



Title	結核動物血清の免疫化学的研究(V) : 抗体の血清蛋白内に占める位置について
Author(s)	萩原, 昭男; HAGIWARA, Akio
Description	
Citation	結核の研究, 9, 76-86
Issue Date	1958-10
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26660">https://hdl.handle.net/2115/26660</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	9_P76-86.pdf



# 結核動物血清の免疫化学的研究 (V)\*

## 抗体の血清蛋白内に占める位置について

萩原 昭 男

(北海道大学結核研究所病理部 指導 森川和雄助教授)

(昭和 33 年 7 月 31 日受付)

Tiselius による電気泳動法の発見は広く免疫化学の研究に幾多の業績を残さしめている。殊に同法による血漿蛋白の分画の研究は、免疫抗体そのものの理解にも強い光を投げ与えている現状である。今日抗体が血漿 globulin 分層に存する事実は広く一般の承認をうるに至っており、殊にその  $\gamma$ -globulin 分層が抗体と特に深い関係を有することも認められている。

当研究室においても数年来の実験的研究によつて、結核動物の血清蛋白中、ツベルクリン抗体が  $\gamma$ -globulin 分層に含まれると考えざるをえない多数の成績が出されている。即ち、BCG 免疫によつて血清  $\gamma$ -globulin が増量し、この  $\gamma$ -globulin はツベルクリン又は生菌による試験管内吸収試験、又は大量ツベルクリン脱感作及び毒力菌重感染によつて著明に減少することを認めており<sup>1)</sup>、卵白アルブミンを用いた Arthus 型アレルギーの場合と軌を一にする事実である。更に興味ある事実は前記吸収試験、ツベルクリン脱感作、又は重感染実験では  $\gamma$ -globulin の減少と共に  $\alpha$ -globulin も著明に減少すること<sup>2)</sup>、 $\alpha$ -globulin 分層にも或る種の抗体の存在を推察させる成績と考えられる。

そこで、全ての抗体は前述の如く  $\gamma$ -globulin 分層に限られているものなのか、更にもしそだとすると、 $\gamma$ -globulin 分層内において種々の抗体が電気泳動的に同一な分布を示すものであるかと言う疑問がわいて来る。今日抗体と目されるものは非常に多種類があつて、その本質が一元的と考えるには都合の悪い多くの事実が認められている。

そこで著者は先ず沈降性抗体と被働感作皮膚反応抗体を一応目標としてアレルギー反応の 2 つの典型的反応と目される Arthus 現象と Tuberculin 反応の場合について実験を行つたわけである。

尚当研究室においては既に奥山、森川<sup>3)</sup>が濾紙泳動

法及び低温アルコール分画法でえた血清蛋白について同様な研究を行つているが、材料の量及び分画法そのものに、幾分不十分な所があるので、その一部については追試と云う形になつてはいるが、今回は更に澱粉による zone electrophoresis 法を併用して血清蛋白各分層を更に細分して、抗体分布を確認しようと試みた次第である。

### 第 I 編 低温アルコール処理法で得た血清分画成分による研究

血清蛋白分層を使用する実験では何と云つても先ず分画された量が問題になる。つまり大量の材料を得ると云う条件がなくては実験遂行は困難であり、又不正確にもなる。この意味で従来の塩析法或いは三塩化醋酸等を利用した方法が推奨出来るが、ここで問題になるのは蛋白質の変性と云う事実である。もとの材料の中にあると全く同じ状態で分画しなければ意味がない。その点低温アルコール法は幾分前記分画法の不備を補つてくれる。それで先ずこの方法をとつてみたわけである。尚 Cole & Favour<sup>3)</sup> は Cohn の記載した方法で結核死菌免疫モルモットの血漿を分離し、 $\alpha$ -globulin,  $\gamma$ -globulin 分層に抗体の存在を認めているが、被働感作動物のツベルクリンに対する反応において、時間的反應経過の観察に欠けているし、又組織反応の記載も簡単であり、又  $\alpha$ -globulin については Favour をして非特異的反應であつたと云わしめている報告<sup>4)</sup>も見られる所から一応彼らの成績を検討する意味でこの実験を企図した次第である。

#### 1. 実験材料及び実験方法

##### i. 使用血清

##### a. アルブミン感作兔血清

Cole の変法<sup>5)</sup>で作製した結晶性卵白アルブミン 1%

\* 本論文要旨は第 47 回日本病理学会総会 (1958 年) において発表した。

溶液 3 ml で隔日 3 日皮下注射により、家兎 5 羽を感作し、30 日後空腹時全採血を行い、血漿を採血した。採血時の各兎の Arthus 現象 (1% 卵白アルブミン溶液 0.1 ml 皮内注射) は 20×20 mm~35×40 mm の発赤、中心は出血している強い反応を示した。この際の沈降反応重層法による抗体価は血清 32 倍稀釈陽性を示した。

#### b. 結核免疫兎血清

8 羽の家兎を、BCG 15 mg 皮内注射により免疫し、60 日後空腹時全採血を行い、血漿を得た。採血 2 日前にツベルクリン反応 (40 倍旧ツベルクリン [伝研製] 0.1 ml 皮内注射, 24 時間後判定) を施行したが 10×13 mm~20×20 mm の発赤を示し、何れも中等度の硬結を示した。全血清を混合して分画した。

#### ii. 分画法

血清の分画は Cohn の低温アルコール処理法の第 6<sup>6)</sup> 及び第 9<sup>7)</sup> 法を応用した。尚全操作は、-10°C の低温室内で行い、沈澱として得た分画成分は凍結乾燥して低温に保存した。

#### 2. 分画成分の性状

血清分画成分は、 $\gamma$ -globulin 分画 (以下  $\gamma$ -分画) とそれ以外の分画 (以下非  $\gamma$  分画) に分けた。非  $\gamma$  分画は、 $\gamma$  分画を除去した残りの分画であるが、血清アルブミン分画は大部分含まれていないものである。これを濾紙電気泳動法で泳動し、その泳動図を図 1 に示した。

