

アレルギー抗体の Zone electrophoresis による分析

〔第Ⅰ篇〕 卵白 Albumin 感作家兎血清中の Arthus 反応型抗体の研究

京都大学結核研究所病態生理学部（主任 教授 辻 周介）

川 田 典 徳

（昭和34年6月30日受付）

1. 序 文

著者は結核に於けるアレルギーと免疫について研究し、その一部を結核免疫に於ける血中抗体の役割という標題のもとに発表した¹⁾。この研究と平行して、著者の他の研究目的である結核アレルギーに関しても、感作された動物の血清中に結核アレルギーを担う抗体があるか否かに関して研究を進めてきた。この点に関して得られた研究成果は第Ⅱ篇に於いて述べる予定であるが、かかる結核アレルギー抗体の分析に当つて血清蛋白を分割し、その抗体位置を決定する必要に迫られた。その理由は、従来血中にアレルギー抗体を発見し得なかつた結核感作動物に於いても、その血清蛋白を分割採取する事によりその特定の部分にこのアレルギー抗体の存在する事を明らかにしたFavour²⁾の報告が我々の実験の途中で行なわれたからである。このFavourの報告の真偽に関しては第Ⅱ篇で詳述する予定であるが、この研究に刺戟されて著者も結核感作動物の血清蛋白の分割を志し、その分割方法として澱粉による Zone electrophoresis 法をこれに援用しようと試みた。然るにこの血清蛋白分割方法によるアレルギーの研究は、単に結核に於いてのみならず他のアレルギー分野に於いても未だ極めてその経験に乏しい状態であるため、著者は先ずアレルギー蛋白採取に関する基礎的研究を行なう必要に迫られた。この意味で著者はアレルギー反応として Arthus 型皮膚反応を選び、卵白 Albumin によつて感作された家兎血清を Zone electrophoresis によつて分割し、その分割された各血清蛋白部分の如何なる部位に Arthus 型反応を示す抗体が存在す

るかを明らかにしようと志した。尙同時に試験管内で認められる各種の血中抗体の分布の有様と上述の蛋白分割とを比較検討した。

従来アレルギー反応を示す抗体に関しては数多くの研究が行なわれた。然しその多くのものはアレルギー抗体としてではなく、アレルギー反応抗体即ち試験管内で認められる各種のアレルギー反応の抗体に関する研究が主体をなして居り、生体組織で示される障碍性のアレルギー反応、即ち狭義のアレルギーを担う抗体に関しての研究は比較的少なかつた。元来アレルギー抗体なるものが、かくの如く生体組織に於ける反応としてその存在を確認し得る事が出来るという性格を有する関係上、この抗体の存在に関する最終的な結論は受動感作という方法に頼る他はないのであるが、この事に関する最初の報告が既に今世紀初頭 Nicolle³⁾ によつて行なわれた。この Nicolle の研究により、感作された動物の血清の移行によつて他の動物にアレルギーを受動的に移し得る事が報告されて以来、種々の論議がこの点に関して闘わされて来たのである。従来血清中に存在する抗体としては、各種の検査法即ち沈降、凝集、補体結合等々の反応によつて認められる各種のものが存在し、研究の当初にはこれらの抗体はすべて互に異つたものであるとされていたのである。其の後次第に研究が進むにつれてこれらの抗体を同一視する一元論が優位を占め、これに対して先の説は抗体の多元論と称せられるに至つた。かかる抗体一元論の進展に伴つて、組織反応を担うアレルギー抗体も又前記試験管内諸アレルギー反応抗体と同一のものであるとする説が行なわ

れ、これは Opie⁴⁾⁵⁾ Cannon⁶⁾ 等の広範な研究に支えられて、アレルギー反応抗体の一元論の中に包括されるに至つたのである。然しアレルギー抗体と試験管内アレルギー反応抗体を区別しようとする多元論的な主張も、Grove⁷⁾ Kahn⁸⁾ 等によつて行なわれ、これに賛同する研究や論議も多数為されて居り、最近我国で行なわれたアレルギー学会のシンポジウム⁹⁾ でも抗体の一元論と多元論とに関する論議が烈しく闘わされた事がある。然し為された多くの論議は、方法論上尙不十分な実験事実に基づく見解の相違によるものが多分にあり、アレルギー抗体に関しては先に述べたように、これを飽く迄受動感作の方式によりその抗体を捕える事が第一の前提に立たねばならぬものである。著者の行なつた実験必ずしもまだ完全なものとは云い得ないが、然しその実験方法に於いて又実験成績に於いて、この方面の研究者の参考に供したい多くの点を有する事を思い、以下それについて記載して諸家の批判と示唆を得たいと思うのである。

2. 卵白 Albumin 感作家兎血清の Zone electrophoresis に関する基礎的実験

a) 実験材料

i) 動物：体重 2500 g 前後の白色雄性家兎

ii) 抗原：Merck 製結晶卵白 Albumin 粉末に滅菌生塩水を加えて約 2% の溶液を作成する。この際充分強力に遠心沈澱して不溶解物を除去した後、溶液の蛋白濃度を測定しその多くが 1.8% 前後にある事を確めた。

iii) 動物の感作：家兎の耳静脈より前記抗原 2.0cc を 3 日間隔で 8 回乃至 10 回注入して感作を行う。最終感作終了後 8 乃至 10 日で血中沈降抗体価を測定し、その価の充分高値にある事を確めた後これを感作終了動物として使用した。

iv) 血清の採取：実験に際して、同時に 2 本の Column (1 本について 10cc の新鮮血清使用) について泳動を行なつた関係上、2 匹の家兎よりその耳静脈から各約 25cc の血液を採取、時には頸動脈より約 80cc の血液を得、これらより血清を分離して使用した。

