牛血清の γ_1 -グロブリン分画に対応する蛋白成分

千 田 広 文*

広島県久井家畜保健衛生所（御調郡久井町江木 1204, 〒722-13）

（平成 4 年 1 月 29 日受付・平成 5 年 3 月 19 日受理）

Protein Component Corresponding to the γ_1 -globulin Fraction
in Protein Fractions of Bovine Serum

Hirofumi SENDA

Kui Livestock Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture, Kui-cho, Mituki-gun, Hiroshima-ken 722-13, Japan

SUMMARY

One protein component corresponding to the γ_1 -globulin fraction (γ_1 -fraction) of bovine serum observed by cellulose acetate electrophoresis was recognized. This component (γ_1 -component) formed a precipitation line which was detected on the cathode side of the transferrin precipitation line and on the anode side of the IgG precipitation line by immunoelectrophoresis with anti-bovine whole serum. It was contained in fractions dissolved with 0.06 M and 0.08 M phosphoric acid buffer solutions in DEAE-cellulose chromatography. The γ_1 -component was precipitated after dialysis with distilled water. The crude γ_1 -component still contained a small amount of IgG. The γ_1 -component was purified by removal of this IgG by the method of affinity chromatography using a Hormyl-Cellulofine -column (Seikagaku Kogyo Co., Ltd) combined with anti-bovine IgG. The γ_1 -component was a protein other than the main proteins of IgG₁, IgG₂, IgM and IgA, which are contained in γ -globulin fractions. This suggested that the protein component is not one of the immunoglobulins corresponding to the γ_1 -fraction of bovine serum and that γ_1 -fraction may be formed more clearly as the component increases.

—Key Words : bovine serum, immunoelectrophoresis, purification, γ_1 -globulin fraction.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 46, 549~553 (1993)

要 約

セルロースアセテート電気泳動法による牛血清蛋白分画の γ_1 -グロブリン分画（ γ_1 -分画）に対応する 1 つの蛋白成分（ γ_1 -成分）が確認された。この γ_1 -成分は免疫電気泳動法ではトランスフェリンの沈降線より陰極側で IgG の沈降線の陽極寄りに観察され、DEAE-セルロースを用いたイオン交換クロマトグラフィーでは 0.06 および 0.08 M のリン酸緩衝液で溶出され、蒸留水に対する透析で沈澱した。これらの操作とアフィニティクロマトグラフィーにより IgG を除去して精製した γ_1 -成分は、 γ -グロブリン領域の主な構成成分である IgG₁, IgG₂, IgM, IgA とは異なった成分であった。また、本成分の増加により γ_1 -分画がより明瞭になるものと推察された。

—キーワード：牛血清，免疫電気泳動，精製， γ_1 -グロブリン分画。

-----日獣会誌 46, 549~553 (1993)

牛血清はセルロースアセテート膜*（セパラックス：CA 膜）を支持体とした電気泳動法によりアルブミン、 α -, β -および γ -グロブリンの 4 分画に分画される¹²⁾。さらに、個体によっては α -グロブリン分画は α_1 -と α_2 -に、 γ -グロブリン分画（ γ -分画）は γ_1 -（ γ_1 -分画）と γ_2 -にそれぞれ細分画される例があり¹²⁾、牛血清では γ -分画が γ_1 と γ_2 に細分画される例が多い^{11, 12)}ことが報告さ

れている。

いっぽう、著者¹¹⁾は電気泳動した CA 膜を観察することにより γ_1 -分画に対応して単一のバンドが認められること、また一部の牛群（肝蛭濃厚感染地域の牛）ではこの γ_1 -分画が観察される例が著しく多いことを報告した。各分画を構成する蛋白成分についてはすでに多くのものが明らかにされており、これら蛋白成分レベルでの増

* 現所属：広島県東広島家畜保健衛生所（東広島市西条御条町 1412-1, 〒724）

Present address : Higashihiroshima Livestock Hygiene Service Center, Hiroshima Prefecture, Higashihiroshima-shi, Hiroshima-ken 724, Japan

減に基づく診断的意義^{12,13)}も明らかにされている。しかし、牛の γ_1 -分画に対応した蛋白成分やその蛋白成分の増減による診断的意義についてはあまり明らかではない。そこで、この γ_1 -分画に対応する蛋白成分の検討および精製を試みた。

