

ツベルクリン感受性伝達因子の化学的 性状に関する研究

[第2篇] ウサギ血漿中に存在する伝達因子の分離精製

京大結研 病態生理学部 (主任 辻 周介 教授)

岡 田 長 保

緒 言

即時型アレルギーに於ては、感作動物の血清による受働感作が可能であるに対し、遅延型アレルギーでは血清による受働感作は不可能であり、細胞によってのみ可能であることがこの両アレルギーの根本的な差異であると考えられている。しかし、血清による受働感作に成功したとする例外的な報告もある。即ち、Cole ら(1)、(2)のモルモット血漿を用いた実験では、そのエタノール分割 Fr. IV-10 (α -globulin) を正常モルモットに投与することにより、ツベルクリンアレルギーの受身伝達に成功したと主張しているが、その追試者達(3)は夫々の得た実験成績より、Cole らの主張を否定したため一般には認められるところとなっていない。又、Waldenström ら(4)、Good ら(5)は agammaglobulinemia のヒトに、ツベルクリン感受性や dinitrofluorobenzene による接触皮膚炎型アレルギーが出現することを報告したが、このことは遅延型アレルギーには即時型アレルギーの場合と異って γ -globulin 抗体が関与していないことを示唆するものである。これらの事実は、遅延型アレルギーの抗体は血中抗体とは無関係の細胞固着性のものであり、従ってその伝達因子も細胞固着性であるとする考えの根拠となるものである。しかるに先に辻ら(6)は、BCG 菌により感作及び challenge を行ったウサギの血清を蒸溜水に対して透析処理することにより、その内

液上清に著明なツベルクリン感受性伝達能を証明することが出来たと報告した。この成功の原因として、第一に感作動物に対する challenge 処置の重要性を強調し、challenge 処置によって細胞内に存在した Transfer factor が体液及血中へ放出された結果であろうと推測した。又第二に細胞抽出液の場合と同様、inhibitor の存在を仮定し、この inhibitor 除去に基くものでであろうと推論した。著者は、この観点より、血漿中の Transfer factor の分離精製及びその性状に関する免疫化学的研究を行い、あわせて第一篇に述べた alveolar macrophage より分離した Transfer factor との比較検討を行った。

実験材料及び実験方法

実験動物：市販白色成熟ウサギ (体重 2~3kg の雌雄) を用いた。recipient としては、第1篇に述べたと同様な方法でツベルクリン反応陰性のもののみを使用した。又、以下、正常動物と記載したものは、単に無処置健康という意味でなく、ツベルクリン反応陰性という意味をも含んでいる。

Donor の感作方法及び血清及び血漿の採取方法：第1篇に述べたと同様な方法でウサギに BCG 死菌感作を行ない、3~4週目に challenge を行なった。challenge 後4日目、頸動脈より採血し、凝固後4°C に一夜放置した後、2500rpm、15分間遠心分離して血清を採取した。分割操作に用いた血漿は、同じく challenge 後4日目のウサギに、採血前へパリンナトリ

ウム 20mg を 2ml 生理的食塩水に溶解して耳静脈より静注し、頸動脈より採血後、2000rpm, 20分間冷却遠心して血漿を分離し、1 Lot につき10~20羽のウサギ血漿をプールして -20°C に保存した。使用直前、9000rpm, 15分間冷却遠心し、その上清を分割操作に用いた。感作のみの動物血清及び血漿は感作後4週目のものを採血し、正常動物血清及び血漿も同様な方法で採取し、夫々10羽分をプールして -20°C に保存した。尚、本文中種々の処置を行なったウサギ血清又は血漿について、次の様な略称を用いた。

V.C. 血清(血漿): BCG 死菌感作及び challenge を併せ行なったウサギ血清(血漿)。

V. 血清(血漿): BCG 死菌感作のみ行なって、challenge を行なわなかったウサギ血清(血漿)。

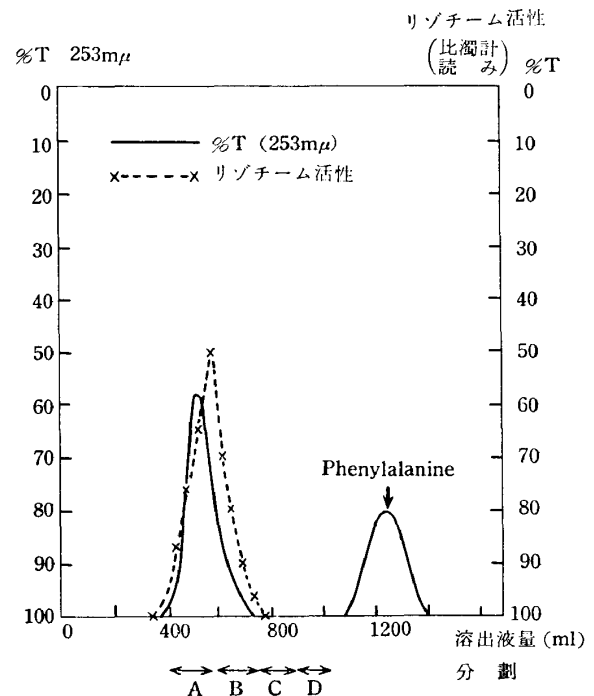
N. 血清(血漿): 正常ウサギの血清(血漿)。

受身伝達実験方法: V.C. 血漿及び N. 血漿分割操作により得た実験材料の recipient に対する投与は、第1篇に述べたと同様に recipient の耳静脈に注射する所謂全身性受身伝達法によった。然る後、経時的に 1:10 O.T. を用いて recipient の皮内反応を追跡した。判定規準も第1篇に於けると全く同様である。

血漿の分割方法:

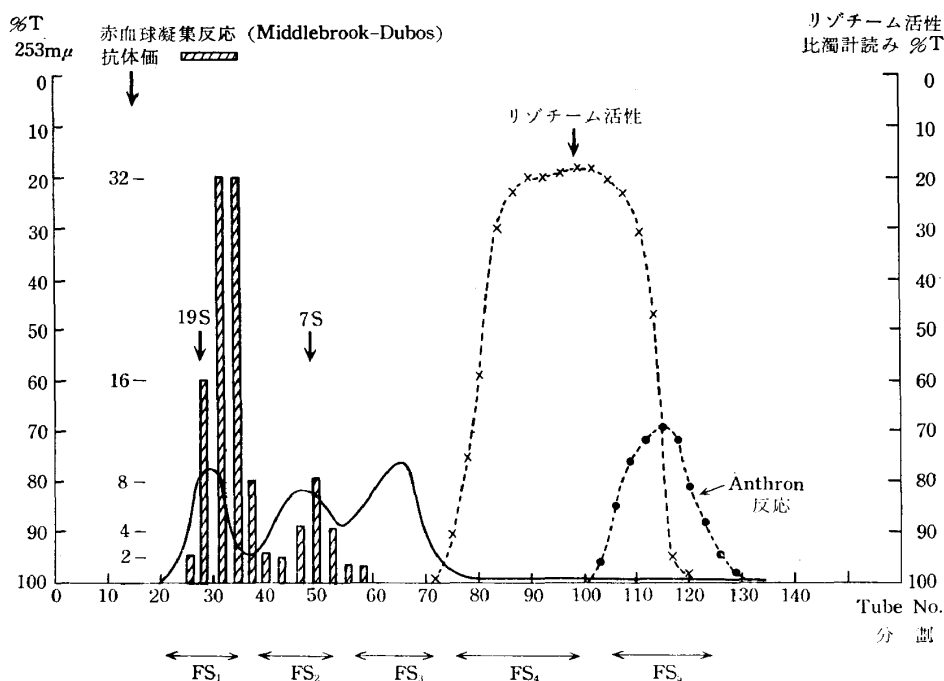
1) Sephadex G-25 gel filtration による分割:
Sephadex G-25 (particle size 100~300 μ , water

