661.36-002-097.5

実験的ビールス性肝炎の免疫血清学的研究

第 3 編

細胞膜面荷電の免疫血清学的検討

岡山大学医学部第一内科教室主任：小坂淳夫教授

相 坂 忠 一

【昭和37年9月26日】

緒 言

前編においてエクトロメリア・ビールス（以下「エ・ビールス」と略す）によるマウスの実験的ビールス性肝炎の炎症過程において，感染とアレルギーの関連性を検討し，特に実質臓器細胞の反応性の変化をもつて示される自己感作現象が，この際成立することを明らかにした．ところでその際の体液性要素及び形態的要因の動態については，多くの研究者により検討が加えられており，ビールス性炎症において生体反応の主役を演ずる間葉系細胞，さらにはビールスの吸着，侵入，増殖より変性壊死に及ぶ実質臓器細胞の主として生化学的動態については，多くの論議がなされているが，ビールス炎症過程において皮立する感染アレルギーおよび自己アレルギーが実質臓器細胞に及ぼす免疫細胞学的影響に関する系統的研究には未だ接していない．

さてビールス感染時，実質細胞におけるビールスの吸着侵入および変性壊死の機作，また感染アレルギーや自己アレルギー時に反応性の変化した実質細胞が体液性要素との間に営む機作は，すべて細胞膜面上，ないしは細胞膜面を介しての機作であり，結果として膜面の物理化学的要素に種々の変化を来すことは推測に難くないであろう．

本編では，エ・ビールス感染による炎症過程，とりわけ感染アレルギーおよび自己アレルギー過程を含むあらゆる時期の細胞膜面の物理的特性とビルースおよび体液要素（抗原抗体）の相互作用を，間葉系遊走細胞の一つてある赤血球と肝実質細胞につき，その界面動電位（η一電位）に基づく微視的細胞電気泳動法[1)2)3)]によつて検討し，若干の興味ある皮績を得たので報告する．

実験材料および実験方法

1. 実験動物および使用ビールス

10～20g の健常市販マウスを使用し，毎日，オリエンタルM 7号固形飼料で，汚染，混合感染の防止に留意しながら，20°C 前後の室温で飼育した．

使用ビールスは本学微生物学教室より分与を受けた Hampstead 株エクトロメリア・ビールスを用い，当該ビールスをマウス腹腔内に接種し，発症極期の感染マウスの肝臓を無菌的に採取し，滅菌 Tyrode 氏液（T. 液と略す．以下同じ）にて乳剤とし，さらに健常マウスの腹腔内に累代接種して毒力の固定した50%致死量（LD_{50}）$10^{-7.4}$ のものを T. 液にて適宜稀釈して腹腔内に接種した．

2. 諸種抗体の測定

(1) 抗原の調製．

正常マウス肝 T. 液抽出抗原，エ・ビールス感染マウス肝 T. 液抽出抗原，可溶性感染肝組織抗原，及び濃縮精製ビールス抗原等の調製法は，第1編II，3,1)．によつて調製した．

(2) 抗体価測定法

すべてアメリカ陸軍軍医学校法[4)]によつて補体結合反応を行つた．

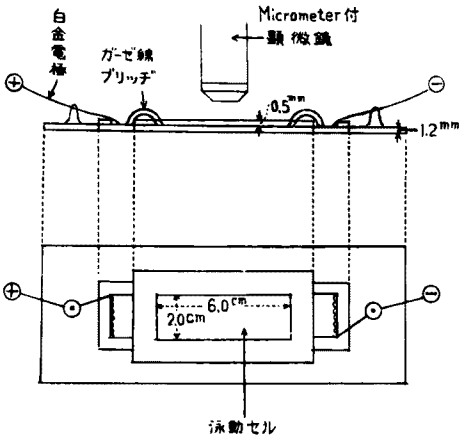
(3) 不完全抗体の測定法

直接 Coombs 試験法[5)]に従つて，第1編II，5によつて測定した．

3. 細胞電気泳動法

20 mm×60 mm×0.5 mm を内槽とする第1図のような硝子製平行面型 Cell 細胞電気泳動装置を用い，9.0%蔗糖液を Medium として内槽を充し，これに出来るだけ生理的条件で無菌的に採取して，滅菌 T. 液で3回洗滌，遠沈した赤血球，及び肝細胞を Capillarpipette で少量入れ，白金電極でガーゼ綿ブリッヂを介して，電圧 50v/cm 定電圧，0.5～

図1. 細胞電気泳動装置



泳動条件

電圧 50V/cm 定電圧

電流 0.5～1.0 mA

Medium 9.0%蔗糖液（pH7.2, μ×0.016）

温度 22°C±2

泳動速度 μ/秒（既知速度の正常ウサギ赤血球を対照として測定）

1.0 mA の強さの直流電流を流し，泳動する被検材料を顕微測微計で 22°C±2（概して室温）において泳動速度（μ/秒）を測定した．

なお肝細胞はマウスの股動脈より放血致死後，無菌的に肝をとり出し，細切し，T. 液で数回洗滌し，脱血させた後，さらに眼科用鋏で微細切，ガラス棒で細粉して T. 液で洗滌遠沈して出来るだけ機械的損壊の少い肝細胞を測定した．

また測定に際して，電場が平行平面型 Cell に適用される場合の，液層の深さと液体の流動面の変化の関係について，電場の適用によつて溶液は Cell の壁に沿つて変化をうけ，他方これと逆方向の流れが Cell の中央部に起るという Smoluchowsky の Depth velocity Parabola に従つて，Medium に対する粒子の泳動速度が正しく観察される位置，即ち内槽深の 0.789倍，及び0.211倍の深さ（位置）に顕微鏡の焦点を合せて観察した．しかし実際上便宜的に泳動速度既知の正常家兎赤血球を対照として各実験の前後に泳動速度を測定補正した．

なお泳動条件において Medium の pH の影響は大きいが，泳動槽の Medium として 1/15 M 燐酸緩衝液（pH 7.3）を用いる場合，しばしば被検赤血球の溶血を来すが，Stone, J. D. 等の方法[3]に従つて1.0%葡萄糖液を添加することによつて溶血現象は阻止することが可能であるが，肝実質細胞は容易に槽底に沈着して測定に甚だ困難を覚えるので，9.0%蔗糖液（pH 7.2, μ=0.016）を用い，被検肝細胞，又は赤血球を充分に液中浮遊状態に保ち観察した．この場合測定前後において，充分 1/15 M 燐酸緩衝液で槽を洗滌して用いるならば，短時間の測定においては測定値の変動も少く，pH の変化による影響もさして認められなかつた．

また泳動速度に対する温度の影響も無視することは出来ず，諸種被検物の細胞電気泳動速度は低温ほど低下し，高温ほど促進し変動しやすいが，主として Medium を 22°C 前後に温めて，常時一定条件のもとで短時間に測定した．

