

非特異性免疫反応増強作用の研究

第 3 編

海狸血清分屑の沈降反応増強作用、及び海狸血清の 加温による物理化学的变化についての研究

岡山大学医学部衛生学教室（主任：大平昌彦教授）

大 滝 千 尋

〔昭和33年7月8日受稿〕

第1章 緒 言

著者は本研究の第1¹⁾及び第2編²⁾において色素、及び海狸血清各分屑の細菌、及び血球凝集反応に対する増強作用について検討し、これら添加物が何れも反応増強作用を有し、しかも海狸血清各分屑の場合非加温のまま添加したものより、56°C 30分加温した血清を添加したものの方が反応増強作用が大である事を知った。

本編においては酵母多糖類反応系の沈降反応に対する海狸血清各分屑の反応増強作用を検討し、更に添加海狸血清の加温による物理化学的な変化を比濁法、及び濾紙電気泳動法により検討し、増強作用の原因について追求したのでここに報告する。

第2章 実験材料及び実験方法

1) 免疫血清：10%乾燥酵母食塩水3ccを夫々3～4日間隔で2700gの家兎の耳静脈に注射し、最終注射日より10日目に全採血し、血清を分離、56°C 30分加温非動化し、終濃度が10,000倍の割合にマーズニンを加えたものを使用した。

2) 反作用抗原：酵母菌多糖類は橋谷氏法³⁾により抽出乾燥して保存し、用いのぞみ1%食塩水溶液として使用した。

3) 添加物：

① 海狸血清：健康海狸より早朝空腹時に心臓穿刺により採血、分離した新鮮血清を生理的食塩水にて10倍に希釈して使用した。

② 海狸血清のAlbumin屑、Globulin屑：上記海狸血清をLiefmannのCO₂法⁴⁾によりAlbumin（以下Alb.と略す）屑、Globulin（以下Glob.と略す）屑に分けたものを10倍食塩水希釈液として、

これをそのまま、又は56°C 30分加温して使用した。

③ 海狸血清Alb., α_1 -, α_2 -, β -, γ -Glob.：上記5部分の分離には澱粉が蛋白質との相互作用が少く、又良く水分を保ち、試料の回収率の高いことより、H. G. Kunkel⁵⁾、中村⁶⁾等の報告による澱粉を支持体とするZone-Electrophoresis装置を用いた。

4) 沈降反応：沈降反応検査法としては上記の添加液にて抗原希釈を行い、Uhlenhuth氏法⁷⁾（以下U氏法と略称す。）緒方氏抗原抗体希釈法⁸⁾により求めた結合帯を中心にして重層法、及び混合法を行つた。

① U氏法：抗原抗体を添加液にて漸次希釈し、これを免疫血清に重層し、接触面の白濁輪の有無を検した。成績判定は重層後15分以内に白濁輪を生じたものを卍、30分以内を卐、1時間以内を卅、2時間以内を+、対照と差を認めるものを±とした。

② 重層法：先ず緒方氏抗原抗体希釈法により結合帯を求ておき、結合帯抗原量になる様に抗原を各添加液を用いて希釈し、免疫血清の希釈には1%アラビヤゴム食塩水溶液を用い、判定はU氏法と同様に行つた。

③ 混合法：抗原、抗体の等量混合法を用い、重層法と同じく抗原を添加液で希釈し、結合帯に於て沈降反応を行い、混合後37°C 孵卵器に2時間、後氷室に24時間放置して濁濁度により卅、+、±、-と判定した。

5) 海狸血清の加温による濁濁度検査：海狸血清の10倍生理的食塩水希釈液の加温温度の変化による濁濁度をKlett製Nephelo-Colorimeterで測定比較した。

6) 濾紙電気泳動法：小林式濾紙電気泳動装置⁹⁾

を用い、濾紙は東洋濾紙 No. 51 を使用し、緩衝液にはペロナールソーダ、醋酸ソーダ、醋酸緩衝液で、pH 8.5 イオン強度 0.045 のものを用い、0.3mA/cm の電流で泳動を行つた。