図1 Sephadex G-25 カラムによる V.C. ウサギ血漿の分割



regain $2.5 \pm 0.2\text{g. water/g. dry gel}$, Pharmacia Uppsala) は、蒸溜水にて頻回洗滌後、直径 6.0cm, 高さ 50cm のカラムに充填した。V.C. 血漿 10ml 宛をカラムに注入し、蒸溜水を用いて溶出分割操作を行ない、20ml/tube の割合でフラクションコレクターで採取した。図1に示す様にA, B, C及びDの4分

図2 V.C. ウサギ血漿の Sephadex G-200 による分割と感作赤血球凝集抗体の分布



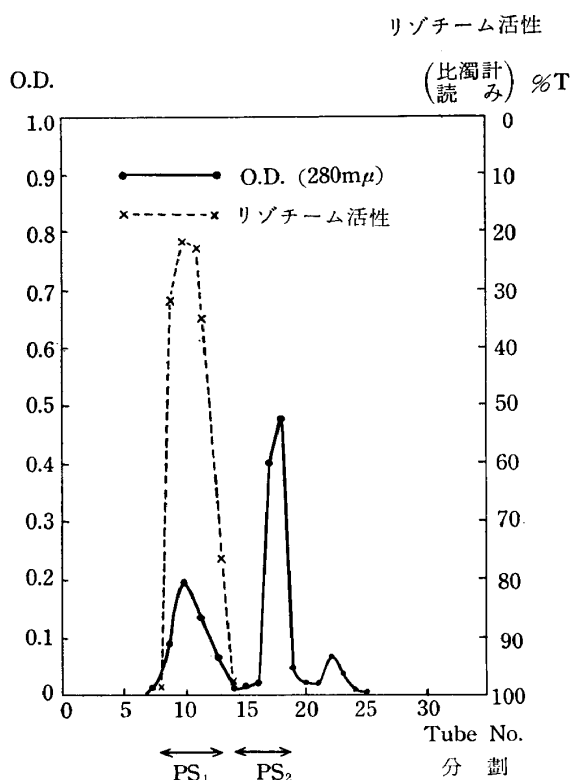
割に分割プールし、夫々を原血漿量迄濃縮後 NaCl を 0.15M となる様に添加して伝達実験に用いた。

2) Sephadex G-200 gel filtration による分割：

使用した Sephadex G-200 は第1篇に述べたと同様のカラム、即ち 6.5cm×50cm に充填し、用いた buffer も pH7.4, 0.075M phosphate buffered saline (0.001MEDTA 含有)——(PBS-EDTA と略称)である。1回の溶出には血漿 10~20ml を用い、図2に示す如く溶出液を FS₁, FS₂, FS₃, FS₄, FS₅ の5分割に分割プールし、夫々を 10~20ml の原血漿量迄凍結乾燥法により濃縮後、FS₁, FS₂, FS₃ は100倍量の PBS-EDTA に対して透析し (No.32 セロファンチューブ, Visking Company, U.S.A.) (透析条件は各表に記載した), 受身伝達実験に用いた。リゾチーム活性を含む FS₄、及び FS₅ は比較的低分子成分であるため、Sephadex G-25 カラム (4.5cm×15.0cm) を用い、第1篇に述べたと同様な方法で FS₄ は PS₁, PS₂ に分割し (図3), FS₅ は同様にして脱塩した。然る後、PBS-EDTA 等張となして伝達実験に用いた。又、一部 FS₁ に関しては濃縮後100倍容の蒸溜水に対して36時間透析後、その内液上清を 9000rpm, 15分間遠心分離し、更に原血漿量迄濃縮後、NaCl を 0.15M 迄添加して伝達実験に用いた。

3) DEAE-Cellulose カラムによる分割：

図3 Sephadex G-25 カラムによる FS₄ の細分割



V.C. 血漿の Sephadex G-200 gel filtration により得られた FS₁ を更に Sober and Peterson の方法 (7)を用いて分割した。使用した DEAE-Cellulose (Sigma) 20g を次の順序で処理した。即ち、蒸溜水にて洗滌後、カラムに充填し、500ml の 0.5NHCl, 蒸溜水, 500ml の 0.5N NaOH, 蒸溜水, 250ml の 0.2M Na₂HPO₄, 250ml の 0.2M NaHPO₄ の順序に洗滌し、最後に以下に記載した第1 buffer で洗滌し、平衡に達せしめた。分割に使用したカラムは、直径 2.5cm, 高さ約 15cm のものである。FS₁ は 100ml 血漿相当量を 100ml 迄濃縮後、20倍容の蒸溜水に対して36時間透析し、その水可溶性分割を 9000 rpm, 15分間遠心分別した後、更に pH6.3, 0.0175M phosphate buffer に対して24時間透析し、遠心分別した上清を用いた。stepwise elution は次の如き一連の buffer を用いて行なった。

I. 0.0175M, pH6.3 phosphate buffer

II, 0.04M, pH5.8 phosphate buffer

III, 0.1M, pH5.8 phosphate buffer

IV, 0.4M, pH5.2 phosphate buffer

かくして得た各溶出段階の分割を図4の如く P₁, P₂, P₃, P₄ としてプールし、濃縮後、生理的食塩水に24時間透析した内液上清を伝達実験に用いた。夫々の分割は、FS₁-P₁, FS₁-P₂, FS₁-P₃, FS₁-P₄ と呼称して記載することにする。

4) 澱粉カラムによる分域電気泳動：

第1篇に述べたと同様の方法、同じ条件で電気泳動し、陽極側より図5の如く I, II, III, IV の4分割に

図4 FS₁ の DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー

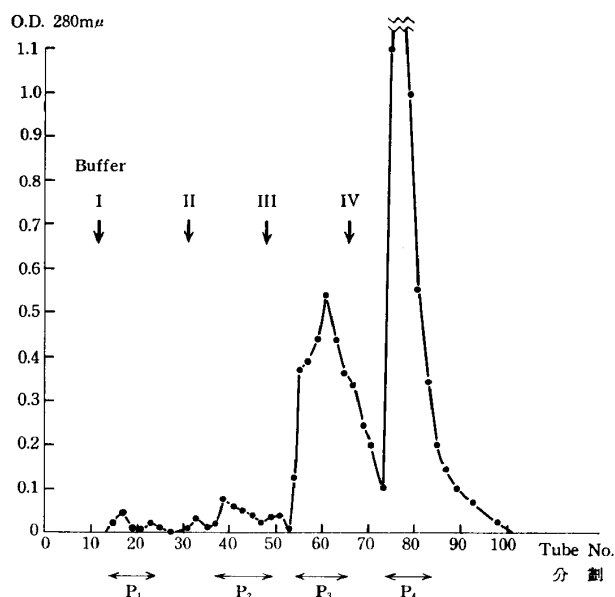
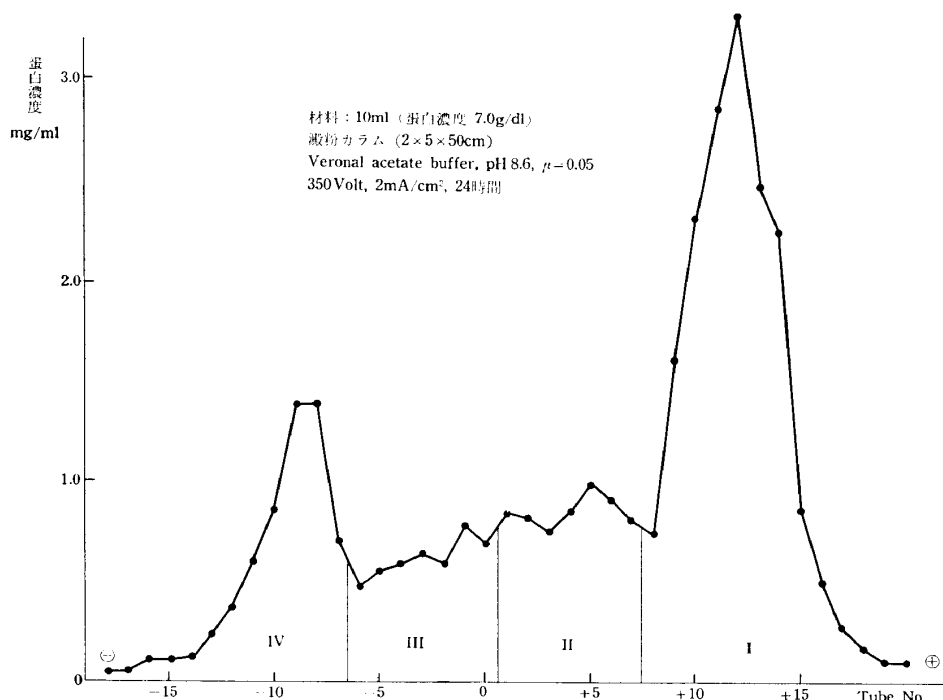