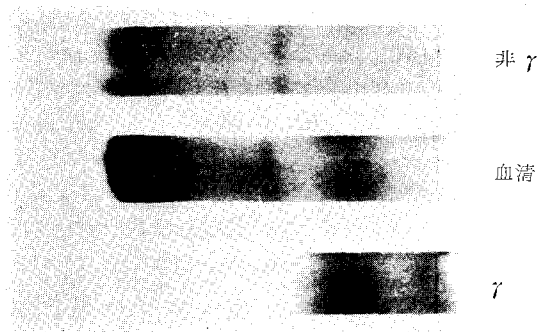


図 1 血清分画成分泳動図 (低温アルコール分画法)

次に各分画を 0.9% 食塩水 2% 溶液として、沈降反応重層法により抗体価を求めた。この結果を表 1 に示した。

表 1 沈降反応重層法による抗体価

アルブミン感作血清 (卵白アルブミン抗原)	非 $\gamma$ 分画成分	(-)
	$\gamma$ 分画成分	8 倍稀釈陽性
結核免疫血清 (旧ツベルクリン抗原)	非 $\gamma$ 分画成分	(-)
	$\gamma$ 分画成分	原液陽性

### 3. 分画成分被動感動物における皮膚反応

皮膚反応の方法は、各分画を生理的食塩水溶液として、モルモット又は兎の腹腔内に注射し、16 時間後に抗原 (卵白アルブミン感作血清分画成分の場合は 1% 卵白アルブミン、結核免疫血清分画の場合は 40 倍稀釈旧ツベルクリン) 0.1 ml を、モルモットでは腹壁抜毛部に 6 ケ所、兎では背部剪毛部に 10 ケ所皮内注射、対照として生理的食塩水 0.1 ml を注射し 1, 3, 6, 10, 24 及び 48 時間後に発赤の直径及び浮腫によって増加した皮膚の厚さを測定した。尚兎の皮膚反応部は時間毎に切り取り、ホルマリン固定し、Hematoxylin-Eosin 染色標本を作製して組織変化をしらべた。

i) アルブミン感作血清分画被動感動物における皮膚反応

#### a) モルモットにおける反応

アルブミン非  $\gamma$  分画成分 16 mgN (mikro-Kjeldahl 法で測定、以下同じ) 又は  $\gamma$  分画成分 10 mgN を 2 つの群の正常モルモット腹腔内に夫々注射した。之らの例中、GA2 (非  $\gamma$  群) (体重 270 g)、及び GA6 ( $\gamma$  群) (体重 335 g) の抗原注射による Arthus 現象の経過を図 2 に示した。尚皮膚反応の強さは発赤平均直径に浮腫の強さをかけたものである。

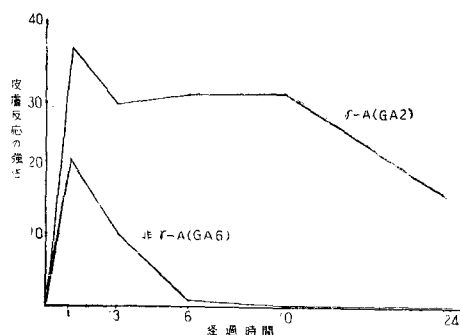


図 2 卵白アルブミン感作家兎血清分画成分で被動感動物したモルモット (GA2, GA6) の卵白アルブミンに対する Arthus 現象 (低温アルコール分画法)

図に見るように非  $\gamma$  分画注射動物 (GA6) は 1, 3 時間に抗原注射による浮腫を主体とした或程度の反応がみられたが、6 時間以降では反応がみられなくなった。これに反し、 $\gamma$  分画注射動物 (GA2) は最初から発赤浮腫の反応が強く、10 時間後までその強さを持続し、24 時間後やや浮腫の減少がみられたが、明らかな発赤を示していた。生理的食塩水対照部は殆んど反応がみられなかった。

#### b) 家兎における反応

アルブミン非 $\gamma$ 分画 50 mgN, 又は $\gamma$ 分画 50 mgN を 2 つの群の正常家兎腹腔内に注射した。之らの内 RA 103 (非 $\gamma$ 群) (体重 2000 g) 及び RA 107 ( $\gamma$ 群) (体重 2100 g) の抗原皮内注射による Arthus 現象の経過を図 3 に示した。図にみられるように非 $\gamma$ 分画注射

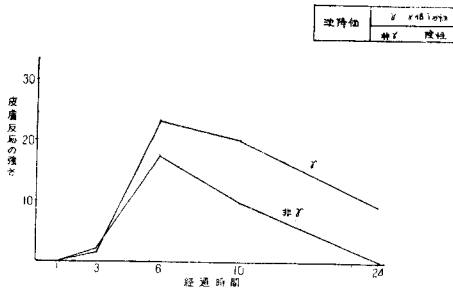


図 3 卵白アルブミン感作家兎血清分画成分で被動感作した兎 (RA 103, RA 107) における Arthus 現象 (低温アルコール分画法)

例 (RA 103) においても、6 時間を頂点とする反応がみとめられたが、 $\gamma$ 分画注射例 (RA 107) における反応の方がより強く、10 時間後にもかなり強い発赤浮腫があり、24 時間後非 $\gamma$ 分画注射例 (RA 103) では反応が殆んど消退しているのに反し、 $\gamma$ 分画注射例 (RA 107) では、まだ明らかな反応がみとめられた。生理的食塩水注射部位にはどちらの例にも反応がみられなかつた。

以上の反応部位を組織学的にみると、非 $\gamma$ 分画注射例では初期に多形核白血球の反応がみられるのみで 3 時間目に一番強い浸潤があり、一般に浮腫が弱い。これに反し $\gamma$ 分画注射例では 10 時間目が最も強い反応であつて、多形核白血球の浸潤が主で、特に血管周囲に強くみられた。浮腫も非 $\gamma$ 注射例より強く、24 時間後にも弱いながら細胞浸潤がみられた。

ii) 結核免疫兎血清分画被動感作例における皮膚反応

a) モルモットにおける反応

結核免疫兎血清非 $\gamma$ 分画 13 mgN, 又は $\gamma$ 分画 18 mgN を 2 つの群の正常モルモット腹腔内に注射した。之らの内、GT 8 (非 $\gamma$ 群) (体重 555 g) 及び GT 12 ( $\gamma$ 群) (体重 570 g) におけるツベルクリン反応 (以下ツ反) の経過を図 4 に示した。図に見られるように非 $\gamma$ 分画注射例 (GT 8) と $\gamma$ 分画注射例 (GT 12) は同じ様な経過の反応を示したが、 $\gamma$ 分画注射例の方が発赤が大きく、浮腫も強く、しかも反応の増強がみられた。しかし $\gamma$ 分画注射例でも 24 時間後には発赤が殆んど消失し、浮腫だけが残つていた。尚生理的食塩水注

