HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	結核動物血清の免疫化学的研究(VI)：免疫血清の連続濾紙電気泳動分画内の各種抗体の分布について
Author(s)	森川，和雄; MORIKAWA，Kazuo; 奥山，春枝 他
Description	
Citation	結核の研究，14，39-44
Issue Date	1961-03
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26712
Type	departmental bulletin paper
File Information	14_P39-44.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

結核動物血清の免疫化学的研究 (VI)

免疫血清の連続濾紙電気泳動分画内の各種抗体の分布について

森川和雄
奥山春枝
(北大結核研究所病理部　主任　森川和雄教授)

(昭和35年10月1日受付)

免疫血清に含まれる各種の血清反応に関与する抗体及び皮膚感作抗体が，電気泳動的に異なる易動度を示して分布するということは，pollen allergy[1] 或いは diphtheria toxoid[2,3] 免疫血清の研究で明らかにされている。結核血清についての報告は Cohn[4] のアルコール分画法を用いた Cole and Favour の成績が僅かにみられるに過ぎない。最近我々の研究室において萩原[6] が，澱粉を medium とする zone electrophoresis を行なつて結核動物血清を分画し，その各画分についての詳細な研究によると，感作性抗体と血清反応抗体の血清内の電気泳動的分布が明らかに異なることが証明され．更に血清反応抗体の中でも沈降性抗体が特に異なる易動度を持つことが報告されている。その実験上，最も困難となつたのは，分画成分溶液中に含まれる，泳動中に溶解した澱粉成分の皮膚刺戟性が強い為に，皮膚感作性抗体の検出を屢々困難とさせたことであつた。この障碍を除去する為に Grassman[7] 等の報告した連続濾紙電気泳動法に着目して，結核血清の各抗体分布の追求を行い，先の報告の成績を追試しようと試みた。

1. 実験材料

i. 電気泳動

電気泳動には三田村製の連続濾紙電気泳動装置を使用したが，購入したまゝの機械では，濾紙面を流下する緩衝液量が一定に出来ない為に種々改良を加えて用いた。

濾紙については血清分画の分離が最もよく行われるものを広範囲に求め，結局この目的に合致する東洋濾紙 No. 2 を使用した。

ii. 血　清

家兎に，予じめ Arlacel Drackeol (1:9) の adjuvant を等量混じた BCG 10 mg 浮游液の皮下注射によつて免疫した。この様に処置した9羽の兎から使用時適宜に採血して電気泳動を行なつた。尚，これら兎の採血前の皮膚反応の強さは，0.01% ツベルクリン蛋白 0.1 mℓ の皮内注射に対して，15×15 mm 以上の発赤と，明らかな硬結を示した。又同抗原に対する沈降反応では2倍稀釈乃至16倍稀釈陽性を示した。

iii. 抗　原

以下に記す各種抗体追求のための抗原としては非加熱ソートンツベルクリン，及びこれから三塩化醋酸 pH 4.0 で沈澱させたツベルクリン蛋白，或は結核菌体蛋白，更に結核菌体多糖類を夫々の反応抗原として用いた。尚菌体成分は本研究所予防部より提出されたものである。

2. 実験方法及び成績

i. 電気泳動的分画

血清は予じめ使用緩衝液で5時間以上氷室内で透析して用いた。緩衝液は veronal -醋酸緩衝液 pH 8.6, μ= 0.045 のものである。血清泳動前に濾紙が均等に緩衝液によつて湿る時間を置いてから更に予備通電を30分乃至1時間行つて血清の泳動を開始した。

泳動条件は，40 mA 定電流で初電圧 700～800 volt で始めた。泳動する血清量により通電時間が異るが，5.0 mℓ の血清量の分画を完了するのには3日間を要した。

泳動完了後は，各試験管に流下した液量を測定し，その 1.0 mℓ について蛋白量を求めた。蛋白量の測定は Biuret 法で，Beckmann 型の spectrophotometer を使用して行い，これに液量をかけ合わせて蛋白総量とした。

