血清反応における帯現象に関する研究

特にケファリン及び蛋白分解酵素の影響について

飯 田 毅

傳染病研究所病理学研究部 (部長 宮崎吉夫教授)

亀 子 宗 平

東京大学医学部衛生学教室 (教授 羽里彦左衛門)

〔受付: 9月10日 1953年〕

加熱抗血清に見られる帯現象の発現因子としての所謂アグルチノイドの本態に関する研究は従来多数の研究者によつて行われたが、羽里、飯田、風間等 (1951) はアグルチノイドは加熱により產生される血清アルブミンと抗体グロブリンとの複合体であるとする Kleczkowski (1941), Bawden & Kleczkowski (1942), Jennings & Smith (1942), Krejci, Jennings & Smith (1942) 及び Kleczkowski (1943) 等の報告を追試確認し更にかくして生じたアグルチノイドは Van der Scheer, Wyckoff & Clarke (1941) 等の酸性沈澱法で比較的容易に且つ純粋に分離し得ること、更にまた菌体附着蛋白素量は加熱抗血清の場合において対照抗血清のそれより大であることを報告した。Horsfall & Goodner (1935) は脱脂脂体処置により凝集作用の消失を来した抗肺炎球菌家兎血清のケファリン添加により凝集作用の復元が認められることを報告し、Pope (1938~9) は加熱ジフテリア抗毒素血清の flocculation は無処置抗血清に比し遅延乃至減弱を来すがペプシン消化により加熱によるかゝる影響を除去し得ることを明らかにした。

われわれは本実験において 68°C 30 分加熱抗 O₉₀₁ チフス菌家兎血清の示す帯現象に対し、抗血清のケファリン添加及び蛋白分解酵素の消化作用が如何なる影響を及ぼすかについて凝集反応及び電気泳動法を用い研究したのでその結果を報告する。

実験材料及び実験方法

1. 抗血清のケファリン添加 Wadsworth, Maltaner & Maltaner (1934) の方法に準じた。使用ケファリンは Folch (1942) の法に従つて新鮮モルモット脳より分離精製したものである。その 1% エチルエーテル溶液を 45°C 水槽中で蒸発せしめた後、45°C に保温された等量の生理的食塩水を急速に添加混合して清澄な溶

液を得。これを 56°C 並びに 68°C 30 分間加熱抗血清のそれぞれに 1:200, 1:500, 1:1,000, 及び 1:10,000 になるように添加振盪混和した。混合物を 37°C 2 時間、更に冷蔵庫に一夜放置した後、型の如く凝集反応を行つた。

2. 抗血清のペプシン消化 使用ペプシンは「ミタニ」製薬「濃ペプシン」をそのまま使用し単位の検定は行わなかつた。2 倍稀釈抗血清に等量の 1% ペプシン液を加え、1N HCl で pH 4.0 に修正し 37°C 1 時間、2 時間及び 3 時間消化し、それぞれを 1N NaOH で中和した後凝集反応を行つた。

3. 電気泳動術式。日立製 Tiselius 電気泳動装置を用い、m/20 磷酸緩衝液 (pH 8.0) 80V, 8mA, 5°C の条件下で行われた。凍結乾燥材料を原血清量の蒸留水に溶解、約 40 倍量の m/20 磷酸緩衝液に 24 時間透析した後実験に供した。

実験成績

1. ケファリン添加の 68°C 30 分加熱抗血清の凝集反応に及ぼす影響

表 1 は高度の抑制帯を示す 68°C 30 分加熱 O₉₀₁ チフス菌抗血清に種々の割合にケファリンを添加した場合の成績である。抑制帯はケファリン添加により著しく縮小され、同時に凝集能の増強乃至復元も認められたが、特に 1:1000 の割合に添加した場合において顯著であつ

IIDA, Tsuyoshi and KAMEKO, Sohei: Studies on the zone phenomenon in antisera with special reference to the effect of cephalin and proteolytic enzyme: The Institute for Infectious Diseases and the Department of Hygiene, School of Medicine, University of Tokyo. — Jap. J. of Bact., (8), 849-852, 1953.

表 1 ケファリン添加の加熱抗 O_{901} チフス菌家兎血清の凝集反應に及ぼす影響

	添加ケファリン量	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	対照
68°C 30分 加熱 抗血清	0	—	—	—	—	—	—	±	+	+	(+)	—
	1:200	—	—	—	±	+	++	++	++	++	++	
	1:500	—	—	—	±	+	++	++	++	++	++	
	1:1000	—	—	+	(++)	++	++	++	++	++	++	
	1:10000	—	—	—	—	+	++	++	++	++	+	
56°C 30分 加熱 抗血清	0	++	++	++	++	++	++	++	++	(++)	+	
	1:200	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
	1:500	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
	1:1000	++	++	++	++	++	++	++	++	++	++	
	1:10000	+	++	++	++	++	++	++	++	++	++	

