電気泳動法, 定量的沈降法による組織蛋白質の 酵素活性度, 抗原性および組織抗体の研究*

(免疫化学研究 第4報)

岡山大学医学部 衛生学教室

緒 方 正 名
望 月 義 夫

Studies on Enzymatic Activity Antigenicity of Tissue Protein and Tissue Antibody
by Electrophoresis and Quantitative Precipitin Method.

Masana Ogata, Yoshio Mochizuki

(Department of Hygiene Medical School of Okayama University)

Director Prof. Masuo Ogata

1) The crossreaction of various kinds of tissue proteins against the liver protein antibody has been investigated by a quantitative precipitin method.

(a) The protein fraction of respectively liver, lymphnode, and spleen has been found to crossreact against the antibody in a descending order of reactivity.

(b) Thyroglobulin and lens protein showed no precipitin reaction against the antibody.

2) The protein fraction of liver prepared by successive salting out with sodium sulfate has been investigated by an electrophoretic method.

The C_3 fraction (0-14 g/dl) shows a simple peak, C_2 fraction (14-28 g/dl) shows several peaks, while C_1 fraction a single peak of obtuse tapering.

If globulin peaks are respectively named G_1 , G_2 , G_3 in order of mobility, the mobility of C_3 fraction apparently corresponds to G_2 peak, and that of C_2 fraction to peaks G_1 and G_3 , while that of C_1 fraction to either G_2 or G_3 .

3) The enzyme activity has been measured in respective liver protein fraction, and the C_3 fraction was shown to contain catalase and peroxidase, the C_2 fraction to contain esterase and cathepsin. The C_1 fraction to contain less enzyme than the C_3 and C_2 fractions.

The precipitate of C_2 and anti C_2 rabbit serum showed 30% esterase activity as against the original C_2 esterase activity.

4) The anti serum- γ -globulin antibody has been discovered to crossreact against the protein of respectively lymph node, spleen, and liver in descending order of reactivity, and C_3 , C_2 , C_1 fraction in order of reactivity.

5) The lens protein evidenced two separate major peaks and another small fast-moving one when treated by an electrophoretic method. The faster moving of the two major peaks apparently represented α crystalline while the slower one did β crystalline.

6) The antibody N produced in various kinds of the tissue protein extracted from the organs of a rabbit that was immunized by means of intravenous injection was discovered to exist in bonemarrow, spleen, lymph node, liver, lung, kidney respectively in order of antibody reactivity.

* 指導 緒 方 教 授

- 7) The antibody N produced in the popliteal lymph node in a rabbit immunized by a foot-pad injection was found to be 1.7-2.2 times greater in amount than serum antibody.

The antibody N remained in lymphatic cells lavaged with saline, and the antibody N of lymphatic saline soluble protein was shown to exist in greater amount than that of mitochondria and nucleus fraction by a quantitative precipitin method.

- 8) It is inferred from the above that the liver protein, which the production of the serum albumin has been attributed, contains an extremely small amount of the component which has been ascertained to have the mobility identical with that of serum albumin by an electrophoretic method, and the reticuloendothelial system which has been believed to be responsible for the production of the serum γ globulin has a component crossreactive to the serum γ globulin, while the tissue antibody increase in the reticuloendothelial system, especially in the lymphatic system through immunization.

緒 言

組織蛋白質の性質を調べることは、組織における代謝、血清蛋白質生成等の動的な研究に対する基本的方法として大切な部門である。一方組織蛋白質の有する性質を研究する場合、色々な方法が存在する。組織の可溶性蛋白質が単一であるか否かということを研究するためには電気泳動法が最も正確な結果を与える。又組織蛋白質が塩析法で何種類の分層に分ち得るかを知らるためには、溶解度曲線の解析より研究を進めることが必要である。各分層に存在する酵素含有量を研究することは、酵素精製法の検討および電気泳動図における峯の意義付け等に大切な実験である。定量的沈降法による免疫化学測定法は各臓器の相互関係、特に近似度を測定し度い場合に1個の臓器(例えば肝蛋白)で免疫して作った抗体と他臓器の組織蛋白質を抗原とする交叉反応を測定するのに必要でありこれにより各臓器間の総合的な差異を表わす1つの尺度として研究できる。組織蛋白質分層の交叉反応の研究は、組織蛋白質の単一か否かの研究の補助手段としても有効である。組織蛋白質と血清蛋白質の関係を調べるためには、電気泳動図の比較と共に、血清 Albumin および γ globulin 抗体と組織蛋白質およびその分層の交叉反応を測定すれば、正確な結果が期待できる。 γ globulin 生産および抗体生産の研究を行うためには、局所および全身免疫法による各臓器中の組織抽出液に含まれた抗体を研究することが適当な方法であろう。以上は細胞中生理的食塩水溶解性蛋白質(主に Cytoplasmic protein)を対象として述べたが更に核および細胞顆粒、またはこれに含有される蛋白質の研究も、細胞機能や蛋白質合成の研究に大切な役割を果たすと思われる。上述の所では組織蛋白質として、我々は肝、腎、脾、淋巴腺等を研究対象としたが、水晶体蛋白質は他の組織蛋白質に比べて電気泳動法では明確に分離し得る2個の蛋白質峯に分離できる点、また免疫化学的には、絶対特異性を有する点において特徴を有する故興味ある

研究対象となった。組織蛋白質の研究は Minot Murphy¹³⁾ 等による肝蛋白中の抗悪性貧血因子の研究を始とし、最近における E.C. Gjessing²⁾ 等による肝 Cytoplasmic protein の Ethanol 分画法に到る迄数多くの研究が行われ、また、本邦においては中村教授御一派¹⁾による系統的研究が行われた。本項発表に当り謹んで敬意を表する。本教室では岡崎³⁾、岸岡⁴⁾の研究がある。

実験方法

1) 組織抽出液の調製——(全操作は 5°C 以下で行った)。牛の肝臓を屠殺後なるべく速に取出し、氷冷生理的食塩水を用い血管より注射器で洗滌する。この際肝臓 500 g に付いて少くとも食塩水 20 l 位は必要とする。他の臓器(腎、脾等)もこれに準じて行う。洗滌後の臓器はミンチで細砕後臓器重量と等量の生理的食塩水を加えホモジナイザーで磨砕する。遠心後の抽出液は後述の分画法の母液とする。

2) 酵素活性度測定法——(Catalase) Warburg 検圧計により Fujita および Kodama⁸⁾ の法に従い 0.31 Mol H_2O_2 0.1 ml より NaCl- NaH_2PO_4 - Na_2HPO_4 - $NaHCO_3$ 浮遊液 (pH 7.7) 中で 38°C 30 分で発生した酸素量 cmm を酵素乾燥量 mg で除して Catalase 係数 Q_{O_2} とした。(Peroxidase)——ピロガロールから H_2O_2 と酵素より生ずるプルプロガリン量を正宗児玉法⁹⁾に従いエーテルで抽出し、重クロム酸加里標準液と比色して計算した。但し反応液は肝蛋白における至適条件を考慮に入れて Catalase と同じ緩衝液を用いた。(Esterase)——ethyl-acetat より Esterase によって生ずる acetate 量を C.J. Harrer and C.G. King¹⁰⁾ 法に従い bromthymol blue を指示薬として 0.01 N NaOH で滴定した。