図 5 V.C. ウサギ血漿の分域電気泳動法による分割



分割プールし、夫々を原血漿量の 1/2 迄凍結乾燥濃縮し、蒸留水に対して 24 時間透析後、その内液上清に NaCl を 0.15M 濃度迄添加し、伝達実験に用いた。1 回の電気泳動には 10ml の V.C. 血漿を用い、5 回反復して得られた各分割(血漿 50ml に相当)を合一して伝達した。

Middlebrook-Dubos 感作赤血球凝集反応及び溶血反応:

Middlebrook-Dubos ら(8)の記載に準じ、ヒツジ赤血球を伝研製ツベルクリン多糖体(9)で感作し、4 倍より倍数稀釈した夫々の試料と混合し、37°C, 2 時間反応せしめた後、4°C に 16 時間放置して管底の凝集の有無を判定した。溶血反応には、上記処置の内容にモルモット血清を加え、37°C, 30 分間反応せしめた後、反応の有無を判定した。

Boyden 反応:

ほぼ Boyden ら(10)の記載した方法に従い、Stavitsky ら(11)の判定基準に従って判定した。1:20,000 タンニン酸処理ヒツジ赤血球の感作には、2.5% 血球浮遊液 1ml に対して pH6.4 phosphate buffered saline 1ml に溶解した PPD 50μg (Park, Davis & Co.) を加えた。感作後、1:100 正常ウサギ血清(56°C, 30 分間加熱非働化し、ヒツジ血球で吸収したもの)にて 3 回遠心洗滌後、同様 1:100 正常ウサギ血清に浮遊させ、2.5% 血球浮遊液とした。0.5ml の試料に対して 0.05ml 感作血球を加え、室温で 5 時間後、12 時

間後に判定した。

寒天ゲル免疫電気泳動:

ほぼ Scheidegger の方法(12)に従い、1% 寒天、pH8.6, 0.075M veronal buffer 用い、7mA/slide, 90 分間泳動した。泳動後、山羊抗ウサギ血清抗血清 (Colorado Serum Company, Denver, Colo., U.S.A., Lot No.6) を用いて、FS₁-P₄ 分割に含まれる蛋白の同定に用いた。

Cellulose acetate 膜を支持体とする電気泳動:

FS₁-P₄ を 5mg/ml の濃度で、第 1 篇に記載した条件で電気泳動し、Ponceau 3R を用いて蛋白染色を施した。

超速心分離機による沈降係数測定:

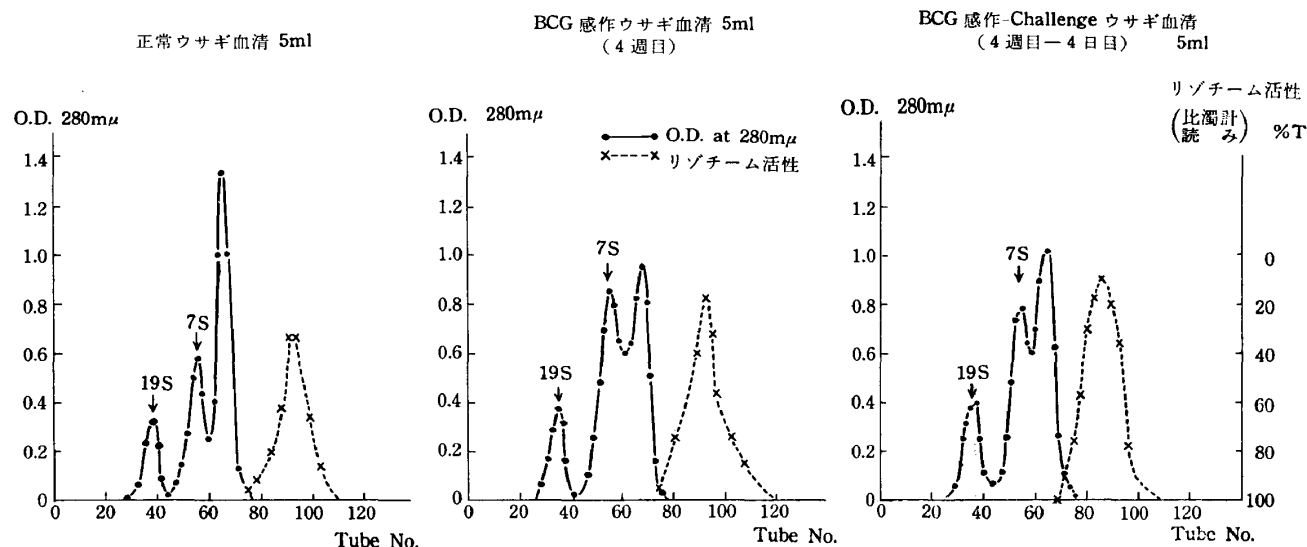
V.C. 血漿 FS₁-P₄ 分割を 0.5% 蛋白濃度として、第 1 篇に記載した方法で測定した。即ち、スピスコ E にて、59,780rpm 4 分毎にシュリーレン法により 10 枚撮影した後、S_{20, w} を計算した。

第一節 実験成績

正常 (N), 感作 (V), 感作-Challenge (V.C.) 血清についての比較検討:

緒言に述べた通り V.C. 血清の水透析内液上清分割が、正常 recipient ウサギに対してツベルクリン感受性の伝達能を有することは、既に辻ら(6)によって報告された所である。この V.C.