7) 濾紙電気泳動図定量法：泳動後の濾紙を乾燥して Bromphenol-Blue, 昇汞, 醋酸混合液にて染色固定し、2%醋酸にて蛋白と結合しない色素を脱色して乾燥後流動パラフィンにより半透明とし、小林式濾紙光電比色計により直接法¹⁰⁾で測定した。又各成分相当部の面積をプランメーターで求めて各

成分の百分率を算出した。

第3章 実験成績

1) 海狼血清、及びその Alb. 屑, Glob. 屑の10倍生理的食塩水稀釈液のそのまま、又は56°C 30分間加温したものを用いて抗原を稀釈してU氏沈降反応を行つたが、第1表の如く海狼血清、Alb. 屑共加温した場合明にU氏沈降価の増強を認めたが、非加温では対照との間に差を認めなかつた。又 Glob. 屑では加温、非加温共に大した変化をみなかつた。

第1表 海狼血清、Alb. 屑, Glob. 屑にて抗原稀釈を行つたU氏沈降反応の比較

抗原稀釈液		抗原稀釈						
		1:1000	1:2500	1:5000	1:10000	1:25000	1:50,000	1:100,000
海狼血清	非加温	+++	+++	+++	++	+	-	-
	56°C 30分加温	+++	+++	+++	+++	++	+	-
Alb. 屑	非加温	+++	+++	+++	++	+	-	-
	56°C 30分加温	+++	+++	+++	+++	++	+	-
Glob. 屑	非加温	+++	+++	+++	++	+	-	-
	56°C 30分加温	+++	+++	+++	+++	+	-	-
生理的食塩水		+++	+++	+++	++	+	-	-

2) 緒方氏抗原抗体稀釈法による沈降反応に於ても第2表の如く海狼血清、Alb. 屑共抗体価の増強をみたが、56°C 30分加温した場合が増強度大であ

り、Glob. 屑では56°C 30分加温して用いた場合に対照に比し1稀釈程度増強するが、非加温では対照と同じであつた。

第2表 海狼血清、Alb. 屑, Glob. 屑にて抗原稀釈を行つた緒方氏法の比較
(結合帯1:1000) (Rは反応輪の明瞭なもの)

抗原稀釈		抗体稀釈				
		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000
海狼血清	非加温	+++R	+	±	-	-
	56°C 30分加温	+++R	+++R	+	-	-
Alb. 屑	非加温	+++R	+	±	-	-
	56°C 30分加温	+++R	++	±	-	-
Glob. 屑	非加温	+++R	±	-	-	-
	56°C 30分加温	+++R	+	-	-	-
生理的食塩水		+++R	±	-	-	-

3) 海狼血清を Alb., α_1 -, α_2 -, β -, γ -Glob. に分けて夫々で抗原を稀釈し、緒方氏抗原抗体稀釈法を行つたが、Alb. > α_2 - > α_1 - > β - > γ -Glob. の順に抗体価増強し、Alb., α_2 -, α_1 -, β -Glob. 共56°C 30分加温したものを稀釈液とした場合が抗体

価の増強度大であつた。

β -Glob. の非加温、 γ -Glob. の加温、非加温共対照との間に差を認めなかつた。

第 3 表 Alb., α_1 -, α_2 -, β -, γ - Glob. 液にて抗原稀釈を行つた緒方氏法の比較
(結合帯 1 : 1000) (R は反応輪の明瞭なもの)

抗 原 稀 釈 液		抗 体 稀 釈				
		1 : 50	1 : 100	1 : 250	1 : 500	1 : 1000
Alb.	非 加 温	+++R	++	±	—	—
	56° C 30 分 加 温	+++R	++	+	—	—
α_1 -Glob.	非 加 温	+++R	+	—	—	—
	56° C 30 分 加 温	+++R	++	±	—	—
α_2 -Glob.	非 加 温	+++R	+	±	—	—
	56° C 30 分 加 温	+++R	++	±	—	—
β -Glob.	非 加 温	+++R	±	—	—	—
	56° C 30 分 加 温	+++R	+	—	—	—
γ -Glob.	非 加 温	+++R	±	—	—	—
	56° C 30 分 加 温	+++R	±	—	—	—
生 理 的 食 塩 水		++	±	—	—	—