(Cathepsin)——Kunitz¹¹⁾ の法を多少変更して用いた。犬の結晶 Haemoglobin を、塩酸 Cystein で賦活した酵素液を用い、pH 4, 37°C 20 分で水解させ、10% 三塩化酢酸溶液で沈澱させた時残留する N 量を測定した。

ものである。基質として Hemoglobin を用いない値は自家融解酵素値とした。両値とも盲験値を差引いた値を用いた。

3) 免疫化学測定法^{5, 6)}——抗原に用いた牛血清 γ globulin は既報⁶⁾のごとく脱水芒硝で精製した。牛血清 Albumin は Alb.+ α glob. 分層より既報^{6, 7)}の如く馬血清の場合と同様に電気泳動法で上昇脚より Albumin を分離しその純度を再泳動で検定したものである。組織蛋白抗原の調製法は後述する。使用抗体は既報の如く^{5, 6, 7)}明礬吸着抗原を Kabat の法で家兎を免疫して作製し定量的沈降法は既報^{5, 6, 7)}の Heidelberger の法によった。

4) 電気泳動法^{5, 6, 7)}——Tiselius 電気泳動装置により pH 7.7 イオン強度 0.2 の磷酸緩衝液中で温度 0.5°C で泳動した。成分比、絶対易動度の測定は電気泳動研究会規定に従った。

5) 塩析曲線の作成法——40 g/dl 脱水芒硝液を用い各濃度の脱水芒硝液の系列を作り肝 C 分層 1 容に対して 8 容の各濃度の脱水芒硝液を加え 30°C 2 時間放置後濾過し上清 N を定量しこの値より計算した。

6) 水晶体蛋白——水晶体 1 個に 10 ml の蒸溜水を加えホモジナイザーで磨砕後、遠心した上清を用いた。

7) 組織抗体の測定法 (免疫法)——淋巴腺經由免疫法は明礬吸着結晶卵白 Alb.⁶⁾を抗原として皮下免疫を行ったもので注射量は 1 回量 4.5 mg である。全身免疫法の抗原は既報⁶⁾の方法で調製した yeast 抽出液 (但し反応用抗原としては yeast マンナン)、結晶卵白 Albumin、牛血清 γ globulin を用いた。(リンパ液およびリンパ球の採集)——T.N. Harris^{16, 22)}に従い家兎膝窩淋巴腺の輸出管を結紮し注射器で採集後遠心する。上清は淋巴液原液とし、沈澱は容量の 5 倍の食塩水を pipet で混じ洗滌後 5 倍量の食塩水を加え、freezing thawing を 3 回行い、5 倍稀釈抗体とした。(淋巴組織の採集)——淋巴液採集後、家兎を全採血し膝窩淋巴腺を取り (ag) 細切後少量の食塩水で振盪洗滌し (重量 bg) これに 2b ml の食塩水を加えホモジナイザーで 2 回抽出した遠心上清を合せ抽出抗体とした。食塩水で振盪し取出した液を遠心した細胞は自由細胞とし freezing thawing を行い、また遠心上清は淋巴洗液とした (図 19)。(分画遠心法)——Schneider¹²⁾の法に従い分画した。組織ホモジネートを 600 g の速度で 10 分間遠心した沈澱を Nw 分層 (Nucleus および Unbroken cell) 8500 g の速度で 10 分遠心した沈澱を Mw 分層 (Mitochondria) として洗滌後、等量の食塩水を加え freezing thawing を 3 回行い、遠心上清を 2 倍称釈液とした。この液を酸性にして核蛋白を除去後反応を用いた。遠心の際の溶媒は主に等張蔗糖液を用いた。(副腎皮質ホルモン注射による抗体量測定)²⁰⁾

——抗結晶卵白 Alb. 家兎を最終免疫より 3 週放置後皮下に Adrex 3 ml を注射し直前およびその後の血清抗体量を定量的沈降法で測定した。(組織抗体抽出法)——免疫家兎を全採血後、全身洗滌を行い更に臓器の個別洗滌を固有色を呈する迄行う。臓器重量の 2 倍量の食塩水を加えホモジナイザーで磨砕後遠心し、更に 2 倍量の食塩水を加え、ホモジナイザーで磨砕し、両液を加え遠心後 (殆ど B 分層には抗体が含まれぬ故) 後述の法で C 分層を調製し含有される抗体量を定量的沈降法で測定した。各回における抽出液の蛋白量より推定すれば本法では組織抗体の約 90% 位は抽出されるものと思われる。臓器洗滌は可能な限り完全を期して行った。

実験結果

I) 肝臓および臓器抽出液の調製 (A 分層)——生理的食塩水抽出液を 7000—8000 g 位で高速遠心した沈澱であって、Schneider の分画遠心法²⁾を用いた時は 600 g 10 分で Nw 分層を、また 8500 g で Mw 分層を分けることができる。(B 分層)——A 分層分離後の上清を 10% 酢酸で pH 4.2 とし沈澱させたものである。本分層には核蛋白の 1 部が含有される。但し B 分層の抽出には分画抽出法の方が容易である。(C+D 分層)——B 分層の上清を pH 7.0 に中和したもので加熱凝固法、塩析法、三塩化酢酸法等で沈澱する C 分層 (主に Cytoplasm protein) と上清である D 分層 (非蛋白性部で ether 等で抽出する) に分れる。但し沈澱方法で C 分層に属する蛋白は多少異なる。以上の A, B, C, D 分層の名称は Minot および Murphy¹³⁾ の分離法に従ったものである。

II) C 分層の塩析法の研究——(脱水芒硝分画法) C 分層の subfraction を行うために脱水芒硝に対する肝蛋白および腎、脾、淋巴腺蛋白の塩析曲線を研究し、(図 1 a b) のような結果を得た。本曲線の解析より C 分層には、0—14 g/dl, 14—28 g/dl, 28—38 g/dl の間で 3 つの沈澱部が存するようであったので、これを C₃, C₂, C₁ 分層として用いた。他臓器もこれに準じて行った。(Ethanol 分画法)——C₃ 分層は Ethanol 0.032 Mol -5°C pH 5.8 の沈澱部であり、C₂ 分層は C₃ 沈澱の上清を Ethanol 0.066 Mol -8°C pH 5.8 で沈澱させたものを用い、また C₁ 分層は C₂ を沈澱させた上清を Ethanol 0.066 Mol -8°C pH 5.8 Zn 0.02 Mol で沈澱させたものを用いた。全操作はアンモニヤガス冷凍箱中で行った。以上の方法は抽出液を分画する法で抽出分画法と名付ける。

III) 継続分画抽出法または分画抽出法の研究——本法は組織 Homogenate を 28 g/dl 脱水芒硝で抽出し抽出液を 40 g/dl で沈澱させ C₁ とし、抽出後の Homogenate より 14 g/dl で抽出し抽出液を 28 g/dl 以上で沈澱させ C₂ とし残りの Homogenate を pH 5.7 で抽出し、14

Fig. 1 a) 牛肝 C 分層の脱水芒硝による塩析曲線

b) 各種臓器 C 分層脱水芒硝塩析曲線

g/dl 以上で沈澱させ C_3 とする. 次いで pH 7.0 で抽出し pH 5.0 または 14 g/dl 以上で沈澱させて B_1 とし pH 7.4 で抽出したものを B_2 とする. Ethanol の場合

は (14) (28) (40) g/dl の代りに (0.032 M pH 5.8) (0.066 M pH 5.8) (0.066 M + Zn⁺⁺ pH 5.8) を用いる. 本法は自家融解の多い組織に用いる時および B 分層の抽出には有利な方法であるが, 操作の複雑なのが欠点である. 両法による C_1 C_2 C_3 分層は殆んど等しい蛋白であり, また芒硝法による C_3 C_2 C_1 分層と Ethanol 法の C_3 C_2 C_1 分層はほぼ等しい蛋白であるが正確に表わすには, 例えば抽出分画法脱水芒硝 C_1 分層は C_1 (ext. frac. Na₂SO₄) 分画抽出法 Ethanol C_3 分層は C_3 (frac. ext. Ethanol) と記すべきである. 本研究には主に抽出液分画法による脱水芒硝分層が用いられ, 即ち C_3 (0-14 g/dl), C_2 (14-28 g/dl), C_3 (28-38 g/dl) である.

