



Title	結核免疫モルモットの脱感作血清中に存在するSRFとMIF活性の分離
Author(s)	柿沼, 光明; KAKINUMA, Mitsuaki; 山本, 健一 他
Description	
Citation	結核の研究, 33, 1-6
Issue Date	1973
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/26820">https://hdl.handle.net/2115/26820</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	33_P1-6.pdf



結核免疫モルモットの脱感作血清中に存在  
する SRF と MIF 活性の分離

柿沼光明\* 山本健一\*\*

(昭和47年9月30日受付)

遅延型アレルギーとマクロファージ遊走阻止現象との間には密接な関係があり、マクロファージ遊走阻止現象は遅延型アレルギーを研究するうえで *in vitro* のモデルとみなされてきた<sup>1)-6)</sup>。この現象は感作状態にあるリンパ球が抗原と接触した際に何らかの機序で細胞外にマクロファージ遊走阻止因子 (MIF) を放出することによって生ずるといわれている。しかし感作状態にあるリンパ球を含む細胞群を抗原の存在下で培養すると MIF の他に多くの生物学的活性を持つ因子が培養上清に出現する。これらの因子群は Dumonde らのグループ<sup>7)</sup> によって Lymphokines と命名されたが、なかでも遅延型アレルギー様の皮膚反応を正常動物に惹起する皮膚反応因子 (Skin Reactive Factor: SRF) はもっとも興味深い。

他方山本<sup>8)</sup> は実験結核症における免疫とアレルギーの機序に関する一連の研究の過程で BCG の cell wall で免疫し、protoplasm で脱感作された動物 (モルモットおよびマウス) の血清中には常に MIF および SRF が見出されることを報告した。この事実はそれまで細胞培養の系でのみ取り扱われてきたこれら mediators あるいは lymphokines が実際に生体内でも形成されていることを示唆している。と同時に脱感作血清そのものが、MIF あるいは SRF の研究に極めて重要な材料となり得ることも充分予想される。

MIF 等の諸因子間の相互関係については、研究が緒についたばかりで断片的な知見しか得られていない。われわれは脱感作血清の分画を試み、SRF と MIF は異なる態度を示すことも知ったのでここに報告する。

## 実験材料および実験方法

## 1) 実験動物

Hartley 系モルモットを使用した。

## 2) 抗原、免疫および脱感作方法

BCG cell wall および protoplasm は Rocky Mountain Laboratory の Dr. A. L. Anacker から供与された。BCG cell wall 1 mg を mineral oil と混合しモルモットに皮内注射した。6週後 BCG protoplasm を 1 mg 静脈内注射し、24時間後に採血した。血清を分離し、56°C、30分間非働化した。

## 3) MIF の測定

測定法は基本的には前報と同じであるが<sup>8)</sup>、種々の画分について測定する場合には下記のごとく行なった。まず、被検画分は Eagle's MEM で一夜透析した。被検画分および正常モルモット血清を最終濃度としてそれぞれ 30% および 15% になるように Eagle's MEM に加え、Sykes-Moore 型 chamber 内で毛細管からマクロファージを遊走させた。対照として被検画分を含まず正常モルモット血清のみ含む Eagle's MEM でのマクロファージ遊走を行なわせ、この遊走面積を 100% として比較した。

## 4) SRF の測定

脱感作血清画分を正食水で透析後、その 0.15 ml を正常モルモット皮内に注射し、9 ないし 10 時間後の発赤、硬結を測定した。

## 5) 脱感作血清の分画

a. Sephadex G 200 による分画: 2.5×90 cm のカラムを用い glycine buffer (0.1M glycine+1% NaCl), pH 8.2 あるいは borate buffered saline (0.015M borate +0.135M NaCl: BBS), pH 8.0 で 2 ないし 5 ml の血清を分画した。分画後、後述する画分にまとめてプールし、限外濾過により濃縮し、生食水で透析した後容量をもとの血清と同じくした。

b. DEAE cellulose chromatography: 1.4×40 cm

\* 北大結核研究所細菌部門

\*\* 北大結核研究所予防部門

のカラムに DEAE cellulose (DE 32) を充填し 0.05M sodium phosphate buffer, pH 6.4 から 0.2M, pH 6.0 まで linear gradient により溶出した。更に 1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  で stepwise elution を行なった。全操作は 2~4°C で行ない、流速は 30 ml/h であった。