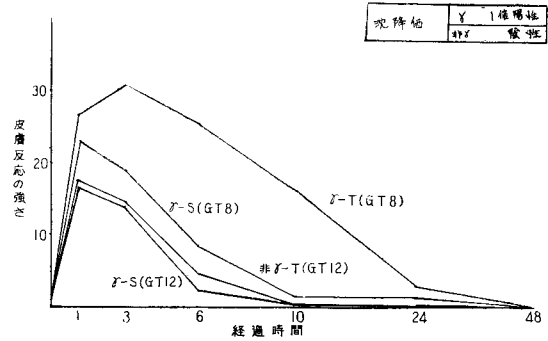


図 4 結核家兎血清分画成分で被動感作したモルモット (GT 8, GT 12) の旧ツベルクリン (T) 及び生理的食塩水 (S) に対する皮膚反応 (低温アルコール分画法)

射部にも初期に相当強い浮腫がみとめられたが、速やかに消失した。この反応を組織学的にみると、非 $\gamma$ 分画注射例では、1 時間後血管内に白血球が僅にみとめられ、3 時間後から多形核白血球の浸潤がみとめられた。浮腫は全層にみとめられ、筋層間にも浸出細胞が入りこんでいた。10 時間後から少量の単球の出現がみとめられた。この頃には白血球浸潤は減少し始め、24 時間では反応はぐつと弱まり、48 時間になると、ほとんど細胞浸潤はみとめられなかつた。 $\gamma$ 分画注射例では、1 時間後血管内に多形核白血球の少量及び単球が現われ、3 時間後から多形核白血球の浸潤が強くなつていのがみとめられた。特に血管周囲に強くみられ、血管内には栓塞様に白血球集塊があつた。単球は少量しかみられない。以後細胞反応は次第に強くなり、10 時間後にもつとも強く、浮腫もみられた。単球は 10 時間後でも余り増量してはいない。24 時間になり細胞浸潤はやや弱まるが非 $\gamma$ にくらべてずつと強く、単球が多形核白血球よりも多くなつた。72 時間後にはまだ単球の強い浸潤の残つていのがみとめられた。

b) 家兎における反応

結核免疫兎血清 $\gamma$ 分画 112 mgN を 3 羽の正常家兎腹腔内に注射した。この内 RT 112 (体重 1950 g) におけるツ反応を図 5 に示した。尚非 $\gamma$ 分画は少量のため行わなかつた。反応は最初から明かに現われたが、6 時間目までは浮腫が主であり、注射されたツベルクリンの拡散が阻害されているような感じであるが、10 時間頃から発赤が明らかとなつて来て、24 時間後発赤が最も大きく又浮腫も強かつた。48 時間後には浮腫がかなり消退し、72 時間後に僅かな発赤だけがみとめられた。生理的食塩水対照部はほとんど反応がみられなかつた。組織学的には、1 時間後から既に多形核白血球の浸潤が

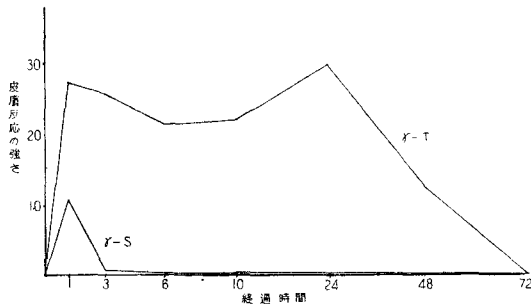


図5 結核家兎血清分画成分で被動感作した家兎(RT 112)の旧ツベルクリン(T)及び生理的食塩水(S)に対する皮膚反応(低温アルコール分画法)

僅かに出現し、次第に増強し、10時間後この浸潤は最も強く、この頃から単球の出現があり、24時間後最も強い単球性の細胞浸潤がみとめられた。48時間後も強い単球の浸潤が持続し、72時間後には単球ばかりの集団が残っているのがみられた。

#### 4. 第I編小括

以上の成績をまとめると、抗卵白アルブミン抗体も旧ツベルクリン抗体も沈降性のは血清 $\gamma$ -globulin分画に含まれる。又皮膚感作抗体については、卵白アルブミン感作家兎血清 $\gamma$ -globulinをモルモット及び兎に腹腔内注射を行うと抗原注射によつて時間的にも又細胞反応の形式においても典型的Arthus型の反応が見られる。一方結核免疫家兎血清 $\gamma$ -globulin分画では家兎の腹腔内注射後旧ツベルクリン皮内注射によつて比較的deleyedの性格の強い反応が起り、単球性反応も幾分著明であるが、モルモットの場合は若干deleyedの性格が弱く、細胞反応の形式においても単球性性格が若干弱く、immediate typeの性格が強調された感を呈する。しかし何れにせよ、 $\gamma$ -globulin以外の分画にはこれらの反応にあずかる蛋白質を含んでいないことは確かである。

## 第II編 Starch Electrophoresis で 得た血清分画成分による研究

前編で卵白アルブミン及びツベルクリン抗体が血清 $\gamma$ -globulinに存在する事実を認めえたので今度は更に詳細にこの分画中の分布を知る必要にせまられた。このためには、どうしても電気泳動法の利用を考えねばならない。しかもCohnの低温アルコール処理法といえどもまだ抗体蛋白の変性が当然想像される。出来るだけ純粋に、しかも抗体蛋白による障害を少く分画する為には