Fig. 2 肝分層 Catalase 活性曲線

IV) 各分層酵素活性度の研究——活性度は抽出分画法における脱水芒硝分層を透析後測定したものである. (Catalase)——図 2 は各分層乾燥重量 1 mg 当りを発生 O_2 量より測定した値である. Catalase は C の Catalase 活性度分層の水溶性蛋白中では, $C_3 > C_2 > C_1$ の順に存在するが主として C_3 分層に含有される. 一方 B 分層では Catalase 含有量は少い. (Peroxidase)

表 1 肝分層 Peroxydase 活性度

肝 分 層	Peroxydase 活性度 (p.z.)
C	1.04
C_1	0.24
C_2	0.74
C_3	1.98
B	0.26
C_2 (水不溶)	0.11
C_3 (水不溶)	0.18

Fig. 3 a) 肝分層 Esterase 活性曲線

——表1は各分層乾燥重量1mg当りの Peroxy-dase 活性度を Purpulogalin 生成量⁹⁾より測定した値である。Alkali 性緩衝液中では Peroxy-dase 含有量は $C_3 > C_2 > C_1$ の順でありほとんど Catalase 活性度と平行する結果を得た。Peroxydase は C_3 および C_2 の水不溶性分層および B 分層における含有量は少ない。(Esterase)——図3は分層1mg当りの Esterase 活性度を 0.01 N NaOH 滴定値で示したものである。Esterase は Catalase の場合と異なり、主に C_2 分層に濃縮されて存在するが、 C_2 の水不溶性分層に最も多く存在することは興味深い。また Esterase を含む C_2 分層を抗原として抗 C_2 抗体と反応させた場合の沈澱中の Esterase activity を測定したのが図3b) であり本例より Esterase の約 $\frac{1}{5}$ が沈澱に移行したことが証明された。(Cathepsin および Autohydrolytic enzyme)——表2は1mg中の Cathepsin および Autohydrolytic enzyme の活性度を分解 N より測定した値である。Cathepsin の各分層における分布差は上述の酵素に比して少ないが $C_2 > C_3 > C_1$ の順に水溶性部に含有され、各分層の水不溶性沈澱中の含有量は少ない。Autohydrolytic enzyme が B 分層に多く含有されることは注目すべきことであり B 分層自身に特に消化され易い性質が無いならば B 分層に本酵素が多く含有されることになり従って本分層を除いた方が肝蛋白としての stability は大であると思われる。C 分層水溶性蛋白の活性度を 100 として上述の 5 酵素の分布を図示したのが図4であって、 C_3 分層には Catalase, Peroxydase が、 C_2 分層には Esterase が、原 C 分層より高い活性度で含有されることが分る。また C_1 分層には含有酵素量は少なく B 分層には自家融解酵素が多いことが証明される。Ortinol 法による多糖類含量は $C_1 C_2 C_3$ では大差無かった。後述のように溶解度と電気泳動の易動度の関係が明確でないので、酵素の位置を決定するのに漸定的に solubility と mobility の両者で表わす方法、例えば

V) 各分層および組織蛋白間の免疫化学的研究 A) 各分層の交叉反応の研究——図5a)b)は C_1 抗体、 C_3 抗体に対する C_1 および C_3 抗原の交叉反応を示し、図

	C_2 分層	反応後	反応上清	反応沈降物
$\frac{N}{100}$ NaOH 滴定値 ml. (30 分)	0.79	0.75	0.60	0.15
Esterase 活性分布 (%)	100	95.0	76.0	19.0

Fig. 3 b) 抗肝 C_2 分層家兎血清対 C_2 分層反応時における Esterase 活性度分布

表2 肝分層 Cathepsin および自家融解酵素活性度

肝 分 層	自家融解酵素 活性度 (a)	総消化 N 量 (b)	Hb に対する Cathepsin 活 性度 (b-a)
C	0.06	0.57	0.51
C_1	0.05	0.43	0.38
C_2	0.11	0.83	0.72
C_3	0.10	0.69	0.59
B	0.23	0.28	0.05
C_2 (水不溶)	0.02	0.15	0.13
C_3 (水不溶)	0.02	0.07	0.05

Fig. 4 牛肝分層各種酵素活性度分布図

6 a) b) は C_1 抗体、 C_3 抗体を血清 Alb, γ glob. の各々で吸収後 C_1 , C_3 に存する Alb および γ glob. による特異性を減じて交叉反応を行ったものである。図6a)は C_1 抗体に対する C_1 抗原および C_3 抗原の反応であり最大沈降量で比較すれば C_1 を 100% とした場合、 C_3

a) 抗 C_1 抗体 (Alb., γ glob. 吸収前) b) 抗 C_3 抗体 (Alb., γ glob. 吸収前)Fig. 5 牛肝蛋白分層 (C_1 , C_2) 交叉反応定量的沈降図 Fig. 6 a) 抗 C_1 抗体 (Alb, γ glob. 吸収後) b) 抗 C_3 抗体 (Alb, γ glob. 吸収後)

は 74% であり, b) は C_3 抗体に対する C_3 抗原および C_1 抗原の反応で C_3 を 100% とした場合, C_1 は 71.4% であった。血清 γ glob. は 0-14 g/dl であり, 血清 Alb. α glob. は 20-32 g/dl 分画に存在するが前報⁷⁾のようにこの両者の交叉度は約 10% しか存しない。これに比して C_1 と C_3 の交叉性が 70% も存することは後述のように肝蛋白の電泳図 (図 11) が易動度より考えて globulin に相当する峯が主成分でありまた肝蛋白が血清蛋白の電泳図に比して単一に近い事と照合せて興味深いことである。また C_1 と C_3 の抗原性の差には後述のごとく電泳図の G 峯における差の他に, C_1 には A 峯および B 峯が含まれるが, C_3 には含まれぬことも原因となる。また既報⁷⁾の如く血清抗原と血清抗体および水晶体蛋白とその対応抗体の定量的沈降曲線が double zone または multiple zone の形を示すのに比べて (図 18 参照) 肝抗体と肝 C 分画の反応が (抗原過剰帯における沈降量の減少度の少いことを除いては) simple zone に近い形であること (図 7) よりも肝蛋白の方が単一に近いことが明らかと思われる。