材料および方法

材 料

供試血清として、前報¹¹⁾の型別により γ_1 -分画が明瞭に観察された40例の牛血清と適切に初乳が給与された2日齢の子牛1頭の血清を供試した。血清は血液採取後室温に静置し自然凝固をまち、2500rpmで10分間遠心分離を行い分離した。

方 法

免疫電気泳動法およびCA電気泳動法：いずれも常法⁷⁻¹⁰⁾どおり実施した。電気泳動法については支持体にセルロゲル*を使用した方法も実施し、ニグロシンによる染色も実施した。免疫電気泳動法には市販の抗牛IgG₁*, 抗牛IgA*および抗牛IgM*と、常法^{9,14,16)}により作製した抗牛IgG, 抗牛全血清および γ_1 -分画に対応する蛋白成分(γ_1 -成分)に対する抗血清(抗牛 γ_1 -成分)を使用した。また、 γ_1 -分画に対応する蛋白成分を確認するため電気泳動したCA膜を免疫電気泳動用の寒天板上に置き、両側の溝に各種抗血清を入れて反応させ沈降線を形成させた。

硫酸塩析：常法^{1,7,16)}どおり実施した。すなわち、牛血清を50%飽和による硫酸塩析を行って得られた沈殿分画をリン酸緩衝食塩液(PBS)で溶解して透析した後、さらに33%飽和塩析を実施した(同一操作を3回繰り返し実施)。これにより得られた上清の分画(牛血清の33~50%飽和硫酸塩析分画)を採取し各種溶液を用いて透析した。また、血清を30%飽和による硫酸塩析を行い、その上清を35%飽和さらに上清を40%飽和、その上清を45%飽和塩析して、それぞれの沈殿分画を採取し(30, 30~35, 35~40 および 40~45%飽和硫酸塩析分画)検討を行った。

透析法および濃縮法：各分画の透析¹⁶⁾は透析膜に試料を充填し、4℃で各種透析液に対してスターラーで攪拌しながら24~72時間実施した。透析液は1日3~4回交換した。蛋白液の濃縮^{7,16)}は透析膜に試料を入れて20~30%のポリエチレングリコール中で適当な濃度に濃縮し

図説

図1 γ_1 -成分の精製方法

た。

イオン交換およびゲル濾過クロマトグラフィー：イオン交換クロマトグラフィー^{1,7,16)}には各種濃度のリン酸緩衝液(PB)で平衡化したDEAE-セルロース*を2×25cmのカラムに充填して使用した。溶出はPBの濃度を0.005M(pH 8.0)または0.02M(pH 7.2)から段階的に上昇させることにより実施した。ゲル濾過クロマトグラフィー^{1,7,16)}は常法により膨潤させたSephadex G-200*をカラム(2.6×90cm)に充填し実施した。これらの溶出液はフラクションコレクターを用いて4mlから2mlの範囲で一定量ずつ採取し、分光光度計で吸光度(O.D. 280nm)を測定した。また、吸光度の高い分画を集めて濃縮し、各種透析液を用いて透析した。

アフィニティークロマトグラフィーによるIgGの除去：抗牛IgG 免血清を33%飽和による硫酸塩析を行って得られた沈殿分画をPBSで溶解して透析した(同一操作を3回繰り返し実施)。この分画を最後に0.1M NaCl加0.2M リン酸-カリウム-リン酸二ナトリウム緩衝液(pH 7.2; Na-K PB)を用いて透析し、ホルミル-セルロファイン*と結合させた。作成した抗牛IgG-ホルミル-セルロファイン免疫吸着体は1×25cmのカラムに充填し、0.2M グリシン-HCl(pH 2.5), 0.5M NaCl加0.005M Na-K PB(pH 7.2)を用いて順次洗浄後、少

* セルロースアセテート膜：(株)常光

* セルロゲル：生化学工業(株)

* 抗牛IgG₁：Serotec Ltd.

* 抗牛IgA：Miles Scientific

* 抗牛IgM：Cooper Biomedical Inc.

* DEAE-セルロース：Brown Co.