最近さかんに用いられるようになった澱粉をmediumとしたzone electrophoresisが一番この条件をかなえてくれると考えられる。Tiselims法では泳動の両極端にあるalbumin及び $\gamma$ -globulinの分離には便利であるが、この中間が分画出来ない点、又両端においても細かく分画出来ない欠点を有する。この点starch electrophoresisは容易にどこでも分画出来るし、又比較的多い量の血清を1回で処理出来る。只実験条件が、その装置が簡単であるだけに未だ確立してない不便がある。泳動そのものの技術のみならず更に澱粉溶出液の濃縮装置その他に幾多の障碍と戦わねばならなかつた。とにかく一応の成績をえたのでここに報告する次第であるが、この編では先ず卵白アルブミン感作家兎血清について行った成績のみを記載する。

### 1. 実験材料及び実験方法

#### i. 使用血清

Coleの変法で作製した結晶性卵白アルブミン1%溶液3mlで隔日に3乃至5回10羽の家兎を皮下に感作し、4週後から随時使用前に心採血を行い、血清を分離して分画に供した。採血2日前に1%卵白アルブミン溶液0.1mlでArthus現象をしらべたが、何れも25×25mm以上の発赤浮腫、中心に出血乃至壊死を示す強い反応がみられた。血清は採血後分画泳動を行うまで氷室内に保存し、3日以内に使用した。

#### ii. 分画法

澱粉をmediumとするzone electrophoresisを応用して分画した。澱粉は市販の馬鈴薯澱粉を用いた。長さ40cm、巾9cmの2枚の硝子板の間の長縁に、1×1cm角、長さ40cmの棒をクリップでとめて、長さ40cm、巾7cm、深さ1cmの泳動槽を作り、内面をパラフィン紙でおおつた。澱粉は、あらかじめ2倍量の25°Cに加熱した蒸留水で2回洗滌して乾燥したものを6時間以上緩衝液(Veronal 醋酸 buffer pH 8.5,  $\mu=0.045$ )に浸し、これを槽の中に流しこんだ。暫らく静置した後、余分の緩衝液を濾紙で吸い取り、一様の固さの澱粉のblockとし、両端は濾紙でおおつた。この両端と緩衝液槽は海綿で連絡した。又電極槽には5%塩化カリ液を使用した。

以上の様にして製作した澱粉blockを、陰極側より14cmの所を1cm巾切りとり、切りとつた澱粉から更によく余分の緩衝液を濾紙で吸いとつて、これに被検血清3.5mlをしみこませてよく混合し、再びそれを切りとつた部分に流しこみ、全体をパラフィン紙でおおつて泳動を開始した。泳動条件は恒電流20mA、初電圧300V、終電圧200V、17時間泳動した。尚泳動中

の泳動槽の温度を一定に保つために、硝子板の上に蛇行した硝子管を置き、水道水を漉流して温度の上昇を抑えた。泳動装置は図6に示した。(本装置は Kunkel 及び Slater<sup>8,9)</sup> の方法に準じて中込, 佐藤<sup>10)</sup> らの方法を参考

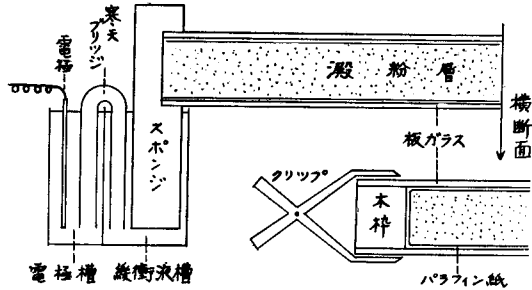


図6 Zone electrophoresis に使用した泳動装置

とし、当研究室で自製したものである。) 泳動終了後は、澱粉 block の上に細長い濾紙を当て、乾燥後 BPB で染色して泳動範囲を確めた。その範囲内を 1 cm 巾に切りとり、使用血清量と同量の 0.9% 又は 0.45% 食塩水を加えてよく混合し、暫く静置した後遠心することにより蛋白質を溶出した。この溶出液について、Biuret 法で Beckmann 型 Spectrophotometer (島津) を用いて蛋白質量を測定した。尚対照として蛋白泳動範囲外の澱粉

からも同様な方法で溶出した。

2. 実験成績

澱粉巾 1 cm 毎の蛋白量をプロットして画かれた泳動曲線は図7にみられるように Tiselius 泳動装置又は濾紙泳動装置で得られる曲線と近似している。ただ albumin の前に小さな1つの峯が先行するのがみられ

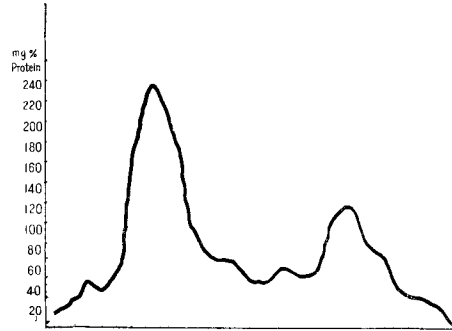


図7 Zone electrophoresis による血清蛋白泳動曲線 (結晶性卵白アルブミン感作家兔 A5 血清)

た。又著者の条件では血清を最初にしみこませた原点より陽極側に2つの峯 (Peak 1, 2) が出来、陰極側に2つの峯 (Peak 3, 4) が出来た。そこでこの各峯の頂点の部分の溶出液について濾紙泳動を行った。図8にみるよ