c. 硫安分画: 5 ml の脱感作血清に 5 ml の BBS を加え、pH 8.0 に調整した飽和硫安を 40% 飽和になるように加えて 1 時間水中に静置し、遠心によって上清と沈澱 (40 P) に分けた。上清には、さらに飽和硫安を加えて 50% 飽和とし、40~50% 沈澱画分 (50 P) を分離した。同様の操作を続けて 50~60% 沈澱画分 (60 P) および 60~80% 沈澱画分 (80 P) を得た。沈澱画分はそれぞれ少量の BBS に溶解し、計算量の飽和硫安を加えて再沈澱させた。得られた画分は、透析をくり返して硫安を除き、濃縮し、さらに生食水で透析した後容量を 5 ml にした。

d. Pevikon block electrophoresis: 脱感作血清 2 ml を  $1 \times 10 \times 40$  cm の Pevikon を支持体として電気泳動した。pH 8.6,  $i=0.05$  の veronal-Na buffer を用い、低温で  $3 \text{ mA/cm}^2$  の定電流を 24 時間通電した。泳動後 1 cm 幅の block を切り出し、10 ml の生食水で溶出した。蛋白質量の指標として溶出液 1 容に 1M 酢酸 9 容を加え 280 nm の吸収を測定した。

## 実験結果

### 1) Sephadex G 200 による分画

図 1 はモルモット血清の Sephadex G 200 カラムからの溶出曲線を示したものである。図 1 A は脱感作血清  $D_2$  5 ml を BBS で溶出したもの、図 1 B は他の脱感作血清  $D_0$  2.5 ml を glycine buffer で溶出した曲線である。これらを正常モルモット血清 (図 1 C) の溶出曲線と比較すると前者の exclusion volume の peak が著しく高かった。この画分の 260/280 の比はおおよそ 1 であり、通常の蛋白以外の物質がここに集まっている可能性が考えられた。 $D_2$  を前半および後半に 2 分し、 $D_2-1$ 、および  $D_2-2$  とすると  $D_2-1$  には SRF のみが、 $D_2-2$  には SRF と MIF が見出された (表 1)。この結果は glycine buffer で溶出した場合の SRF の分布と著しく異なっていた (図 1 B)。即ち BBS を用いてゲル濾過を行なった場合には glycine buffer によって溶出したときよりも SRF の溶出が早いことを示している。

### 2) DADE cellulose chromatography による分画

$D_2-1$  は、280 nm において高い吸収を持つ物質が含まれ、このものが DEAE cellulose のカラム内で不溶性の沈澱物を作り chromatography に何らかの障害を与え

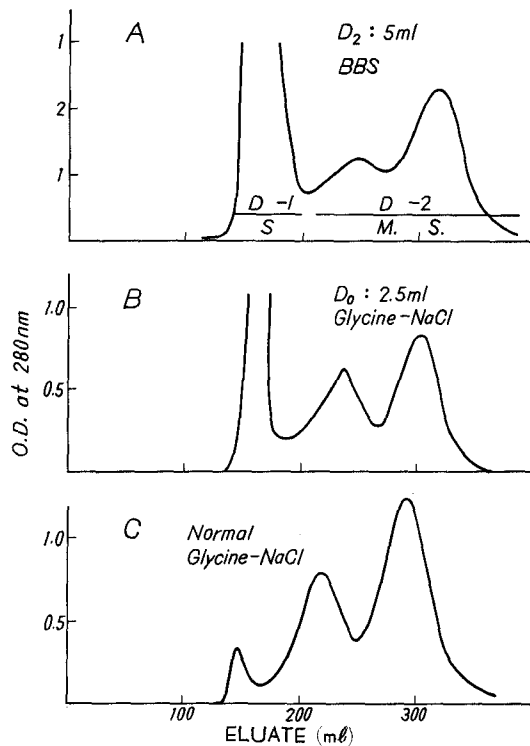


図 1 モルモット血清のゲル濾過

Sephadex G 200 のカラム ( $2.5 \times 90$  cm ないし  $2.5 \times 95$  cm) を 30 ml/h の流速でゲル濾過した。溶出液は BBS (ほう酸緩衝液 0.01M, NaCl 0.135M, pH 8.0) あるいはグリシン-NaCl (グリシン緩衝液 0.1M, NaCl 1%) を用いた。 $D_2$  および  $D_0$  は脱感作血清, Normal は正常血清を示す。