なお前述の Smoluchowsky の depthv elocity Parabola による測定値のちらばりを是正するための被検細胞に対する 1% Gelatin 溶液での Coating[6]は被検細胞表面界面動電位を出来るだけ生理的条件において観察測定する目的上，あえてこの処置を施さなかつた．

4. Transaminase 活性値測定

血清，及び肝細胞中の Glutamic oxaloacetic transaminase（S-GOT：血清中，L-GOT：肝細胞中），及び Glntamic pyruvic transaminase（S-GPT：血清中，L-GPT：肝細胞中）を新谷[7]の方法で測定した．

5. 形態学的観察．

(1) 病理組織学的検査

第1編II，7に従つて Carnoy 氏液固定後，型のように切片を Hematoxylin-Eosin 染色を行つて鏡検観察した．

(2) 位相差顕微鏡検査

第2編実験方法に従つて被検細胞を T. 液，37°C 恒温箱の中で，位相差顕微鏡により，核，細胞顆粒形質，及び Neutral red, Janus green に対する染色性の変化等について観察した．

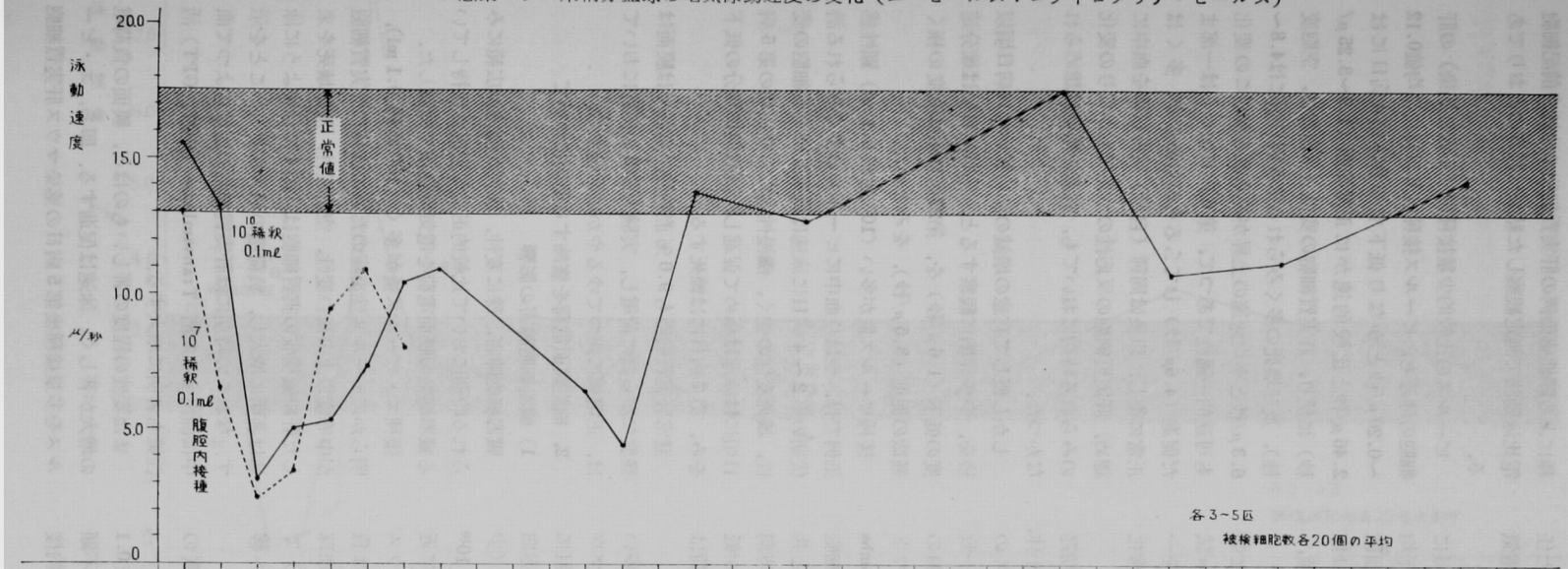
実 験 成 績

1. ビールス感染経過の細胞膜面電荷に及ぼす影響

1)，エ・ビールス感染マウスの末梢赤血球表面荷電の変化．

エ・ビールス T. 液 10^{10} 倍稀釈乳剤の 0.1ml を健常マウスの腹腔内に接種して，経時的に当該ビー

図2　エ・ピールス感染マウス末梢赤血球の電気泳動速度の変化（エ・ピールス：エクトロメリア・ピールス）



病日	前日	1	2	3	4	5	6	7	11	12	14	17	21	24	27	30	35
血中各種抗体（平均抗体価）																	
ニワトリ赤血球凝集素	(−)	10	60	50	20		20	20	(−)		(−)	(−)	(−)		20	(−)	
Coombs 直接反応	(−)	(−)	(±)	(+)(+)(+)	(−)(−)	(+)(+)	(−)	(+)(+)(+)(−)	(+)(+)(+)	(+)	(−)	(−)(−)	(−)	(−)	(−)		(−)(−)
抗 Virus 補体結合抗体		0.25	1.7	2.0	2.0	3.30	6.0	5.2 4.5	9.0 4.5	3.3	2.3	0	1.0 0	1.5 1.5	0.5	2.0 2.8	2.7
ニワトリ赤血球凝集抑制抗体	(−)	(−)	(−)	20	60	480		640	960		320	80	100		40	(−)	
肝自己抗体	0	0	0.1	1.0	1.6	0.3		0.3	1.3 3.0		1.1	1.2	2.7 5.3	3.5	3.0	6.0 6.0	8.0

ルス感染マウスを3～5匹宛順次殺して採取した任意各20箇の末梢赤血球の電気泳動速度を，細胞電気泳動法で測定した成績は図2のとおりである．

末梢赤血球の泳動速度はビールス接種後2日目に3.3μ/秒，3日目 5.1μ/秒，4日目 5.3μ/秒（平均値）と非常に遅延するが，この遅延は一過性に回復し，11日前後に若干の遅延がみられるものの14日目頃には，ほぼ正常範囲（12.8～17.5μ/秒：平均値，以下同じ）に戻り，以後大した変化は認めない．

この初期の泳動速度の遅延時に一致して，既に第1編において明らかにしたように，直接 Coombs 試験は陽性となり，しかも当該反応の陰性化と軌を一にして泳動速度（泳動と略す，以下同じ）の正常化の傾向を示している．

なおまた，2～3日目頃にみられる泳速の初期遅延時には，一部肝実質細胞にエ・ビールス基本小体，稀に Marchal 小体を認め，この時期はビールスのニワトリ赤血球凝集素が血中に増加する時期に一致している．次に10～11日目頃にみられる第2回目の初期遅延は血中に抗ビールス補体結合抗体，ニワトリ赤血球凝集抑制抗体が高値にみられ，直接Coombs試験も陽性で，肝の病理組織像においても実質細胞の局所壊死巣が分画化され，著しい星細胞反応と共に hyperergie な状態，即ち感染アレルギーの時期と一致している．しかし同種（自己）抗肝抗体が低値ながら血中にみられる時期には赤血球膜面電荷はほぼ正常である．