* Sephadex G-200：Pharmacia Fine Chemicals

* ホルミル-セルロファイン：生化学工業(株)

図2 γ_1 分画に対応する蛋白成分 (左側:陽極)
電気泳動した CA 膜を寒天板上に置き各種抗血清と反応
1: 抗牛全血清, 2: 抗牛 γ_1 成分, ⑤: 牛血清を電気泳動した CA 膜, ①: 精製した γ_1 成分を電気泳動した CA 膜

量の IgG を含む粗精製な γ_1 成分を材料としてアフィニティクロマトグラフィーを行った。流出液はフラクションコレクターで 1.5ml ずつ採取して吸光度が高い分画を集め濃縮し、PBS または生理食塩液を用いて透析した。これらの操作は IgG が検出されなくなるまで繰り返し実施した。

抗血清の作製方法: 常法^{9,14,16)}により、抗牛全血清、抗牛 IgG および抗牛 γ_1 成分を作製した。抗牛全血清には 36 頭分のプール血清を、抗牛 IgG には市販の IgG* を抗原として使用した。なお、抗牛 γ_1 成分は少量の IgG が含まれる粗精製な γ_1 成分を家兎に免疫し、 γ_1 成分に対する抗体と同時に産生された IgG に対する抗体をアフィニティクロマトグラフィーにより除去することにより作製した。アフィニティクロマトグラフィーは前述の方法に準じて IgG とホルミル-セルロファインの免疫吸着体を作製し実施した。

蒸留水に対して透析した場合の γ_1 成分の動向: 血清を蒸留水に対して透析し、遠心分離 (4°C 9000rpm 20 分) した。得られた沈殿は生理食塩液に溶解し、遠心上清は同液にて透析した後、沈殿と上清のどちらの分画に γ_1 成分が含まれるかを検討した。

γ_1 成分の精製方法: 図 1 に示した方法により γ_1 成分の精製を行った。

成 績

γ_1 分画に対応する蛋白成分: 電気泳動した CA 膜と抗牛全血清を反応させたところ、 γ_1 分画に対応して 1

図3 硫酸塩析による γ_1 分画の動向 (支持体:セルロゲル, 上側:陽極)
1: 40~45%飽和硫酸塩析分画, 2: 35~40%飽和硫酸塩析分画, 3: 30~35%飽和硫酸塩析分画, 4: 30%飽和硫酸塩析分画

本の沈降線が観察された (図 2)。また、免疫電気泳動法による牛血清と抗牛全血清の反応では、トランスフェリンの沈降線より陰極側では IgG (IgG₁, IgG₂) と IgM の沈降線のほか IgG の沈降線の陽極寄りに 1 本の沈降線が認められた。

硫酸塩析における γ_1 分画の動向: 牛血清の 30, 30~35, 35~40 および 40~45%飽和硫酸塩析分画の電気泳動像 (支持体セルロゲル) では、 γ_1 分画は 35~40 および 40~45%飽和硫酸塩析分画でよりはっきりと認められた (図 3)。さらに、これら分画を免疫電気泳動法により抗牛全血清と反応させた結果、トランスフェリンの沈降線の位置より陰極側には IgG の沈降線とともに IgG の沈降線の陽極寄りにもう 1 本の沈降線が認められ、これらは硫酸塩析によるいずれの分画にも認められた。以下、免疫電気泳動法で IgG の沈降線の陽極寄りの位置に沈降線を形成する蛋白成分 (γ_1 成分) について検討した。

イオン交換クロマトグラフィーによる γ_1 成分の動向: 牛血清の 33~50%飽和硫酸塩析分画を DEAE-セルロースによるイオン交換クロマトグラフィーによりさらに分画したところ、 γ_1 成分は 0.06M および 0.08M PB (pH 7.2) で溶出した分画に含まれていた。

ゲル濾過クロマトグラフィーによる γ_1 成分の動向: 牛血清の 33~50%飽和硫酸塩析分画を Sephadex G-200 を用いたゲル濾過クロマトグラフィーにより分画したところ 2 峰に分離された。これら流出液を第 1 峰と第 2 峰の前半、中央および後半部の 4 つに分画し検討したところ、 γ_1 成分は第 1 峰には全く含まれていなかったが、第 2 峰の各分画には IgG とともに含まれていた。

蒸留水に対して透析した場合の γ_1 成分の動向: 血清を蒸留水に対して透析した結果、 γ_1 成分は IgG などとともに沈殿の分画に含まれていた。

* 牛 IgG: Miles Inc. Research Products Division

図4 γ_1 -成分とIgA, IgMとの関係(左側:陽極)
1: 抗牛 γ_1 -成分, 2: 抗牛IgA, 3: 抗牛全血清,
4: 抗牛IgM, ⑤-1: 初乳接種後1日目の子牛血清,
⑤-2, ⑤-3: 成牛血清

γ_1 -成分の精製: 図1に示した方法により γ_1 -成分が精製された。精製した γ_1 -成分は免疫電気泳動法により抗牛全血清と反応させた結果、IgGの沈降線の陽極寄りの位置に1本の沈降線が認められた(図2, 5)。