図 6 Sephadex G-200 カラムクロマトグラフィー



血清を種々の方法を用いて分割し, inhibitor を除去することによって, 活性の高い Transfer factor を得, その性状を検討することが本篇の目的である。分割の第一の手段として, Sephadex をとりあげたが, その準備として, N, V, V.C. 血清を夫々 Sephadex G-200 を用いて分割し, 比較検討することによって, V.C. 血清の特異性を先づこの面から追究しようと試みた。

使用血清は, 夫々10羽分以上プールしたものを用い, 同一量, (5ml), 同一カラム (6.5cm×50cm) によって行った。図6は夫々の gel filtration による分割実験の成績を示したものである。Flodin ら(13)の報告にも明かな如く, 第1の蛋白ピーク (FS₁) は 19S macroglobulin, α-, β-lipoprotein を主とするものであり, 第2のピーク (FS₂) は 7S γ-globulin を主体とする分割であり, 第3のピーク (FS₃) は albumin を主とするものである。N. 血清に比し V. 及び V.C. 血清に於て著明な現象は, 7S γ-globulin を含むピークが著しく増大していることであり, 又, リゾチーム活性分布状態にも Oshima ら(14)が指摘した如く, V.C. > V. > N. の順序に増加がみられ, 感作及 challenge 処置の影響をみる事が出来た。更に, 各血清及びその分割についてツベルクリン多糖体を抗原とする Middlebrook-Dubos 感作赤血球凝集反応及び溶血反応を検討した結果, 表1に示す如き結果を得

た。特に, V.C. 血清が V. 血清に比して反応陽性価が減少せず, 反って増加の傾向を示すことは泉(15)が報告した所と同一であり, challenge によりツベルクリン反応が脱感作されるのとは逆に血中抗体産生に対してはむしろブースター効果が現われているものと思われる。各分割では, V., V.C. とも macroglobulin 分割 (FS₁) 及び 7S γ-globulin 分割 (FS₂) が赤血球凝集反応陽性であり, 図2の知見からしても, その抗体活性分布は FS₁ に著明であった。これらの成績は Daniel の報告(16), 即ち, BCG 死菌感作後3~4週目迄のウサギ血中には, γ_{1M} 抗体が著明であり, 4週以後 7S γ₂-globulin 抗体が増量していくという事実と一致するものである。従って, 感作後如何なる時期に採血するかによって, 上述の抗体分布の様相も変動するであろう。次にツベルクリン蛋白 (P.P.D.) を抗原とする Boyden 反応の成績は表2及び図7に示す通りである。1:100正常血清では凝集反応陰性であるに対し, V., V.C. 血清とも8192倍稀釈迄陽性を示した。従ってツベルクリン蛋白に対する抗体とみなされている Boyden 反応抗体も challenge 処置によって減少しないことを示すものである。図7に示す活性分布は, Middlebrook-Dubos 感作赤血球凝集反応の場合と同様 FS₁ 蛋白ピークに一致して高い凝集価が示され, FS₂ にも若干の反応が認められた。以上の

表 1 N., V., V. C. ウサギ血清及びその Sephadex G-200 分劃による Middlebrook-Dubos 感作赤血球凝集反応, 溶血反応成績

稀 釈 倍 数			4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	対照 1
凝 集 反 応	N.	血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V.	血 清	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	V.FS ₁	(1mg/ml)	+	+	+	+	—	—	—	—	—	—	—
	V.FS ₂	(1mg/ml)	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V.FS ₃	(1mg/ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V.C.	血 清	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
	V.C.FS ₁	(1mg/ml)	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	V.C.FS ₂	(1mg/ml)	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—
	V.C.FS ₃	(1mg/ml)	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	N.	血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
溶 血 反 応	V.	血 清	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—
	V.FS ₁	(1mg/ml)	+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	V.FS ₂	(1mg/ml)	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V.FS ₃	(1mg/ml)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V.C.	血 清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—
	V.C.FS ₁	(1mg/ml)	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—	—
	V.C.FS ₂	(1mg/ml)	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—	—
	V.C.FS ₃	(1mg/ml)	+	±	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	N.	血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	V.	血 清	+	+	+	+	+	+	+	+	±	—	—

対照 1 : 4 倍稀釈試料と非感作血球 ; 対照 2 : 生理的食塩水と非感作血球(—)
() 内は蛋白濃度を示す。

表 2 V. ウサギ及び V.C. ウサギ血清の Boyden 反応

稀 釈		8	32	128	512	2048	8192	32,768	131,072	対照 1
血清										
V.	血 清	+++	+++	++	++	++	+	±	—	—
V.C.	血 清	+++	+++	++	++	++	+	±	—	—

対照 1 : V. 又は V.C. 血清(1:8)と非感作血球

対照 2 : 1:100 N. ウサギ血清と感作血球(—)

事実に基づき血清抗体の存在を考慮しつつ、以下に述べる V.C. 血漿の分劃とツベルクリン感受性伝達因子の検討を行った。

第二節 V.C. ウサギ血漿の分劃実験

① 澱粉カラム分域電気泳動法による V.C. 血漿分劃のツベルクリン感受性受身伝達実験 :

V.C. 血漿 10ml を電気泳動した結果は図 5 に示す通りである。表 3 に示す如く、各分劃 I, II, III, 及び IV を recipient に投与した結果、

分劃 II (α -globulin 領域) の投与をうけた recipient は、1 日目～3 日目に著明な発赤と硬結を伴う反応を示し、7 日目には既に減弱していた。この事実は、Transfer factor は電気泳動上、 α -globulin と同様な易動度を有することを示している。

② V.C. 血漿の Sephadex G-25 gel filtration 分劃によるツベルクリン感受性受身伝達実験 :

さきに述べた(6)は、V.C. 血清はそのままではツベルクリン感受性の伝達能を発揮し得ないが、

之を透析した内液を用うれば伝達作用を示すことから、低分子の inhibitor の存在を仮定したのである。この点を更に別の面から検討する目的でこの実験を行った。即ち、血漿を透析する代りに Sephadex G-25 によって処理し、分子量 5,000~10,000 以下の物質を除去することにより、予想される inhibitor の存在と、その molecular size を知ろうとしたのである。図1と表4とから明かな如く、蛋白ピークは一団となって溶出し、リゾチーム活性は僅かに遅れて溶出する傾向を示した。これを便宜上、A、Bの2分割に分け、更に分子量 10,000~5,000 以下と思われる分割を C、D として採取した。A

図7 Sephadex G-200 カラムによる V.C. ウサギ血漿の分割と Boyden 反応抗体の分布

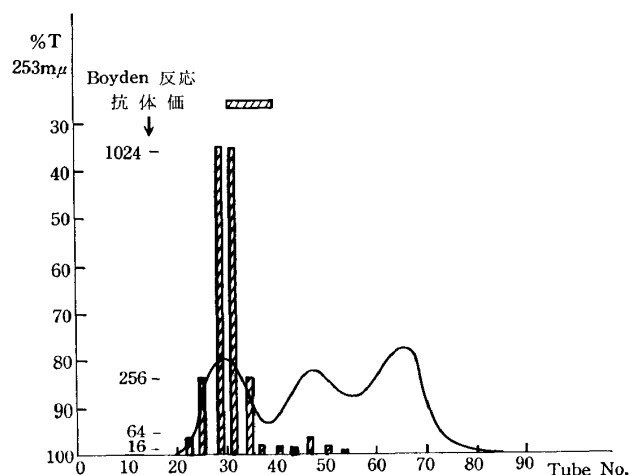


表 3 V.C. ウサギ血漿の分域電気泳動分割によるツベルクリン感受性伝達実験

分割	投与量 ml (原血漿量)	Recipient のツベルクリン反応(1:10 O.T. 発赤径 mm)											
		静脈内投与後の日数											
		直後			1 日			3 日			7 日		
		時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48
I	50	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
II		—	—	—	—	++ (17×15)	++ (14×15)	—	++ (29×22)	++ (20×26)	—	±	±
III		—	—	—	—	±	—	—	±	±	—	—	—
IV		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