我々の用いた定電流による泳動法は，一般の濾紙泳動法或は澱粉などを medium とする zone electrophoresis においては電圧の漸減があつても，分画成績には影響はないが，連続濾紙泳動の様に流下と左右への電気的泳動の二者を同時に行い，しかも長時間かゝるものでは，電圧低下による分離度の低下が，最後の分画成績に影響を与える。従つて我々の実験成績では，短時間泳動のもの程各分画の分離が良好であり，長時間行なつたものは，

アルブミンと γ-globulin 間の距離が狭まつてくる。

泳動終了後，濾紙を乾燥して brom phenol blue で染色して泳動距離を定めた。尚試験管番号は，陽極側を1とし，血清の濾紙面への接触部は No. 24 の試験管の上部に相当する。泳動3日間行なつた際の泳動図及びそれによつて得られた蛋白量曲線を図1，図2に示した。尚図中の蛋白量は総量を示している。図にみられるように Tiselius 電気泳動法で得られる曲線と類似しているが，α-globulin の分離がやゝ劣つている。この事は，長時間泳動の場合には常に認められた。

ii. 分画成分による血清反応

血清反応としては，重層法による沈降反応，血球凝集反応 (Middlebrook-Dubos 法，Boyden 法) 及び溶血反応 (Middlebrook 法) を行なつた。それぞれの抗原は沈降反応にはツベルクリン蛋白を，Middlebrook-Dubos 法の血球凝集反応及び Middlebrook 法の溶血反応は結核菌体多糖類を，Boyden 法の血球凝集反応は結核菌体蛋白を用いた。血球凝集反応術式は小野，高橋[8] の記載した方法及び萩原[6] の記載したと同様に行なつた。