v) 沈降抗体価の測定：沈降抗体価の測定は村田の試験管を使用する重層法を用い、抗体積によつてその価を決定したが、この際使用した抗原は 1000 倍卵白 Albumin 生塩水溶液である。

vi) 血清の Zone electrophoresis (Z. E.): 方法は Kunkel¹⁰⁾¹⁹⁾ の記載に従つたが、この方法による血清蛋白の分割は澱粉による蛋白の吸着もなく極めて優秀な方法として中村¹¹⁾ によつても記載されている。装置は Z.E. のために設計された電流発生装置 (定電流) を、又資料の支持体としては局方精製馬鈴薯澱粉を使用した。この際澱粉は蒸溜水にて数回洗滌し、乾燥粉末となしたものである。緩衝液としてはペロナール醋酸緩衝液を、そのイオン強度 0.1, pH 8.6 として用いた。この緩衝液で前記澱粉粉末を適當の濃度に泥状となし、巾 5.0cm 高さ 2.0cm, 長さ 50cm, の合成樹脂製泳動槽に充填し、濾紙にて余分の緩衝液を除去した後資料の充填を行なう。充填に当つては泳動槽内澱粉柱の中央部を巾 1.0cm の範囲内で除去し、約 9g の乾燥澱粉を 10cc の試験血清にて泥状としたものをこの欠損部に注入する。後蓋をして附属金属止具で緊ばくし泳動槽が完成する。かくして作製した泳動槽の両断端は、これを濾紙で封鎖し、更にその上を新しいガーゼで覆つた後、そのガーゼの遊離端を緩衝液槽に浸漬し、この緩衝液槽と KCl 電解槽との間を KCl 寒天脚にて連結し、以下の条件で通電を開始する。上記操作中、泳動槽の作製は可及的迅速に室温で、電気泳動は 4.0°C に調製された恒温室内で行なつた。通電は 2mA/cm² (断面に付)、前記 Column 2 本を同時に泳動すれば両端にかかる電圧は約 250V. 前後であつた。通電時間は約 36 乃至 48 時間で、かくすれば血清蛋白の両端は約 20 cm の巾で展開する。泳動終了後この澱粉柱を 1.0 cm 巾に切断、試験管内にて 10cc の生塩水で 24 時間 4°C にて抽出を行ない以下の実験に使用した。蛋白の定量の為には、Folin 法を採用し、資料の 0.2cc を Folin-Ciocalteu の Phenol 試薬により発色させ、これを比色計で定量、その資料に応じての蛋白

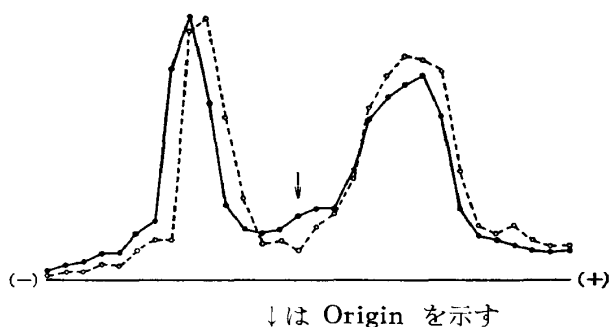
分布の **Pattern** を得る事が出来た。以下著者の示した成績はすべてこの方法によるものであつて、この際蛋白各成分の発色の差違による補正は加えられていないが、蛋白分布の様相と目的とする分割採取の為にはこれによつても充分効果をあげ得たものと考ええる。

b) 実験成績

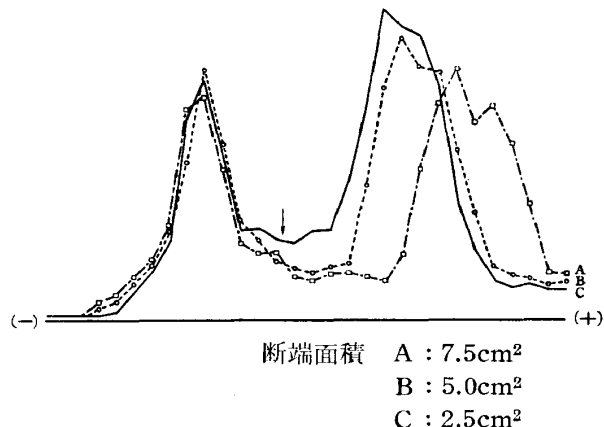
以下は繰返し得られた実験成績の一部を図示し、且その各々について詳述する。

第1図：a) は同時に泳動された2本の **Column** について **Folin** 法による比色定量を行ない、得られた蛋白分布を示したものであり、その資料は正常家兎血清である。**Albumin** 及び γ -**Globulin** に相当する蛋白分割が明瞭に出現し、 α -、及び β -**Globulin** に相当する分割は比較的不明瞭な分布を示して居る。尙この二つの曲線は、同一資料について行なわれたものであるが、**Column** の個々の性状や、装填された資料の状態等により図に示される程度の差違が現われる。これは現在我々の使用する方法の精度を現わすものであつて、かかる誤差は主として充填された資料の泳動状態が未だ比較的不均一

