原　著

抗体に関する化学的研究

第一報　溶血素に就て

和昭32年4月30日受付

信州大学医学部生化学教室
手塚晃次

1890年 Behring 及び北里両氏[1] が Diphtheria 及び破傷風に罹患せしめた家兎血清中に此等両菌に対する免疫抗体の存在を認めて以来，種々の細菌に対する免疫抗体が相ついで発見された。即ち Pfeiffer 及び Issaeff[2][3]は1894年 Cholera 菌に対する溶菌素を発見し，1895年 Bordet[4]は溶菌素による溶菌現象には血清中の加熱に対して不安定な要因と，安定な要因との二つの協力によつて起ることを認め，Gruber 及び Durham[5]は1896年に細菌浮遊液に夫等の細菌にて感染せしめた動物の血清を加へると細菌は凝集されて沈澱することを確めた。次いで Kraus[6]はその翌年 Cholera 菌の透明な培養液に Cholera 菌感染動物の血清を加へると混濁を生ずることを観察した。

此等の免疫抗体は夫々溶菌素，凝集素，沈降素などと呼ばれる処のものである。

抗体と言ふ名称はかゝる病原性細菌に対するものゝみでなく，死菌或は異種動物の赤血球，蛋白質等の注射によつて血清中に生ずる特殊生成物に対しても用いられる。血球の注射により生ずるものを凝集素及び溶血素と称し，異種蛋白質の注射により生ずるものを沈降素，補体結合性抗体と言ふ。

抗体の化学的本態に関しては1900年 Landsteiner が溶血素が血清中の Globulin 劃分に移行することを発見して以来，此を可及的純粋の状態に分離し，その化学的本態を明らかにせんとする実験が多数行はれている。

抗体の精製には Mellanby[7]は低温に於て Alcohol によつてDiphtheria抗毒素の大部分を変性せしめることなく分離し，Eisller 等[8]は抗体を水酸化 Alminium に吸着させ，稀 NaOH 溶液により抽出することによつて Thyphus 菌に対する凝集素を精製している。

此の他尚は電気泳動法，中性塩による塩析法などが抗体の精製に利用されている。小酒井[9]は赤血球溶血素を吸着物から蔗糖溶液により抽出することに成功した。

溶血素の化学的本態に関しては未だ確定的な研究は行はれていない。一般に此は免疫血清中の Globulin 劃分に含まれ，且つ加熱，Alcohol 又は酸，Alkali によつて変性を受けると言ふことは蛋白質と全様であると一致した意見である。

著者は本実験に於て溶血素を可及的純粋な状態に分離し，この化学的本態を窺い，同時に従来免疫操作中に抗体生成と同時に増量すると言はれている血清 Lipoid と抗体との関係を観察した。

実験及結果

1）溶血素の生成及び分離

（a）溶血素血清の調成

実験動物としては成熟家兎を用いた。此れを生理的食塩水を以て洗滌液に Biuret 反応が消失するまで充分に洗滌した緬羊血球の3％浮遊液を以て毎回 1.0cc. 7日間隔で耳静脈内注射により3回免疫し，最後注射より7日目に試験採血し，その2000倍以上の稀釈血清 0.5cc. が充分の補体の存在の元で3％緬羊赤血球浮遊液 0.5cc. を完全に溶血するものを実験に供した。

（b）溶血素の分離

従来抗体は血清中の Globulin 劃分に移行すると称せられているが，他の血清中の蛋白質劃分の溶血素に対する補助的作用の有無を検するため次の実験を行つた。

10倍稀釈抗血清に飽和目 Na_2SO_4 溶液（37°C 恒温中に保存する）を加へてその濃度を 13.5％とし充分に混和した後2時間室温に放置し遠心沈澱により上清と沈澱（Euglobulin-劃分）とに分かつ。沈澱は更に13.5％ Na_2SO_4 溶液にし3回洗滌する。上清液に更に飽和 Na_2SO_4 溶液を加へてその濃度を 21.5％となし全様に室温に2時間放置した後遠心沈澱によつて上清と沈澱（Pseudoglobulin 劃分）とに分劃する。沈澱は 21.5％ Na_2SO_4 溶液にて3回洗滌する。上清に結晶 Na_2SO_4 を加へて飽和せしめ生じた沈澱（Albumin）を遠心沈澱により集める。

3劃分を夫々少量の蒸溜水に溶解し Collodium 膜を用いて加圧しつゝ流水下に透析し内溶液に SO''_4 の反

応が消失するに至らしめる。各劃分を蒸溜水を以つて原抗血清の $^1/_8$ 量となし食塩を0.85%の濃度に溶解する。各々を次表の組合せにて同量づつ混合する。

一列の試験管に各組合せの50, 100, 200, ……倍稀釈液を夫々0.5cc.宛とり，此等に3%綿羊血球浮遊液0.5cc.及び2単位宛の補体（海猿血清0.5cc.の3%綿羊赤血球を充分の溶血素の存在の元に完全に溶血せしめる補体量を1単位とする）を加へ37°C 1時間半保つた後その溶血度を検する，その結果は第1表に示す。