作製した抗牛 γ_1 -成分: 作製した抗牛 γ_1 -成分は、免疫電気泳動法による牛血清との反応ではIgGの沈降線の陽極寄りの位置に、泳動したCA膜との反応では γ_1 -分画に対応して1本の沈降線を形成した(図2, 4)。

γ_1 -成分とIgA, IgM, IgG₁およびIgG₂の関係: 免疫電気泳動法により成牛血清および初乳接種後1日目の子牛血清と各種抗血清を反応させたところ、形成されたIgM, IgAおよび γ_1 -成分の沈降線はそれぞれ異なっていた。また、成牛血清と抗牛IgAの反応では沈降線が形成されなかったが、抗牛 γ_1 -成分とは沈降線が形成された(図4)。さらに、 γ_1 -成分と抗牛IgAを反応させたところ沈降線は形成されなかった。牛血清および γ_1 -成分と各種抗血清の反応では形成されたIgG₁, IgG₂および γ_1 -成分の沈降線はそれぞれ異なっていた。また、 γ_1 -成分と抗牛IgG₁の反応では沈降線は形成されなかった(図5)。

考 察

CA電気泳動法により多くの牛血清の γ -分画は γ_1 -と γ_2 -の2つに細分画されることが報告¹²⁾されている。この γ_1 -分画に対応する蛋白成分について検討したところ、 γ_1 -分画には1つの蛋白成分(γ_1 -成分)が存在していた。したがって、牛血清は γ -分画が γ_1 -と γ_2 -の2つに細分画されない⁸⁾人血清とは異なり、 γ_1 -分画に対応して1つ

図5 γ_1 -成分とIgG₁との関係(左側:陽極)
1: 抗牛全血清, 2: 抗牛IgG₁, 3: 抗牛 γ_1 -成分,
⑤: 牛血清, A: 精製した γ_1 -成分

の蛋白成分が存在しこの成分が増加することにより前報¹¹⁾のように γ_1 -分画がより明瞭になるものと考えられた。 γ_1 -分画は血清の35~40および40~45%飽和硫酸塩析分画でよりはっきりと認められ、 γ_1 -成分は蒸留水に対する透析で沈殿し、DEAE-セルロースを用いたイオン交換クロマトグラフィーでは0.06および0.08M PBで溶出された。これらの操作では γ_1 -成分からIgGを完全に取り除くことができなかったが、この少量含まれるIgGを抗牛IgG-ホルミル-セルロファイン免疫吸着体を用いて除去することにより γ_1 -成分が精製された。

牛の γ -グロブリン領域の蛋白成分についてはすでに多くの報告^{2,4)}があり、IgG₁, IgG₂, IgAおよびIgMが主な構成成分として知られている。また、免疫電気泳動法でトランスフェリンの沈降線より陰極側にみられる沈降線としても、これら成分が報告^{7-9,16)}されている。しかし、免疫電気泳動法による各種抗血清と牛血清および γ_1 -成分との反応により、 γ_1 -成分はIgM, IgG₁, IgG₂の沈降線の出現位置や形状^{7-9,16)}とは異なっており、これら免疫グロブリンとは異なった成分と考えられた。また、 γ_1 -成分は沈降線の出現位置や形状^{7-9,16)}からIgAの可能性が考えられたが、IgAについては蒸留水で透析した場合上清の分画に認められること^{3,16)}、免疫電気泳動法による成牛血清と両者の抗血清の反応状況の差や γ_1 -成分と抗牛IgAとが反応しなかったことからIgAとも異なった成分と考えられた。なお、成牛血清と抗牛IgAとの反応で明瞭な沈降線が形成されなかったが、成牛血清中のIgAは初乳摂取子牛に比較し濃度が低いことが報告^{5,15)}されており、これが原因と思われる。

いっぽう、血漿を電気泳動法により分画した場合に γ_1 -分画の位置あたりにフィブリノーゲンによるバンドが形成されることが知られているが、これは血漿を材料とした場合に観察され血清の場合は観察されない^{6,8)}とされている。今回の報告は血清での検討であり、 γ_1 -成

分はフィブリノーゲンとは異なった成分と考えられる。これら以外では γ_1 -成分に該当するような蛋白成分の報告^{7-9, 12, 16)}はみられず、 γ_1 -成分がどういった成分であるかは不明であるが、牛血清には前述の免疫グロブリンとは別の蛋白成分が γ_1 -分画に存在していると考えられ、今後さらに検討が必要と思われる。