各反応の成績を図3，図4，図5，図6に示した。

尚，図示した成績に用いた血清は，数匹の免疫血清を混合したもので，その泳動前の血清抗体価は次の通りであつた。

沈降反応：64 倍稀釈陽性

血球凝集反応 (Middlebrook-Dubos 法)：160 倍稀

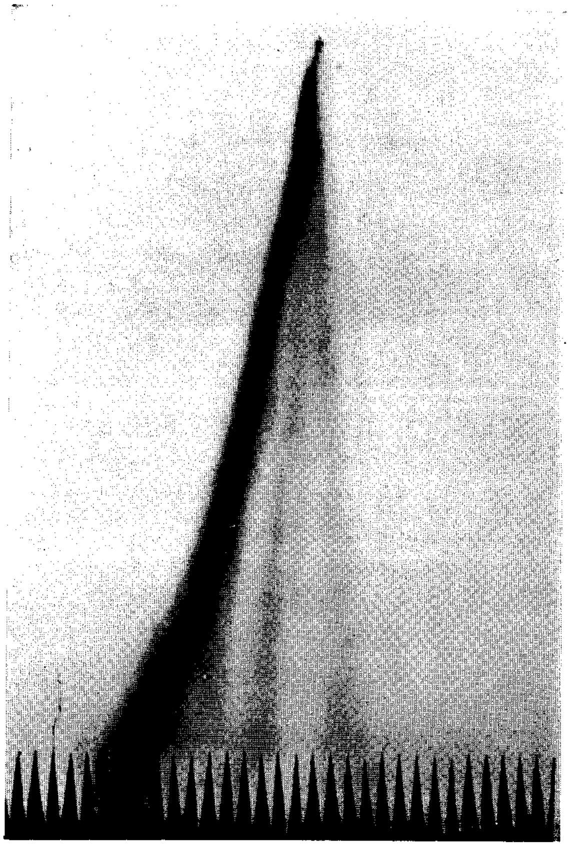

図1. 連続濾紙電気泳動図