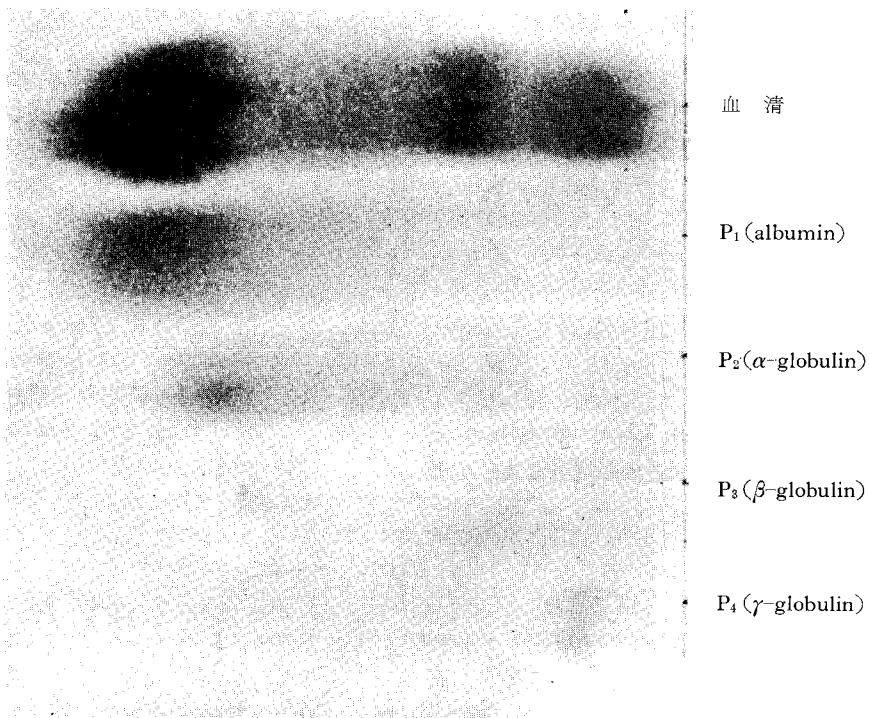


図8 血清分画成分泳動図 (Zone electrophoresis)

うに  $P_1$  は albumin,  $P_2$  は  $\alpha$ -globulin,  $P_3$  は  $\beta$ -globulin,  $P_4$  は  $\gamma$ -globulin にそれぞれ相当した易動度を示した。

i. 分画成分と沈降性抗体価の関係

先ず各峯 ( $P_1, P_2, P_3, P_4$ ) について沈降反応を行った。即ち 3 回分の泳動成分をそれぞれ pool して透析後凍結乾燥し、それを生理的食塩水で 2.5% 溶液に作り、沈降反応重層法で抗体価を測定した。抗原には 0.02% 結晶性卵白アルブミン溶液を用いた。その結果  $P_1, P_2, P_3$  分画成分ではいずれも陰性、 $P_4$  分画成分だけが明らかな陽性反応を示した。次に 1 cm 巾に澱粉 block を切った分画成分個々について沈降反応を行った。この際は濃縮せずに溶出した液そのまま反応を実施した。成績は図 9 に示したように、原血清 (抗体価 64 倍稀釈陽性) の分画成分では試験管番号 20 番より陰極側、即ち

$\gamma$ -globulin の峯の陰極側の分画成分が 4 倍稀釈乃至原液陽性、又原血清 (32 倍稀釈陽性の血清) の分画成分も試験管番号 24 番より陰極側、即ち  $\gamma$ -globulin の峯の陰極側部の分画成分だけが 4 倍稀釈乃至原液陽性を示した。

ii. 分画成分と皮膚感作性抗体の関係

皮膚反応の方法は、正常家兎の背部をあらかじめ剪毛しておき、それに抗血清及び各分画成分 (それぞれ 3 倍に常温で扇風機で濃縮したもの) 0.2 ml を 2ヶ所ずつ対照的位置に皮内注射し、40 時間後卵白アルブミン 1% 溶液 0.1 ml、対照側に生理的食塩水 0.1 ml を皮内注射して、そのあと経時的に発赤及び浮腫の強さを測定した。先ず前述の沈降反応をしらべた各峯の分画成分

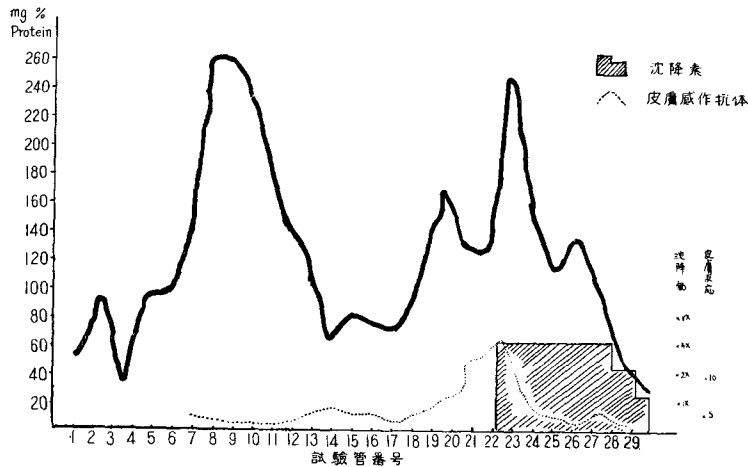


図 9 分画泳動図と各分画の皮膚感作性抗体及び沈降性抗体分布  
結晶性卵白アルブミン感作家兎 (A4) 血清, 抗体価 64 倍陽性

(各 2.5% 溶液) について皮膚反応を行った。溶出液は澱粉の混入が避けられないため、抗原注射前に既に直径 10 mm 程度の発赤がみとめられるため、抗原注射後の反応の測定がむずかしいが、図 10 にみるように抗血清注射部では 1 時間以降 10 時間まで持続し、24 時間でやや減退する 10×10 mm 程度の発赤を示す反応がみられた。一方  $P_1, P_2, P_3$  分画成分では抗原注射による反応はほとんどみられなかつたが、 $P_4$  分画成分注射部だけは、抗血清原液注射部より発赤も大きく、浮腫も強い反応を示した。この反応は 10 時間を最高として 24 時間後なお明らかな反応としてみとめられた。次に 1 cm 毎の澱粉 block の溶出液を用いた皮膚反応を図 9 (前掲), 11 に示した。之らの図の記載数値は 24 時間後判定の

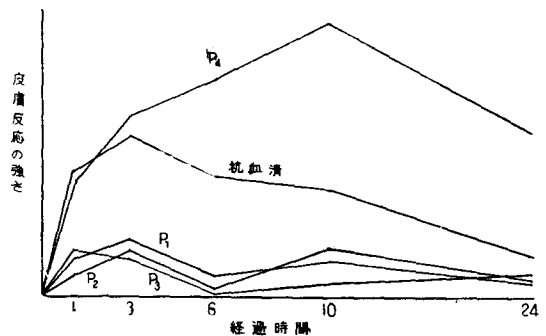


図 10 卵白アルブミン感作家兎血清から zone electrophoresis で分画した 4 成分注射部の Arthus 現象 (Prausnitz-Kustner 法) 沈降素  $P_1$  (-)  $P_2$  (-)  $P_3$  (-)  $P_4$  (+)