第1図 a) 正常家兎血清分離図



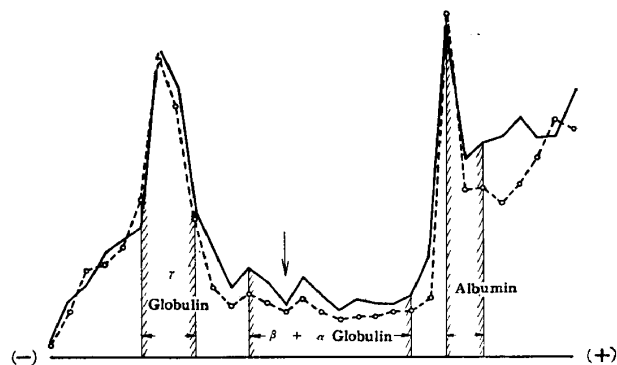
第1図 b) 正常家兎血清



である事を示しているという事が出来るであらう。然し図に示された正常家兎より得た血清の **Pattern** を見れば、その蛋白分割が **Tiselius** の装置によつて得られたものと略一致した成績で、又 **Paper chromatography** のそれとは更によく近似するものである事を示している。b) は異つた個体より得られた血清を、同時に3個の **Column** で泳動したものである。得られた成績は、a) で示された事実を確認するものであつた。この b) の実験では、一般に著者が使用した断面 10cm² の **Column** と異つて 7.5cm², 5cm² 及び 2.5cm² のものを使用した。得られた **Albumin** 峰の移動が、**Column** の断面の増加と共に大となつて居るが、これは泳動時に於ける装置の電気抵抗の差によるものと思われる。

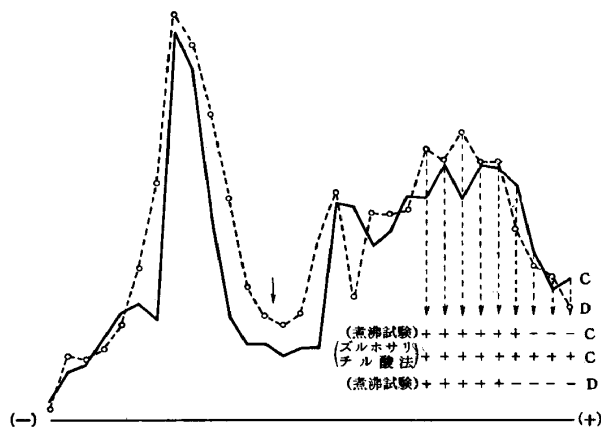
第2図：然るに卵白 **Albumin** 感作家兎血清より得られた **Pattern** は a) で示される如く極めて顕著な変化を、殊に **Albumin** 部位に於いて示している。即正常血清の **Albumin** 峰と考えられる泳動部より更に陽極側に極めて高度の **Folin** 反応を示す物質の存在を認めるのであつて研究の当初にはこれを蛋白質以外の混入物によるものと考えた。然し b) に示される様に、この **Folin** 陽性部に一致して極めて強い蛋白反応を示す事実が明らかとなり、これ又 **Albumin** 峰の一部と考える外はないものと判断された。従つて陽極に向う泳動部分に見られるこの二つの分割を同じ **Albumin** 中の二つの分割と見做すべきか、或いは又両者の一つを **Albumin** 以外の分割と見做すべきか、目下の所は未定であるが、漸定的に著者はこれを **Albumin I** 及び **Albumin II** として記載する事にする。扨て **Albumin I** 及び **Albumin II** の比率は感作された家兎の個体によつても、又感作状態によつても異なるもののようであり、感作が強い時には **Albumin II** が増量し (b), 感作状態が遷延した場合にはこれが減少する (c) ものの如く思われる。更に感作が遷延し、或いは採血が多きに過ぎた後の感作動物では、遂に **Albumin II** 峰が殆ど消失しその泳動像は非感作動物に於けると同様のもの (d) となる。

第2図 a) 卵白 Albumin 感作家兎



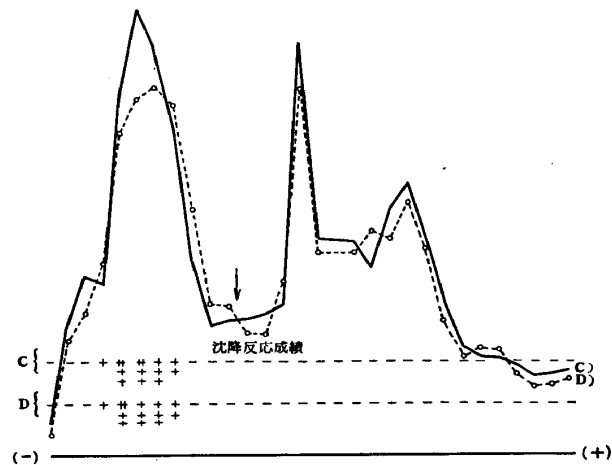
註：↓は Origin を示す
ペロナル塩緩衝液 pH 8.6
(Folin フェノール試薬による)