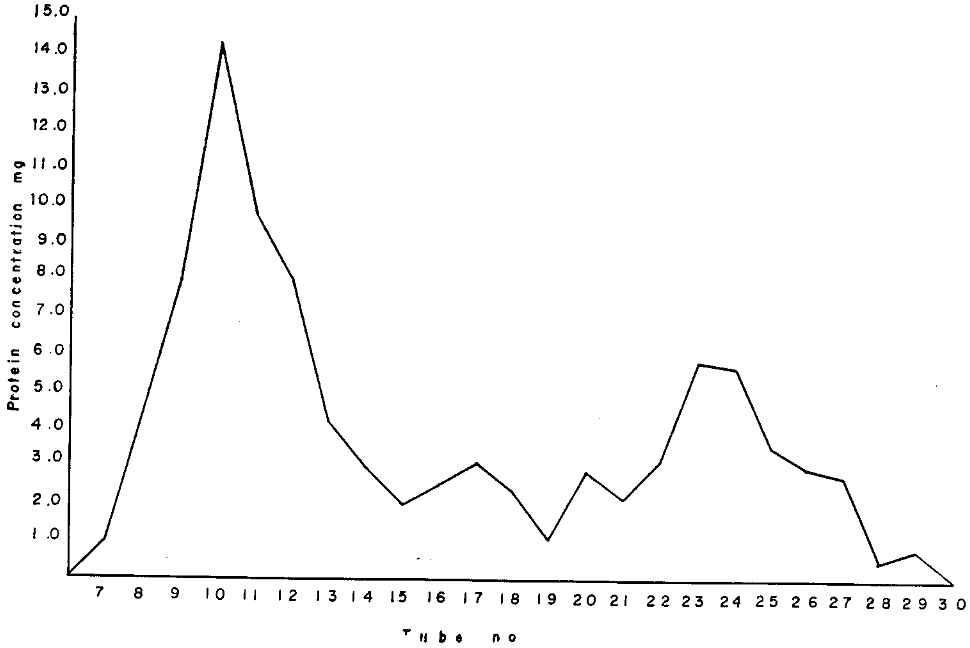

図2. 連続濾紙泳動法による泳動曲線

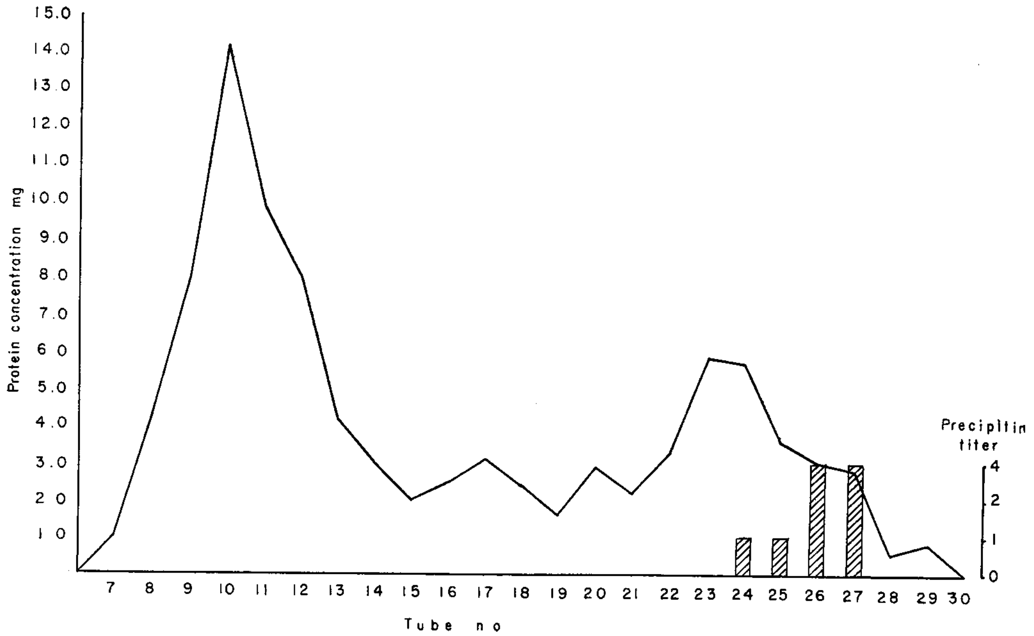

図 3. 連続濾紙泳動分画における沈降性抗体の分布

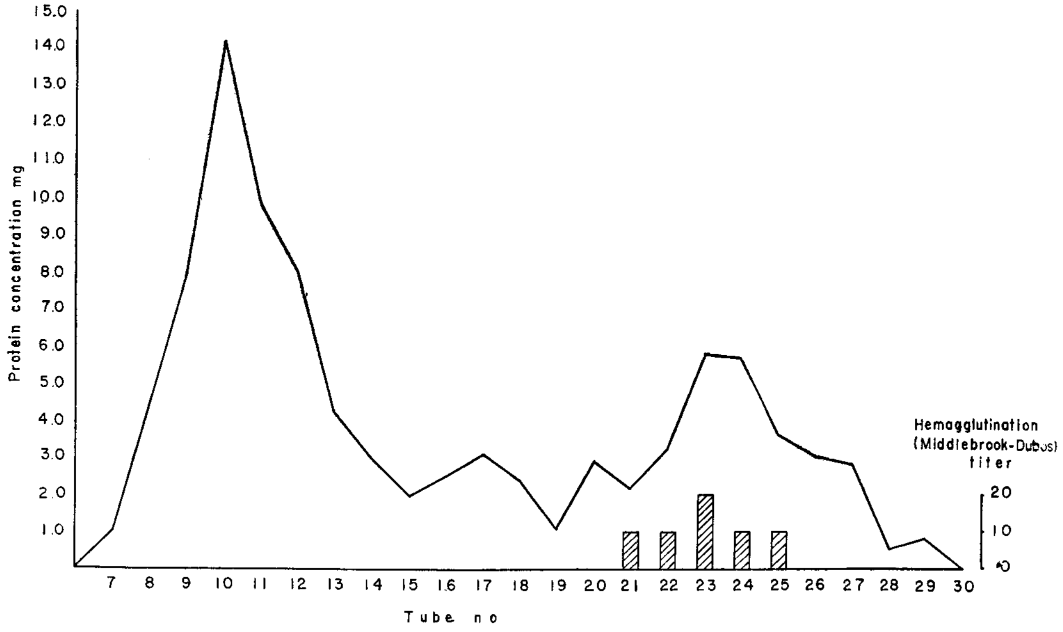

図 4. 連続濾紙泳動分画における血球凝集反応性抗体の分布 (I)