及び B は著明な発赤と硬結を伴う反応を惹起し、然も 7 日目には既に減弱乃至消失していた。然るに、低分子成分 C、D はツベルクリン感受性を伝達することが出来なかった。以上の結果より、高分子成分が低分子成分(inhibitor)と分別されることによって、Transfer factor としての活性を現し得たとみることが可能である。但し、この場合、蒸留水を用いて溶出した後、プールした分割を凍結乾燥濃縮する際、不溶性部分が除去されるので、この不溶性部分の inhibitor 作用の有無についても検討する必要がある。

③ V.C. 血漿の Sephadex G-200 gel filtration 分割によるツベルクリン感受性受身伝達実験：

表5及び表6に示す如く、FS₂、FS₃及びFS₅の3分割は何れも正常ウサギに静脈内投与を行

ってもツベルクリン感受性を伝達することは出来なかったが、FS₁及びFS₄の両分割には夫々伝達能が認められた。FS₁は既述の如く 19S macroglobulin を主体とする分子量約 200,000 以上の高分子分割であり、FS₄は albumin より後に溶出される著明なリゾチーム活性を示す比較的 low molecular weight 成分である。然して FS₄ は第1篇で述べた alveolar macrophage 細胞抽出液の Sephadex G-200 による分割 FC₃ に相当し、略同一の molecular size を有する分割であって、両者とも正常ウサギに静脈内投与することにより遅延型反応を付与し得たことより、両者が同一物質である可能性が考えられる。この事実は、alveolar macrophage に存在した Transfer factor が、challenge により細胞から体液中へ遊離し、一時的にせよ血中に存在し得ると

表4 V.C. ウサギ血漿の Sephadex G-25 分劃によるツベルクリン感受性伝達実験

血漿 Lot. No.	分劃	原血漿量 ml	Recipient のツベルクリン反応 (1:10 O.T. 発赤径 mm)											
			静 脈 内 投 与 後 の 日 数											
			0			1			3			7		
			時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48
1	A	15	—	±	±	—	⁺ (16×14)	⁺ (12×10)	—	±	±	±	⁺ (24×14)	⁺ (14×14)
	A	15	—	—	—	—	±	⁺ (10×10)	—	⁺ (17×16)	⁺ (18×15)	—	±	±
	B	15	—	—	—	—	—	—	—	⁺ (16×16)	⁺ (12×11)	—	—	—
	B	15	—	—	—	—	—	—	—	⁺ (16×14)	⁺ (18×17)	—	—	—
2	A	20	—	—	—	—	—	—	—	⁺ (17×17)	⁺ (16×14)	—	⁺ (17×15)	±
	B	20	—	—	—	—	—	—	—	⁺ (27×22)	⁺ (22×17)	—	—	—
	C	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	D	20	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

表5 V.C. ウサギ血漿のSephadex G-200 分劃によるツベルクリン感受性伝達実験

分劃	処 理 法	血清相当量 ml	蛋白質量 mg	Recipient のツベルクリン反応(1:10 O.T. 発赤径 mm)											
				静 脈 内 投 与 後 の 日 数											
				時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48
FS ₁	PBS-EDTAに 対して48時間透 析内液上清	40	341	—	—	—	—	⁺ (11×10)	±	—	±	—	—	—	—
FS ₁	同上 36時間透析	40	356	—	—	—	—	—	—	—	⁺ (17×17)	⁺ (13×12)	—	±	—
FS ₁	同上 36時間透析	30	247	—	—	—	—	—	—	⁺ (18×16)	⁺ (20×17)	⁺ (15×14)	±	⁺ (22×17)	⁺ (18×17)
FS ₂	同上 48時間透析	40	216	—	—	—	±	—	—	⁺ (20×18)	±	—	⁺ (18×16)	—	—
FS ₂	同上 36時間透析	40	244	—	—	—	—	—	—	±	±	—	±	±	±
FS ₂	同上 36時間透析	30	165	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—
FS ₃	同上 48時間透析	40	450	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FS ₃	同上 36時間透析	40	436	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FS ₃	同上 36時間透析	30	360	—	—	—	—	—	—	—	—	—	死 亡	—	—
FS ₅	Sephadex G-25 により脱塩	30		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FS ₅	同 上	30		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FS ₅	同 上	30		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

の辻らの推測を裏づけるものである。対照実験として同時に行った正常ウサギ血漿 FS₄ の投与によっては、かかる伝達現象を認めることは

出来なかったことより、V.C. 血漿由来の FS₄ に特異的な現象とみることが出来る。FS₁ に関しては、その伝達された反応性も弱く、且つ5時

表6 V.C. ウサギ及び N. ウサギ血漿の Sephadex G-200 による分割 FS₄ のツベルクリン感受性伝達実験

Donor	分 割	細 分 割	原 血 漿 量	蛋 白 量	Recipient のツベルクリン反応 (1:10 O.T. 発赤径 mm)											
					静 脈 内 投 与 後 の 日 数											
					0			1			3			7		
					時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48
V.C.	FS ₄	PS ₁	10	0.8	—	—	—	—	—	—	—	++ (19×19)	++ (18×15)	± (24×16)	+	(15×12)
		PS ₂	10	0.8	—	—	—	—	—	—	—	+	± (16×14)	± (20×15)	±	—
	FS ₄	PS ₁	20	1.6	—	—	—	—	+	+	—	+	+	—	+	+
		PS ₂	20	1.6	—	—	—	—	—	—	—	±	±	—	±	—
	FS ₄	PS ₁	20	1.2	—	—	—	—	±	±	—	++ (18×16)	+	—	±	—
		PS ₂	20	1.2	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	FS ₄	PS ₁	20	1.8	—	—	—	—	—	—	—	++ (19×19)	+	—	±	±
	FS ₄	PS ₁	35	4.8	—	—	—	—	—	—	—	++ (22×20)	+	—	±	±
		PS ₂	35	4.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	FS ₄	PS ₁	35	4.8	—	—	—	±	+	(14×12)	±	—	±	±	±	±
		PS ₂	35	4.8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
N.	FS ₄	PS ₁	20	1.0	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	FS ₄	PS ₁	20	1.0	—	—	—	—	—	—	±	—	—	—	—	—
	FS ₄	PS ₁	40	2.0	—	—	—	±	—	—	±	—	—	—	—	—
	FS ₄	PS ₁	40	2.0	—	—	—	±	—	—	—	—	—	—	—	—

間目にすでに発赤反応を認めうる例があり、即時型反応の混在も疑われるので本分割における伝達因子の存否及び認められた皮膚反応の性状については更に検討を要するものと思われた。

第三節 FS₁ に対する検討：

① FS₁ の蒸留水に対する透析処理：

FS₁ を PBS-EDTA に対してではなく、表 7 に示す如く、100 倍容量の蒸留水に対して 48 時間、4°C で透析し（その間 2 回外液交換）、水不溶性劃分を遠心除去後、その上清水溶性劃分を recipient に投与した所著明な伝達能を認めることが出来た。本反応は明かに硬結を伴い、表 5 に示した反応よりも強い反応であった。この事実と、V.C. 血清を蒸留水に対して透析しその内液上清をもってツベルクリン感受性伝達に成功した辻らの報告とを、あわせ考えると次のことが推察せられる。即ち、一定以上のイオン強

度を有する溶媒には可溶性であるが、蒸留水透析によりイオン強度が低下すると析出する水不溶性の劃分（euglobulin）に、inhibitor が存在していたのであろう。

