		
CMP	0.18	460	0.18	460	0.19	480		
UMP	0.12	300	0.19	480	0.12	300	—	180
Uracil	0.24	610	0.21	530	0.30	760		
Orotic acid	0.36	930			0.35	900	30	
Biotin	0.18	460	0.18	460	0.20	500		
V.B ₆	0.21	530	0.18	460	0.21	530		
Pantothenic acid	0.37	940	0.35	900	0.38	970		
Cysteine	0.19	480	0.15	370	0.13	320	160	50
Cysteine-s-Sulfonate	0.24	610	0.23	590	0.23	590	20	
Thiazolidon-4- carboxylic acid	0.33	840	0.34	860	0.31	800	40	60
Taurin	0.13	320	0.11	260	0.15	360		
Na ₂ S ₂ O ₃	0.14	350			0.13	320	30	

註： 1) O.D. は 650 mμ における吸光度で、実測値とは前報⁵⁾の図 1 γ -グロブリン産生の検量標準曲線によって O.D. より換算した値である。実測値は肝湿重量 1g 当りの BSG 産生量である。

2) 培養は前報に準じ、2 時間培養である。

3) 対照群は Krebs Ringer 培地に牛肝スライスを培養したもので、供剤は入れてない。各供剤ごとに対照を附したのは、各供剤は表中濃度で 2~3 回の平均値であり、実験の都合上、各供剤ごと測定日が異つたためである。

シンの代謝分解産物であり、この間の酵素アデノシンデアミナーゼが SH 酵素で⁴⁾、システインはその賦活剤となつたばかりでなく、それ自身 BSG の産生促進効果を発揮したことから、その作用機構探究の一助として、システインとその誘導体 3 種をも選んだ。また無機グルタチオンの別名を有するチオ硫酸ソーダも実験に供した。山田氏¹⁸⁾によつて抗体産生促進効果が報告されている V. B₆ も対照的に採用し、またビオチンをも用いた。入手しえたプリン塩基以外の CMP, UMP, またオロット酸も実験に供した。

結果は表 I に示したように、供剤 13 種類のうちでシステイン、チアゾリドン-4-カルボン酸および UMP において若干有効性が認められた。

2. システインのイノシン効果に及ぼす影響

イノシンとシステインを同一培地に添加して両者の関係を追究した。システインは Co²⁺ イオンとキレート化合物¹²⁾を作り、KR 培地組成では両者の結合は強く、他の金属イオンと競合は起らない。そこでシステイン効果の培地中における調節者として CoCl₂ を併用した。

表 2 イノシンとシステインの加重現象

テスト 順位	Inosine		Cysteine		CoCl ₂		産生量 μg/g
	2.5× 10 ⁻⁴ M	2.5× 10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	10 ⁻⁵ M	10 ⁻⁶ M	
1	○						490 (40)
2		○					580 (130)
3			○				530 (80)
4	○		○				600 (150)
5		○		○			650 (200)
6	○		○		○		510 (60)
7		○		○		○	485 (25)
対 照							450

註： 条件は表 1 と同様

表 2 に示したように、この実験の範囲ではイノシンの 2.5×10⁻⁴M では著明な促進効果はみとめられなかった。イノシンを 2.5×10⁻⁴M, 2.5×10⁻⁵M としてシステイン量を 10⁻⁵M に添加した場合には、イノシン低濃度の方が有効であつた。Co²⁺ イオンはイノシン効果を阻害

しなかつた。イノシン、システイン、 Co^{2+} イオンの三者混合の場合にはシステインと Co^{2+} イオン効果はほとんど発揮されなかつた。

さきの報告でアデノシン、ADP のそれぞれ単独添加により BSG の産生促進効果がみられたが、これらに対してシステインの態度を観察するため、アデノシン、ADP はそれぞれ終濃度 10^{-5}M 、それにシステインを 10^{-4}M の終濃度になるように添加して過剰生産量をみると、アデノシン単独添加群は $155 \pm 8.3 \mu\text{g/g}$ 、アデノシンとシステイン添加群は $315 \pm 24.1 \mu\text{g/g}$ 、ADP 単独添加群は $60 \pm 3.7 \mu\text{g/g}$ 、ADP とシステイン添加群は $170 \pm 11.8 \mu\text{g/g}$ であつた。