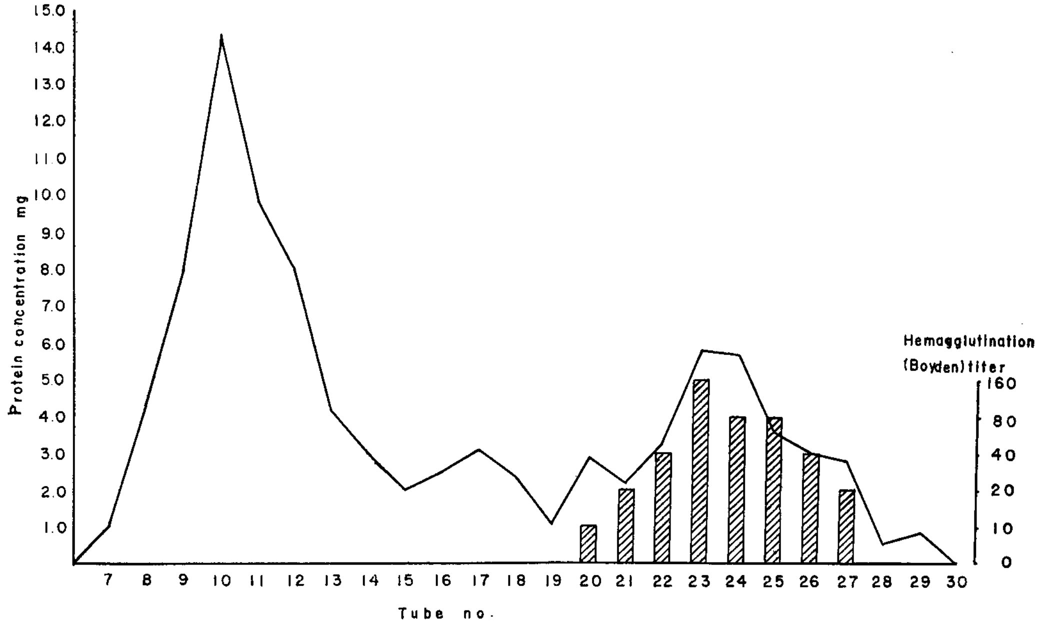

図 5. 連続濾紙泳動分画における血球凝集反応性抗体の分布

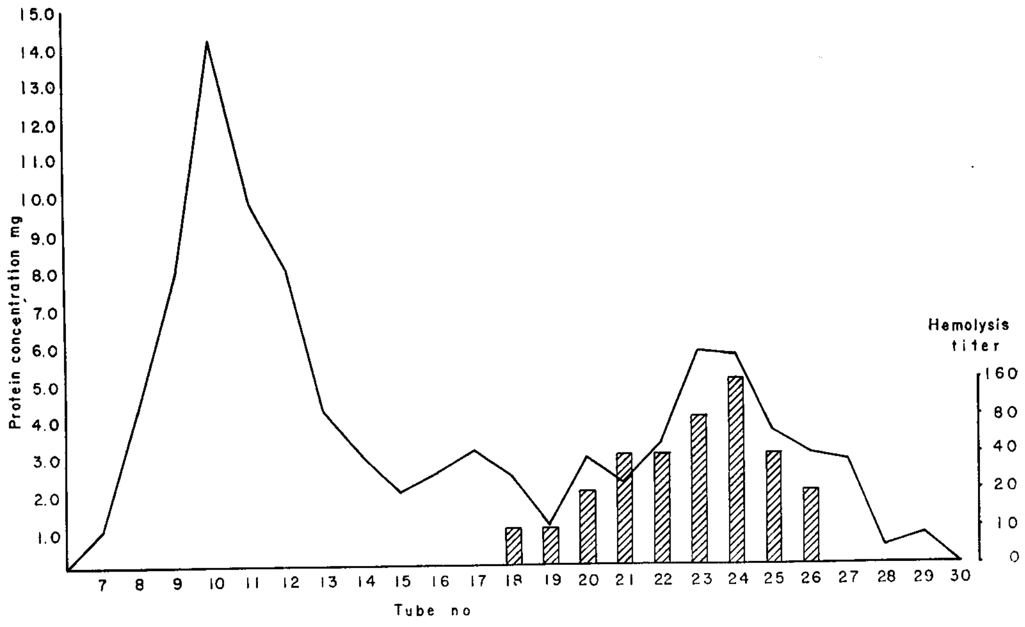

図 6. 連続濾紙泳動分画における溶血反応性抗体の分布 (II)

釈陽性

同　上 (Boyden 法): 1280 倍稀釈陽性

溶血反応 (Middlebrook 法): 1280 倍稀釈陽性

図に見る如く，沈降反応によつて証明される抗体価は試験管番号 No. 25, No. 26 に高い。即ち γ-globulin 曲線の頂点を越えた低易動度側に明らかに偏つて抗体の存在が証明された。同じ様に蛋白を抗原とした反応である Boyden 反応では，No. 23 に相当する γ-globulin の頂点に抗体価の頂点がみとめられた。全体の抗体価の量的分布は，γ-globulin 量と平行して認められた。次に Middlebrook-Dubos 反応では全体的に抗体価が低いので，反応陽性の試験管数は少いが，その頂点は Boyden 反応と同様に No. 23 の試験管にみられた。又これに補体を加えた溶血反応では，抗体価が高く，γ-globulin 領域に広く分布しているが，その抗体価は矢張り γ-globulin 量に比例てしていた。

iii. 分画成分による皮膚反応

各分画成分そのまゝでは蛋白濃度がうすいので，グロブリン部分だけを 5 部分に分けて各 2 乃至 4 本の分画成分をプールして量を多くし，これを流水で一夜透析して緩衝液を除去し，更に透析に用いたセロファンバッグのまゝ扇風器で通風して約 1/10 量に濃縮した。これを更に生理的食塩水で数時間透析したものを，家兎背部の剪毛部に 0.2 mℓ 宛皮内注射し，48 時間後，同じ部分に 40 倍稀釈ツートンツベルクリンを 0.1 mℓ，対照としては 0.1 mℓ の生理的食塩水を注射して，1, 3, 6, 24, 48 時間後に発赤の大きさ及び浮腫の強さを測定した。24 時間後の反応の強さを図 7 に示した。図にみられるように，