ることが予想されたために  $D_2-2$  のみについて分画を行なった。溶出曲線を図 2 に示す。溶出液を図のごとく  $D_2-2a$  から  $D_2-2h$  までにまとめた。血清アルブミンは  $D_2-2c$  から後の全画分に分布し、 $\gamma$ -グロブリンは  $D_2-2a$  から  $D_2-2d$  までに認められた。 $D_2-2a$ ,  $D_2-2b$  は SRF のみ陽性、 $D_2-2c$  から  $D_2-2e$  までは SRF, MIF とともに陽性、 $D_2-2f$  と  $D_2-2g$  は MIF のみ陽性であった。1M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  で溶出した  $D_2-2h$  は SRF および MIF とともに陽性であった (表 1)。以上の結果は SRF が MIF より早く溶出されることを示しているが、両者の分離は完全ではなかった。これは chromatography の条件にかなり大きく左右されるため、このことは  $\gamma$ -グロブリンや血清アルブミンの溶出からも明らかである。なお  $D_2-2h$  の活性については後に考察を加えたい。

### 3) 硫安分画

硫安分画によって得られた画分についての SRF および MIF 活性を表 2 に示す。SRF は 40 P, 50 P, 60 P,

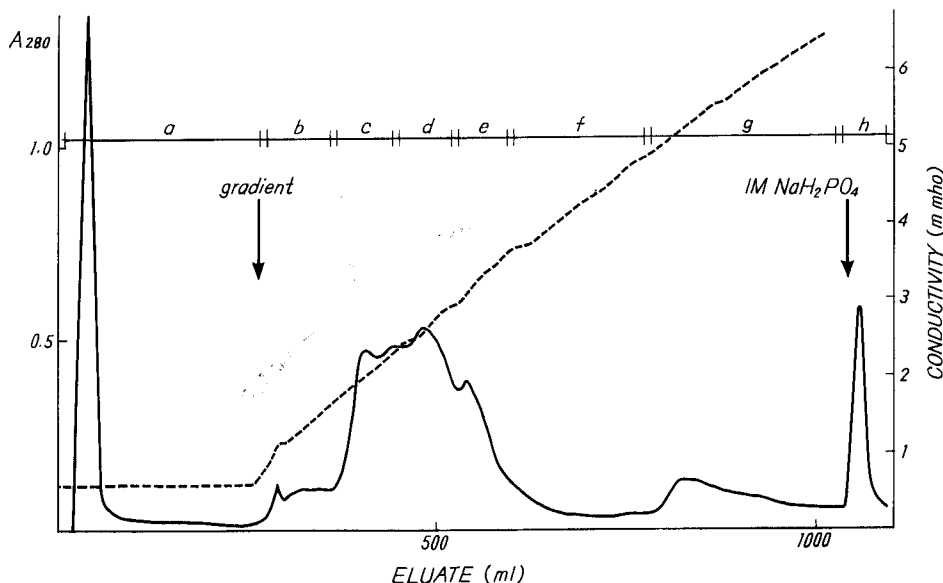


図2 図1AのD<sub>2</sub>-2画分のDEAEセルロースクロマトグラフィー

D<sub>2</sub>-2 5 ml を1.7×40 cm のカラムで30 m/h の流速でクロマトした。初め0.05M リン酸緩衝液で溶出し(a), つづいて直線勾配で濃度を上昇し(b~g), 最後に1M リン酸1ナトリウムで溶出した。実線は280 nm における吸光度を示し, 破線は電気伝導度を示す。

表1 脱感作血清(D<sub>2</sub>)のゲル濾過およびDEAEセルロースクロマトグラフィー画分による皮膚反応とMI

画 分	280 nm における吸光度	皮膚反応 <sup>1)</sup> (mm)	MI <sup>2)</sup> (%)
D <sub>2</sub>	—	16 (+)	51
D <sub>2</sub> -1 <sup>3)</sup>	—	13.5(+)	90
D <sub>2</sub> -2a <sup>4)</sup>	7.2	18 (+)	97
D <sub>2</sub> -2b	1.75	18.5(+)	89
D <sub>2</sub> -2c	7.2	16 (+)	69
D <sub>2</sub> -2d	8.8	10 (+)	59
D <sub>2</sub> -2e	4.5	12.5(+)	54
D <sub>2</sub> -2f	2.1	8 (±)	70
D <sub>2</sub> -2g	3.1	0	53
D <sub>2</sub> -2h	0.5	15 (+)	62