システイン 単独添加群は $85 \pm 4.8 \mu\text{g/g}$ であつたからシンテンインは ADP およびアデノシンに対して加重現象あるいは相乗効果を発揮したものとといえよう。

CMP、グアニンに対しても同様の実験を行なつたが、いずれの場合にも加重あるいは相乗効果はみとめられなかつた。

表 3 はシステインの阻害剤の効果であるが、それら単独での BSG 産生には無影響が著しい阻害を示した。すなわちチオ尿素、ヨード加里はほとんど無影響、アトキシール、*p*-アミノ安息香酸、*p*-クロール安息香酸は著しく阻止的であつた。イノシンを $2.5 \times 10^{-5}\text{M}$ 、システインを 10^{-5}M の混合組成にこれら供剤を $10 \mu\text{g/ml} \sim 1 \mu\text{g/ml}$ の割になるように添加して BSG の産生量を測定したが、供剤単独の場合に近い結果であつた。

表 3 SH 阻害剤の効果

供 剤	添加量 $\mu\text{g/ml}$			対 照
	100	10	1	
Thiourea	360	360	350	360
Kalium iodate	360	360	360	360
Atoxyl	240	280	300	360
<i>p</i> -Aminobenzoic acid	260	260	260	410
<i>p</i> -Chlorobenzoic acid		260	300	410

註：測定条件は表 1 と同様

3. アドレナリンのイノシン効果に及ぼす影響

アドレナリンがアデノシンの分解酵素アデノシンデアミナーゼの活性促進効果を発揮することは明らかにされ、その機構も解明されている¹¹⁾。そこで BSG の生合成におけるアデノシンとイノシンの促進効果の影響を実験した。アデノシンとイノシンはそれぞれ終濃度 $2.5 \times 10^{-4}\text{M}$ として、これにアドレナリンを 10^{-4}M 終濃度にな

るように添加して 2 時間培養後の結果、アデノシン単独添加群 $120 \pm 8.5 \mu\text{g/g}$ 、アデノシン+アドレナリン添加群は $220 \pm 11.8 \mu\text{g/g}$ 、イノシン単独添加群は $200 \pm 11.3 \mu\text{g/g}$ 、イノシン+アドレナリン添加群は $60 \pm 5.9 \mu\text{g/g}$ 、の過剰産生で、アドレナリンはアデノシンに対して明らかに促進効果を示したが、イノシン効果に対しては却つて若干の阻害効果を発揮した。

4. UMP, CMP の BSG の産生促進効果

表 1 に明らかなように、UMP の添加は BSG の産生促進効果を発揮したのでプリン塩基以外の塩基の観察をかねて、UMP (ウリジン・5' リン酸) の量的関係を実験した。なお CMP においては同様実施してみたが、この場合にはその濃度に関係なく促進効果はみとめられなかつた。

表 4 UMP の濃度の影響

UMP 添加量 終 濃 度	Net-production $\mu\text{g/g}$
10^{-3}M	30 ± 2.8
10^{-4}M	90 ± 5.3
10^{-5}M	140 ± 11.6
10^{-6}M	140 ± 8.3
10^{-7}M	30 ± 5.0
10^{-8}M	30 ± 3.9
Control	0

総括ならびに考察

以上の実験成績により、第 1 報の成績に追加して用いたイノシン代謝関連物質による BSG の生合成に及ぼす影響はほとんどみられるべきものがなかつた。しかしながらアデノシン→イノシンの反応系において、システインは SH 酵素アデノシンデアミナーゼの賦活効果があるところからシステイン並びにその誘導体を用いたところ、単独添加においてシステインは BSG 産生促進効果を著明に発揮し、チアゾリドン-4-カルボン酸は有効性を示し、システイン-S-スルホン酸は無影響であつた。タウリンはかえつて阻害的に作用した。従来システインは活動免疫の過程で併用すれば抗体産生を促進し、また免疫動物の液性抗体の血流中動員促進効果を有することが明らかにされている¹⁴⁾⁻¹⁷⁾。in vitro で BSG の産生促進効果を発揮したことは誠に興味ある成績といわねばならない。 Co^{2+} イオンはシステインと水溶液中で 1 : 2 あるいは 1 : 3 のキレート化合物を形成することは明らかである¹²⁾。そこでこの性質を応用して、イノシンに