B) 各臓器の C 分層の交叉反応に関する研究—図 7 は肝 C 抗体に対する各臓器 C 分層を抗原とする定量的沈降曲線である。肝 C 分層との最大沈降量を 100% として各臓器 C 分層の最大沈降量で比較した場合に、腎蛋

Fig. 7 抗牛肝 C 分層抗体に対する各臓器 C 分層交叉反応図

白は (54.5%), 淋巴腺 (38.6%), 脾 (29.8%), である。又甲状腺 Thyroglob., 水晶体蛋白は殆んど反応性を持たず, この蛋白は絶対特異性 (註) を有する特異蛋白といわれたが, 血清のみならず, 他の組織蛋白との反応性も少い様である。以上の結果より肝蛋白との近似性は, 肝>腎>淋巴腺>脾の順に減少する。また 図 8 は淋巴腺 C 分層で免疫した場合における各臓器 C 分層の交叉度を表わし, 本図より淋巴腺>脾>腎>肝の順に近似性を有すること

表 3 牛肝臓蛋白脱水芒硝分層電気泳動測定値

分 層	成 分 比 (%)					絶 対 易 動 度				
	A	B	G ₁	G ₂	G ₃	A	B	G ₁	G ₂	G ₃
C	6.8	12.6	36.1	28.4	17.1	5.5	4.3	3.2	2.2	1.3
C ₃			7.6	77.1	15.2			3.3	2.4	1.1
C ₃ 上清	14.8	5.7	43.2	10.2	26.1	5.4	4.2	3.5	2.8	1.4
C ₂	4.4	7.0	47.8	10.4	30.4	5.4	4.7	3.3		1.2
C ₂ 上清	13.5	13.5	24.3		48.7	5.6	4.7	3.6		1.3
C ₁	15.5	9.9	9.1	9.2	56.3	5.6	4.4	4.2		1.3

Phosphate Buffer pH 7.7, I.s=0.2, 絶対易動度 = $-cm^2volt^{-1}sec^{-1} \times 10^5$

Fig. 8 抗牛淋巴腺 C 分層抗体に対する各臓器 C 分層交叉反応図

Fig. 9 抗牛肝 C₃ 分層抗体に対する各臓器 C₃ 交叉反応図

が分り、上記の結果を更に確認する結果となった。図 9 は各 C₃ 分層に対する各臓器 C₃ 分層の交叉性を示したもので肝蛋白に対する近似性は肝>腎>淋巴腺>脾の順に減少した。C₃ 分層は各臓器共に 0-14 g/dl の溶解度の部であり本研究には 2 回精製したものを用いたが溶解度の他に、電泳図の易動度も大体近い所に存する。それ故 Solubility 及易動度の近い蛋白でも含有される臓器が別の場

合には、異なる免疫化学的態度を取ることができる。

(註) 一般に臓器特異性は同一臓器の各動物における反応性と共に論ずるもので (例えば牛肝臓と豚肝臓の関係) あるが我々の研究は臓器相互の関係を論じたもので厳密な意味の臓器特異性を研究したものでは無い。

C) 血清 γ Glob. および Alb. と各臓器 C および C₁, C₃ 分層の交叉反応の研究——図 10 a) は牛血清 γ glob. 家兎抗体に対する血清および各臓器 C 分層抗原の定量的沈降曲線である。各臓器の C 分層と γ glob. 抗体との反応における最大沈降量は γ glob. と抗体の最大沈降量より低く例えば γ glob. 15 mgN, 腎 0.4 mgN 位であるがこれに比して血清の場合は最大沈降量はほぼ一致し最大沈降帯の抗原量がずれる。このことは血清には γ glob. と同成分の蛋白が最大沈降帯の比よりかぞえて約 $1/4 \sim 1/3$ 近く含まれるのに比し、各組織には γ glob. と同一の蛋白ではないが、共通の決定群を持つ蛋白が存在するとも考え得る。但しこの場合は臓器蛋白中に抗原抗体反応阻止因子が無いと仮定した時であり、一方 図 10 a) では組織抗原の沈降曲線は抗原を加えるにつれ、平行に近くなっておる故、恐らく実測値以上の抗原を加えた部に最大沈降帯はないと思われるが最大沈降帯が図中の抗原量以上の抗原過剰部に存在しないとはいえないので現在の所明確な結論は避け度い。以上の結果より γ glob. に交叉性をもつ組織蛋白が γ glob. の前階級物であるか組織固有の glob. が γ glob. と共通抗原性を持つためかまたは γ glob. それ自身であるかは不明であるが、一方各組織の C 分層の血清が γ glob. に対する親近度は淋巴腺, 脾, 腎, 肝の順に交叉度が少くなる事実が存する。又後述の各臓器の組織抗体含有量も未洗滌淋巴腺, 脾, 肝, 腎の順に少くなる事と考え併せて、上述の結果は抗体および γ glob. 生産の盛んな臓器程、抗体及び γ glob. 含有量の高い事を意味し、この問題の解決に興味

Fig. 10 抗牛 Alb. および γ glob. 抗体に対する各臓器および各分層定量的沈降図

深い結果を与える。(但し淋巴腺の位置は洗滌で多少は変位する)我々は同一沈降量を生ずるに必要な抗原量の比より計算した値を、免疫化学的定量値としたが、この値は組織蛋白の場合では最大沈降量が異なる故、 γ glob. と同一決定群を持つ蛋白に換算することになる。本計算法では淋巴腺蛋白は 5% 以上 γ glob. 類似蛋白を含有する。図 10 b) は γ glob. 抗体に対する肝および淋巴腺の C_1 , C_2 , C_3 抗原の交叉反応を示し、実線は肝、点線は淋巴腺である。両臓器共に γ glob. に対し $C_3 > C_2 > C_1$ の順に交叉度が強く、殆んど C_3 に含まれるとも言い得る。免疫化学的測定値は肝では C_3 は 8% 以上、 C_2 1.5% 以上、淋巴腺では C_3 14.3% 以上、 C_2 1.6% 以上の γ 類似蛋白を含むことになる。以上は、組織液に反応阻止因子の無いと仮定した場合の計算値である。本結果は臓器抗体が C_3 分層に多く含有される結果と平行する。図 10 c) は Alb. 抗体に対する肝 (実線) および淋巴腺 (点線) の交叉反応であり、両臓器共に Alb. との交叉反応は $C_1 > C_2 > C_3$ の順で特に C_1 には交叉性の殆んどが含まれる。含有量は淋巴腺 14.4% 肝 8.4% である。 C_3 は γ glob. と C_1 は Alb. と交叉性があることは C_3 と γ glob. および C_1 と Alb. は脱水芒硝に対する溶解度が近い故に組織でも血清でも近い溶解度の部は同じような交叉性を有することを意味する。 γ glob. および抗体の生産臓器である淋巴系および網内系に γ glob. および抗体の多く含有されるのに比べて、Alb. 生産臓器

と云われる肝に、電泳法では Alb. と同じ易動度を有する峯の含有量が少なく、肝と他臓器との Alb. 峯の含有差も少ない。また免疫化学的測定でも肝と他臓器との Alb. 交叉性蛋白の含有量の有意義な差の存しない。以上のことより ① Alb. は肝で生成されるがすぐ血中に放出される。② 他臓器も多少は Alb. 生産に関与する等の要因も Alb. 生産に一応存在するのではないかということが推定される。