表 2 ペプシン消化加熱抗 O_{901} チフス菌家兎血清の示す凝集反應

	ペプシン消化	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	対照
56°C 30分 加熱 抗血清	1時間	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
	2 "	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	
	3 "	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	
	対 照	++	++	++	++	++	++	++	++	+	—	
68°C 30分 加熱 抗血清	1時間	++	++	++	++	++	++	(++)	+	—	—	
	2 "	++	++	++	++	++	++	+	+	—	—	
	3 "	++	++	++	++	++	++	+	+	—	—	
	対 照	—	—	—	—	—	±	+	+	(+)	—	

註 消化條件。pH 4.0 37°C

表 3 ペプシン消化並にケファリン添加が 68°C 30分加熱抗血清の "C,, 分割溶液の凝集反應に及ぼす影響

抗 血 清	ペプシン消化 (0.5%)	ケファリン	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	対照
56°C 30分加熱	/	/	++	++	++	++	++	++	++	+	+	—	—
68°C 30分 "	/	/	—	—	—	—	—	±	+	+	±	—	
68°C 30分 加熱 抗血清の酸沈澱 上清液	/	/	++	++	++	++	++	+	—	—	—	—	
68°C 30分 加熱 抗血清の "C,, 分割溶液	pH 4.0 37°C 2時間	/	++	++	++	++	++	++	+	—	—	—	
	/	1:1000 添 加	—	+	++	++	++	++	++	+	±	—	
	/	/	—	—	—	—	—	—	—	+	±	—	

た。56°C 30 分加熱抗血清に対してはケファリン添加は高度稀釈部分における凝集反應を幾分増強させるような結果を示した。

2 ペプシン消化の 68°C 30 分加熱抗血清の示す凝集反應に及ぼす影響

抗血清は酸性下ペプシン消化により時間と共に沈澱を生ずるが NaOH で pH 7.0 に修正すれば全く清澄とな

る。外観的に琥珀色、粘稠性を有する 68°C 30 分加熱抗血清も消化後においてはかゝる性状が消失し 56°C 30 分加熱抗血清のそれと全く同様となる。

表 2 はペプシン消化抗血清の凝集反應の結果を示す。表が示す如く 56°C 30 分加熱抗血清に於ては消化による影響は殆んど認められなかつたが、68°C 30 分加熱抗血清においては顕著な抑制帯が完全に消失し、56°C 30 分

加熱抗血清と同程度の凝集能の復元が認められた。

3. ケファリン添加及びペプシン消化の 68°C 30 分加熱抗血清から酸性沈澱法により分離した "C", 分割溶液に及ぼす影響

68°C 30 分加熱抗血清を Vander Scheer 等に従い pH6.0 にし遠心沈澱して得る "C", 分割溶液は殆んどすべてが凝集反応を抑制するアグルチノイドよりなることは羽里, 飯田, 風間等により明らかにされているので, 上述ケファリン添加並びにペプシン消化が本分割溶液に対しても前述同様の影響を及ぼすかを検した。

表 3 から明らかなる如く, 68°C 30 分加熱抗血清から Van der Scheer の酸性沈澱法により得た "C", 分割には尙お少量の健全抗体の残存していることが認められるが, これに 1:1000 の割合にケファリンを添加する時は全血清を用いた場合と同様抑制帯の著しい縮小と凝集作用の復元とが認められた。またペプシン消化によつては抑制帯の完全な消失が見られ対照抗血清と同程度の凝集能の復元が認められた。

4. 68°C 30 分加熱抗血清の電気泳動的研究

図 1 68°C 30 分加熱抗 O₉₀₁ チフス菌家兔血清の電気泳動図

図 (1) 68°C 30 分加熱抗血清の電気泳動図。

Van der Scheer 等の所見と同様, 56°C 30 分加熱対照抗血清に比べ, アルブミン及び γ グロブリンの山が低くなり, α, β グロブリンを基として新しい山 "C", の出現が認められた。

(2) 68°C 30 分加熱抗血清より酸性沈澱法で分離した "C", 分割溶液の電気泳動図

アルブミンの山は完全に消失しているが, γ グロブリンは少し残存している所見が得られた。一方 "C", 分割を除去した遠心上清の電気泳動図においては, アルブミンの著明な残存と γ グロブリンの存在が認められた。然しながら, α, β の示す山は 56°C 30 分加熱抗血清のそれと比べ非常に不鮮明であつた。