② FS₁ の DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー：

FS₁ に含まれる伝達因子の存在を更に確認し、併せてその性状を調べるため、DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィーによって FS₁ を分割しそれらを用いて伝達実験を行った。図 4 は FS₁ の蒸留水透析内液上清を DEAE-Cellulose カラムを用いて分割した実験成績である。著明なピークは pH5.2, 0.4M phosphate buffer による溶出段階に認められ、Sober and Peterson (7) の報告した α -globulin 分割に相当する部分であった。本分割を recipient の静脈内に投与した結果、表 7 に示す如く 24 時間及び 48 時間目に硬結を伴う著明な発赤が認められ、明か

表 7 V.C. ウサギ及び N. ウサギ血漿 FS₁ に関するツベルクリン感受性伝達実験

分 割	処 理 法	血 清 相 当 量 ml	蛋 白 量 mg	Recipient のツベルクリン反応 (1:10 O.T. 発赤径 mm)											
				静 脈 内 投 与 後 の 日 数											
				0			1			3			7		
				時間 5	24	48	5	24	48	5	24	48	5	24	48
FS ₁	PBS-EDTAに 対して36時間透 析	20	185	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
FS ₁	同 上	20	114	—	—	—	±	(16×14)	(15×12)	±	(16×16)	(12×12)	±	—	—
FS ₁	蒸溜水に対して 透析36時間後の 水可溶性分割	20	80	—	—	—	—	—	—	±	++ (15×15)	(11×14)	—	(15×15)	±
FS ₁	同 上	20	92	—	—	—	—	—	—	±	++ (17×20)	(11×15)	—	—	—
FS ₁	DEAE-Cellulose P ₄	20	34	—	—	—	—	—	—	±	++ (18×15)	(15×14)	±	++ (14×14)	(13×12)
FS ₁	同 上	20	34	—	—	—	±	±	—	+	(18×17)	(12×12)	(16×14)	±	(14×13)
FS ₁	同 上	20	34	—	—	—	—	—	—	—	++ (18×16)	(15×16)	—	(16×15)	±
対 照	正常ウサギの FS ₁ 36時間蒸溜水透析 内液上清	40	140	—	—	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—
		20	70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		20	70	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

にツベルクリン感受性が伝達されていた。しかし、本分割に特徴的なことは、先にも述べた通り5時間目に若干の発赤が認められ、一例に於ては可成りその程度が著明であったことで、あるいは即時型反応の混在も疑われる。この問題については血中抗体の検索と関連して後述することにする。尚、対照としてN血漿 FS₁ を全く同様に蒸溜水透析処理し、その水溶性分割を recipient に投与した結果は凡て陰性であった。従って V.C. 血漿 FS₁ に特異的な現象とみることが出来る。

③ FS₁ の細分割 P₄ 及び FS₄ の Middlebrook-Dubos 感作赤血球凝集反応及び Boyden 反応：

V.C. 血漿の FS₁ はツベルクリン多糖体、或いはツベルクリン蛋白 (P.P.D.) を抗原とする感作赤血球凝集反応を著明に惹起し得た。更に FS₁ の水可溶性分割を DEAE-Cellulose カラムで分割して得た P₄ について検討を行った所、表8に示す様に何れも著明な抗体価を示し、特に Boyden 反応陽性価は用いた試料の蛋白量に比して極めて高いものがあった。然して同時に

行った実験で FS₄ 及び V.C. ウサギ alveolar macrophage 抽出液 FC₃ (第1篇で記載した如く、Transfer factor を含む分割) については、いずれの反応もすべて陰性であった。

④ FS₁ の DEAE-Cellulose カラムクロマト分割 P₄ の免疫電気泳動結果：

図8に示す如く、山羊抗ウサギ血清抗血清を用いて P₄ 分割の寒天ゲル免疫電気泳動を行った結果、 γ_{1M} -globulin 及び著明な α_2 -globulin に相当する沈降線を得た。後者は後述する超遠心分析結果からしても α_2 -macroglobulin であると推定された。Daniel の報告(10)より、Middlebrook-Dubos 赤血球凝集反応抗体が γ_{1M} に局在することは確実であり、Boyden 抗体も同様と思われる。しかし α_2 -globulin との関係は明かでない。要するに P₄ 分割は少なくとも γ_{1M} -globulin, α_2 -macroglobulin を含有していることが明かである。

⑤ 超遠心分離器による分析：

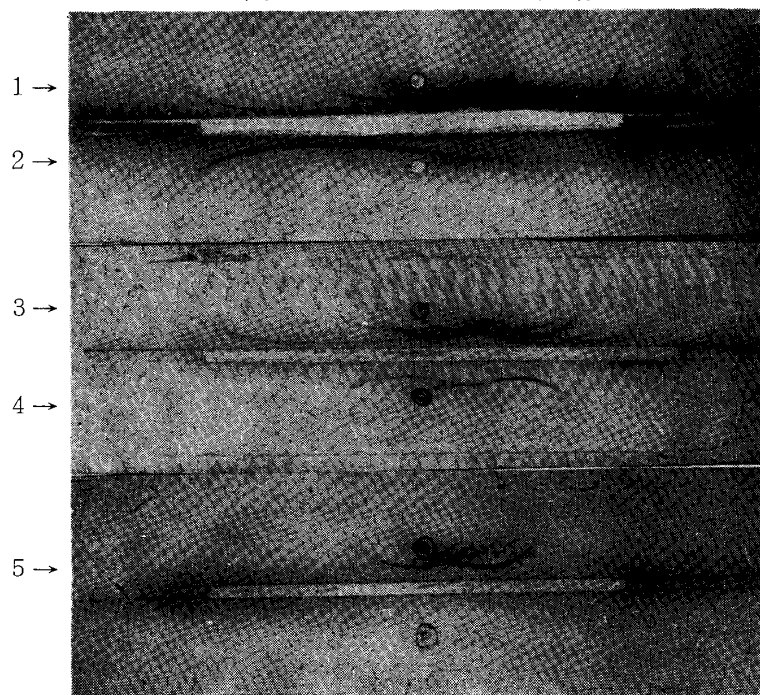
上記 P₄ 分割の0.5%溶液 (pH7.4, 0.075M phosphate buffered saline) を 59,780rpm で遠心し、4分毎に撮影したシュリーレン沈降図形を

表 8 V.C. ウサギ血清, V.C. ウサギ血漿 FS₁ 及び V.C. ウサギ Alveolar macrophage 抽出液 FC₃ の各活性分割における Middlebrook-Dubos, Boyden 感作赤血球凝集 反応成績

反 応	稀釈倍数		4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2028	対照 1
	分	割											
① Middlebrook-Dubos 反 応	V.C. 血清		+	+	+	+	+	+	+	+	—	—	—
	V.C. FS ₁ (蒸溜水に対して24時間透析内液上清) (0.5mg/ml)		+	+	+	+	+	±	—	—	—	—	—
	V.C. FS ₁ -P ₄ (0.6mg/ml)		+	+	+	+	±	—	—	—	—	—	—
	V.C. FS ₄ の PS ₁ (0.4mg/ml)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Alveolar macrophage 抽出液 FC ₃ (0.7mg/ml)		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
② Boyden 反 応	稀釈倍数		4	16	64	256	1024	4096	16384	32768			対照 1
	V.C. 血清		+++	+++	++	++	++	±	—	—			—
	V.C. FS ₁ -P ₄	56°C 30分, (0.6mg/ml)	+++	++	++	+	±	—	—	—			—
		加熱せず (0.6mg/ml)	+++	++	++	+	±	—	—	—			
	V.C. FS ₄ の PS ₁ (0.4mg/ml)		—	—	—	—	—	—	—	—			—
	Alveolar macrophage 抽出液 FC ₃ (0.7mg/ml)		—	—	—	—	—	—	—	—			—