VI) 各分層の電気泳動法による検討 a) C 分層の電気泳動像——図 11, 図 12, 図 13 の各上段に C 分層の電気泳動像を示した。C 分層の内易動度の速い峯を A 峯とし、また主成分である易動度の遅い Globulin 主峯を G 峯とし、A と G の中間峯を B 峯とした。A 峯の易動度は血清 Albumin に近い。B 峯は上昇脚では B_1 B_2 B_3 の 3 成分に分れる傾向があるが下降脚では明確な分離は見られず 1 個の平坦な峯の形を示した。G 峯は上昇脚では明らかに 3 成分より成り、これを G_1 G_2 G_3 としたが、下降脚の場合では、多少分離の不完全な傾向があった。肝細胞の色素層は赤褐色または赤黄色を呈するが、電泳図では、上昇脚で G_2 峯附近より薄い着色があり G_3 峯附近で明確な着色が見られた。 G_2 峯の色素と G_3 峯の色素の異同は現在不明である。

b) 脱水芒硝による C_3 C_2 C_1 分層の電気泳動像——易動度を中心に考え先ず脱水芒硝分層を主眼として検討を行った。 C_3 は (0-14 g/dl) C_2 は (14-28 g/de) C_3 は

Fig. 11 牛肝蛋白脱水芒硝分層電泳図

(註) 上より C 分層, C₃ 分層, C 分層より C₃ を沈澱させた上清, C₂ 分層, C₃ 上清より C₂ を沈澱させた上清, C₁ 分層の電泳図である。

(28-38 g/dl) 分層である(以下図 11 参照)。

① A 峯は C₁ 分層, C₂ 分層に含まれるが, C₃ 分層には存在しない。C₁ 分層中の A 峯%は 15.5% C₂ は 4.4% 位で C₁ に殆んど含有される。

② B 峯は C₁ 分層, C₂ 分層に含まれるが, C₃ 分層には殆んど存在しない。C₁ の含有量は C₂ より多いが大差はない。

③ (イ) C₃ 分層の G 峯は単一峯に近い形を示し, 易動度の少し速い小峯 (おそらく G 峯に含まれるもの) が存在する。C₂ 分層の G 峯は複合峯で主として 2 峯より成立する。C₁ 分層は幅の広い単一峯の形を示す。

(ロ) 各分層の G 峯が G₁ G₂ G₃ の何れの峯に属するかという問題は, C 分層の G₁ G₂ G₃ 峯の易動度が近いと分層の不安定性のために正確な結論は困難であった。現在我々の経験した 1 例を 11 図に示した。本例

Fig. 12 牛肝蛋白脱水芒硝分層電泳図

Fig. 13 牛肝蛋白 Ethanol 分層電泳図

が肝蛋白分層における一般的な場合か否かは不明であるが, 沈澱の電泳図と上清の電泳図の正確な比較のできた例である故に本例を中心に考えることにする。本例では C₃ 分層の主峯の易動度は G₂ 附近である。C₂ 分層は G₁ および G₃ 峯を主峯とする複合峯を示した。C₂ 分層は酵素含有量が多い故, 更に各酵素分布を研究するつもりである。C₂ 分層の上清の電泳図は C₁ 分層に近く, また C₁ 分層は恐らく G₂-G₃ 峯附近を中心とする幅広い峯ではないかと推定される。

次いで他の 1 例の各分層の電泳図を図 12 に示した。本例では C₂ 分層は複峯であるが第 1 例程明確な 2 峯に分離しなかった。C₃ および C₁ は前例に近かった。第 1 例 (図 11 の例) における易動度および面積比は表 3 に示してある故参照され度い。

c) Ethanol 分画法による C₃ C₂ C₁ 分層の電気泳

動像— C_3 (0.032 M pH 5.8), C_2 (0.036 M pH 5.8) C_1 (0.066 M pH 5.8+Zn $\cdot$ 0.02 M) で C_3 は (-5°C), C_2 及び C_1 は (-8°C) 附近で分画したものである。A 峯が C_1 に含まれ, B 峯が C_1 および C_2 に含まれる点, 又 G 峯が C_3 では単一峯に近く, C_2 では複合峯であり, C_1 では幅広い単一峯である点では脱水芒硝における C_3 C_2 C_1 峯分層の電泳図に近い。脱水芒硝の C_3 C_2 C_1 分層と Ethanol の C_3 C_2 C_1 分層が厳密に一致するかまたどの点で差異が存するかは, 将来の研究に待ち度いと思う (図 13 参照)。

VII) 電気泳動分離法による分層 Cf, Cs と交叉反応—電気泳動図の峯を中心として考えた時の組織蛋白の特異性を研究するため肝 C 分層を電気泳動後上昇脚より G_1 を目標として分離し, これを faster moving component として Cf とし, 下降脚より G_3 を目標として分離し slower moving component Cs とした。8~9 回電泳分離後集めて再泳動した電泳図を図 14 に示した。

Fig. 14 牛肝 C 分層電気泳動分離電泳図

Cf 29.8% であった。この差違は faster および slower moving component の差によるものである。血清吸収後 (図 16) 交叉度の大きな変動は無かった。Cf, Cs の抗原性の差が塩析法の C_1 C_3 の抗原性の差より大であることより電気泳動の峯の区別の方が溶解度の差より抗原

Fig. 15

Fig. 16

Cf には A, B, G_1 , および G_2 の一部が含まれ, Cs には G_3 および (G_2 の一部) が含まれる。次に Cf 抗原, Cs 抗原および各対応抗体を用い, 定量的沈降法で相互の交叉反応を行い図 15 に示した。この交叉度は Cf 抗体に対し Cf 100%, Cs 40%, Cs 抗体に対して Cs 100%,

性の差が大きいのではないと思われる。

VIII) 水晶体蛋白質の研究 (以下図 17 および表 4 参照)—牛水晶体蛋白質の分画は, Woods および Burky^{14, 15)} の方法を用いた。水晶体液を $1/10$ 規定酢酸を最強の濁濁を生ずる迄加える。(附加する酢酸量は予備

実験で予じめ決定し大体 pH 4.8 ± 0.3 附近である) その後氷室に一昼夜放置する。沈澱は α Crystalline であり、 $1/10$ 規定アンモニア液で pH 7.4 の条件で溶解し、24 時間透析後、更に酢酸を pH 4.8 附近迄加え沈澱させる。上清は β Crystalline であり、流水中で透析後、 $1/10$ 規定酢酸で残留しておく α Crystalline を沈澱させる。上清は中和後、脱水芒硝で塩析し濃縮する。

水晶体の電気泳動図 (17 図) は 2 個の明確な峯を有するが、この前に小さい fast moving Component が存する (f 峯と名付られた)。f 峯は血清 Alb. に近い易動度を有するが、 α Crystalline にも f 峯が存する場合があるので本峯の成因は明らかでない。 α Crystalline は易動度の速い峯で第 1 回の等電点沈降法は少量の β Crystalline を残すが、第 2 回目の沈降法では 95% 程度の純度とすることができた。 β Crystalline は易動度の遅い峯で、第 1 回の等電点沈降法で α Crystalline を沈澱させた後もなお相当部の α Crystalline 峯が残ったが、第 2 回沈降法で α Crystalline を除けば殆んど単一の峯となすことができた。また α Crystalline の後部が丁度血清の α glob. のように分離する傾向があり、また β Crystalline の部は更に 2 個の峯に分離する傾向が存するが各々明確な峯として確認することはできなかった。また水晶体を電泳分離法で上昇脚より易動度の早い峯を分離し (f