またこうした関係はエ・ビールスの接種量の多い例（エ・ビールス原乳剤 10^7 稀釈液 0.1 ml，マウス腹腔内接種例）でも直接 Coombs 試験は2日目に一部陽性を呈した他は殆んど陰性であつたが，赤血球の泳速はやはり2日目に，10^{10} 稀釈接種例（少量接種例）以上に急激に低下し，4日目頃には 10^{10} 稀釈接種の不顕性感染群よりも比較的早く正常に近く復するが7日目には殆んど斃死する．健常マウスの末梢血赤血球は pH6.0～8.0 では細胞膜面は負に荷電し，9.0%蔗糖液の Medium での浮遊赤血球は前記条件下（50v/cm 定電圧，1.0 mA，室温）で12.8～17.5μ/秒とほぼ一定した泳速で正電極へ移動する．

2）エ・ビールス感染マウス肝細胞の膜面荷電の変化．

前記同様の条件で，エ・ビールス 10^{10} 稀釈液0.1 ml をマウス腹腔内に接種したビールス少量の不顕性感染例と，より大量の 10^7 稀釈 0.1 ml 腹腔内接種による顕性感染例の肝実質細胞の泳速を前記細胞電比泳動法で測定観察した結果は図3のとおりである．

ビールスの比較的少量接種例（不顕性感染）の肝細胞の泳速も，ビールス接種後2日目に平均値0.12～0.20μ/秒とかなり低下するが，第4病日には2.46μ/秒と比較的速かに正常範囲（1.9～3.25μ/秒）に戻り，肝実質細胞の変性（蛋白変性，空胞変性），及び壊死の多くみられる第5病日頃には4.8～6.3μ/秒と平均泳速の上昇がみられるが，この変化も可逆的一過性であつて，第6病日頃からは一部まだ促進（4.6μ/秒）してゐるものもあるが，多くは正常に復し，以後は同種（自己）抗肝抗体を血中に認め，肝実質細胞の反応性のうえでもかなりの変化のみられる時期においても，有意の増減は認められなかつた．

しかし概して有意の増減の認め難い第14病日頃以後を，やや詳細に観察すると，第17病日頃は幾分速度の低下（1.6μ/秒）を，第27病日頃は速度の極く軽微の促進（3.6μ/秒），をみとめた．

接種ビールス量が多い（10^7 稀釈 0.1 ml）顕性感染例では，やはり血中にビールスの多くみられる潜伏期の第2～4病日に泳速は低下し肝実質細胞の変性，壊死変性の強く，瀰漫性となる発症期の第5病日頃には泳速は極めて促進し，死直前に幾分の低下をみ，第7病日には斃死する．

健常肝実質細胞も9.0%蔗糖液，室温では膜面は軽度ながら負に荷電し，実験方法3の条件においては，正電極に向つてゆるやかに泳動する，

2，細胞膜面電荷を修飾する要因について

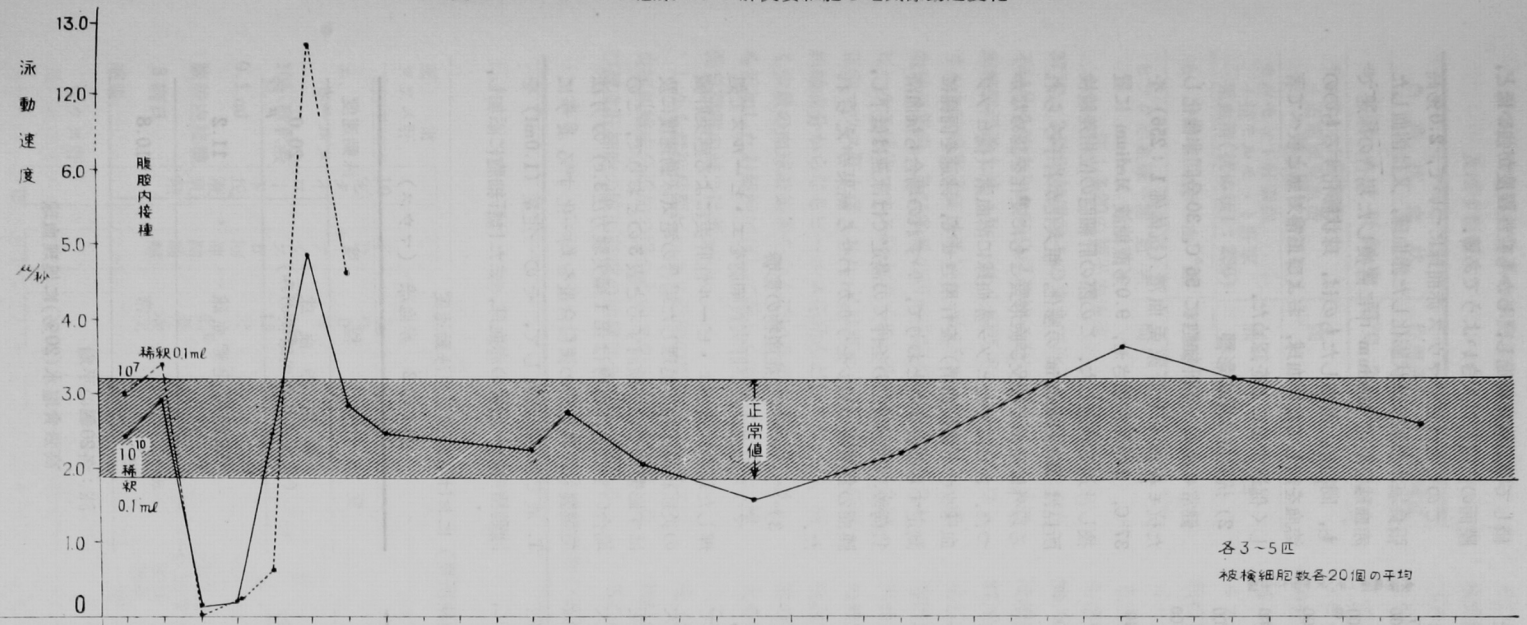
1）臓器細胞障害の影響

臓器細胞障害，殊に変性，壊死が瀰漫性広範にみられる時期において比較的正常な形態を保持している臓器細胞の膜面電荷を電気泳動法で検討した．

接種エ・ビールス量が多く（10^7 釈稀 0.1 ml），明らかにビールス性炎症のために広範に肝実質細胞が中等度以上の蛋白変性，空胞変性，及び壊死を来した肝組織構成の実質細胞は，図4に示すように泳速は著明に増大し，負荷電の増大が著しいことを示す．なおこの時期には肝実質細胞の崩壊によつて血中に漏出する血清 Transaminase（GOT，GPT）活性値も著明に増大する．