特に記さない限り試料は 56°C, 30分間, 加熱非働化した。対照 1 : 4 倍稀釈試料と非感作血球 ; 対照 2 : 反応①では生理的食塩水と感作血球 ; 反応②では正常ウサギ血清 (1 : 100) と感作血球。対照は何れも陰性。() 内は蛋白濃度を示す。

図 8 FS₁-P₄ の免疫電気泳動

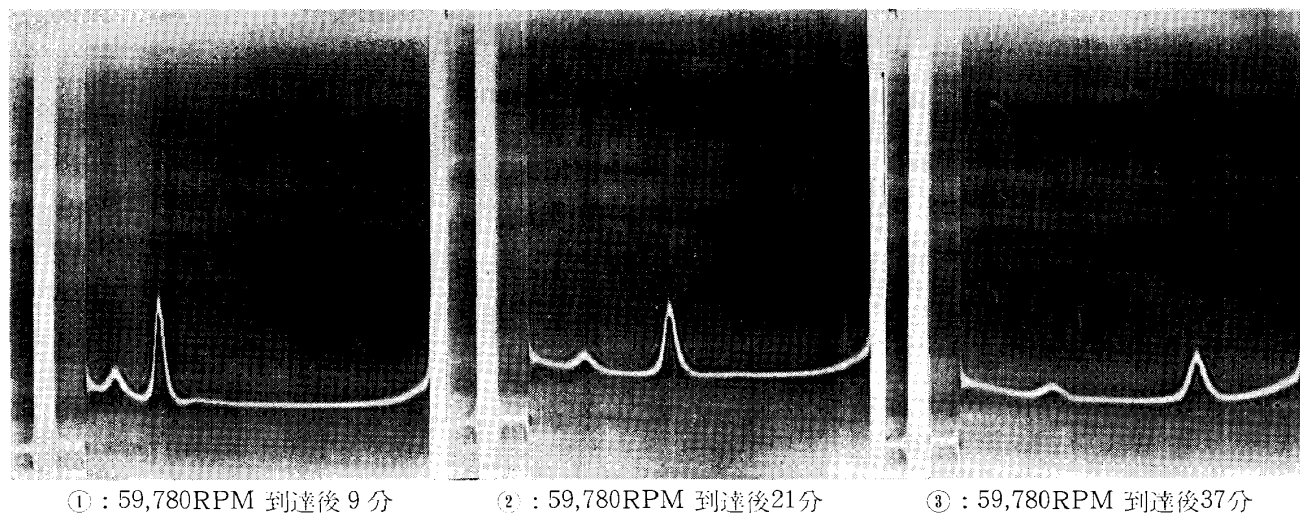


- 1 : V.C. ウサギ血漿
 2 : ウサギ γ -globulin Fr II (Nutritional Biochem. Co.)
 3 : V.C. ウサギ血漿
 4 : FS₁-P₄ (1mg/ml)
 5 : FS₁-P₄ (5mg/ml)
 抗血清は何れも山羊抗ウサギ血清

図 9 に示した。これらより S_{20, w} を計算した結果, 17.0S 及び 6.9S の 2 成分が存在し, 前者は免疫電気泳動結果, 精製操作過程, 抗体活性の存在などより判断して γ_1 M 及び α_2 -macroglobulin であり, 後者は少量混在する 7S type の成分と推定された。従って第 1 篇に記述した細胞抽出液の FC₃ が 3.2S の沈降係数を示した事より, FC₃ に含まれた Transfer factor と, FS₁ に含有される伝達因子とは molecular size に於ても異なることが明かである。

⑥ FS₁-P₄ の Cellulose acetate 膜電気泳動結果 :

FS₁-P₄ の免疫電気泳動では, γ_1 M 及び α_2 -macroglobulin の存在が検出されたが, cellulose acetate 電気泳動では β 領域に更に一コの蛋白質が認められた。超遠心分析に於てその

図 9 V.C. ウサギ血漿 FS₁-P₄ のシュリーレン沈降図形表 9 V.C. ウサギ血漿 FS₁ の Trypsin 処理の有無による伝達実験成績

分 割	処 理 法	血 漿 相 当 量 ml	蛋 白 量 mg	Recipient のツベルクリン反応 (1:10 O.T. 発赤径 mm)								
				静 脈 内 投 与 後 の 口 数								
				直 時 間	後 24	後 48	1 日	3 日	7 日	14 日	21 日	28 日
FS ₁	蒸溜水透析24時 間, 内液上清, 0.3% NaHCO ₃ ,	20	56	—	—	—	—	±	+	+	+	+
FS ₁	37°C, 24時間	20	56	—	—	—	—	±	+	+	+	+
FS ₁	同上処理後 5mg Trypsin 加,	20	56	—	—	—	—	±	—	—	—	—
FS ₁	37°C, 24時間	20	56	—	—	—	—	—	—	—	—	—

混在を認められた 7S type の蛋白に相当するものと思われる。

⑦ Trypsin 処理による検討：

表 9 に示す如く、pH7.8 にて FS₁ の trypsin 消化を 37°C で 24 時間行くと、その伝達能は消失した。従ってこの伝達因子は蛋白質に関係を有するものと推測された。

考 按

本実験で明かになし得たことは、感作後 challenge 処置をうけたウサギ血漿中には、ツベルクリン感受性を伝達する Transfer factor として 2 つの異った molecular size を有する物質が存在することである。その一つは、Sepha-

dex G-200 による分割 FS₁ に属し、分域電気泳動上、更には trypsin 処理の結果などより判断して α₂-globulin がその主成分をなし、沈降係数は 17S を示すものであった。FS₁-P₄ 分割は、その他、γ₁M-globulin 及び 7S type の微量蛋白を含有し、前者は感作赤血球凝集反応抗体を含んでいることが明かであったが、後者については不明である。然してこの 7S type の物質は FS₁ に最初から FS₂ の tailing として混入していたのか、若しくは透析その他の処理によって、より大きな分子より解離して来たものであるか不明である。従って 7S type 成分のツベルクリン感受性伝達現象に果す役割の有無は更に検討を要する所である。以上の如く、

FS₁ には α_2 -macroglobulin を主成分として3つの成分が混在していることが明かであり、そのいずれが伝達因子の役を果し得るか目下のところ不明である。もう一つの因子即ち FS₄ に検出された伝達因子は、比較的分子量成分で albumin より小さく、リゾチームよりは大きい分子量を有し、第1篇で記述した alveolar macrophage 抽出液の分割 FC₃ とは Sephadex G-200 カラムにおける溶出態度が同一であり、又電気泳動の実験成績からしても両者は同一物質であると考えられる。

先に辻ら(6)は、Lawrence がヒト白血球について行った in vitro の実験結果(17)を、in vivo の状態に演繹して考察し、細胞中に存在した Transfer factor が challenge 操作によって血中へ遊離すると結論した。著者の実験結果は、このことを裏付けるものであろう。即ち、細胞抽出液で証明した FC₃ の Transfer factor が血中へ遊離して V.C. 血漿 FS₄ として捕捉されたものと考えられる。従って、血中低分子性 FS₄ 伝達因子については第1篇に記載した細胞性 FC₃ 伝達因子の諸性質がそのまま当てはめられるものと考えられるので、本篇に於ては主として高分子性 FS₁ の伝達因子について吟味を行ったのである。この高分子性因子は細胞抽出液よりは検出し得なかったものであって、上述の辻らの推測、即ち血中の伝達因子は一時的に細胞より流出し来たものとの仮定は当てはまらない。従ってこれは血液固有のもの、即ち humoral antibody の一種と考えるべきであらう。一方、この因子によって伝達された皮膚反応の様相は低分子因子によって伝達された典型的なツベルクリン反応とはやや異り、早期反応を混えている如き感があることは注意せねばならない。Arthus 反応が時にはツベルクリン反応と区別困難な様相を呈し得ることを考慮し、又次に述べる血中抗体との関連性を考慮すると、この高分子性因子により伝達された皮膚反応が真のツベルクリン反応であるか否かについて断言をはばかるのである。この点は更に吟味を要すると思われる。