分層) とし、下降脚より易動度の遅い峯を分離し、S 分層とした。f 分層を pH 4.8 とした時に f 分層 1.28 mgN 中 1.15 mgN 沈澱するので T 分層の 88% が沈澱することとなる。また S 分層は 1.13 mgN 中 0.22 mgN 沈澱

Fig. 17 牛水晶体および成分分層電泳図

表 4 牛水晶体および成分分層電気泳動測定値

	成分比 (%)				絶対易動度			
	F	α		β	F	α		β
水晶体	1.8	50.5		47.3	5.4	4.6		2.1
α Cryst. (粗)	1.5	88.2		10.3	5.4	4.5		2.2
α Cryst. (精)	1.5	95.6		2.9	5.4	4.5		2.3
β Cryst. (粗)	2.3	22.7	19.7	55.3	5.5	4.8	3.7	2.3
β Cryst. (精)			6.1	93.9			3.6	2.1

Phosphate Buffer pH 7.7 I.s.=0.2, 0.5°C 絶対易動度 = $-\text{cm}^2\text{volt}^{-1}\text{sec}^{-1} \times 10^5$

Fig. 18 抗牛水晶体抗体に対する成分分層定量的沈降図

するので S 分層中 19.0% が沈澱することとなる。それ故 f 分層は α Crystalline で S 分層は β Crystalline と思われ、一方 f 分層と上昇脚の濁濁の一致することもこの結果と矛盾しない。図 18 は水晶体抗体を水晶体抗原およびその分層である α および β Crystalline で反応させた場合の定量的沈降図であって、水晶体抗体との沈降曲線は 2 個の最大沈降帯を有する所謂複合系 Complexform を形成し、この成因は相互に独立した抗原性を有

する α および β Crystalline より成立することが本図より理解される。この結果は水晶体の電泳図が明確な 2 峯を有することと対比して興味深い。

用い、洗滌前リン巴球の抗体価はリン巴液抗体価より高いが洗滌後の抗体価はリン巴液より低いことを発表しておるが我々の場合は、定量的沈降法を用いたため抗体量に制限

IX) 組織抗体の研究 (局所免疫法)

図 19 a) は足蹠皮下に 8 回免疫後膝窩リン巴腺の洗滌後の組織抽出液における抗体量を、定量的沈降法で測定した沈降曲線である。本系統では抗原抗体稀釈法による Ehrlich, Harris 一派の研究^{16, 17, 18, 19, 22)}がある。リン巴腺抽出液では沈降 N 量は 0.32 mgN であり、また洗滌液では 0.25 mgN であって、何れも血清の沈降 N 量 0.15 mgN より高い値を示した。この際リン巴腺中のリン巴液の沈降 N 量が問題となるが以上の結果より局所免疫による組織抽出液の方が血清より高い抗体 N を有することとなる。次に図 19 b) は 13 回免疫の場合を測定したもので沈降 N 量は洗滌リン巴腺では 0.6 mgN であって a) の 0.32 mgN より多く、また対称として用いた免疫しない側のリン巴腺抗体量 0.15 mgN に比して 3-4 倍の沈降量を示した。本例では他臓器例えば骨髓等に組織抗体がリン巴腺抗体に比し a) より多く含まれ、頻回免疫のため抗原が血清を通り他臓器にも移行したようである。リン巴腺抗体は本例では血清抗体の 1.5 倍の沈降 N 値を示した。図 19 c) は ① リン巴腺抽出液 C 分層, ② 輸出管より採集したリン巴液, ③ リン巴球抽出液および ④ Schneider 法で分画遠心した Nw 分層, Mw 分層の抗体量を定量的沈降法で測定した沈降曲線である。本例よりリン巴腺抽出液中の抗体量は輸出管よりのリン巴液より高いことが分る。リン巴球抽出液にはリン巴液の約 $\frac{1}{4}$ の沈降抗体が存在した。Harris²²⁾ は稀釈法を

Fig. 19 局所免疫法定量的沈降図

があったので、重量の5倍量の生理的食塩水洗滌後の抽出液中の沈降N量であり、洗滌前リンパ球との比較は不明である。以上を要言すれば、局所免疫法によるリンパ組織抽出液の抗体量は、輸出リンパ管よりのリンパ液抗体量よりも多く、また血清抗体量よりも多い。それ故リンパ腺組織細胞には、抗体が吸着または含有されて存在することとなる。即ち組織抗体の存在する可能性があると考えることができる。洗滌後のリンパ球にも或程度の抗体は存在する。リンパ組織抽出液抗体の定量的沈降曲線は他臓器と異り、定型的な拋物線を描き血清抗体の場合と一致する。このことはリンパ腺抗体の性質が血清抗体に近くただちに mobilize され得ることおよび、抽出液に反応阻止因子の少いことを示すと思われる。図 19 c) にはリンパ腺組織の N および Mw 分層抽出抗体の卵白 Alb 抗原に対する定量的沈降曲線が併せ記されている。Schneider¹²⁾ によれば N 分層は核および未破壊細胞より成り、Mw 分層は主に Mitochondria より成るとされているが、この2分層より洗滌後 freezing thawing で抽出した組織抗体量は、溶解性蛋白分層即ち C 分層に比べて約 $\frac{1}{5}$ であって、核や Mitochondria に含有される抗体量は Cytoplasmic protein の抗体に比べて少ないのではないかと推定される(77 頁註参照) 組織細胞で生成される抗体と血清抗体との関係を調べる他の1つの研究法として Dougherty²⁰⁾ 一派が進められた pituitary adrenotropic hormone の研究がある。

我々は増加した抗体の性質を研究するために mobilize された抗体量を定量的沈降法で測定した。図 20 は Adrex 注射後における血清中の沈降量曲線の変化を示したもので、総沈降量は注射前は 0.35 mgN であるが注射後3時間値 0.37 mgN、6 時間値 0.47 mgN、9 時間値 0.49 mgN と増加し、抗体/抗原比は注射前 10.7、3 時間値 11.3、6 時間値 14.3、9 時間値 15.7 と増加した。抗血清中における抗体量増加の形式は既報⁷⁾ の免疫経過における、血清抗体の増加と同形式であり、抗体増加後の、沈降曲線も拋物線である故組織抗体が完成された抗体として血中に放出されると見ることができる。このことはリンパ組織抗体は拋物線であることと対比できる。抗体増加の原因として ① 臓器に存在する抗体の放出、即ち予備抗体の動員という形式、② 抗体生産増の強形式が考えられるがリンパ球破壊像の見られ