第2図 b) 卵白 Albumin 感作家兎血清



註：Albumin II 峰に於ける蛋白試験

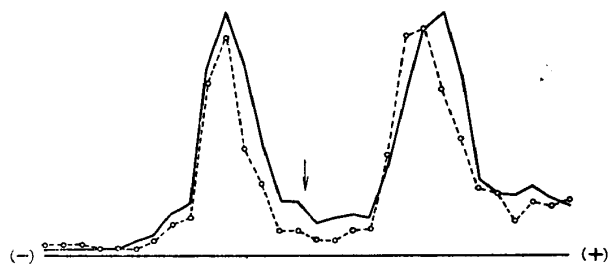
第2図 c) 卵白 Albumin 感作家兎血清



註：沈降反応成績は各相当抽出部位毎に C), D) 各々について行つたものである。

第3図：因みに抗原とした結晶卵白 Albumin 溶液の泳動像を示すとこの図の如くである。図に示された卵白 Albumin の2峰の中、

第2図 d) 卵白 Albumin 感作家兎血清

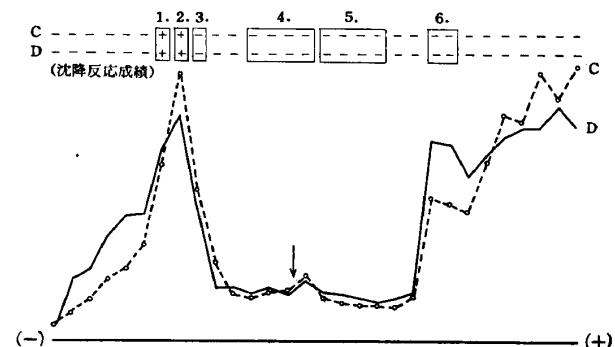


Albumin に相当する分劃は極めて移動度の速いもので、この卵白 Albumin 分劃が先に述べた抗体蛋白の Albumin II 峰の原因となる可能性を考えて、現在これに関する実験を行なっているが尙結論を得るに至っていない。又結核死菌流パラ・ラノリン感作家兎血清では第II篇に示す如くかかる分層は現われず、卵白 Albumin 感作に特異的な現象の如く思われるのであるが、これが如何なるものかこの本体に関しては未だ不明の儘残されている。以上 Albumin 分劃に見られる変化の外に、従来感作動物血清の γ -Globulin の増加が指摘されているが、著者

第3図 卵白 Albumin (Merck) 1.8% 泳動図



第4図 卵白 Albumin 感作家兎血清



註：沈降反応成績は各相当抽出部位毎に C), D) 各々について行つたものである。

抽出試験 (群)番号	1	2	3	4	5	6
皮膚反応 (P-K型)	15×15	8×8	7×7	6×6	6×6	6×7
24時間後	7×8	13×17	10×12	7×7	7×7	6×7

の実験では第Ⅱ篇で示される様に、感作モルモット血清に於いてその増量が明らかに認められたが、家兎に於いてはその増量を認める事は出来なかつた。

扨て以上得られた各分劃について、その各抽出部毎に沈降反応を行なつた成績が第2図c)に示されている。沈降反応は前記方法に従つたが、抗体液としては先に生塩水で抽出された各試験管毎にその一部を取出し、1.5%アラビヤゴム浮游生塩水で倍量とし、これを原液としこの階段的稀釈液について試験したものである。成績は第2図c)に示された如く、沈降反応陽性部が γ -Globulin部位に限られて陽性に出現した。即ち卵白Albumin感作家兎血清に見られる沈降反応抗体は γ -Globulin分劃に存在する事が直接的に証明されたものである。

3. 血清分劃の受身移行によるアレルギー抗体の研究

a) 実験材料及び実験方法

動物は Recipient として 2000g 前後の白色家兎、及び体重 300g 前後の白色モルモットを使用した。

アレルギー反応の受身移行の為に使用した抗体液は先に Z. E. により分離した各血清分劃であつて、その採取部位は第2図a)に示す如く Albumin 峰の一部、 γ -Globulin 峰の一部と、更に α -、及び β -Globulin はこれを明らかに分劃採取し得ぬ儘これらが含まれるものと見做される数ヶ分劃部分を取り、原血清 60cc の各分劃量に相当する Albumin, $\alpha + \beta$ - 及び γ -Globulin 分劃を pool, その各々を Carbowax 1500 で、セロファン膜にて濃縮して約1/20量とし、これを抗体液として使用した。又時にはこれを更に生塩水で透析したが、透析の如何によつて成績に著明な変化は来さなかつた。尙この際、Donor の血液採取より Recipient への移行迄に要する期間は6日以内とした。アレルギー反応惹起抗原は感作に使用したのと同じ結晶卵白 Albumin の約1.8%生塩水溶液を使用した。抗体及び抗原の動物接種方法は表に示してある。即ちアレルギー反応は正規の Arthus 型の反応

によるものと、Prausnitz-Küstner型反応による両方法が用いられた。Arthus 型の反応には前記分劃液の略全量を Recipient の静脈内に接種、又 Prausnitz-Küstner 型反応によるものには各 Recipient 腹側皮内に同じく血清分劃液を、家兎には 0.2cc, モルモットには 0.1cc を注射し、後両型共に24時間して、前者にはその腹側皮内え、後者には同一局所に、抗原液 0.1cc の接種を行ない、其の後は経時的に皮内反応を観察した。尙この際 Arthus 反応型形式の例には各 Recipient 一例につき一つの分劃を、又 Prausnitz-Küstner 型反応形式の例には各 Recipient 一例につき同時にその腹側皮内3ヶ所について接種を行なつた。尙この後者については、皮膚の部位による反応程度の差違を考へて、接種部位を互に交換する様に配慮した。モルモットに於いては、Prausnitz-Küstner型反応を行なうに際しても、抗体の接種は皮膚(腹側)の一ヶ所についてのみ行なつた。以上両型の反応に加えて、更に多少これを修飾したものとして、皮膚に抗体を注射した後、抗原を静脈内に接種して皮膚反応を観察する逆 Arthus 型反応を行なつた。この場合にも抗体移注後24時間して抗原を静注し、以後経時的にその反応を検討した。以上抗体及抗原の血管内注入に当つては、家兎では耳静脈より、モルモットでは頸静脈よりこれを行なつた。

b) 実験成績

成績は表に明らかな如くである。

i) Arthus 型反応 (抗体を大量静脈内に接種し、抗原の皮内注射を行なつた群) : 家兎例では、対照群即ち正常家兎血清分劃の注射を受けた Recipient では、Albumin 分劃に極めて薄い発赤を認めただけで他の分劃では殆ど異常を認めなかつた。然るに感作群即ち感作家兎血清分劃の注射を受けた Recipient では、 γ -Globulin 分劃に於いて著明な反応があり、24時間後には溢血斑を伴つた発赤が認められたが、然し浮腫は認められず、この点自動感作動物に惹起されるような典型的な Arthus 反応は認める事が出来なかつた。これは抗体量からしても止むを得ない事と考える。Albumin 分劃では全く反応