4) 非加温, 及び 56°C 30分加温の海狼血清, Alb. 屑, Glob. 屑で夫々抗原稀釈を行い, 等量法にて混合法沈降反応を行つたが, 第4表の如く海狼血清, Alb. 屑, Glob. 屑共対照に比較して1稀釈程度延長を見たが, いづれも加温したものをを用いた場合に延長度稍々大であつた。

5) 加温による海狼血清, 及び海狼各分屑の分子凝集状況の検討を行つた。

以上行つた沈降反応実験, 及び第2編²⁾で行つた細菌, 赤血球凝集反応に於て海狼血清, 又はその各分屑を加えることにより各反応の増強が見られたのであるが, この場合添加物を加温した後加えた方がより一層の反応増強が起る事が見られ, これは加温することにより血清蛋白分子の凝塊を生ずる為ではないかと考え, 加温温度による海狼血清, 及び Alb. 屑, Glob. 屑の濁度を Klett 製 Nephelo-Colorimeter を用いて測定してみた。測定には海狼血清, Alb. 屑, Glob. 屑の10倍食塩水稀釈液を加温後対照と明度を合せ, その液柱の高さを3回測つて平均値をとり, これで対照の液柱の高さを除したものを比濁度とした。

その成績は第5表, 第6表, 第7表, 及び第1図, 第2図, 第3図に示す如くで, 海狼血清, 及び Alb. 屑は加温温度の上昇につれ急激に濁度を増し, Glob. 屑は 60°C 前後の加温にてはほとんど濁度に差を認めなかつた。

以上の成績は凝集反応, 沈降反応に於て海狼血清,

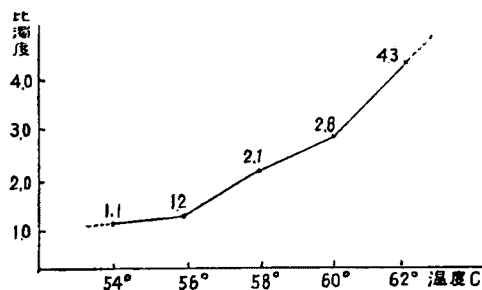
第4表 海狼血清, Alb. 屑, Glob. 屑で抗原稀釈を行つた混合法の比較

抗 原 稀 釈 液	抗原稀釈	抗 体 稀 釈			
		1 : 50	1 : 100	1 : 250	1 : 500
非 加 温 海 狼 血 清	1 : 500	++	+	±	—
	1 : 1000	++	+	+	—
	1 : 2500	+	+	±	—
56°C30分 加 温 海 狼 血 清	1 : 500	++	+	+	—
	1 : 1000	++	++	+	—
	1 : 2500	++	+	±	—
非 加 温 Alb. 屑	1 : 500	++	+	±	—
	1 : 1000	++	++	+	—
	1 : 2500	++	+	±	—
56°C30分 加 温 Alb. 屑	1 : 500	++	+	+	—
	1 : 1000	++	++	+	—
	1 : 2500	++	+	±	—
非 加 温 Glob. 屑	1 : 500	++	+	±	—
	1 : 1000	++	+	+	—
	1 : 2500	++	+	±	—
56°C30分 加 温 Glob. 屑	1 : 500	++	+	+	—
	1 : 1000	++	++	+	—
	1 : 2500	++	+	±	—
生 理 的 食 塩 水	1 : 500	+	+	—	—
	1 : 1000	++	+	—	—
	1 : 2500	+	±	—	—

第5表 10倍稀釈海猿血清の加温による
濁度 (対照液柱 $h_1=20\text{mm}$)

加温温度	測定値 (mm)	平均値 ($h_2=\text{mm}$)	比濁度 ($\frac{h_1}{h_2}$)
54°C	19.0	19.0	1.1
	19.2		
	18.8		
56°C	17.5	17.2	1.2
	16.8		
	17.5		
58°C	9.5	9.6	2.1
	9.6		
	9.7		
60°C	6.9	7.2	2.8
	7.2		
	7.5		
62°C	4.6	4.6	4.3
	4.6		
	4.7		