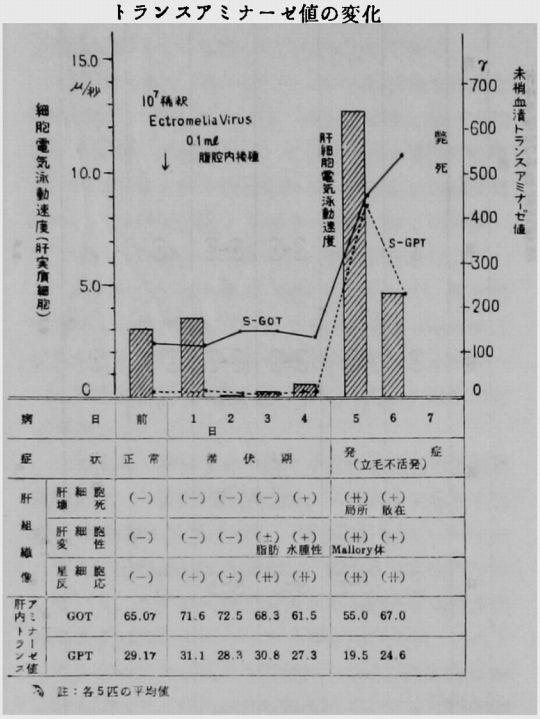
また変性の程度の著しいものほど，膜面の負荷電の増大が著しく，泳速は促進する．即ち，エ・ビールスを多量接種後第5病日の感染マウス肝実質細胞

図3　エ・ピールス感染マウス肝実質細胞の電気泳動速度化



病日	前	1	2	3	4	5	6	7	11	12	14	17	21	24	27	30	35
肝組織像 細胞内基本小体		(−)	(−)	(+)	(+)	(−)～(+)	(−)～(+)	(−)		(−)	(−)		(−)		(−)	(−)	(−)
肝組織像 肝細胞変性			(−)	(±)	(卌)	(+)～(−)	(−)	(−)		(−)	(−)		(−)～(±)		(−)	(−)	(−)
肝組織像 肝細胞壊死			(−)～(+)	(−)	(+)～(−)	(卌)～(±)	(+) 局所	(+)		(+) 分画	(±) 結織化		(±)～(−)		(±)～(−)	(±)～(−)	(±)～(−) 後結節
肝組織像 星細胞反応			(+)	(卌)～(+)	(卌)～(+)	(+)	(+)	(+)		(卌)	(卌)		(卌)～(+)		(卌)～(+)	(+)～(卌)	(卌)～(+)
血中抗体 ニワトリ赤血球凝集素	(−)	10	60	50	20		20	20	(−)		(−)	(−)	(−)		(−) 20	(−)	
血中抗体 Coombs直接反応	(−)	(−)	(±)	(±)(+)(+)	(−)(+)(+)	(+)(+)(+)	(−)	(+)(+)(+)(−)	(+)(+)(±)	(+)	(−)	(−)(−)	(−)	(−)	(−)		(−)(−)
血中抗体 抗Virus補体結合抗体		0.27	1.7	2.0	2.0	3.0	6.0	5.2 4.5	9.0 4.5	3.3	2.3	0	1.0 0	1.5 1.5	0.5	2.0 2.8	2.7
血中抗体 肝自己抗体	0	0	:0.1	1.0	1.6	0.3		0.3	1.3 3.0		1.1	1.2	2.7	5.3 3.5	3.0	6.0 6.0	8.0

図4　感染による障害時の肝実質細胞の泳速とトランスアミナーゼ値の変化



の位相差鏡検所見で，細胞核がやや縮少し，Chromatin 網工の判然としない均質でやや輝いてみえ，胞形質もやや膨化し，Mitochondria も粗大凝集したかなり高度な変性細胞と，核には大した変化はみられないが，胞形質の Storage granula は大小不同で，Mitochondria 粗大，塊状化し，一部外縁部に小 Blister がみられる程度の中等度の変性細胞の泳速を正常細胞のそれと比較すると表1のように，概して前二者は促進し，しかも変性程度が強いほど，膜面の負電荷は大きいようである．

このことは正常マウス赤血球について，2.0%高張食塩水添加で球状膨化した赤血球，又は溶血した赤血球を所定 Medium 中に置換した場合の泳速でも，同様に，溶血したものは，球状膨化するものの溶血を起してない血球，および正常対照と較べて著しく促進することを認めた．

2）抗原抗体系の影響

健常モルモット肝細胞に 56°C，30分間非働化した抗モルモット肝家兎血清（抗体価1：256）を 37°C，2時間作用させ，9.0%蔗糖液 Medium に置換し泳速を測定した．この際の肝細胞の位相差鏡検所見は Mitochondria の膨化，粗大化が若干みられる以外は殆んど核及び胞形質ともに変化を認めなかつた．さらにまたヒツジ赤血球に溶血素（抗ヒツジ血球ウサギ免疫血清）を作用させて，泳速を同様に測定すると表2のとおりで，いずれの場合も抗血清負荷後，前記所定の条件での湯定では泳速は低下し，膜面の負荷電の減少をうかがわせる結果がえられた．

3）ビールス性炎症産物の影響

マウス赤血球及び肝実質細胞をエ・ビールスで処理した場合，及びエ・ビール性肝炎による感染肝臓の炎症組織産物で処理した場合の電気泳動速度に及ぼす影響について検討すると表3のとおりで，この場合いずれも作用物は第1編実験方法3.c）の方法で調製し，各上清の蛋白含量を均一化するように T. 液でさらに調製して，その一定量（1.0ml）を泳動槽内の一定量の赤血球，または肝細胞に添加し，

表1　変性現象（位相差鏡検所見）における細胞電気泳動速度

表1の1　肝実質細胞（マウス）

変性程度	泳動速度
(+++) 核：均質化，縮少，輝度強 肥体：膨化，糸粒体：粗大，凝	10.4 μ/秒
++ 核：正常　変化なし 肥体：水泡(小稀辺縁)，糸粒体，粗大塊状	5.2
(−) 正常	1.9

註（1）変性細胞は エ. ビールス多量接種例の時5病日の肝組織から採取
（2）位相差鏡検下の泳動
（3）各4～10個の平均

表1の2　赤血球（マウス）

変性程度	泳動速度
溶血赤血球（破壊された血球膜のみ）	20.0 μ/秒
球状膨化赤血球	11.2
正常	10.8

註：各20個の平均
高張食塩水(20%)に処理血球

表2　諸抗原抗体系の細胞電気泳動速度に及ぼす影響

負荷抗血状	作用条件	泳動速度
モルモット肝細胞	37°C, 2時間	4.6 μ/秒
モルモット肝細胞＋正常家兎血清（生食2倍稀釈）	同　上	0.9
モルモット肝細胞＋抗モルモット肝家兎血清（抗体価1：256）	同　上	0.15
ヒツジ赤血球	37°C, 30分	22.3
ヒツジ赤血球＋溶血素	同　上	8.6