血清分割によるアレルギー反応

	実 験 方 法							結 果		
	Recipient	血 清 分 割				抗 原		皮 内 反 応		
	家 兎 No.	Donor	静脈内	皮 内	量 (§)	静脈内	皮 内	6 時間後	24 時間後	48 時間後
Arthus 型反応	483	正常	Alb.		15.0cc		(cc) 0.1	0	10×14	6 × 8
	494	//	α+β		//		//	0	0	0
	495	//	γ		//		//	0	0	0
	401	感作	Alb.		//		//	0	0	0
	402	//	α+β		//		//	5×5	5 × 5	0
	403	//	γ		//		//	13×13	15×19 B	10×11
Prausnitz-Küstner 型反応	481	正常	Alb.		0.2cc		//		16×18※	0
	//	//	α+β		//		//		15×20※	5 × 8※
	//	//	γ		//		//		16×17※	7 × 8※
	404	感作	Alb.		//		//	15×15	4 × 4	0
			α+β		//		//	5 × 5	4 × 4	0
			γ		//		//	16×16 B	27×25 B	14×13※
	405	//	Alb.		//		//	5 × 5	5 × 5	0
			α+β		//		//	10×10	0	0
			γ		//		//	25×25 B	19×23 B	15×16※
	406	//	Alb.		//		//	18×19	14×15	0
			α+β		//		//	8 × 8	0	0
逆 Arthus 型反応			γ		//		//	20×25	29×27	15×16※
	407	//	Alb.		//		//	25×25	18×12	0
			α+β		//		//	10×10	13×13	0
			γ		//		//	30×33 B	28×19 B	11×14
	482	正常	Alb.		0.2cc	5.0cc		0	0	0
			α+β		//			0	0	0
			γ		//			0	0	0
	408	感作	Alb.		//	5.0		0	0	0
			α+β		//			0	0	0
			γ		//			0	25×19※	0
	409	//	Alb.		//	5.0		5 × 5	15×15※	0
Prausnitz-Küstner 型反応			α+β		//			0	0	0
			γ		//			18×18	24×28	0
	410	//	Alb.		//	5.0		5 × 5	0	0
			α+β		//			5 × 5	0	0
			γ		//			10×8	18×18※	0
	411	//	Alb.		//	5.0		8 × 7	0	0
			α+β		//			0	0	0
			γ		//			15×8	17×13※	0
	モルモット No.	正常	Alb.		0.1		0.1cc		5 × 5	0
	471	//	α+β		//		//		12×14	7 × 8
	473	//	γ		//		//		4 × 8	7 × 8
逆 Arthus 型反応	474	感作	Alb.		//		//	21×17	0	0
	423	//			//		//	0	18×14	0
	424	//	α+β		//		//	30×36	29×30	0
	427	//			//		//	24×20	0	0
	431	//	γ		//		//	29×31	28×29	0
	429	//			//		//	29×33	24×33	24×23
	430	//			//		//			
	475	正常	Alb.		//	1.0cc			0	0
	476	//	α+β		//		//		14×17	0
	477	//	γ		//		//		10×12	0
	425	感作	Alb.		//		//	0	0	0
逆 Arthus 型反応	421	//			//	0.5		0	0	0
	422	//	α+β		//	1.0		0	0	0
	426	//			//		//	19×19	19×19	21×15
	428	//	γ		//		//	35×35	27×27	26×27
	432	//			//		//	26×28	29×32	14×15
					//		//			

註) ※: 発赤の弱いもの B: 出血を伴うもの § 1.0cc 中に血清約 3.0cc 中の各分割相当量含有

が現われず、 $\alpha+\beta$ -Globulin 分劃ではわづかに発赤が認められる場合があるが、これは極めて制限されたものであつて陽性成績とは云い難い程度のものであつた。

ii) 家兎に Prausnitz-Küstner 型反応を行なつた場合：対照群では各三分劃に於いて相当大的な反応が24時間で観察された事があるが、この発赤は非常に弱いもので48時間後には全く消失した。この反応は勿論非特異的のものと考へるべきであるから、得られた資料は総てこの程度の非特異反応を示す事を考慮におく必要がある。感作群では、同じく γ -Globulin 分劃に特に著明な反応が認められ、その反応は先の Arthus 型の投与形式と略同様であつた。又 γ -Globulin 分劃ではすべての動物で反応陽性成績が得られているが、他の分劃では、特に Albumin 分劃で時に陽性を示す成績が得られたが、後者は果してアレルギー反応を示すものか否か未だ疑わしい点がある。

iii) 家兎に逆 Arthus 型の反応を行なつた場合：対照群では全例に於いて陰性成績を得たが、感作群では、これも又 γ -Globulin 分劃に陽性成績が認められた。他の分劃には反応は認められず、 γ -Globulin 分劃で示された陽性成績も極く軽度の発赤を示す程度のものであつて、概してこの型の反応は他の型に比し特徴的なものではなかつた。