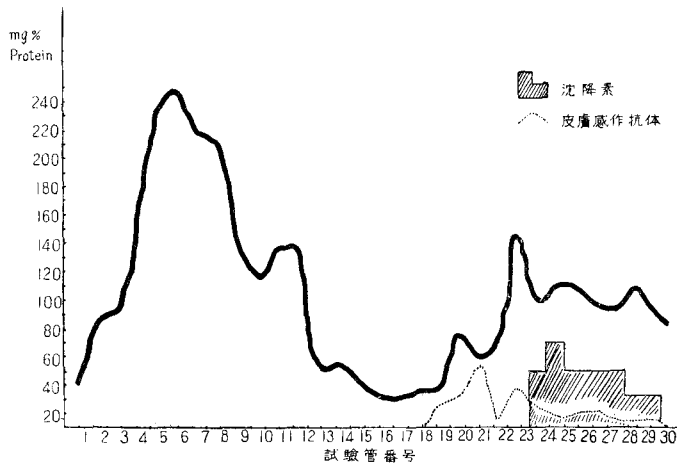


図 11 Zone electrophoresis による泳動曲線と沈降水皮膚感作抗体との関係  
結晶性卵白アルブミン感作家兎 (A6) 血清 (抗体価 32 倍陽性)

ものから抗原注射直前の値を差引いたものである。図に見られるように  $\gamma$ -globulin の峯の陽極側部分乃至  $\beta$ -globulin に相当する峯の陰極側部分の分画成分注射部に明らかな発赤の増強がみられた。同様な傾向は図に示さなかつたが、A7, A8, A10, 及び A12 の感作家兎血清の分画成分による皮膚反応でもみとめられた。

### 3. 第 II 編小括

結晶性卵白アルブミン感作家兎血清を澱粉を用いた zone electrophoresis によつて分画した所、蛋白量曲線は殆んど Tiselius 法、濾紙法でえられるものと一致しており、その 4 つの峯の部分をとつて見ると  $\gamma$ -globulin に相当した部分に、沈降水及び皮膚感作抗体が存在することがわかつた。次に各蛋白分層を更に細分して各々について測定した所、沈降水抗体は  $\gamma$ -globulin の陰極側部分に、皮膚感作性抗体はその陽極側部分に分れて存在する成績をえた。尚その他の部分にはどちらの抗体も存在を認めえなかつた。

### 第 I, II 編に対する総括、考按

詳細な考按は次報に述べることにして、ここには第 I, II 編の総括と若干の方法論についての考按を述べる。

以上の成績を総括すれば、抗卵白アルブミン抗体は沈降水のものも皮膚感作性のものも何れも血清  $\gamma$ -globulin 分層に含まれる。殊に、starch electrophoresis 法で調べると、沈降水抗体は  $\gamma$ -globulin の陰極側部分に偏し、皮膚感作性抗体はその陽極側に偏しており、両者は異つた分布を示す成績であつた。

次に低温アルコール法でえた  $\gamma$ -globulin 分画には、卵白アルブミン同様、旧ツベルクリンに対する沈降水抗

体及び被動性皮膚感作抗体が存在する。ただし、この分画によつて被動性に感作された正常モルモットに見るツベルクリン反応には若干 Arthus 型反応の性格が強調されている。

そこで先ず問題となるのは先にも述べた抗体蛋白の変性と云うことである。Kuhn<sup>11)</sup> は低温アルコール分画法も抗体の分布と活性度を変えるらしいことを強調しているが、単純な凍結乾燥装置だけが抗体力価を低下させる事実は経験している所であつて、ツベルクリン抗体の様に量的に少い、或いは活性度の低いものについては充分慎重な注意を払わねばならないと考えられる。更に分画した材料を正常動物の皮内に接種すると非特異的の反応が非常に強く現われることが問題である。低温アルコール法でえた場合が強いが、澱粉泳動の場合も相当強い。Prausnitz-Küstner 反応の場合に大きな障碍となる。Sehon<sup>12)</sup> は Seitz 濾過がよいと述べているが、その方法を利用しても或いは透析を行つても、或いは抗生剤の添加を行つても非特異的の反応を除くことは出来なかつた。尚皮膚反応に使う溶出液は濃縮を行つていたので、著者は始め澱粉から溶出させる際の食塩水濃度を 0.45% と薄いものを用いた。又濃縮法そのものについても、今回は小さな扇風機型 dryer を用いたが、この点を考えて次回からは新たな濃縮装置を組立てて行つた。之については次報にのべる。

次に澱粉による泳動法そのものについて若干考按して見よう。前述の Sehon<sup>12)</sup> にせよ Kuhn<sup>11)</sup> にせよ何れも血清蛋白分画には澱粉泳動が他の方法より優れている点を強調しているのであるが、Cann & Loveless<sup>13)</sup> は free electrophoresis で抗体が  $\beta$ -globulin にある事を

主張する根拠として、この reagin は澱粉に可逆性に結合しうること、又この結合によつて reagin の構造に変化を来さしむること。従つて易動度にも又抗体の被動感作能力にも低下が来ること、などの点から free electrophoresis 法による分画を推している。たしかにこの electrophoresis-convection 法は抗体蛋白にとつて一番 mild な分画法に違いない。しかし何と云つても最大の欠点は、泳動の両端を除いて易動度を異にする血清蛋白分層を別々に分画出来ないと云う事実である。種々の phase で取り出した種々の割合の混合分層について、夫々の結果の総合判定によつて抗体の力価を計算して出さねばならない。之は従来の塩析法、アルコール沈澱による分画法と大体軌を一にする欠点である。この様に考えると現在の所、澱粉を利用する方法が比較的優劣と云わねばならないであろう。