註：各20の個平均泳速

37°C, 2時間静置後そのままで泳速を測定したが，不純物を除去した純粋浮遊液に近いエ・ビールス濃縮精製浮遊上清（V）（第1編既述のようにニワトリ赤血球凝集素価は低い），及びエ・ビールス，赤血球凝集素，及び多量の可溶性症炎組織成分を含むビールス感染マウス肝上清（E）を添加した場合は，正常マウス肝上清（N），又は主として可溶性炎症組織成分からなるビールスを殆んど含まないが，極く少量の血球凝集素を含んでいる超遠沈上清（S）を添加した対照例に比して著しく泳速は低下し，膜面負荷電の減少は著しい．

しかも濃縮精製ビールス添加の場合とビールス性炎症組織成分添加の場合とのマウス健常赤血球，及び健常肝細胞の膜面荷電の態度は全く同一である．

そして主として炎症組織成分よりなる超遠沈上清の細胞膜荷電に及ぼす作用は，主としてビールス，及びその血球凝集素を多く含む超遠沈前の上清を用いた場合に較べると軽微である．

エ・ビールスの赤血球凝集素は感染力を有するエ・ビールス自体とは別個のものであり，殊に37°C, 60分でニワトリ赤血球で大部分吸収され，一旦赤血球に吸着すると容易に溶離し難い[15]が，エ・ビールス感染マウス肝 10^2 稀釈乳剤の 0.1 ml をマウス腹腔内に接種して2日目の明らかに泳速が減退し，ビールス及び血球凝集素の吸着が著しいと推定される感染マウス赤血球を生理食塩水で3回洗滌後，23%感染マウス赤血球浮遊液を作り，その 15 ml を 30,000 r. p. m., 15分遠沈して沈渣を採取し，その沈渣に pH 7.3 1/10M 燐酸緩衝液 32 ml を加え，37°C, 2.5時間静置後，さらに 3000r. p. m., 15分遠沈し，37°C 生理食塩水で洗滌し，遠沈を数回行い溶離困難とされているエ・ビールスを出来る限り遊出せしめた後の沈渣赤血球の泳速を感染マウスよりの無処理の赤血球のそれと同一条件，35～36°C で検討すると表4の如く，ビールス遊出につとめた細胞の方が泳速は明らかに促進し，膜面の負荷電の増大を知ることが出来る．

この場合，遊出処理赤血球のマウスに対する感染能（50%感染価，又は50%致死量の測定），及び既知抗血清による赤血球凝集抑制抗体価測定などによる詳細の検討によらなければならないが，前記処理

表3　エ．ビールスまたはビールス性炎症組織産物の正常マウス赤血球，肝細胞泳速に及ぼす影響

作用物質作製法	作用物質	条件	作用をうけた正常マウス赤血球泳速	作用をうけた正常マウス肝細胞泳速
正常マウス肝 → 10%タイロード氏液乳剤 → ドライアイス5回凍結融解 → 3000 r.p.m. 15分 低温遠沈 → 上清	正常マウス肝上清（N）	室温 2時間	8.80 μ/秒	0.32 μ/秒
エ．ビールス 10^2 稀釈液 0.1 ml 腹腔内接種 3病日 感染マウス肝 → 10%タイロード氏液乳剤 → ドライアイス5回凍結融解 → 3000 r.p.m. 15分 低温遠沈 → 上清 → 超遠沈＝30000 r.p.m. 60分 → 沈渣＋pH 7.3 1/10M 燐緩酸衝液	上清（S）		7.90	0.23
	濃縮精製ビールス浮遊上清（V）		2.32	0.11
	ビールス感染マウス肝上清（E）		1.83	0.07

註：作用物質はいずれも蛋白含量を均一にして用う．

表4 エ．ビールス遊出操作を施した感染マウス赤血球の諸条件における泳速変化

被検材料	細胞電気泳動速度 17°C	細胞電気泳動速度 35～36°C
エ．ビールス感染マウス第2病日の赤血球から37°C 1/10M 燐酸緩衝液にてビールス遊出操作をした感染マウス赤血球	0.12 μ/秒	3.66 μ/秒
エ．ビールス感染マウスの第2病日の赤血球（無処置）	0.11	0.54
正常マウス赤血球（末梢血）	10.8	13.4

註：いずれも各10個の平均値

によるビールス遊出は完全なものではなく，処理後も若干のビールス及び赤血球凝集素の残存吸着は想像に難くないが，35～36°C の条件の場合と異り，17°C では遊出処理と未処理のものとの間にさして差を認めないことは興味あることで，エ・ビールス，及び赤血球凝集素の赤血球表面吸着度の温度よる差異によることと共に，赤血球膜面界面電位そのものに対する温度の影響，即ち温度条件の差異による細胞表面よりの荷電成分の消失度の変化，ないし細胞表面の荷電群の立体的配置の変化を考慮の外におくことは出来ないようである．

なお，既述の細胞泳動法（II，3）における検討で明らかなように，Medium の pH 及び温度の泳速に及ぼす影響は無視することが出来ないことは論及するまでもない．

総括並びに考案

第1編及び第2編で既に検討したエ・ビールス感染による全身感染現象と共に実質臓器のビールス性炎症の進行と感染アレルギー，殊に不顕性感染の後期に認められることの多い自己アレルギー過程の系統的解明の一環として，本編ではビールスの動態及び宿主の間葉系遊走細胞の一つである末梢赤血球，さらには実質臓器細胞の肝実質細胞の動態を物理的化学的量として細胞電気泳動法し膜面荷電の動態を検討した．

電気泳動は粒子の表面，あるいは内部に存在する電荷が電場の作用をうけて液体中を移動する現象に他ならない．この際，粒子はその構成成分が溶液中でイオン化するか，又は溶液中のイオンが粒子の表面に吸着されることによつて電荷を持つに至り，粒子と液体との間に，粒子に附着した非移動性液体層とその外側の自由に移動しうる層との電気的二重層が形成され，実際には拡散的であるが，移動層と固着層の間にち一電位（Zeta Potential）が生ずる[16]．

電気泳動において粒子が二重層の厚さに比べて大きい場合，粒子の単位表面についての電荷σ（クーロン/cm²），粒子の泳動速度 v（cm/秒），適用した電場の強さE（ボルト/cm），液体の粘性係数 η とする粒子の泳動速度が一定，即ち電場によるカと液体の抵抗力が平衡状態になつた場合

$$E\sigma=\eta v/d$$

従つて $v=E\sigma d/\eta$

Eは定電圧，Medium が一定（η が一定）の場合，泳動速度は粒子表面の電荷に比例するため，泳動速度（泳速と略す）の測定は膜面電荷をうかがいしる妥当性を有している．

著者の泳動条件，即ち 50 V/cm 定電圧，1.0 mA，9％蔗糖液，22±2°C ではマウスの正常赤血球及び正常肝実質細胞は，いずれも負に荷電し，前者は 12.8～17.5 μ 秒，後者は 1.9～3.25 μ 秒の泳速で陽極に向つて泳動する．