以上家兎に於いては γ -Globulin 分劃にアレルギー抗体があるという事の出来る成績を得たのである。

iv) 次にモルモットの実験では家兎に比し反応の出現が比較的不安定なものと思われた。即ちモルモットの皮膚反応は、この様な反応型式に於いては発赤の出現が非常に貧弱で却つて蒼白色を示す場合が多く、又浮腫の出現が著明である。従つて反応の観察にはこの浮腫を目標にしたのであるが、斯くして測定された反応直径を見れば、Prausnitz-Küstner 型反応に於いては γ -Globulin 分劃に反応が特に著明で、次いで $\alpha+\beta$ -Globulin 分劃に反応が出現し、Albumin 分劃では反応が起らないという成績を得たのである。又逆 Arthus 型の反応を行なつた群では、

先に述べたと同様浮腫を主徴とする皮内反応が認められたが、この場合には Albumin, $\alpha+\beta$ -Globulin, 及 γ -Globulin 何れにも同程度に認められ、果してこれらをすべて反応陽性としてよいか、疑わしいものであつた。

v) 第2図d)に示されたものは先に述べた様に Albumin II 峰の出現が殆ど見られなかつた血清の泳動図であるが、その分劃された蛋白各成分を用いて以上と同様の方法によつてアレルギー抗体の位置が検索された。この成績でも48時間後の Prausnitz-Küstner 型反応では γ -Globulin 分劃に抗体の存在を思わせる反応を認めたが、24時間後の反応は γ -Globulin よりも却つて Albumin に強反応を呈するものも存在し、先に行なわれた実験に比較して γ -Globulin 分劃に於ける抗体の存在が不明瞭と思われた。

vi) 第4図は感作家兎血清の泳動図で、其の得られた各蛋白分劃の抽出試験管毎に行つた沈降反応と、皮膚に於ける Prausnitz-Küstner 型のアレルギーの成績を同時にこれに併記したものである。アレルギー反応の試験は抽出した試験管の一部についてのみ行なつたが、この成績によるも沈降反応抗体は γ -Globulin 分劃、又アレルギー抗体も同じく γ -Globulin 分劃に認められる成績であつた。

以上家兎及びモルモットについて行なわれた卵白 Albumin 感作家兎血清分劃の、受身移行による Arthus 抗体の所在に関する探究実験は、その多くのものが γ -Globulin 分劃にアレルギー抗体の存在を示す結果となり、極く一部に於いて Albumin, $\alpha+\beta$ -Globulin 分劃に陽性成績を得たのであるが、 γ -Globulin 分劃を除く他の成績は非常に不安定なものであつて、これをアレルギー反応として認めてよいかどうか、尙疑問の余地を残すものであつた。

4. 総括及び考按

著者は感作された動物の血中抗体のアレルギーに於ける役割を検討する目的で、その血清を分劃しその分劃の何れの部分にアレルギーを挾う抗体が存在するかを血清分劃の受身移行により検討しようと試みた。従来血清蛋白の分劃は塩析法により行なわれ、Pseudoglobulin, Eug-

lobulin, Albumin 等の分割が分離され、その化学的な又生物学的な性状が種々研究されてきた。これと共に近年 Svedberg¹²⁾ によつて超遠心器を利用する蛋白分割が行なわれ、この方法によつて蛋白の分子量が略測定され得る事となり、前記塩析によつて得られた分割の各々についても又この超遠心器による方法との間でその成績が比較されてきたのである。更に Tiselius^{13) 14) 15)} によつて電気泳動法なる分割法が行なわれるに至り、これによつて血清蛋白が Albumin, α -, β -, 及び γ -Globulin 等の各成分に分割されるものである事が明らかにされ、この方法による研究が大いに進展した。然し Tiselius 法による研究ではその分割された資料を各個にとり出してその各々を検討する事は至難の技であつた。この点最近 Turba¹⁶⁾ 等によつて考案された濾紙電気泳動法は、濾紙上に展開された各種の分割を濾紙より溶出してその性状を検討する事が可能であり、この点極めて好都合なものと云い得る。然し惜しむらくは、この方法によつて展開される資料の量は極めて制限されたものであり、取り出された分割を動物に大量移入しようとする著者の意図には用うべくもないのである。最近濾紙電気泳動法以外に各種の支持体を利用する Z.E. の方法が考案され、各方面で使用されるに至っている。例えば、支持体として澱粉ゲルを用いる方法¹⁷⁾ の他に、ガラス粉末¹⁸⁾、イオン交換樹脂¹⁹⁾、濾紙の粉末、寒天ゲル、シリカゼリー等各種^{20) 21)} の支持体が使用されるに至り、又 Fraction-collector との組合せ^{22) 23)} 其他技術的考案²⁴⁾ が各方面でなされている。著者の使用した澱粉を用いる方法は、主として中村¹¹⁾ の記載に従つたものである。この方法によれば資料の約 5 乃至 10cc を 1 本の Column で泳動する事が出来、著者は同時に 2 本の Column を常用した故に、一度の泳動で 15~20 cc の血清の泳動が可能であつた。電気泳動に当つて充填する資料の量が余りに多きに過ぎた場合には、その泳動成績が不良となる。然し著者の実験目的は極めて多量の分割を同時に得る事にあつた為、多少精度の悪くなる事を覚悟して可及的大量の血清を泳動した。従つて

著者の得た資料では Albumin, 及び γ -Globulin 峰は勿論明らかに分離されたが、 α - 及び β -Globulin はこれを明らかに分離する事が出来ず、多くの場合 Albumin 峰及 γ -Globulin 峰の間に存在する $\alpha + \beta$ Globulin 分割として使用した。