第1図 海猿血清加温による濁度曲線



Alb., Glob. を加えた場合に示す成績と対比して何らかの関連性があるのかもしれない。

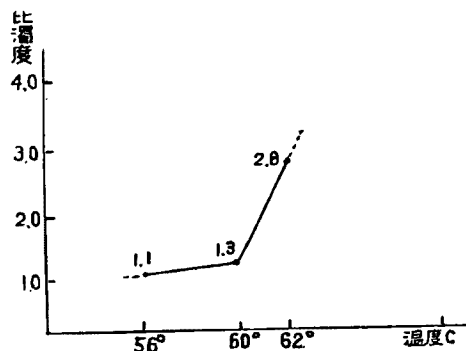
6) 加温海猿血清の濾紙電気泳動法による検討を行つた。

以上述べた如く海猿血清は加温によりその濁度が増大する事を認めたが、著者は更に濾紙電気泳動法により 56°C 30分加温し補体活性を非動化した海猿血清と正常海猿血清との泳動図の比較検討を行つた。尚現在濾紙電気泳動法の再現性について種々論議されているが著者はその誤差を最少にする為に同

第6表 10倍稀釈 Alb. 肩の加温による濁度 (対照液柱 $h_1=20\text{mm}$)

加温温度	測定値 (mm)	平均値 ($h_2=\text{mm}$)	比濁度 ($\frac{h_1}{h_2}$)
56°C	17.5	17.6	1.1
	17.4		
	18.0		
60°C	15.0	15.3	1.3
	15.6		
	15.2		
62°C	7.4	7.2	2.8
	7.2		
	7.0		

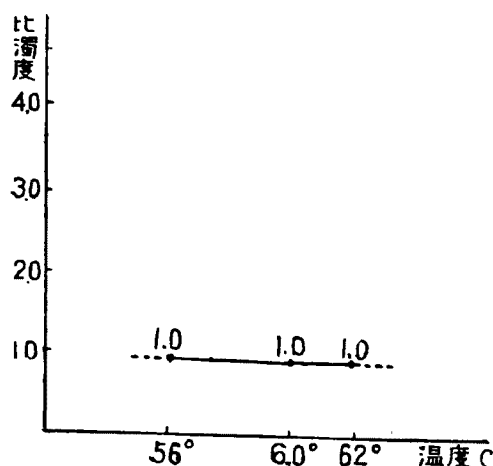
第2図 Alb. 肩加温による濁度曲線



第7表 10倍稀釈 Glob. 肩の加温による濁度 (対照液柱 $h_1=20\text{mm}$)

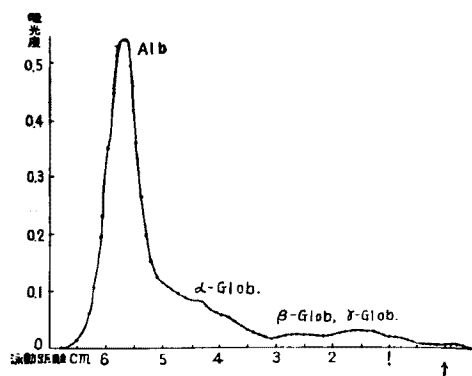
加温温度	測定値 (mm)	平均値 ($h_2=\text{mm}$)	比濁度 ($\frac{h_1}{h_2}$)
56°C	20.0	19.9	1.0
	19.4		
	19.3		
60°C	19.8	19.9	1.0
	19.9		
	20.1		
62°C	20.6	20.3	1.0
	20.0		
	20.0		

第3図 Glob. 屑加温による濁度曲線

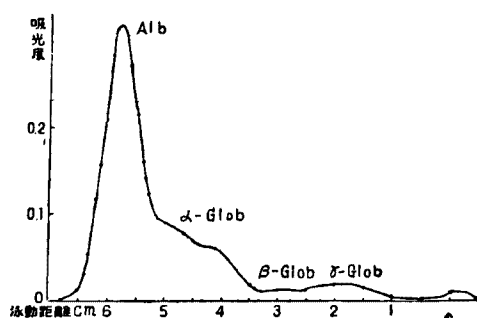


一濾紙上において加温、及び正常血清を泳動し、その泳動図を求めた。その成績は第4図、及び第8表に示す如くである。すなわち56°C 30分加温海狼血清は正常血清に比べて Alb. が多少減少し、 α -Glob. が増加している様である。