- 0.15 ml を正常モルモットの皮内に注射し9時間後の反応。数字は発赤直径, カッコ内は硬結の程度を表わす。
- 正常モルモットのマクロファージ遊走面積を, 被検画分を加えない場合を100%として表わしたものの。
- 図1Aのゲル濾過画分。D<sub>2</sub>-2は測定しなかった。
- 図2の画分。

表2 脱感作血清の硫酸画分による皮膚反応とMI

画 分	280 nm における吸光度	皮膚反応 <sup>1)</sup> (mm)	MI <sup>2)</sup> (%)
40 P	15.5	14(+)	112
50 P	3.8	13(+)	37
60 P	3.2	13(+)	18
80 P	17.6	16(+)	20
80 S	1.75	0	35

1), 2) 表1と同じ

および80 Pに認められ, MIF活性は50 P, 60 P, 80 Pおよび80 Sに陽性であった。この場合も先のDEAE cellulose chromatographyの場合と同じくSRFとMIFの明確な分画は認められなかったが, SRFがMIFより沈澱し易いことが明らかにされた。

#### 4) Pevikon block electrophoresis による分画

脱感作血清の電気泳動像を図3に示す。脱感作モルモット血清の電気泳動像の特徴は, α領域の高い280nmの吸収である。ここに泳動される物質は先のSephadex G 200でvoid volumeに高い吸光度を示したものに相当している。MIF活性は血清アルブミンの領域に認められ, SRFはαからβ領域にかけて陽性であった

(表3)。図4に Pevikon block electrophoresis の分離能を知るために行なった免疫電気泳動の結果を示す。血清蛋白質相互の分離は Pevikon block electrophoresis

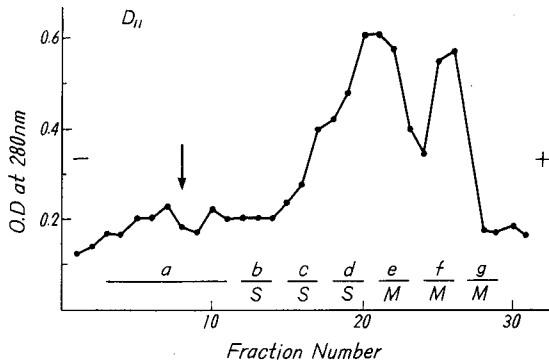


図3 Pevikon 電気泳動による脱感作血清 ( $D_{11}$ ) の分画

2 ml の血清を  $1 \times 10 \times 40$  cm の Pevikon ブロックで電気泳動した。30 mA 24 時間、 $4^\circ\text{C}$  で泳動し、1 cm 幅に切り出し生食水 10 ml で抽出した。おのおの抽出液はさらに 1:9 の比で 1M 酢酸で稀釈し 280 nm の吸光度を測定した。矢印は資料を负荷した位置を示す。

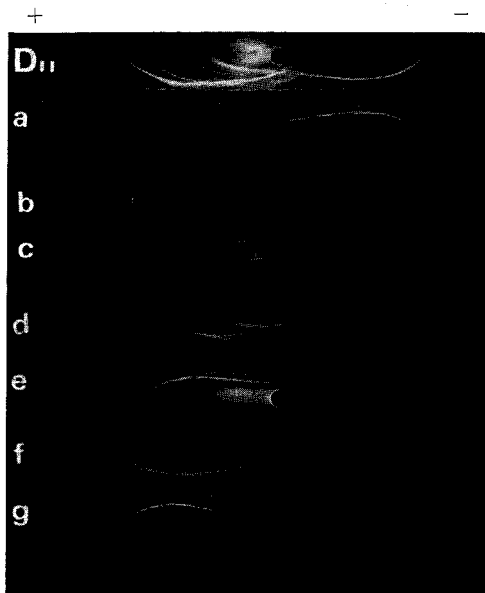


図4  $D_{11}$  およびその画分の免疫電気泳動

1.5% の寒天 (Noble agar) を 2 mm の厚さにゲル化し、pH 8.6 ベロナル緩衝液、 $i=0.05$  で 3 時間泳動した。電流は 2 mA/0.2 cm<sup>2</sup>。抗血清はウサギ抗モルモット全血清を用いて 24 時間室温で反応させ、型のごとく洗滌し、アミドブラックで染色した。