著者の得た成績よりすれば、正常家兎の血清には γ -Globulin 分割が、モルモットのそれに比し相当多量に存在して居たが、卵白 Albumin 感作による γ -Globulin の増量は、家兎に於いては極めて僅かに過ぎなかつた。卵白 Albumin 感作動物の血清に見られる特徴的な点は、正常血清の Albumin 泳動部を越えて更に陽極側に蛋白反応陽性を示す分割の多量に出現する事で、研究当初にはこれを蛋白以外の Folin 反応陽性物質によるものと判断したのであるが、現在これが蛋白である事を確認し、Albumin 部に認められる二つの峰を Albumin I 及び Albumin II と命名した。卵白 Albumin の感作によつて現われる Albumin II は感作の程度と相関がある如く思われる。卵白 Albumin 感作家兎血清の澱粉柱による Z.E. に際して認められる以上二つの特徴を背景に、これらの分割に存在するアレルギー抗体及びアレルギー反応抗体を探究したのである。

先づ抽出された各分割のすべての試験管について、卵白 Albumin 1000倍稀釈液を抗原として沈降反応を行なつた。その結果、沈降反応抗体は γ -Globulin 峰その中では特に陰極側によつた部位に多量の抗体が存在する事が明らかとなり、他の分割、即ち Albumin, 或いは $\alpha + \beta$ -Globulin に相当する分割にはこれを認める事が出来ないという成績を得た。

分割されたこれらの各成分を生体に受身移行し、生体にてアレルギーを呈する抗体が何れの分割に存在するかを検討した実験では、 γ -Globulin 分割に於いて明らかに Arthus 反応を示す抗体が存在し、他の分割にはその存在が極めて疑わしいという成績を得た。実験は家兎及びモルモットの皮膚に於いて Arthus 型、逆 Arthus 型及び Praunitz-Küstner 型の反応として検索されたのであるが、家兎に於いては何れの反応

形式でも、 γ -Globulin 分割に抗体の存在を示す陽性成績を得たのであるが、モルモットではこのような反応形式に於いては浮腫を主徴とする皮膚反応が各分割に比較的強く現われて、発赤乃至は出血を呈する典型的な Arthus 型反応を得る事が出来なかつた。この点は従来云われてきたモルモットの Arthus 型反応に対して尙検討を要求するものと云う事が出来るであらう。反応実施に当つて注意された点は、血清分割の濃縮に際して使用した Carbowax 1500 が分割溶液中に移行する事であつて、この為か皮膚に分割蛋白液を注射した後24時間後即ち二次注射当時には尙局所に明らかな発赤が認められる場合もあつて、これが以後の Arthus 型反応の出現を妨害し、或いは判定を誤らせる可能性が危惧されたが、各種の検討の結果此の反応は24時間以後殆ど消褪し、目的とするアレルギー反応の判定に障害を残すものとは思われない成績で、この点混入した Carbowax 1500 を透析除去する方が好ましい事は勿論としても、行なわれた著者の実験成績がこれによつて歪められる程度のものではないと判断した。以上の如く著者の行なつた実験結果では、卵白 Albumin による感作家兎血清の γ -Globulin に沈降抗体とアレルギー抗体が共に存在する事が明らかとなつた。

従来行なわれた実験でも、少くとも試験管内で認められるアレルギー抗体が γ -Globulin に存在する事は略確証されていた。この点に関する実証的な事実は多数存在する故、これを一々指摘するの煩を避けて、只 Tiselius が電気泳動法によつて得た抗体成分が γ -Globulin に相当する事を明らかにして、既に γ -Globulin が治療面で実用化されている事実をあげれば足りるであらう。序文でも述べた様に、各種の抗体が果して同一物であるか否かという点に関しては、殊に血中に見られる各種の抗体と組織のアレルギーを現わす抗体とが、果して同一物か否かという点をめぐつて、古くより尙多くの議論が闘わされている。Opie,^{4) 5)} Cannon⁶⁾ 等又我国では緒方²⁶⁾ 等がその広範な実験を基礎として、試験管内抗体とアレルギー抗体とを同一物と見做す議論を展開しており、此等の一元論を代表する

ものとしてあげる事が出来るであらう。緒方²⁶⁾ 等は最近再び沈降抗体価と Arthus 現象とが互に平行する事を結晶卵白 Albumin を抗原として得た感作家兎について実証し、又吉田²⁷⁾ 等は牛血清で免疫した家兎血清中の抗体は、沈降抗体が γ -Globulin に、又同じく硫酸曹達で塩析した γ -Globulin 部に Arthus 型の抗体が共に存在する事を指摘した。これに対し血中抗体とアレルギー抗体との分離を主張するものとしては、古くは Coca²⁸⁾ 等の主張があるが、其の後一元論に圧倒されて次第に影を薄めてきた。然し二元論又はこれに類する主張は結核アレルギーの研究者殊にツベルクリン反応抗体が血中に出現しない点をめぐつてその主張が続けられ、枯草菌、又最近ではペニシリンによるアレルギーに対する抗体も、これに類するものとしてこれらの主張の根拠となつている。前川²⁹⁾ は組織の磷脂質がハプテンとなつてアレルギー抗体が作られるものと考えて、これを免疫抗体と対立させ厳密な二元論を唱えている。更に小野江^{30) 31)}、其の他によつて行なわれている脱感作動物による研究も、或る程度は血中抗体とアレルギー抗体との分離を主張する説の一つの拠り所を提供するもののようである。著者は今回行なつた自らの実験に関する限りでは、卵白 Albumin で感作した家兎血清中の γ -Globulin 分割に沈降抗体とアレルギー抗体とが同時に認められる事実を指摘し得るのみであつて、果して両種抗体が同一のものか否かについては尙これを明らかにし得なかつた。然し乍ら少くとも両種抗体が解離する事実を認め得ず、又今後技術的な考慮を重ねる事により沈降抗体について行なつたと同様アレルギー抗体に関しても、分割された各試験管毎にその反応を検する事によつて両種抗体が厳密に平行するか否かを検討したいと考えるのである。従つてこの研究が進行すればある程度抗体一元論の可否に關しての発言をなし得ると期待しているものである。