第4図 正常海狼血清濾紙電気泳動図



56°C 30分加温海狼血清濾紙電気泳動図



第8表 正常、及び加温海狼血清の濾紙電気泳動による各成分組成

	Alb.	α -Glob.	β -Glob.	γ -Glob.
正常海狼血清	66.4(%)	20.9	4.5	8.2
56°C30分加温海狼血清	62.7	28.2	3.9	6.2

第4章 総括並に考案

著者は沈降反応に於て抗原を海狼血清、及びその各分屑にて稀釈して反応を行い、沈降反応への影響を検討したが、U氏法に於ては海狼血清、Alb. 屑共加温後稀釈に用いた時は沈降反応の延長を認めたが、非加温のままでは沈降反応への影響はほとんどなかった。

Glob. 屑では加温、非加温共に増強作用を余り認めなかった。

緒方氏抗原抗体稀釈法に於ては海狼血清、Alb. 屑共に反応の延長を見たが、Glob. 屑では加温した場合には反応が延長したが、非加温では影響が見られなかった。

又同じく緒方氏法に於ける Alb., α_1 -, α_2 -, β -, γ -Glob. の影響を見たが、Alb. $> \alpha_2 \geq \alpha_1 > \beta > \gamma$ -Glob. の順に反応の増強が認められ、Alb., α_1 -, α_2 -Glob. は加温して用いた場合の方が反応増強度が強かつたが、非加温 β -Glob. 加温、及び非加温 γ -Glob. の場合は共に対照との間に差を認めなかった。

混合法に於ても海狼血清、Alb. 屑、Glob. 屑共に反応の増強が見られるが、やはり加温して用いた場合が延長度稍々大であつた。

以上の結果が何に起因して起るかは抗原と抗体が結合して沈降物を作ることについての説明に定説がない現在明かにすることは出来ないが、Haurowitz¹¹⁾は抗原抗体反応を2段階に分け、第1段階を抗原と抗体の特異的結合、第2段階を抗原抗体複合体の非特異的結合と説明しているが、先の凝集反応への海狼血清の影響²⁾及び本実験の成績よりして海狼血清を加えることにより反応の促進されることは血清成分に抗原抗体複合体への結合作用があり、これがHaurowitzの説が正しいとすれば彼の云う第2段階の反応を強め、沈降物を増加させる原因となっているのではないと思われる。

然して海狼血清、及びその各分屑を加温して用いた場合の方が非加温のまま用いた時より反応増強度の大であるのは緒方、望月¹²⁾の海狼血清の熱凝固

についての研究があるが、海猿血清加温による凝濁度曲線に示される如く海猿血清成分も加温により結合して粒子の大となることが見られ、又海猿血清、及び Alb. 屑は沈降反応増強力が大であるのに比し、Glob. 屑はさほど増強力の強くないことも、海猿血清、Alb. 屑の凝濁度曲線が温度の影響の強くあらわれているのに対し、Glob. 屑ではほとんど影響のなかつた成績と何らかの関係があるのではないかと考えられる。

又56°C 30分加温海猿血清の電気泳動図は Alb. 分屑の僅かな減少と、 α -Glob. 分屑の多少の増加とを示しているが、これは緒方、望月¹²⁾等の60°C 15分加温海猿血清の電気泳動図が α -Glob. 位分屑の増加が著明であるという報告と一致する。これは加温によつて生ずる変性成分 (C-Component) が56°C 30分でも僅かながら生成される事を示しており、上記の凝濁度の増加の成績と共に加温による蛋白分子凝集を思わせるものであり、以上2編にわたる抗原抗体反応の増強作用は一部は補体の特異作用であるとしても加温血清、及びその各分屑の反応増強作用は一部は加温による添加血清分子の凝集により非特異性の反応増強作用もあるのではないかと思われる。

第5章 結 論

- 1) 各種沈降反応に於て抗原を海猿血清、及びその各分屑を非加温のまま、又は加温したものをを用いて稀釈して反応を行い沈降反応への影響を検討した。
- 2) U氏法に於ては海猿血清、Alb. 屑共加温後用いた時は沈降反応の増強を認めたが、非加温のままでは沈降反応への影響はほとんどなかつた。Glob.