次に泳動法に関する事項であるが、著者の経験からえた注意事項としては、泳動中の温度が重要である。出来るだけ低温保持を心掛けねばならない。次に両極の buffer には血清とは逆の流動が起ることを忘れてはならない。それで細いピニール管で両 buffer 槽を結合させて行つた。次に良好な泳動図を作らせるには澱粉 block に血清を注入する場所と血清の量が問題である。十数回の test の結果前記の如き方法を選んだ。之には澱粉を注入する硝子箱の大きさと電流、電圧とが関係していることは勿論である。又泳動開始時の澱粉 block の硬さも問題となる。この為に一定量の澱粉を良く洗滌した後、一定量の buffer に浸漬してその上清一定量を捨て、硬さを出来る丈一定になる様にした。この他色々考按工夫した方法があるが、何れにせよ、澱粉泳動は濾紙泳動のように簡単に行かないようである。

さて今回の成績から非沈降性抗体の問題が close up されるわけであるが、実験が完了したわけではなく、又補助的に小さな別の確認実験も行わねばならない所であるから、本報告ではこの事について未だふれなぬでおく。只抗ツベルクリン皮膚感作抗体については、低温アルコール法だけしか今回はやつていないし、又前述の如く、その方法にも或いは不十分な点があるかも知れない。菌体蛋白そのものに対する蛋白アレルギーのみを観察したのかも知れない。之については更に詳細な再検討も現在加えつつある。しかし  $\gamma$ -globulin に抗ツベルクリン皮膚感作抗体が存在することは事実である。

## 結 論

結晶性卵白アルブミン感作家兎、及び BCG 免疫家兎の血清について、低温アルコール分画法及び澱粉に

よる zone electrophoresis を行い、抗体の血清蛋白中の存在位置を求めた。

### 1. 低温アルコール分画法でえた材料について

① 卵白アルブミン及びツベルクリンに対する沈降素は  $\gamma$ -globulin 分画に含まれる。

② 被動性皮膚感作性抗体も、兎、モルモットについては、 $\gamma$ -globulin 分画に含まれる。但し被動感動物の卵白アルブミンによる Arthus 現象は時間的にも細胞反応の点でも典型的な速時型の反応であつたが、被動感作モルモットの旧ツベルクリンによる皮膚反応は若干遅延性の性格を離れ、速時型の性格を帯びている。被動感作兎では遅延性性格が幾分強い。

### 2. 澱粉による zone electrophoresis による分画について

① 抗卵白アルブミン沈降素及び被動性皮膚感作抗体は共に  $\gamma$ -globulin 分画に存在する。

② その内沈降素は易動度の低い  $\gamma$ -globulin 分層部分に、又皮膚感作抗体は易動度の高い  $\gamma$ -globulin 及び易動度の低い  $\beta$ -globulin 分層に存在する。

## 文 献

- 1) 奥山, 森川: 結核の研究, **3**, 102 (1955).
- 2) 奥山, 森川: 結核の研究, **3**, 99 (1955).
- 3) Cole, L. R. & Favour, C. B.: J. Exp. Med. **101**, 397 (1955).
- 4) Cole, L. R. & Favour, C. B.: J. Exp. Med. **101**, 415 (1955).
- 5) Cole, A. G.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med. **31**, 1162 (1933).
- 6) Cohn, E. J.: J. Amer. Chem. Soc., **68**, 459 (1946).
- 7) Oncley, J. L., Melin, M., Richert, D. A., Cameron, J. W. & Gross, P. M.: J. Amer. Chem. Soc., **71**, 554 (1949).
- 8) Kunkel, H. G. & Slater, R. J.: J. Clin. Invest. **31**, 677 (1952).
- 9) Kunkel, H. G. & Slater, R. J.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **80**, 42 (1952).
- 10) 中込, 他: 総合医学, **14** (11), **51** (1957).
- 11) Kuhn, J. W.: J. Exp. Med. **99**, 586 (1954).
- 12) Schon, A. H. et al: J. Exp. Med. **103**, 679 (1956).
- 13) Cann, R. J. & Loveless, H. M.: J. Allergy, **28**, 379 (1957).

## 写真説明

- Fig. 1 結晶性卵白アルブミン感作家兎血清の  $\gamma$ -globulin 分画 50 mgN を正常家兎の腹腔内注射後、16 時間目に卵白アルブミン皮内注射、3 時間後の皮膚所見。血管壁に多形核白血球の付着、及び滲出が始まる。
- Fig. 2 同じく 10 時間後の所見。多量の多形核白血球の浸潤、浮腫、一部白血球の崩壊が見られる。
- Fig. 3 同じく  $\gamma$ -globulin を除いた分画 50 mgN を正常家兎の腹腔内に注射し、16 時間目に卵白アルブミンを皮内注射し、3 時間後の皮膚所見。少量の多形核白血球の滲出、浮腫が見られるに過ぎない。
- Fig. 4 同じく 10 時間後の所見。多形核白血球は若干多くはなつてはいるが、 $\gamma$ -注射例に比し遙かに弱い反応を示す。
- Fig. 5 BCG 接種家兎血清の  $\gamma$ -globulin 分画 112 mgN を正常家兎の腹腔内に注射し、16 時間目に旧ツベルクリンを皮内注射、3 時間目の皮膚所見。多形核白血球（この写真では小形単球様に見える）の浸潤が比較的強く起つており、血管壁にも多量に付着している。
- Fig. 6 同じく 10 時間目の所見。多形核白血球は量を増し、単球がこれに加わってくる。
- Fig. 7 同じく 24 時間目の所見。単球が滲出細胞の主体をなす。浮腫も残つている。
- Fig. 8 同じく 48 時間目の所見。完全に単球のみの広範囲の浸潤が認められる。
- Fig. 9 BCG 接種家兎血清の  $\gamma$ -globulin 分画 18 mgN を正常モルモットの腹腔内に注射し、16 時間後に旧ツベルクリンを皮内注射、10 時間目の所見。主として多形核白血球の強い浸潤が見られる。
- Fig. 10 同上血清の  $\gamma$ -globulin を除いた分画 13 mgN を正常モルモットの腹腔内に注射し、16 時間後に旧ツベルクリンを皮内注射、10 時間目の所見。多形核白血球の滲出が見られるが、 $\gamma$ -分画例に比し遙かに弱い反応と認められる。