エ・ビールスを健常マウスの腹腔内に接種してビールス感染による肝炎を招来させると，末梢赤血球及び肝実細胞の膜面荷電は経時的に速やかに変化し，興味ある動態を示す．即ち，間葉系遊走細胞の一つで，膜面構造及び形態の単純な赤血球の膜面負荷電の動態は感染後速やかに変化するが，この変化の要因はビールス感染，とりわけ感染に基づく血中体液性要因に影響されるところが大きい．血中成分との関連性では，第2～5病日の血球膜面荷電の初期減少は，ニワトリ赤血球凝集素出現状態との関連からも明らかなように，血中ビールス自体，またはそれから遊離した赤血球凝集素の作用（膜面への吸着）によるものであり，第11～12病日の後期減少は一部ビールス自体の影響も無視することは出来ないが，主として血中諸種抗体，殊に直接 Coombs 試験で認知できる不完全抗体等が主要な役割をなしているようである．

Mumps-Influenza 群ビールスが赤血球を凝集し[17]，その血球凝集反応はビールス自体，主としてビールス自体が持つている血球凝集素の赤血球表面への吸着により[10][11]，血球相互の一般凝集反応におけると同じ機序により凝集塊を形成するものであること[12]が明らかにされた．なお，その表面吸着については電子顕微鏡によつて形態的にも明らかにされ[18]，ま

た血球凝集素をビールス自体の結合基として，細胞表面に存在する Receptor とほぼ特異的機械的に結合すること[14)19)20)]．なお，また当該ビールスの吸着は人赤血球の泳速を低下するが[13)14)]，殊にエ・ビールス等の牛痘群ビールスも中性 Medium では負に荷電[21)]し，細胞膜面吸着によつて泳速を減少させることは Haning, M[22)], Martin, H.,[14)] Stone, J. D.[3)] 等によつて指摘されている．

そうするとエ・ビールス濃縮精製浮游液添加の健常マウス赤血球，または肝細胞の泳速が低下することを明らかにした著者の実験もビールス体（その一部を構成している凝集素）の細胞表面への吸着による膜面荷電の変化を首肯させうる．なお殆んどビールスを含まない肝実質細胞の炎症崩壊産物（可溶性成分）は泳速に対して影響を与えないことは上記の事実をさらに裏書きする．

従つてエ・ビールス感染マウス赤血球の初期の膜面負荷電の減少は，上記の事実及び血中凝集素との相関性等から血中ビールス体及び凝離凝集の細胞表面吸着によることは明確である．

同様に感染マウス肝実質細胞の泳速も感染極く早期において著明に低下したが，この事実もまたコレラ菌培養液から精製した Receptor 破壊酵素で，フエレット肺上皮細胞を処理すると Iufleuenza ビールスの吸着が困難で感染能が低下することから，Stone, J. D.[23)] 等は宿主細胞（赤血球以外）にもビールスに対する Receptor が存在することを想定していること，及び著者がエ・ビールスの少量(10^{10} 稀釈 0.1 ml) 腹腔内接種した例において肝細胞の泳速低下が血中凝集素の出現状況と平行して，殊に基本小体や，Marchal 小体の胞体内にまだ出現しない第2病日頃から著明に低下すること等から考え合せて，恐らくエ・ビールスの宿主親和性実質細胞表面への吸着，Receptor 破壊の細胞内侵入準備の過程によるものと考えて大して誤らないであろう．

Haning, H. はビールスによる泳速低下の要因について，①細胞からの荷電成分の消失，②細胞の荷電群の立体的位置の変化，③溶媒の荷電成分の細胞表面への吸着，を挙げているが，前述のエ・ビールス感染初期のビールス吸着，及び不完全抗体（吸着）によると想定せられる初期の泳速低下の要因も，果してそれら単一の要因によるものであるか，又は2ケ以上の相乗作用によるものであるほかは，軽々に断じにくいことで今後の検討にまたねばならない．

細胞表面に吸着した Mumps-Influenza 群ビールスは，その持つ一種の Mucin 分解酵素で表面の Receptor を破壊して遊離するが，表面 Receptor が破壊された赤血球の泳速は低下し[22)]，また Trypsiu, Papain 等の蛋白分解酵素処理赤血球，及び Crystal violet 等の色素結合赤血球は細胞表面の物理化学的性状も変化し，凝集しやすく，凝速も低下すると[8)]されている．

なおまた膜面荷電に及ぼす各種抗原抗体系の影響については前記実験成績，2，3の著者の実験と共に丸本[8)]は健康人赤血球で Middle brook-Dubos Test, Coombs Test, Paul-Bunnell Test 等のいずれにおいても凝集反応の起り始めた赤血球の泳速は著しく減じてくることを明からにし，高島等[9)]も細胞電気泳動法によるチフス菌感感作赤血球の表面荷電が低下すると述べている．このように不完全抗体の血球膜面附着をはじめとして，特異抗体の特該抗原を有する細胞表面に対する作用も膜面荷電に変化を与え，泳速は明らかに低下することは明確となつた．

従つて，エ・ビールス感染第11病日前後の時期は，感染に基因した諸抗体が血中に厳も著明にみられる感染アレルギー期に相当し，この時期にみられる感染マウス赤血球泳速低下の要因は，Mumps-Influenza 群ビールスと同様に牛痘群のエ・ビールスによつても，ビールス自体，又はその凝集素の吸着侵襲をうけた赤血球は，ビールス遊出後，赤血球表面の特異 Receptorが破壊され表面荷電状態に変化を来していること，及び血中諸種完全抗体と共に直接 Coombs 試験で認知しうる血球表面附着の不完全抗体による血球膜面の変化も大きく影響しているようである．

一方第4～7病日頃に最も多く血中にも認められるエ・ビールス性肝炎による肝実質細胞の可溶性崩壊産物（殆んどビールスを含まない）の赤血球膜面荷電に及ぼす作用については，エ・ビールス感染マウスの赤血球泳速の動態及び実験成績 2，3 によつて明らかなように殆んどその影響は認められないようである．

このような赤血球膜面荷電の変化も第14病日になるとほぼ正常に復するようになる．この時期には血中にビールス及びその凝集素は認められず，抗ビールス補体結合抗体，ニワトリ赤血球凝集抑制抗体等は血中に存在するが不完全抗体及び同種（自己）抗肝抗体は認められないで，一度ビールスの侵襲をうけ，Recetor 配壊され表面構造の変化した赤血球もこの頃にはほぼ流血中から消失してしまうためと考

えられる.