表3 脱感作血清 ( $D_{11}$ ) の電気泳動画分による皮膚反応と MI

画分	皮膚反応 <sup>1)</sup> (mm)	MI <sup>2)</sup> (%)
$D_{11}$	19(+)	—
$D_{11}$ -a	11(±)	102
$D_{11}$ -b	14(+)	92
$D_{11}$ -c	16(-)	90
$D_{11}$ -d	18(+)	96
$D_{11}$ -e	10(±)	62
$D_{11}$ -f	0	62
$D_{11}$ -g	0	49

1), 2) 表1と同じ

が今回用いた分画法の中ではもっとも優れており、その結果が SRF と MIF を互いに混入することなく明確に分離させたと言える。

## 考 案

脱感作モルモット血清中に正常モルモットのマクロファージ遊走を阻止する因子 (MIF) および正常モルモットに皮内反応を惹起する因子 (SRF) が存在することを既に報告した<sup>8)</sup>。これらの因子はともに耐熱性 ( $56^\circ\text{C}$ , 30 分) であり Sephadex G 200 のゲル濾過では血清アルブミンと同じ画分に溶出する。ただし SRF が MIF よりもやや早く溶出するようである。これらの事実はいままで *in vitro* のリンパ球培養上清に見いだされていた MIF および SRF が生体内でも生成・放出されることを強く示唆している。

われわれは今回脱感作血清を分画し、SRF 活性と MIF 活性の分離を試みた。用いた3法のうち電気泳動法がもっとも優れており、両者の活性は完全に分離した。MIF は血清アルブミン画分に、SRF は  $\alpha$  から  $\beta$  画分に分布していた (図3)。硫酸分画によると SRF は 40% 飽和で沈澱したのに対し、MIF は 50% 飽和ではじめて沈澱したが、両者の分離は完全ではなかった (表2)。DEAE cellulose chromatography によると SRF が MIF よりも早く溶出しはじめるが、linear gradient による溶出では tailing の影響が著るしく、両者の分離も不完全であった。DEAE cellulose column から step-wise elution を行なうことにより SRF と MIF は完全に分離しえる (未発表)。以上の実験から SRF と MIF は明らかに異なる因子と考えることができよう。しかし、DEAE cellulose chromatography で  $D_2$ -2h と名づけた画分には SRF 活性も MIF 活性も認められた。この画分に SRF 活性が認められた場合とそうではない

場合があり、D<sub>2</sub>-2h の真の意義についてはまだ問題が多い。SRF として2種以上の分子種が存在するのか、あるいは何らかの人工産物としてこの画分が SRF 活性を持つようになったのか何れかであろうと思われる。

さて、ここでわれわれの扱っている脱感作血清中の SRF および MIF を *in vitro* で発見された SRF および MIF と比較してみたい。

Remold ら<sup>9),10)</sup> は MIF は分子量 35,000 から 55,000 の糖蛋白質で disc electrophoresis では prealbumin に易動すると報告した。MIF は trypsin には抵抗したが chymotrypsin および neuraminidase により失活したという。吉田と Reisfeld<sup>11)</sup> は、Sephadex G 100 による分画で MIF は分子量 67,000 と 12,000 の両画分にとめられ、そのうち 67,000 の画分には SRF 活性も認められたが、分子量 12,000 の画分は SRF 活性は陰性であったと報告した。Bernstein ら<sup>12)</sup> は Sephadex G 75 と disc electrophoresis で精製した MIF 画分は prealbumin に位置し、分子量 30,000~40,000 で SRF 活性

も共存していたという。これより先に Bennet と Bloom<sup>2)</sup> が報告した SRF 活性は MIF 画分の中に認められたものであった。

他方 Pick ら<sup>13)</sup> は SRF のみを取り扱ったが、電気泳動的には  $\alpha$  の位置にあり DEAE-Sephadex から早期に溶出されると述べた。また奥山<sup>14)</sup> らは、ウサギのマクロファージ培養上清に SRF 様物質が認められ、この画分には MIF 活性がなく、有効物質はアルブミンか  $\alpha$ -グロブリンに易動度を持つと述べている。このほかに菊地<sup>15)</sup>、Heise ら<sup>16)</sup>、Amos ら<sup>17)</sup> の報告があるが、これらは抗原特異性と MIF の産生機構に関する示唆を与える点において Turk ら<sup>18),19)</sup> のグループとともに重要な報告であるが、SRF と MIF の異同とは直接関係がないと思われるので省略する。