引 用 文 献

- 1) 赤尾頼幸, 有田峰生: ウイルス実験学総論, 国立予研学友会編, 202-212, 丸善, 東京 (1973)
- 2) BUTLER JE: J Dairy Sci, 52, 1895-1909 (1971)
- 3) BUTLER JE, MAXWELL CF: J Dairy Sci, 55, 151-164 (1972)
- 4) FEY H, PFISTER H, MESSERLI J et al: Zbl Vet Med B, 23, 269-300 (1976)
- 5) ISIKAWA H, KONISHI T: Jpn J Vet Sci, 44, 555-563 (1982)
- 6) 金井 泉, 金井正光: 臨床検査法提要, 第25版, VII-18 -VII-24 (1970)
- 7) 国安主税: 畜産衛生に必要な免疫の概念と術式, 農林省畜産局衛生課, 家衛試監修, 5版, 88-96, 132-137, 日本獣医師会, 東京 (1980)
- 8) 松田重三: タンパク分画と免疫電気泳動像-臨床的意義と読み方, 第1版, 8-41, 医歯薬出版, 東京 (1979)
- 9) 松橋 直, 臼井美津子: 電気泳動実験法, 電気泳動学会編, 第5版, 285-314, 文光堂, 東京 (1976)
- 10) 小川恕人: 電気泳動実験法, 電気泳動学会編, 第5版, 45-80, 文光堂, 東京 (1976)
- 11) 千田広文: 日獣会誌, 45, 159-165 (1992)
- 12) 友田 勇: 日獣会誌, 31, 154-162 (1978)
- 13) 友田 勇: 獣医学 1986, 伊沢久夫ほか編, 149-180, 近代出版, 東京 (1986)
- 14) 臼井美津子, 菅野恒博, 松橋 直: 臨床検査, 22, No 7, 703-712 (1978)
- 15) WILLIAMS MR, MAXWELL DAG, SPOONER RL: Res Vet Sci, 18, 314-321 (1975)
- 16) 山本静雄: 家畜電気泳動研究会誌, No 9, 10, 59-68 (1982)

日生研の 動物用 ワクチン

M2-12

- 日生研ニューカッスル生ワクチンS
- 日生研NB生ワクチン
- 日生研IB生ワクチン
- 日生研C-78・IB生ワクチン
- 日生研ILT生ワクチン
- 日生研マレックワクチンQ
- 日生研IBD生ワクチン
- AE乾燥生ワクチン
- 日生研穿刺用鶏痘ワクチン
- 日生研乾燥鶏痘ワクチン
- ネオ日生研ニューカッスル不活化ワクチン
- 日生研NB不活化ワクチン
- 日生研ニューカッスル・コリーザ混合ワクチン
- 日生研IBD不活化ワクチン
- 日生研コリーザワクチン
- 日生研C型菌コリーザワクチン
- 日生研コリーザ2価ワクチン
- 日生研MG不活化ワクチン

- 日生研日本脳炎生ワクチン
- 日生研豚TGE生ワクチン
- 豚コレラ生ワクチン
- 日生研豚丹毒生ワクチンC
- 日生研豚コレラ・豚丹毒混合生ワクチン
- 日生研日本脳炎TC不活化ワクチン
- 日生研豚TGE濃縮不活化ワクチン
- 日生研豚ARワクチン
- 日生研豚PLE-2不活化ワクチン
- 日生研クレーサー病不活化ワクチン

- イバキ病生ワクチン「日生研」
- 日生研牛アデノ生ワクチン
- IBR生ワクチン「日生研」
- IBR・BVD・PI 混合生ワクチン「日生研」
- アカバネ病生ワクチン「日生研」
- 日生研チュウザン病不活化ワクチン
- 牛流行熱不活化ワクチン

- 日生研狂犬病TCワクチン

- 日生研日本脳炎TC不活化ワクチン
- 日生研馬インフルエンザワクチン
- 日生研馬ゲタウィルス感染症不活化ワクチン
- 馬鼻肺炎不活化ワクチン「日生研」

- 日生研ジステンパーワクチン「ミンク用」
- 日生研緑膿菌感染症不活化ワクチン
- アユ・ヒブリオ病不活化ワクチン「日生研」

■印は要指示医薬品です。

日生研株式会社

〒198 東京都青梅市新町2221-1

TEL: 0428-33-1004~9 (営業部)
0428-33-1056 (学術部)

9304