血中に同種（自己）抗肝抗体の出現する初期，第21～25病日においても赤血球泳速は正常で膜面荷電の変化はうかがわれないが，第27～30病日頃には一時軽微の低下がみられる．これは遷延不顕性感染肝炎の経過により自己アレルギーの成立をみ，血中に増多した同種（自己）抗肝抗体と共に，一部赤血球に附着した不完全抗体によるものか，又は自己アレルギーによる赤血球表面の物理的化学的な非特異性変化による膜非荷電の減少に基づくものか，なお今後の検討にまたねばならない問題と思われる．

複雑な代謝機構を有する肝実質細胞の膜面電荷を左右する要素は，赤血球のそれほど単純でないが，肝実質細胞の泳速変化は既述のように，第2～3病日の著しい泳速低下を経て，第4病日には正常に復し，第5病日には急激に泳速は促進する．この泳速上昇の時期は肝実質細胞中にビールス基本小体を認め，殊に肝臓においてはビールス性炎症病変度の極期で，実質細胞の変性壊死は著しい（測定被検細胞は位相差鏡検でなるべく正常に近い細胞のみを選んだが）．従つてビールス接種量が多く，極めて高度の変性壊死を招来させ，実質細胞の壊死崩壊で漏出した血清 Trausammase 値も甚だ高い場合には肝実質細胞の泳速は促進すること，及び位相差鏡検で明らかに変性現象（一部壊死をも含む）を呈する宿主細胞の泳速も増大する（実験成績2,1)）ことと考え合せて，実質細胞のエ・ビールス接種第5日の泳速増大は，当該細胞の一部壊死現象をも含めて，変性現象が細胞表面荷電に著しい変化を与え，負荷電の著増を呈するためと考えられる．

接種ビールス量の少ない不顕性感染例でも，ビールスが宿主細胞表面に吸着し，その酵素作用で Receptor を破壊して侵入準備を完了すると，1～2日で速やかにビールスは細胞内に侵入し，基本小体を形成し，変性壊死を招来させる．この全過程はまた極めて急激に進行する．しかも細胞電気泳動法による膜面荷電の動態において追求しうる範囲の肝実質細胞の変性過程は，主として測定した変化の少ない細胞に関する限り一過性可逆性のようで，泳速の亢進した肝実質細胞は，また速やかに第6病日頃には正常に復し，以後ほぼ正常範囲を上下するのみである．

しかし，ほぼ正常範囲にある肝実質細胞の泳速変化も詳細に検討すると，第17病日頃に若干の泳速低下を，第27病日頃には，むしろ幾分の泳速増大を認める．前者は同種（自己）抗肝抗体出現は極稀で，抗ビールス補体結合抗体，ニワトリ赤血球凝集抑制抗体及び直接 Coombo 試験場陽性抗体等の諸種抗体も血中に認められない時期で，ただ第2編既述のように当該細胞は位相差鏡検において正常マウス肝抗原添加により軽度の変性現象を認め，反応性の変化と共に細胞拘着性抗体の存在の可能性をうかがわせた．本編でもモルモット肝細胞に抗モルモット肝家兎血清を2時間作用させ，さしたる変性もみられない細胞は膜面荷電が低下していることを明らかにしたが，従つてこの第17病日の肝実質細胞の泳速低下は細胞膠着性抗体の存在の可能性と自己アレルギーの成立によるものであることが，膜面の物理的化学的性状変化から充分認知できる．

後者は血中に同種（自己）抗肝抗体を高値高率に認めるが，直接 Coombs 試験陽性抗体はみられない時期で，第2編において既にふれたように，この時期の肝実質細胞は，抗原又は諸種抗血清添加により位相差鏡検上かなり著しい変性現象を呈し，自己アレルギーの進展による細胞自体の反応性の変化を推測させるが，細胞電気泳動における泳速増大，即ち荷電増大という細胞膜面の静電気的特性は実質細胞の反応性の変化，即ち何らかの意味での実質細胞の変性過程を現わすものであることを教えている．しかしともかくいずれも軽度で一過性可逆性の過程をとるものであることはその前後の泳速の経時的動態から明らかである．

また肝実質細胞膜面の物理化学的変化の一過性可逆性の本質については，実質細胞自体の機能の複雑性及び組織機能の代償性の大きさに負うところが多いようであるが，なお不明の点を多く残している．

ところで赤血球膜面に附着した不完全抗体は直接 Coombo 試験で検出されるが，この際，用いられる Coombo 血清は抗 γ-Globulin と抗非 γ-Globulin を含んでいるため，かなり広範な反応性を示すものとみてよい．畔柳[24] も自己免疫性溶血貧血において血漿中の線維素触解酵素等により，赤血球の表面に変化を来し，血漿中の γ-Globulin を吸着して起る可能性を示唆しているが，著者は直接 Coombs 試験の陽性反応の出現状況を赤血球の泳速動態及び感染過程の推移から考察して，ビールス感染極く初期のビールス自体，又はその血球凝集素の血球表面吸着時に直接 Coombs 試験陽性例が多いこと等から感染アレルギーの成立する時期の主として不完全抗体と考えられる直接 Coombs 試験陽性物質と異なり，

感染極く初期の直接 Coombs 試験陽性物質は，血中の主としてビールス自体及びその血球凝集素を含んだ感染に基ずく初期変化（物質）と密接な関連を有するものと考えられる．

なお肝自己抗体の生物学的意義については，今なお説が分かれてはいるが，Cytotoxin 様作用を有し肝細胞に障害を及ぼすものであることは今日，Meyer-Krahmer, H. G.[25] 及び教室長島[26]，太田[27] 等によつてほぼ定説とされてきているが，著者も第2編でこる点について若干の検討を加えた．畔柳[28] 等は抗ラッテ肝家兎血清を ^{131}I で標識して肝細胞の障害作用を追求した結果，肝細胞に附着して障害作用を呈するものは肝細胞細胞膜を抗原として産生された抗血清であることを指摘しており，組織（細胞）アレルギー反応における組織（細胞）の障害性の要因として，細胞膜に対する抗体の重要性が一部注目されているが，著者の感染アレルギーにおける細胞膜面の静電気的特性の追求も，この点において興味ある知見と信じている．

結　　語

エ・ビールス感染による実質臓器及び全身の感染現象の進行における感染アレルギー，殊に主として不顕性感染の後期に認められる自己アレルギー過程の本態解明の一環として，ビールス感染過程における宿主の間葉系遊走細胞の一つである末梢赤血球及び肝実質細胞の膜面荷電気泳動法で追求し，細胞膜面の静電気的特性を物理的化学的量の動態として追求し，次の結果をえた．

1）本測定条件では正常マウス赤血球は負に荷電しているが，エ・ビールス感染における宿主赤血球の膜面荷電は，感染の極く初期より膜面負荷電は著しく減少し，約3日の経過後正常範囲に復する傾向を示したが，ビールス接種量の少ない不顕性感染例では再び第12病日頃に負荷電が低下し，14病日頃には全く正常に復した．初期減少の要因は，主として血中のビールス体及びその血球凝集素の血球表面吸着によるものであり，後期減少はビールス遊出後の血球表面の特異 Receptor の破壊及び直接 Coombs 試験で検出される血球表面附着の不完全抗体によるものであることが推測され，感染による肝組織の崩壊産物の影響は比較的少なかつた．