Fig. 20 Adrex 注射による抗体変動図 (抗卵白 Alb. 家兎抗体)

a) 抗酵母マンナン臓器抗体

b) 抗卵白 Alb. 臓器抗体

c) 抗牛 γ glob. 臓器抗体

Fig. 21 静脈免疫 (全身免疫) 家兎臓器抗体定量的沈降図

ること及び増加時間の早いことは、前者に有利な条件となるが、①のみが絶対的条件で②が全く存在しないと明言できない。寧ろ多少存するのではあるまいか。(全身免疫法)——図 21 は単一抗原で全身免疫を行った場合における各臓器 1 g (湿量) 当りの抗体量を定量的沈降法で測定した沈降曲線であって、a) は酵母マンナン、b) は結晶卵白 Alb. c) は牛血清 γ glob. 系の場合である。本図より全身免疫法における抗体含有量は骨髓>脾>洗滌淋巴腺>肝臓>肺>腎臓の順のことが分る。表 5 は図 21 の結果を表示したもので本例に用いられた抗体は酵母マンナン系 $y=10.5x-32x^2$ 、結晶卵白 Alb. I は $y=20.2x$

$-102x^2$ 、II は $y=16x-100x^2$ 牛血清 γ glob. 系 I は $y=13.2x-36x^2$ 、II は $y=14.2x-40x$ の反応方程式を有して何れも標準抗体であった。酵母マンナンは多糖類であり N 含有量が 0.08% 位であるから沈降 N 量がそのまま沈降抗体量となり得る故、組織抗体測定用には最適の反応系であった。蛋白抗原の場合は反応が完全でないようであるが一応総沈降量を目標に論ずることとした。それ故実際の沈降抗体量は多少低い値となる。また肝抗体でも C 分屑は N および M 分屑より多くの抗体を有した。表 5 第 II 列は単位臓器湿重量当りの総沈降量で、第 III 列は各臓器含水度の差を考慮して単位乾燥重量当り

表 5 a)

臓 器	抗酵母マンナン家兎抗体				抗卵白アルブミン家兎抗体 (1)			抗卵白アルブミン家兎抗体 (2)		
	抗体 mgN 湿臓器 g	抗体 mgN 乾臓器 g	総抗体量 mgN	血清比 (%)	抗体 mgN 湿臓器 g	抗体 mgN 乾臓器 g	総抗体量 mgN	抗体 mgN 湿臓器 g	抗体 mgN 乾臓器 g	総抗体量 mgN
血 清	0.97				1.08			0.74		
骨 髄					0.33	3.50		0.20	2.10	
脾	0.26	2.70	0.65	26.8	0.30	3.48	0.90	0.19	1.98	0.57
淋 巴 腺	0.22	2.34			0.27	2.86		0.23	2.45	
肝	0.16	1.58	9.80	16.5	0.28	2.76	18.2	0.15	1.48	7.20
肺	0.12	1.37	3.00	12.4	0.21	2.39	4.60	0.13	1.48	3.12
腎	0.11	1.02	2.65	11.3	0.07	0.63	1.68	0.05	0.47	0.90
淋巴洗液					0.10			0.06		
淋巴細胞					0.02			0.02		

b)

臓 器	抗牛血清 γ グロブリン家兎抗体 (1)			抗牛血清 γ グロブリン家兎抗体 (2)		
	抗体 mgN 湿臓器 g	抗体 mgN 乾臓器 g	総抗体量 mgN	抗体 mgN 湿臓器 g	抗体 mgN 乾臓器 g	総抗体量 mgN
血 清	1.44			1.54		
骨 髄	0.56	5.88		0.56	5.88	
脾	0.52	5.41	1.56	0.46	4.78	1.61
淋 巴 腺	0.28	2.97		0.32	3.38	
肝	0.33	3.25	23.2	0.28	2.76	18.8
肺	0.16	1.82	3.20	0.12	1.37	2.45
腎	0.06	0.56	1.62	0.08	0.74	2.00
淋巴洗液	0.12			0.10		
淋巴細胞	0.03			0.12		

の総沈降量として表わした値である。第Ⅳ列は臓器に含有される総抗体量を表わし、この結果のみから云えば、肝のような重量の多い臓器は案外抗体生産の関与度は高いかもしれない。第Ⅴ列は血清 1 ml 中の沈降 N 量と組織湿重量 1 g 中の沈降 N 量の比を求めたものである。以上の結果より単位重量当りの抗体量は骨髓脾洗滌淋巴腺肝肺腎の順に少いことが分る。但し未洗滌淋巴腺は骨髓と殆んど等しいかまたは多い。一般に網内系臓器の前三者と肝とに多少の差があり肝と肺腎との差は大きい。強力に洗滌後の γ glob. 系の例では腎に殆んど抗体は含有されなかった。単位重量当りの比較は臓器中の抗体純度の比較であり、即ち抗体生産組織含有率の比較であるが、総量の時は前述のごとく肝等が問題となる。定量的沈降曲線より云えば臓器抗体の当量帯における抗体/抗原比は血清抗体より低く、且つ淋巴腺抗体以外は拋物線に対し多少偏位する。また臓器 1 g 当りの最大沈降帯は血清より抗原過剰側に存する。以上の事実は組織抗体の場合、反応の不完全性を示すもので、その原因は、抗体自身の不完全なためか抗体量の少いために沈降物の溶解度によるものか、または組織蛋白に反応阻止因子の存するためかの何れかと思われる。組織抗体の存する分層は γ glob. と反応交叉性の部が C_3 に殆んど存することおよび、既報のごとく組織抗体が Felton の solution で濃縮されることより、恐らく C_3 分層に存すると思われる。また組織抗体の臓器含有量の順序は組織培養における抗体生産の順序と矛盾しない。一方全身免疫法の場合は組織洗滌後の血清抗体の残留が誤差となる。本研究は局肝免疫法による淋巴腺抗体の研究が他の網内系臓器および淋巴組織含有臓器に応用できる可能性を全身免疫法を用い検討したものである。Harris¹⁹⁾ は淋巴腺のみならず脾のマルビギー氏小体の activity と抗体価の平行することより本組織が抗体生産に与ることを推定し、また Moeschlin の行った脾に免疫時 plasma 細胞の出現を見出した実験²¹⁾ と考え併せ、我々の実験結果も淋巴球説のみを中心に考えた場合でも成立する可能性が存するが、一方抗体生産に網内系細胞の関与も否定できない。それ故抗体生産に関与する細胞が淋巴系のみか、また網内系に属する他の細胞群が関与するかは今後の研究に待ち度いと思う。

考 案

臓器洗滌 血液凝固の起らぬ内に全身洗滌および臓器洗滌を行う必要があるが、一方かかる洗滌法を如何に完全にしても臓器より残留血清の全部を取り去ることは不可能であるから、血清蛋白と臓器蛋白の比較としての交叉度および臓器抗体の含有量の研究の時には、結論を慎重にする必要がある。臓器抗体が細胞に吸着性であるか、

含有性であるかを決定するのは今後の問題である。電泳図臓器分層の電泳図に就いても glob. の易動度を有する峯が主峯であるが、これらの峯に Protein-protein association が有るか否かは、峯の意義付けに大切で、酵素含有分層と、結晶化酵素の易動度の比較も、Protein-protein association の解決に大切である。易動度の決定には、脱水芒硝分層が基本的には簡易であるが、酵素分画自身としては塩析剤除去の容易な Ethanol 法が有効と思われる。