以上述べた諸報告を直接比較することは、実験条件が必ずしも同じでないために多少無理があろうが、大略表4の如くまとめることができよう。

表4 リンパ球培養上清に出現した SRF と MIF を含む画分の分類

	電 気 泳 動	分 子 量	活 性	報 告 者
A	$\alpha$ -グロブリン		SRF	Pick ら 1969 <sup>1)</sup> 奥山 <sup>2)</sup>
C	アルブミンまたはプレアルブミン	30,000~70,000	MIF SRF	Yoshida ら 1970 Bennet ら 1968 Bernstein ら 1971
B	アルブミンまたはプレアルブミン	12,000	MIF	Yoshida ら 1970

1) MIF は測定していない

2) リンパ球を除いたマクロファージにこの活性をみとめている。

(A)  $\alpha$  領域に出現し分子量はアルブミン程度で SRF 活性のみを持つもの。

(B) アルブミンに近い易動度を持ち、分子量は 12,000 かそれより大きい程度で MIF 活性のみを持つもの。

(C) アルブミンに近い易動度を持ち分子量は(B)より大きく 30,000 以上あり、MIF 活性と SRF 活性を併せもつもの。

われわれが脱感作血清中に見出した SRF は(A)と極めて似ており、MIF は分子量は未定であるが(B)と似ていると言えよう。(C)の範疇に入る MIF は脱感作血清からはまだはっきりと分離されていないが、DEAE cellulose chromatography で得た D<sub>2</sub>-2h の画分は、あるいは(C)と analogous なものかもしれない。いずれにし

ても脱感作血清中の SRF および MIF は、いままで *in vitro* で得られた SRF、MIF と比較しうるものと言えよう。

## 結 語

結核免疫モルモットの一過性脱感作血清中に見出された MIF と SRF は電気泳動法などの分画法によって分離しえた。これら MIF と SRF は、*in vitro* のリンパ球培養上清中に見出されていた SRF および MIF と極めて似た性質のものと思われる。

## 文 献

1) Bloom, B. R. and Bennett, B.: Science, **153**, 80

- (1966).
- 2) Bennett, B. and Bloom, B. R.: Proc. Nat. Acad. Sci., **59**, 756 (1968).
  - 3) David, J. R., Al-Askari, S., Lawrence, H. S. and Thomas, L.: J. Immunol., **93**, 264 (1964).
  - 4) Yamamoto, K. and Anacker, R. L.: Infection and Immunity, **1**, 587 (1970).
  - 5) Thor, D. E. and Dray, S.: J. Immunol., **101**, 51 (1968).
  - 6) Godfrey, H. P., Bear, H. and Chaparas, S. D.: J. Immunol, **102**, 1466 (1969).
  - 7) Dumonde, D. C., Wolstencroft, R. A., Panayi, G. S. Matthew, M., Morley, J. and Howson, W. T.: Nature, **224**, 38 (1969).
  - 8) Yamamoto, K. and Takahashi, Y.: Nature New Biology, **233**, 261 (1971).
  - 9) Remold, H. G., Katz, A. B., Haber, E. and David, J. R.: Cell. Immunol. **1**, 133 (1970).
  - 10) Remold, H. G. and David, J. R.: J. Immunol., **107**, 1090 (1971).
  - 11) Yoshida, T. and Reissfeld, R. A.: Nature, **226**, 856 (1970).
  - 12) Pick, E., Krejci, J., Cech, K. and Turk, J. L.: Immunology, **17**, 741 (1969).
  - 13) Bernstein, I. D., Thor, D. E., Zaber, B. and Rapp, H. J.: Science, **171**, 1729 (1971).
  - 14) 奥山春枝・他: 結核の研究, **31**, 31 (1971).
  - 15) 菊地由生子・他: 結核の研究, **32**, 9 (1972).
  - 16) Heise, E. R., Han, S. and Weiser, R. S.: J. Immunol. **101**, 1004 (1968).
  - 17) Amos, H. E. and Lachman, P. J.: J. Immunol. **18**, 269 (1970).
  - 18) Pick, E., Krejci, J. and Turk, J. L.: Immunol. **22**, 25 (1972).
  - 19) Pick, E. and Turk, J. L.: Immunol, **22**, 39 (1972).