次に血中抗体と伝達因子との関係を考察して

みたい。Lawrence らのヒト Transfer factor は conventional antibody でないとされているが、Middlebrook-Dubos 感作赤血球凝集反応及び Boyden 反応を用いて上記伝達活性分割に於ける抗体価を検討してみた結果、低分子伝達因子を含む FS₄, FC₃ に於ては全ての抗体価が零であった。従って本分割に属する Transfer factor は、第1篇に述べたと同様 conventional antibody でないことが明かである。然るに、 α_2 -macroglobulin を主成分とする FS₁-P₄ には著明な抗体活性が認められ、特に Boyden 抗体価には極めて高いものがあった。又、成分の分析によっても、3種の蛋白質を含むことが明かであり、この内、抗体価に明かに関与するものとして γ_1 M をあげることが出来た。従って、この高分子分割によって即時型皮膚アレルギーが伝達され得る可能性は甚だ濃い。これが典型的なツベルクリン反応とは云えない反応を来したゆえんであろう。さきに Cole らの示した Fr. IV-10 (α -globulin) が、今回著者の提示した FS₁ と甚だ近似な関係にあることは推測に難くないが、以上の理由によってこれも真のツベルクリン感受性伝達因子と呼ぶことに躊躇を感じるわけである。この疑問を解決するためには上記3成分を夫々純粋に分離した上、その抗体活性とツベルクリン感受性伝達能とを分別検索することが必要であらう。

之を要するに、感作後 challenge を行ったウサギの血漿中には確かにツベルクリン感受性伝達因子が含まれており、之はさきに alveolar macrophage の抽出液から分離した低分子の伝達因子と同一のものと推定される。従って、第1篇に於て考察したと同様に、これは conventional antibody ではないが 3.2S の沈降係数を有する蛋白で、抗体のフラグメント又は precursor ではなかろうかという興味深い推測を下し得るものである。このものは challenge 処置によって細胞から遊離し、一時的に血中に存在するもので、よしこれが抗体の一種としても、humoral antibody と呼ぶことは不適當であり、やはり cellular なものとする。故に、今回血中に Transfer factor を検出したからと云っ

て、ツベルクリンアレルギーが cellular antibody hypersensitivity であるとする従来の定義を訂正するものとは考えない。

17S 附近の沈降係数を有する高分子の因子については、血中抗体との関連性が甚だ密であり、且つ伝達された皮膚反応の様相も典型的なツベルクリン反応とは些か趣を異にしている点から、今のところ真のツベルクリン感受性伝達因子と呼ぶことに躊躇する段階であり、更に今後の検討を必要とするものとする。

総 括

BCG 加熱死菌で感作後、challenge 処置を加えた (V.C.) ウサギ血漿中にツベルクリン感受性伝達因子 (Transfer factor) が存在することを確認し、Sephadex G-25, G-200 gel filtration, DEAE-Cellulose カラムクロマトグラフィー、分域電気泳動、透析操作などを用いて分割することにより、inhibitor を分離して活性の高い本因子を得、更に若干の物理化学的及び免疫化学的性状を検索せんと企てた。

① V.C. ウサギ血漿中には、その分子量に於て異なる 2 種の伝達因子が存在した。その一つは、 α_2 -macroglobulin (沈降係数 17.0S) を主体とする分割にあり、他の一つは albumin とリゾチームの中間に位する分子量を有する分割に属した。

② 高分子量を有する伝達因子は、trypsin 処理によってその伝達能を失い、且つその分割は Middlebrook-Dubos 感作赤血球凝集抗体価及び著明な Boyden 反応抗体価を示したが、この分割には γ_1 M-globulin, 7S type の蛋白を混入するため、伝達因子と抗体との異同を論じ得る段階ではない。

③ 低分子伝達因子は、電気泳動結果、Sephadex G-200 における溶出態度よりして、第 1 篇に述べたウサギ alveolar macrophage 抽出液の分割 (FC₃) に属する伝達因子と同一物質であると思われ、さきに提案された challenge 処置による Transfer factor の細胞から血中への放出という現象を裏づけることが出来た。

④ inhibitor の存在に関して、次の 2 つの点

が明かとなった。第一に、Sephadex G-25, G-200 による分割により、5,000~10,000 以下の分子量を有する分割と分離することによって、伝達因子の活性が著明になることが認められたこと。第二に、高分子分割 FS₁ を PBS-EDTA (phosphate buffered saline, 0.001M EDTA を含む) の如き塩類溶液に対して透析したのでは活性は極めて弱かったのに反して、蒸溜水に対する透析後、その水不溶性分割を除去することによって活性が著しく上昇した事である。

⑤ 低分子の伝達因子はたしかにツベルクリン感受性を伝達し得る因子であると考えるが、高分子のそれに関しては尚疑問の点が多く、今後の研究の結果を待つ必要があることに関して論述した。

謝辞：本稿を終るに臨み、終始、御指導を賜りました辻周介教授に篤く御礼申し上げます。又、研究面での御協力を頂いた大島駿作助教授、泉孝英博士に深く感謝致します。

文 献

- 1) Cole, L.R. and Favour, C.B.: J. Exp. Med., 101 : 391, 1955
- 2) Cole, L.R., Paldino, R.L., Henderson, R.W. and West, A.P.: Am. Rev. Resp. Dis., 80 : 398, 1959
- 3) Ehrenkranz, N.J. and Waksman, B.H.: J. Exp. Med., 109 : 935, 1956
- 4) Kulneff, V.N., Pederson, K.O. and Waldenström, J.: Schweiz. Med. Wchnschr., 85 : 363, 1955
- 5) Good, R.A., Zak, S.J.: Pediatrics, 18 : 109, 1956
- 6) Tsuji, S., Oshima, S., Oshiro, M., and Izumi, T.: J. Immunol., 93 : 838, 1964
- 7) Sober, H.A. and Peterson, E.A.: Fed. Proc., 17 : 1116, 1958
- 8) Middlebrook, G. and Dubos, R.: J. Exp. Med., 88 : 521, 1948
- 9) Takeda, Y., Aoki, Y. and Watanabe, T.: Japan J. Tnberc., 2 : 307, 1954
- 10) Boyden, S.V.: J. Exp. Med., 93 : 107, 1951
- 11) Stavitsky, A.B.: J. Immunol., 72 : 360, 1954
- 12) Scheidegger, J.J.: Int. Arch. Allergy, 7 : 103, 1955

- 13) Flodin, P., Killander, J. : Biochim. Biophys. Acta, 63 : 403, 1962
- 14) Oshima, S., Myrvik, Q.N. and Leake, E.: Brit. J. Exp. Path., 41 : 138, 1961
- 15) 泉孝英 : アレルギー, 13 : 524, 1964
- 16) Daniel, T.M.: J. Immunol., 95 : 100, 1965
- 17) Lawrence, H.S. and Pappenheimer, A.M.: J. Clin. Invest., 36:908, 1957.