5. 結 論

著者は澱粉を支持体とする Zone electrophoresis によつて家兎血清の分割を行ない、その基礎的研究を進めると共に、卵白 Albumin

で感作した家兎血清の抗体位置を決定しようと試みた。

i) 卵白 Albumin 感作家兎血清の Albumin 分劃は二つの峰を現わし、これを Albumin I, 及び Albumin II と命名した。 γ -Globulin 分劃は正常家兎血清に於いても比較的多量に存在し、感作によるその増量は著明でない。

ii) 卵白 Albumin 1000倍液を抗原とする沈降反応で、沈降抗体が γ -Globulin の陰極寄りに存在する事が示された。家兎及びモルモットを Recipient とする抗体の受身移行で検査された Arthus 型及び Prausnitz-Küstner 型の反応で感作家兎の γ -Globulin に一致してアレルギー抗体の存在する事が示された。

(稿を終るに当り、終始御鞭達御指導並びに御校閱を賜つた安平公夫助教授に、又 Zone electrophoresis の実施に当つて種々御教示を戴いた大島駿作助教授に深甚の謝意を表します。)

文 献

- 1) 川田典徳：結核免疫に於ける血中抗体の役割，京大結研紀要，8.(2)掲載予定
- 2) Cole, L.R., Favour, C.B. : Correlations between plasma protein fractions, antibody titers, and the passive transfer of delayed and immediate cutaneous reactivity to tuberculin PPD and tuberculopoly saccharides, J. Exp. Med., 101, 391(1955).
- 3) Nicolle, M. : Étude sur la morve expérimentale du cobaye, Annales de l'Institut Pasteur, 20, 801(1906).
- 4) Opie, E.L. : The relation of antigen to antibody (precipitin) in the circulating blood, J. Immunol., 8, 55 (1923).
- 5) Opie, E.L. : Desensitization to local action of antigen (Arthus phenomenon), J. Immunol., 9, 247 (1924).
- 6) Cannon, P.R. and Marshall, C.E. : Studies on the mechanism of the Arthus phenomenon, J. Immunol., 40, 127(1941).
- 7) Grove, E.F. : Studies in anaphylaxis in the rabbit, J. Immunol., 23, 101(1932).
- 8) Kahn, R.L. : Studies on tissue reaction in immunity, J. Immunol., 25, 295 (1933).
- 9) 武田勝男他：シンポジウム「免疫とアレルギー」：アレルギー，1，3 (1953)。
- 10) Kunkel, H.G. : Methods of Biochemical Analysis. 1, 141 (1954).
- 11) 中村弘：澱粉を支持体とする Zone electrophoresis, 生物物理化学, 3, 58 (1956), 医学領域に於ける生化学実験法, 医学書院, 東京・大阪, 345(1959)
- 12) Svedverg, T., Pedersen K.O. : The ultracentrifuge, Clarendon Press, Oxford (1940).
- 13) Tiselius, A. : Electrophoresis of serum Globulin. I, Biochem. J., 31, 313 (1937).
- 14) Tiselius, A. : Electrophoresis of serum globulin. II, Biochem. J., 31, 1464 (1937).
- 15) Tiselius, A. : Electrophoresis of immune serum, Science, 87, 416 (1938).
- 16) Turba, F. & Esser, H. : Angew. Chem., 65, 256(1953).
- 17) Smithies, O. : Zone electrophoresis in starch gels, Biochem. J., 61, 629 (1955).
- 18) Coolidge, T.B. : A simple cataphoresis apparatus, J. Biol. Chem., 127, 551 (1939).
- 19) Kunkel, H. G. & Slater, R. G. : Zone Electrophoresis in a starch supporting medium, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 80, 42 (1952).
- 20) Consden, R., Gordon, A.H., Martin, A. J. P. : Ionophoresis in silica jelly, Biochem. J., 40, 33 (1946).
- 21) Sanger, F.H., Tuppy, H. : The amino-acid sequence in the phenylalanyl chain of insulin, Biochem. J. 463 (1951).
- 22) Strain, H. H. : On the combination of electrophoretic and chromatographic adsorption methods, J. Am. Chem. Soc. 61 (1), 1292 (1939).
- 23) Haglund, H., Tiselius, A. : Acta Chem. Scand., 4, 957 (1950).
- 24) Bernfeld, P., Nisselbaum, J. S. : A modified method for protein separation by zone electrophoresis on a starch gel, J. Biol. Chem., 220, 851 (1956).

- 25) 緒方富雄：血清学の領域から，河出書房，東京，（1945）．
- 26) 緒方富雄，鈴木達男，村上省三：アルチュス現象と沈降抗体価，日本病理学会誌，42(総)，153（1953）．
- 27) 吉田長之，住友健治：試験管内抗体と Arthus 現象抗体の一元性に関する実験的研究，アレルギー，1，171（1952）．
- 28) Coca, F., Kosakai, M. : Studies in anapylaxis, J. Immunol., 5, 197(1950).
- 29) 前川孫二郎：アレルギーをどう考えるべきか，日本臨床，8，5（1950）．
- 30) 小野江為則，特異的脱感作療法の理論，新臨床，4，99（1950）．
- 31) 小野江為則，細菌性アレルギーと異種蛋白アレルギー，アレルギー，2(2)，57（1952）