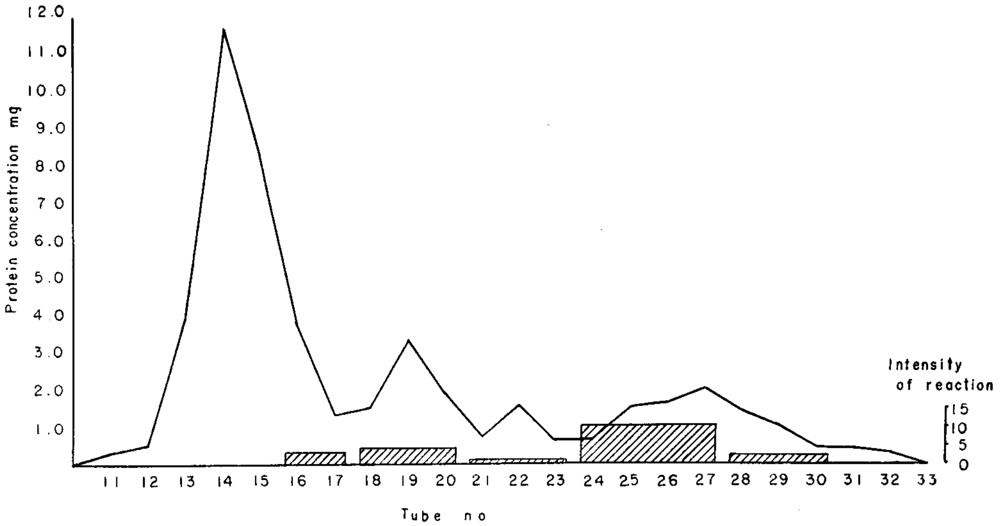

図 7. 連続濾紙泳動分画における皮膚感作性抗体の分布

どの分画成分においても程度の差はあるが発赤が認められた。特に 1 及び 3 時間後はどの成分も同程度の発赤があるが，24 時間になると，γ- グロブリンの高易動度部分注射部位だけに特に強い反応が持続しているのがみとめられた。即ち，高易動度 γ- グロブリンに皮膚感作力が強くみられた。

考　　按

血清蛋白分屑の各画分を電気泳動的に分画する場合各分画を細かく分けられ，しかも或程度の量が一回の泳動で得られるには zone electrophoresis が適している。我々の研究室では澱粉を medium として電気泳動を行ない，その溶出液を用いて各種血清反応抗体，皮膚感作抗体の検出に用いてきたのであるが，緒言に述べた様に皮膚感作力の研究には，溶出液そのものによる非特異的反応が屢々強くおこる為に判定の困難なことが多かつた。それでこの刺戟性を避ける為に，連続濾紙電気泳動法に着目して実験したのである。

我々が用いた装置は三田村商店製作のものであるが，実際に実験するに当つては種々の改良を余儀なくされた。即ち，一定の分画成績を得る為には緩衝液の濾紙面の流下速度と電流の強さの関係が一定で，しかも可及的蒸発を防がなければならい。緩衝液流下量は上部緩衝液槽における緩衝液面を一定させることによつてどうやら満足させられ，又温度に関しては冬期間のみの実験であつたので室温 (10°C 以下) で支障を来さなかつた。又濾

紙によつて緩衝液流下速度が非常に異なり，我々の場合は線維の割合粗な東洋濾紙 No. 2 が最適であつた。通電は定電流で行なつたのであるが，通電が長時間に亘ればば電圧の低下が大きい。従つて泳動の巾が変つてくる。3日間通電を続けた場合にはアルブミン側と γ-globulin 側が中央に近づいてくる傾向がみられている。しかも3日間で 5 mℓ の血清しか処理出来ないということは，大量の実験をするのには不便であると思われる。分画成分は又かなり稀釈された状態で得られるので，皮膚反応に用いるにはかなり濃縮しなければならなかつた。しかし，我々が目的とした皮膚の非特異的刺戟性は，澱粉を用いた zone electrophoresis の溶出液と比較するとかなり減少させることが出来た。