結 論

1) 肝蛋白を A, B, C, D 分層に分ち、更に C 分層を脱水芒硝の溶解度曲線より C_1, C_2, C_3 の三分層に分つことができた。2) 各分層の酵素分布を調べ C_3 には Catalase, Peroxydase, C_2 には Esterase が多く、 C_1 は酵素含有量が少く、B には自家融解酵素が多い結果を得た。3) C_1 分層と C_3 分層は相当の交叉反応が存し、また肝 C 蛋白系沈降曲線が単一に近いことは、C 分層の電泳図に G (glob.) 分層が多いことと同じく、C 分層が血清等より単一に近いことを示す結果を得た。4) 肝 C 抗体、淋巴 C 抗体に対する各臓器の交叉反応より、肝、腎、淋巴腺、脾の順に近似性が存し、また溶解度の同じ C_3 分層でも臓器により反応性を異にした。5) γ glob. 抗体との臓器 C 分層の近似性は、淋巴腺>脾>腎>肝の順で、また臓器では $C_3>C_2>C_1$ の順序に交叉度が有り、Alb. 抗体には $C_1>C_2>C_3$ の順序であった。6) 肝電泳図は glob. に属する易動度の峯が多い。脱水芒硝による C_1, C_2, C_3 分層、および Ethanol 分画による C_1, C_2, C_3 分層の電泳図を検討した。Alb. に属する易動度の峯は少かった。牛水晶体蛋白の電泳図は 2 個の明確な峯が存し、その峯は α, β Crystalline であることが分層の電泳図より証明された。定量的沈降法では水晶体反応系は複合蛋白系の形を示した。7) 足蹠免疫法による家兎の膝窩淋巴腺抗体量を定量的沈降法で測定し、淋巴組織抗体量は淋巴液および血清の抗体量より高いことを証明した。また溶解性蛋白の沈降 N 量は核およびミトコンドリア分層の沈降 N 量より多く、 $M_w>N_w$ であり、また洗滌後の淋巴球抽出液にも抗体が残存した。8) 全身免疫法による家兎抗体の臓器抗体量を定量的沈降法で測定した結果骨髓>脾>洗滌淋巴腺>肝>肺>腎の順が得られた。9) γ glob. および抗体を作る淋巴腺および網内系に抗体および γ glob. 交叉蛋白が吸着、または含有されることが証明されたが、一方 Alb. を生産する肝に Alb. が少いことは、Alb. が肝で造られて後、直ちに血中にでるか、または他の臓器も多少 Alb. 生産に関与するか何れかで無いかと推定される。緒方教授の御指導に深謝の意を表

する。

文 献

- 1) 高橋基之, 林靖, 本誌 1 卷 2 号 17 (1952) 等.
- 2) E.C. Gjessing et al; *J.B.C.*, **188**, 155 (1951)
- 3) 岡崎卓一, 岡医誌, 498 号 (1931)
- 4) 岸岡精華, 岡医誌, 522 号 (1933) 531 号; 877 (1934)
- 5) 緒方正名, 本誌 1 卷 2 号, 21 (1952)
- 6) 緒方正名, 本誌 1 卷 3 号, 55 (1953)
- 7) 緒方正名, 本誌 2 卷 2 号 (1954)
- 8) A. Fujita, T. Kodama; *Biochem. Z.*, **20**, 232 (1931)
- 9) H. Masamune, K. Kodama; *J. Biochem.*, **14**, 475 (1931-32)
- 10) C.J. Harrer, C.G. King; *J.B.C.*, **138**, 111 (1941)
- 11) M.J. Kunitz; *J. gen. phys.*, **30**, 291 (1946-47)
- 12) W.C. Schneider; *J.B.C.*, **176**, 259 (1948)
- 13) G.R. Minot, Wp. Morphy; *J.A.M.A.*, **87**, 470 (1926)
- 14) A.C. Wood & E.L. Burky; *J.A.M.A.*, **89**, 102-110 (1927)
- 15) A.C. Wood et. al.; *Arch. Opth.*, **57**, 464-466 (1928)
- 16) W.E. Ehrlich & T.N. Harris; *J. Exp. med.*, **76** (4), 335 (1942)
- 17) W.E. Ehrlich & T.N. Harris & E. Mertens; *J. Exp. med.*, **83**, 373 (1946)
- 18) T.N. Harris and Susanna Harris; *J. exp. med.*, **90**.
- 19) W.E. Ehrlich and W. Voigt; *Beitr. path. Anat. ag. path.*, **93**, 348 (1934)
- 20) Dougherty & White; *Endocrinology*, **35** (1), 1 (1944)
- 21) S. Moeschlin und B. Demiral; *Klin. Woch. schr.*, **30**, 827 (1952)
- 22) T.N. Harris and Susanna Harris; *J. immunol.*, **61** (1950)

(註) 抗体含有量は $Mw > Nw$ の順であるが I^{131} ラベル抗原を用いて細胞内顆粒に含有される抗体と吸着反応を行った結果では Mw (Mitochondria) $> Pw$ (Microsom) $> Nw$ (Nucleus) の順になり, 前二者と Nw との差は大きい。

近 時 雑 感

私共の研究室にあるチゼリウスの電気泳動装置は誠に不細工なものである。日立製の第 2 号とか第 3 号製品とかであるそうである。私共の処以外でも御使用になっておられる方は勿論あることと思われるが, 現在のスマートな製品に比べれば全くのバラック・セットと云えるであろう。何しろ水槽, レンズ系等が汽車の走るレールの上に載ってるのである。始めてこの装置が教室に届いた時, 梱包の中に 7-8 尺もある恐しく重い箱があったが, 開けて見たらこのレールであった。何もレールを使わなくとも良いのにとと思って聞いた処, 丁度有り合せがあったのでこれに取りつけたという話であった。

始めてどうやらパターンが写るようになった時, 二三の教授にも見に来て戴くことにしたが, この時水槽の中に氷を山に入れて冷したため, 水槽のレンズが曇ってどうにも処置がない。1 人が数秒見ている中に曇ってしまう。その度にレンズを拭くのであるが, 操作している者は全く汗みどろになってしまった。その後もレンズの曇るのには手を焼いて, 理髪店で使うドライヤーを使ってみたり, また乾燥剤を使って見たり, 苦心に苦心を重ねねばならなかった。またセルの破損にも悩まされ通しであった。蓄電池から定電圧定電流装置への改良, 各分層の測定に重量法の採用等今日から見れば全くの常識的なことが, その当時は非常な苦心を要した事柄であった。

しかしこの不細工なバラック・セットにも捨て難い味がある。私共が現在夢中になっているこの装置によって, アルブミンとグロブリンを別個に取り出すという仕事もこのバラック・セットの御蔭である。この点から云えば実験装置というものは余りコンパクトにでき上ったものが必ずしも最も価値のあるものとはいえないような気がする。

* * * * *

ハイルマイヤーが来朝したりして, 今後日本でも高電圧濾紙電気泳動法が盛になると思われる。高電圧を用いるという考え方は, X 線写真撮影に於ても独逸では応用されて, すぐれた成果をあげている。しかし高電圧撮影法は日本独自の蓄電放電式によるものと一利一害であると考えられる。

* * * * *

私は嘗て行った分光分析に於ける断続弧光法の研究から, 濾紙電気泳動法にもこの装置を応用したらと考えている。時間と金があったら今年中に何とかして手をつけたいと思うが, 特志家の御協力を願う次第である。

慶応義塾大学 五味 二郎