屑では加温、非加温共に大した変化を認めなかつた。

3) 緒方氏抗原抗体稀釈法に於ては、海猿血清、Alb. 屑共に反応の増強を見たが、Glob. 屑では加温した場合には反応が増強したが、非加温では影響が見られなかつた。

4) 同じく緒方氏法に於て Alb., α_1 -, α_2 -, β -, γ -Glob. の影響を見たが、Alb. $> \alpha_2 \geq \alpha_1 > \beta > \gamma$ -Glob. の順に反応の増強が見られ、Alb., α_1 -, α_2 -Glob. は加温して用いた方が増強度大であつたが、非加温 β -Glob. 加温及び非加温 γ -Glob. の場合は共に対照との間に差を認めなかつた。

5) 混合法に於ても海猿血清、Alb. 屑、Glob. 屑共に反応の増強が見られたが、やはり加温して用いた場合が増強度稍々大であつた。

6) 海猿血清の Alb. 屑、Glob. 屑の加温による凝濁度を検討したが、海猿血清、Alb. が加温による凝濁度大なるに比し、Glob. は非動化に用いる程度の温度ではほとんど影響がなかつた。

7) 56°C 30分加温海猿血清の濾紙電気泳動図は正常血清に比べ Alb. の僅かな減少、及び α -Glob. 位分屑の多少の増加が見られた。

終りに臨み終始御鞭撻、御指導を賜りかつ御校閲を賜りました恩師緒方名誉教授、並びに御校閲を賜りました大平教授に深甚なる謝意を表します。尚併せて種々御援助をいただいた望月助教授に深謝致します。

(本論文要旨は昭和33年2月第67回岡山医学会総会に於て発表しました)。

文 献

- 1) 大滝：岡山医学会雑誌投稿中 (第1編)
- 2) 大滝：岡山医学会雑誌投稿中 (第2編)
- 3) 橋谷：酵母学103頁 (昭24)
- 4) H. Liefmann: Berl. Klin. Wochenschr., (1911)
- 5) H. G. Kunkel: Methods of Biochemical Analysis 1, 141, (1954)
- 6) 中村 弘：生物物理化, Vol. 3, No. 1, 58, (1956)
- 7) Uhlenhuth u. Weidanz: Technik u. Methodik d. biol. Eiweisdiff. Verfahrens, (1909)
- 8) 緒方：第1回衛生学、微生物学、寄生虫病学聯合学会講演, 昭和2年
- 9) 小林、森：濾紙電気泳動法の実際, 南江堂, (1955)
- 10) Röttger, H.: Klin. Wochenschr., 31, 85, (1953)
- 11) Haurowitz, F.: Chemistry and Biology of Proteins, 291~295, (1950)
- 12) Ogata and Mochizuki: The Acta Medicinæ Okayama Vol. 10, No. 2, pp. 82~88, (1956)

Studies on Augmentation of Precipitin Titer by Guinea-Pig
Serum and its Fractions, and on Physical Characters
of These Denatured Proteins by Heating

By

Chihiro Otaki

From the Department of Hygiene, Okayama University Medical School
(Director: Prof. M. Ohira, M. D., M. P. H.)

Adding guinea pig serum, its natural or heated fractions to the antigens, their effects on precipitin reaction have been studied. As the antigen, polysaccharides from yeast have been used, and the antiserum has been obtained from rabbit immunized by it. The results were as follows:

1) Uhlenhuth's precipitin reaction by the antigen diluted with heated serum or heated albumin fraction shows higher titer than routine method, while the reaction by the antigen diluted with natural (unheated) serum or the unheated albumin fraction does not show any effect to increase the titer. The globulin fraction shows no effect whether it is heated or not.

2) In Ogata's reaction (antigen-antibody diluting method), both guinea pig serum and its albumin fraction have the increasing effect. The globulin fraction has the effect if it is heated, but not if it is used unheated.

3) The fractions by electrophoresis, albumin, α_1 -, α_2 -, β -, γ -globulin have the effect of following order.

albumin $> \alpha_2 - \cong \alpha_1 - > \beta - > \gamma$ -globulin

4) Guinea pig serum and its albumin fraction shows remarkable turbidity by heating, but its globulin fraction does not show any difference among turbidities caused by heating (from 56°C to 62°C).