連続濾紙電気泳動法で得られた分画成分での血清反応の成績をみると，萩原[6] が澱粉電気泳動法を用いて発表したと全く同じ結果が得られたわけである。即ち，沈降反応によつて証明された抗体のみが γ-globulin の低易動度側に大きく偏つてみられており，血球凝集反応抗体，溶血反応抗体は γ-globulin の蛋白量曲線に完全に一致している。たゞ Middlebrook-Dubos の血球凝集反応は他の2反応より抗体価が低い為に，その分布範囲がせまいが，そのピークは γ-globulin の蛋白量のピークと一致している。しかしこれらの抗体間の比較で問題となるのは，反応に用いた抗原の違いである。沈降反応はツベルクリン蛋白であり，Middlebrook-Dubos の血球凝集反応は菌体多種体であり，Boyden 反応には菌体蛋白を用いているが，これらの血清反応の抗原としてはそれぞれ蛋白多糖体が最もよい抗原であることが，本研究所高橋[8] らの成績から知られているのでこの様なものを用いたのである。たゞし，同一の抗原ですべての反応をしらべることは，それが精製されたものであればある程困難なことで，なおこの抗原側の反応原性については目下詳細に研究中であるので次回に発表する予定である。

とにかく以上，血清反応成績からみると，沈降性抗体は血球凝集反応性抗体又は溶血反応性抗体とは明らかに異なるものであるといえる。同じ血球凝集反応であつても Middlebrook-Dubos 反応と Boyden 反応は抗原が異なるが，その分布域は全く同じであるので両者を位置的に区別することは出来ないし，又進藤がいう様に溶血反応性抗体が不完全抗体を証明するものであるとしてもこの分布からは血球凝集反応性抗体との差をみつけることが出来なかつた。

皮膚反応性抗体の追求は濃縮しなければ反応が出ないので量の関係から2乃至4体の試験管内容を一緒にして用いた。即ち蛋白曲線でグロブリン領域の各ピークに合わせ，γ-globulin はその前半と後半に分けてしらべたのであるが，γ-globulin の高易動度側の分画注射部位に最も強く 24 時間後まで続く反応がみられた。沈降性抗体の証明された低易動度 γ-globulin では非常に弱い反応が認められたにすぎない。

以上の成績は，澱粉泳動を用いた萩原の成績と完全に一致するもので，刺戟性の少ない連続濾紙電気泳動法で得られた分画成分によつて，皮膚感作性抗体が γ-globulin 高易動度側にあることが更に確認されたのである。

結　　論

1) BCG 免疫兎血清を連続濾紙電気泳動法で分画を行なつた。

2) 各分画成分について，沈降反応，血球凝集反応 (Middlobrook-Dubos, Boyden), 溶血反応 (Middlebrook), 皮膚反応 (Prausnitz-Küstner 法) を行なつて各抗体の分布をしらべた。

3) 皮膚感作抗体は γ-globulin の高易動度側にあり，沈降性抗体は γ-globulin の低易動度側に，血球凝集反応性抗体，溶血反応性抗体は γ-globulin 全体に分布することが証明された。

文　　献

1) Sehon, A. H., Hollinger, H. Z., Harter, J. G., Schweitzer, A. E. &Rose, B.: J. Allergy, **28**, 229 (1957).
2) Kuhns, W. F.: J. Exp. Med., **99**, 577 (1954).
3) Kuhns, W. F.: J. Immunol., **75**, 112 (1955).
4) Cohn, E. J.: J. Amer. Chem. Soc., **68**, 459 (1946).
5) Cole, L. R. & Favour, C. B.: J. Exp. Med., **101**, 391 (1955).
6) 萩原昭男：結核の研究, **11**, 96 (1959).
7) Grassmann, W. & Hannig, K.: Z. Physiol. Chem., **292**, 32 (1953).
8) 小野勝男，高橋義雄：結核の研究, **9**, 1 (1958).
9) 進藤宙二：Minophagen Medical Review, **3**, 49 (1958).