以上総て低温アルコール分画法使用、Hematoxylin-Eosin 染色。

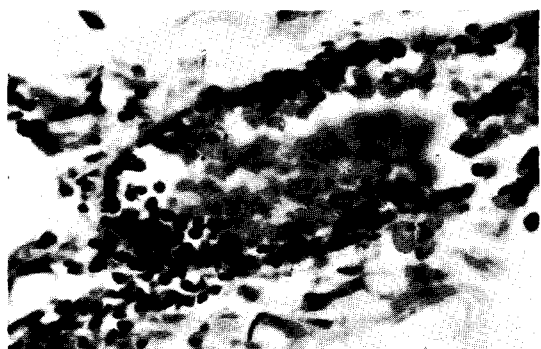


Fig. 1

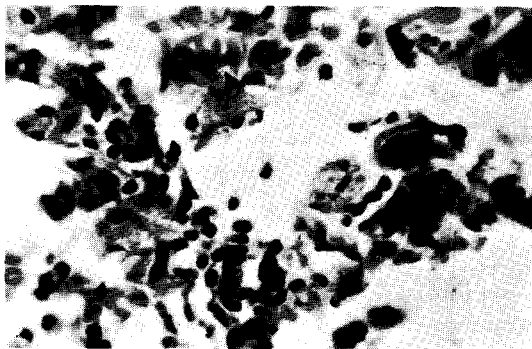


Fig. 4

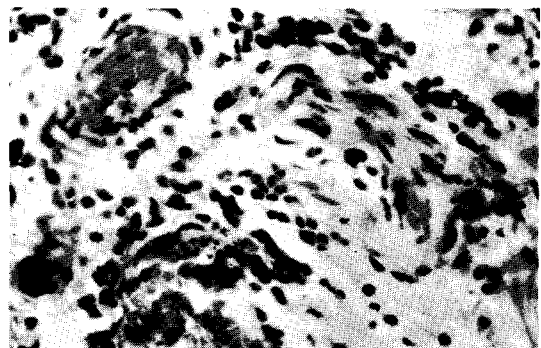


Fig. 2

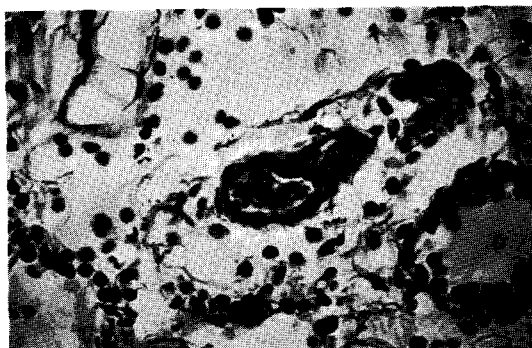


Fig. 5



Fig. 3

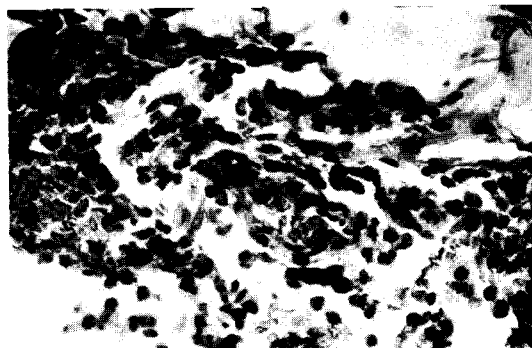


Fig. 6

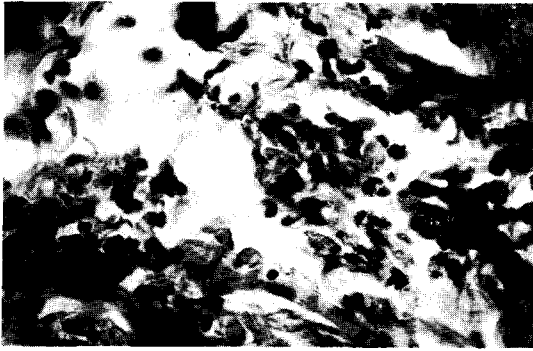


Fig. 7

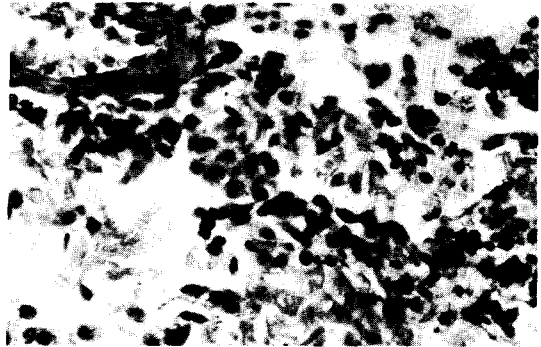


Fig. 9

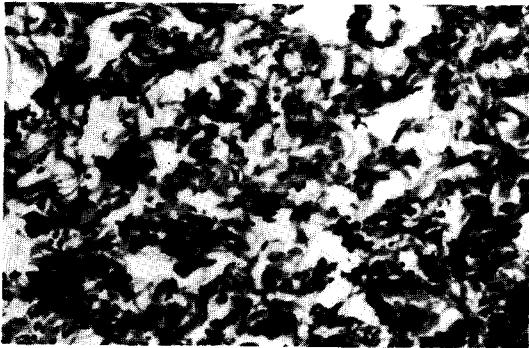


Fig. 8

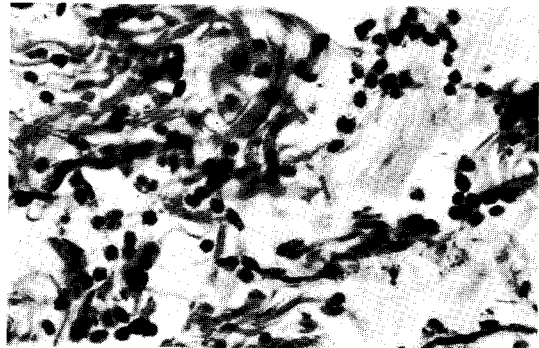


Fig. 10