対するシステイン効果を観察するに、システインはイノシン効果と加重効果を発揮した。アデノシン効果に対してはアデノシンデミニナーゼに対する賦活と同様に BSG の産生に対しても賦活的であり相乗効果を思わせる結果がえられた。

アドレナリンは ATP やアデノシンからイノシンの形成促進効果を発揮し、同時にイノシンの分解阻止効果を発揮することが萩原ら⁴⁾により明らかにされている。そこでアデノシン、イノシンに対する影響を観察するに、前者には賦活効果を発揮し、後者にはかえって阻害効果を発揮した。

これらの結果からシステインとアドレナリン BSG の産生に対して作用機構上相当の相違を有することが明らかになる。ところが、この現象から生体内変動を考察すれば、抗原の侵襲は交感神経系緊張相を示し¹³⁾、芝¹⁴⁾⁻¹⁷⁾、片岡⁵⁾⁻⁶⁾らが明らかにしている SH 系物質(還元グルタチオン、システイン、ビタミンCなど)の著しい減少からアデノシン→イノシンの賦活系はアドレナリンに依存することの方が大であると考えられることである。しかも榑原らの明らかにしたアドレナリンはイノシンの分解を阻害遅延せしめる作用を発揮するという現象⁴⁾から考えて、抗体産生におけるイノシンの意義は極めて大であるといえよう。

チオ尿素、ヨード酸加里、アトキシール、*p*-アミノ安息香酸、*p*-クロール安息香酸のような SH 基阻害剤や重金属 Co^{2+} イオンは BSG の産生に無影響か阻害作用を発揮したことは当然といえよう。しかしながら、オロトン酸、V.B₆、パントテン酸などがともに無影響であったことは半ば期待に反した成績であつた。ピオチンもかえって阻害的に作用したことは興味ある問題であろう。

以上の成績と前報での成績³⁾の中で、プリン系物質の相互関係と個々の BSG 生合成促進効果(+)を示したものが図1である。ウサギでの血流中抗体動員効果と若干作用上の相違はあつたが、ここで BSG 産生係促進効果を発揮した物質は抗体動員効果をも発揮している。

プリン系以外にピリミジン塩基の中でたまたま UMP が促進的に作用したことは興味ある問題である。

結 論

前報に引続き、定量的沈降反応を応用して牛肝より血清 γ グロブリン (BSG) の生合成の可能なことを証明し、ノイシンを中心とした関連物質の BSG 産生促進効果の有無を実験して次のごとく結果がえられた。

1) 供剤 13 種の中、システインはそれ自体で BSG

図 1 イノシン生成段階と牛血清 γ -グロブリンの生成効果との関係

註：(+)印は牛血清 γ -グロブリン (BSG) 産生促進効果を発揮することを意味し(++)印はかなり促進効果があり、(+++)印は顕著な促進効果を発揮する。(一)印は無影響か、あるいは却つて低下せしめる場合を意味する。(また (+) 印の物質は凝集素抗体の血流中動員効果を発揮した成績に一致した)

図 2 BSG 産生促進効果

の産生促進効果がみとめられた。またその誘導体チアゾリドン-4-カルボン酸には有効性はみとめられたが、システイン-S-スルホン酸は無影響、タウリンではかえって阻害効果がみとめられた。