2）血中に同種（自己）抗肝抗体が出現し，（自己）抗肝抗体が出現し，自己アレルギー現象の成立すると思われる時期には，赤血球膜面荷電の変化は殆んど認められなかつた．

3）エ・ビールス感染過程における宿主肝実質細胞の膜面荷電は特色ある動態を示し，感染の極く初期には，親和性実質細胞表面 Receptor へビールスの吸着，そして Receptor 破壊による侵入準備過程で肝実質細胞膜面荷電は著しく減少し，ビールスが胞体内に侵入し，基本小体を形成，変性壊死過程になると急速に膜面負荷電は増大を示した．

4）ビールス接種量の少ない不顕性感染の場合，膜面荷電の動態から追求しうる肝実質細胞の変性過程は，概して一過性可逆性で，速やかに正常に復した．

5）感染の後期より自己アレルギーの成立すると思われる時期までの肝実質細胞腹面荷電はほぼ正常範囲であつた．

6）ビールス接種量の少ない不顕性感染の第17病日頃に，肝実質細胞膜面負荷電の若干の減少が認められた．

7）同種（自己）抗肝抗体が血中に比較的高値高率にみられるエ・ビールス不顕性感染の第27病日頃の自己アレルギー過程における肝実質細胞は，一過性可逆性の軽度の変性現象を内包する細胞自体の反応性の変化のため，表面負荷電を増大し，泳速は促進した．

8）感染初期にみられる直接 Coombs 試験陽性物質は不完全抗体とは異なり，血中のビールス体及びその血球凝集素，さらには感染初期変化物質と密接な関連がみられた．

稿を終えるに当り終始御懇篤な御指導と御校閲を賜わつた恩師小坂教授並びに長島助教授に深甚な謝意を捧げます．また貴重なエクトロメリア・ビールスを株供与された本学微生物学教室に厚く御礼申し上げます．

文　　献

1）関　正次：組織検査法と無化学，杏林書院，1952.

2）Abramson, H. A., Moyer, L. S. &. Gorin, M. H.: Electrophoresis of Proteins, New York, Reinhold Publishing Co. 1942.

3）Ada, G. L. & Stone, J. D.: Brit. J. Exp. Path., 31, 263, 1950.

4）伝染病研究所学友会編：細菌学実習提要，東京

丸善,
1955.
5) 松橋 直：臨床病理, 2, 404, 1954., 臨床病理, 5, 315, 1957.
6) Miller, G. L., Lauffer, M. A. & Stanley, W. M: J. Exp. med., 80, 549, 1944.
7) 新谷和夫：臨床病理, 5, 264, 1957.
8) 丸本 彰：日血会誌, 18, 433, 1955.
9) 高島一良, 大久保彰三, 小川川郎, 安威康夫：日血会誌, 18, 349, 1955.
10) 福見秀雄, 山本繁夫：日新医学, 34, 193, 1947.
11) Hirst, G. K.: J. Exp. Med., 87, 301, 1948.
12) 新宮正文：Virus, 6, 502, 1956.
13) Stone, J. D. & Ada, G. L.: Brit. J. exp. med., 33, 428, 1952.
14) Martin, H.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 63, 385, 1949.
15) 北岡正規, 多ケ谷勇, 小沢芳治, 鈴木 誠, 小原正樹：Virus, 2, 154, 1957.
16) 江藤秀雄：医学と生物学のための物理学, 共立全書, 共立出版 1958.
17) Hirst, G. K.: Science, 94, 22, 1941.
18) Heinmetz, F.: h. Bact., 55, 823, 1948.
19) Burnet, F. M., McCrea, J. F. & Anderson, T. F.: Nature, 160, 404, 1947.
20) Sagik, B., Puck, T. & Levine, S.: J. Exp. Med, 99, 251, 1954.
21) 矢追秀武他：Japan, J. Exp. med., 7(2), 241, 1929.
22) Haning, H.. Proc. Soc. Exp. Biol. & med., 68, 385, 585, 1948.
23) Stone, J. D.: Austr. J. exp. Biol. & Med. Soc., 26, 49, 287, 1948.
24) 畔柳武雄, 栗栖 明：日新医学, 47, 791, 1961.
25) Meyer-Krahmer, H. G.: Z. Exp. med., 116, 390, 1959.
26) 長島秀夫, 太田康幸：アレルギー, 5, 132, 1956.
27) 太田康幸：岡山医学会誌, 71 (776), 6645, 1959.
28) 畔柳武雄：日本臨床, 20, 59, 1962.

Immunoserological Studies on Experimental Virus Hepatitis

3rd Chap. An Immunoserological Study on the Electric Charge of Cell Membrane

By

Tadakazu AISAKA

The First Department of the Internal Medicine
Okayama University Medical School
(Director: Prof. K. Kosaka)

For the purpose of clarifying the infection allergy on Ectromelia virus infection, especially auto-allergy which was noted in the later stage of subclinical infection, alternations of membranous electric charge in erythrocyte, which was a host of infected virus and mesenchymal wondering cell, and in parenchymal liver cell were studied by means of cells electrophoresis, and the following results were obtained:

1) Erythrocytes of normal mouse were all negatively charged. Upon Ectromelia virus infection membranous electric charge density of the erythrocytes, which were host of the

virus, markedly decreased from the beginning of the infection and then returned to normal level in three days or so. However, in the cases of subclinical infection to which a small amount of virus inoculated, it again decreased around 12 th day and returned to normal in two days or so.

The initial decrease in the membranous electric charge density was considered mainly due to adhesion of the virus and hemagglutinin to the surface membrane of erythrocyte, while the later decrease due to inactivation of specific receptor on the surface of erythroeyte following moving out the virus and also to incomplete antibody attached to the surface of erythrocyte which was able to detect by the direct coombs' test. The influence of break-down products of the liver by the infection was relatively little.

2) There were little changes in the membranous electric charge density at the stage of infection when auto-allergy phenomenon and auto-liver antibody were noted in the blood.

3) During the virus infection, alternations of the membranous electric charge density of parenchymal liver cells were characteristic. At the beginning of the infection the electric charge significantly decreased when the virus atracted te the receptor on the surface membrane of the liver cells and then the virus was ready to move into the cell following inactivation of the receptor. The electric charge rapidly increase when the virus moved into the cells to form elementary body, namely degeneration-necrosis stage.

4) In case of subclinical infection, in which a small amount of virus inoculated, degenerative changes of parenchymal liver cells, as judged by the alternations of suface electric charge, were transient and reversible and recovered to normal shortly.

5) The membranous electric charge of parenchymal liver cells had been almost normal range during the period from the later stage of the infection to the stage of completion of auto-allergy

6) In case of subslinical infection, in which a small amouut of virus inoculated, a slight decrease in the membranous electric charge of parenchymal liver cells was noted around 17 th day.

7) The membranous electric change and velocity of electrophoresis were increased in parenchymal liver cells in subclinical infection around 27th day when the auto-liver antibody titre was rather high. This was due to affected reactibility of the liver cells which had some mild transient reversible degeneration in themselves.

8) The positive direct Coomhs' test component, which appeared in the early stage of the infection, presented close relations with virus, hemoagglutinin and also degenerative substances in the blood seen at the beginning of infection.