(3) ペプシン消化 68°C 30 分加熱抗血清の電気泳動図 56°C 30 分並びに 68°C 30 分加熱抗血清を前実験と同様方法でペプシン消化する時は, いづれの場合においても γ の位置に無処置抗血清のそれよりも高い山が出現し, それ以外は消失している所見が認められた。即ち 68°C 30 分加熱抗血清では新しい山 "C", が出現しそれに伴つて γ , アルブミンの山が低くなることが認められたのであるが, ペプシン消化により "C", の山が消失する一方 γ の山が高くなるのである。この所見は前述の凝集反応でペプシン消化により 56°C 30 分加熱抗血清の示す凝集作用と同程度の凝集作用を呈した所見と関連し興味深いことである。なお "C", 分割ペプシン消化溶液の電気泳動図においても全く同様の所見が得られた。ペプシン消化後に出現する γ の山について, Van der Scheer, Wyckoff & Clarke (1941) は同様消化抗毒素血清の電気泳動的研究で, 短時間消化では消化過程に生ずる電気泳動的に不均一な物質に起因するものと解釈した。

図示しなかつたが 0.1% ケファリン添加加熱抗血清の電気泳動所見は添加前の抗血清のそれと差異が認められなかつた。

考 察

Horsfall & Goodner は脱脂脂体処置抗肺炎球菌家兔血清は凝集作用を示さないが, 抗血清を動物腹腔内に注射し一定時間後に採取した腹腔液, またはケファリン添加抗血清は凝集作用を示すことを報告したが, 本実験において, 68°C 30 分加熱抗 O₉₀₁ チフス菌家兔血清に 0.1% の割合にケファリンを添加することにより抑制帯の縮小と凝集作用の顕著な復元が認められ更にまた酸性沈澱法により加熱抗血清より分離した "C", 分割溶液についても同様の結果を得た。

抗血清の加熱処置によつて生ずるアグルチノイドがアルブミン-抗体グロブリン複合体であることは Kleczkowski 等, Jennings 等及び羽里等によつて明らかにされたところであるが, 抗原との結合力を保持しているにも拘らず可視性凝集物を形成しないのは, 複合体の構成成分であるアルブミンが抗原抗体反応の第 2 段階の進行に阻制的に作用することに起因するものであることが推察される。Pope は, flocculation の遅延乃至減弱を示す加熱ジフテリア抗毒素血清を蛋白分解酵素で消化すると再び加熱前の反応力に復元せしめ得ることを報告した。われわれも本実験で 68°C 30 分加熱抗 O₉₀₁ チフス菌家兔血清並びに, 酸性沈澱法で加熱抗血清より分離した

"C,, 分割溶液をペプシン消化することにより, 56°C 30分加熱対照抗血清と殆んど同程度まで凝集作用を復元せしめ得た。この際かゝる消化抗血清は同一條件で消化した 56°C 30分加熱抗血清と電気泳動的に全く同一所見を示した。

これらの所見より, ケファリン添加による加熱抗血清の凝集作用の復元乃至増強は, ケファリンが抗体グロブリンに結合したアルブミンの親水性を弱めることに起因し, ペプシン消化によるそれは抗体グロブリンと結合したアルブミンが消化されて抗体が裸になることによるものであると考えられる。

結 論

1. 68°C 30分加熱抗 C₉₀₁ チフス菌家兎血清並びに酸性沈澱法で分離した "C,, 分割溶液に 0.1% にケファリンを添加すると抑制帯の縮小及び凝集作用の復元並びに増強が認められる。

2. 68°C 30分加熱抗 O₉₀₁ チフス菌家兎血清並びに "C,, 分割溶液をペプシン消化すると完全な凝集作用の復元が認められる。

3. 電気泳動図上, 抗 O₉₀₁ チフス菌家兎血清の 68°C 30分加熱により新しい山 "C,, の出現が見られ, この山はペプシン消化により容易に消失し, 56°C 30分加熱対照抗血清を消失した場合と全く同一像を示す。

終りに臨み御指導を頂いた羽里教授に深謝すると共に電気泳動を行うに際し御援助を頂いた傳研第3研究部服部学士に謝意を表する。

文 献

- 1) Bawden, F. C. and Kleczkowski, A.: Brit. J. Exp. Path., 23, 1942, 178 (Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 3rd Ed. 1946 より引用)
- 2) Folch, J.: J. Biol. Chem., 146, 1942, 35
- 3) 羽黒彦左衛門, 風間新助, 飯田毅: 昭和26年2月傳研学術集談会発表
- 4) Horsfall, F. L. Jr. and Goodner, K.: J. Exp. Med., 62, 1935, 485
- 5) Jennings, R. K. and Smith, L. D.: J. Imm., 45, 1942, 105
- 6) Kleczkowski, A.: Brit. J. Exp. Path., 22, 1941, 188; Biochem. J., 37, 1943, 30. (Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity, 3rd Ed., 1946 より引用)
- 7) Krejci, L. E., Jennings, R. K. and Smith, L. D., J. Imm., 45, 1942, 111
- 8) Pope, C. G.: Brit. J. Exp. Path., 19, 1938, 245; 20, 1939, 132, 201
- 9) Scheer, van der, J., Wyckoff, R. W. G. and Clarke, F. H.: J. Imm., 40, 1941, 39, 349
- 10) Wadsworth, A., Maltaner, E. and Maltaner, F.: J. Imm., 26, 1934, 25