2) システインはアデノシンとの併用において相乗効果を発揮し、イノシンおよび ADP との併用において加重効果を発揮した。

3) XMP, CMP, ウラシル, オロトン酸などは無影響であつた。

4) SH 阻害剤チオ尿素, ヨード酸加里, アトキシール, *p*-アミノ安息香酸, *p*-クロール安息香酸, Co^{2+} イ

オンなどは無影響か阻害作用を発揮した。

5) V. B₆, ビオチンおよびパントテン酸はほとんど無影響か阻害的であつた。

6) ウリジン-5'-リン酸 (5'-UMP) は BSG の生成促進効果を発成し、その効果はほぼシステインに匹敵した。

7) アドレナリン作用は単独ではかえつて阻害効果を示したが、アデノシンに対しては賦活効果を発揮した。しかしながらイノシンとの併用においては無効か阻害的であつた。

8) アドレナリンとシステインの作用差はアデノシンとの併用においてアドレナリンは賦活効果があり、システインは相乗効果または加重効果であつた。またイノシンとの併用においてアドレナリンは阻害効果であり、システインは加重効果であつた。この現象は生体への抗原侵襲早期の生体反応相に徴して極めて興味ある問題である。抗原侵襲早期には交感神経系緊張相のため、アドレナリン過多で、しかも血流並びに組織中の SH 化合物減少より抗体動員機構の経過を説明する重要な知見といえよう。

稿を終えるに当たり、榊原教授の御懇切なる御指導と

御校閲に対し深甚なる感謝の意を現わすものである。

なお本論文の要旨は昭和 41 年日本細菌学会総会 (於広島) において発表した。

文 献

- 1) 東恵彦(1958): 生化学, **30**, 472-477.
- 2) 東恵彦(1958): 生化学, **30**, 1037-1042.
- 3) 広尾哲三(1965): 日本細菌学雑誌, **20**, 617-622.
- 4) 萩原一成(1960): 四天王寺短期大学紀要, **8**, 86-97.
- 5) 片岡保幸(1958): 日本細菌学雑誌, **13**, 112-122.
- 6) 片岡保幸(1958): 日本細菌学雑誌, **13**, 540-545.
- 7) 神田隆吉(1959): 日本細菌学雑誌, **14**, 177-185.
- 8) 神田隆吉(1959): 日本細菌学雑誌, **14**, 223-228.
- 9) 榊原栄一(1959): 日本細菌学雑誌, **14**, 868-872.
- 10) 榊原栄一(1962): 日本細菌学雑誌, **17**, 428-433.
- 11) 榊原栄一(1964): 日本細菌学雑誌, **19**, 61-67.
- 12) 榊原栄一(1959): 仁泉医学, **8**, 669-678.
- 13) Sakakibara. E. (1964): Memoirs Osaka Gaku-gei University, B 15, 255-274.
- 14) 芝隆夫(1955): 日本細菌学雑誌, **10**, 1035-1041.
- 15) 芝隆夫(1956): 日本細菌学雑誌, **11**, 59-62.
- 16) 芝隆夫(1956): 日本細菌学雑誌, **11**, 297-299.
- 17) 芝隆夫(1956): 日本細菌学雑誌, **11**, 385-390.
- 18) 山田弘三(1960): ビタミン, **20**, 515-523.

Influence on Bio-synthesis of Bovine Serum *Gamma* Globulin of the Antibody-Promoting Substance "Inosine" (Part 2)

Tetsuzo HIROO

Department of Hygiene, Osaka Kyoiku University

(Head: Prof. E. Sakakibara, M. D.)

In the previous report, it was made clear that inosine, the antibody-promoting factor, accelerated the biosynthesis of bovine serum *gamma* globulin (BSG) when applied to the quantitative precipitation test. In the present investigation, 13 substances were selected from among those related to inosine metabolic degradation, and examined *in vitro* to clarify the interrelations between their action and inosine in the biosynthesis of BSG.

I. Of these substances tested, cysteine increased the formation of BSG, whereas its derivatives, such as thiazolidon-4-carboxylate, cysteine-s-sulfonate, and taurin, were ineffective or inhibitory. When cysteine was used together with adenosine, it displayed a potential effect on the biosynthesis of BSG. Moreover, it displayed an additional effect when used together with either inosine or ADP.

2. XMP, CMP, uracil and orotic acid did not act effectively upon the biosynthesis of BSG.

3. SH-inhibiting substances, such as thiourea, potassium iodate, atoxyl, *p*-aminobenzoic acid, *p*-chlorobenzoic acid, and cobaltous ion, had an ineffective or inhibitory action upon the biosynthesis of BSG. UMP alone displayed such an accelerating effect as that of cysteine.

4. Pyridoxal, biotin and pantothenic acid had hardly any effect upon the biosynthesis of BSG.

5. When used alone, adrenalin exerted an inhibitory action on the biosynthesis of BSG and a stimulating effect upon the adenosine action.