表中（卅）は完全溶血，（－）は溶血完全陰性，（卄），（＋）及び（±）はその中間の溶血度を示す。

この結果より溶血素は抗血清のPseudoglobulin劃分のみに含有せられ，而かも他の蛋白質劃分は溶血作用には関係なく且つ之に対して補助的作用をも呈しないことが明かである。従つて以下の実験では抗血清のPseudoglobulin劃分を上記の方法により分離して実験に使用した。

2）抗血清中Lipidと溶血素生成との関係

血清中のLipid含有量は免疫操作によつて増加を示す事実より抗体そのものとLipidと直接の関係があると考へている研究者もある。Danysz-Michel, Laskownicki⑩及びIonesco-Mihaesti及びDamboviceanu⑪は夫々家兎或は馬をParatyphus菌で免疫すると抗体生成と同時に血清Cholesterinの増量を来すことを報告している。殊に後者はCholesterin含有量は抗血清の凝集素価と平行することを報じている。

Felton及びKaufamaunは動物をⅠ型又はⅡ型肺炎菌で免疫する時にはその血清中にAlcohol及びEther溶性の物質が増加して来ることを観察した。又反対にMarie⑫等は種々の馬抗血清は正常馬血清よりもそのCholesterin含有量が減少していると言つている。

著者は先づ溶血素の生成に対し血清Lipid含有量の増加が必然的の経過か否かを明らかにするため，次の実験を行つた。

（a）溶血素血清の各Lipid含有量

本実験に於てはLipidの分析に供した正常家兎血清は何れも家兎を一夜空腹にした後採血して室温に放置して凝固せしめ遠心分離により採集した。

血清Lipidの定量はBloor法⑫によつた。

Lipidの抽出

100cc.のMessflask中で70ccの煮沸Alcohol-Etrer混合液（3：1）に1cc.の血清をflaskを回転しつゝ添加し，数分間加温浸出した後，室温に冷却しAlcohol-Ether混合液を以て100cc.に稀釈する。

総Lipidの定量

第1表　抗血清蛋白各劃分の溶血試験

A

劃分＼稀釈度（倍数）	50	100	200	500	1000	2000	5000
Albumin	－	－	－	－	－	－	－
Pseudoglobulin	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Euglobulin	－	－	－	－	－	－	－
Alb＋Pseudoglob	卅	卅	卅	卅	卅	＋	－
Alb＋Euglob	－	－	－	－	－	－	－
Preudoglob＋Euglob	卅	卅	卅	卅	卅	＋	－
Alb＋Pseudoglob＋Euglob	卅	卅	卅	卅	卅	＋	－
原抗血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卄

B

劃分＼稀釈度（倍数）	50	100	200	500	1000	2000	5000
Albumin	－	－	－	－	－	－	－
Pseudoglob	卅	卅	卅	卅	卅	卅	－
Euglobulin	－	－	－	－	－	－	－
Alb＋Pseudogl	卅	卅	卅	卅	卅	卅	－
Alb＋Euglob	＋	＋	－	－	－	－	－
Preudoglob＋Euglob	卅	卅	卅	卅	卅	卅	－
Alb＋Pseudoglob＋Euglob	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卄
原抗血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卄

C

劃分＼稀釈度（倍数）	50	100	200	500	1000	2000	5000
Albumin	－	－	－	－	－	－	－
Pseudoglob	卅	卅	卅	卅	卅	＋	－
Euglobulin	－	－	－	－	－	－	－
Alb＋Pseudogl	卅	卅	卅	卅	卅	＋	－
Alb＋Euglob	－	－	－	－	－	－	－
Pseudoglob＋Euglob	卅	卅	卅	卅	卅	卄	－
Alb＋Pseudoglob＋Euglob	卅	卅	卅	卅	卅	卄	－
原抗血清	卅	卅	卅	卅	卅	卅	－

上記浸出液30cc.をとり，蒸発乾固し15ccのEtherに溶解し不溶分を除去しその5cc.をとつて更に蒸発乾固し，之に少量のNicloux試薬を加へて煮沸水浴中にて2時間加熱して之を酸化する。冷却後20cc.の水及び1cc.の40%沃度加量溶液を加へて $^N/_{25}$ Na-thiosulphate溶液で数滴の1%澱粉溶液を標試薬として滴定する。所要Na-thiosulphateのcc数をAとする。

燐脂質の除去

上記Ether溶液10ccをEllenmeyerflaskにとり，水浴上にて濃縮した後少量のAcetonと$MgCl_2$ Alcohol

溶液数滴とを加へ室温に30分間放置した後濾過により生じた沈澱(燐脂質)を除く此の濾液をEtherで10cc.となし，その5cc.を用いてNicloux試薬を用い上述と全様の方法によつて酸化した後 $^{N}/_{25}$ Na-thiosulphate溶液にて滴定する所要Na-thiosulphate液のcc数をBとする。

Cholesterin の除去

上記Ether溶液5ccをとり，5ccのAccton及び1.0ccの0.2% Digitonin-Alcohol溶液を加へて水浴上に蒸発乾固する。これを再びEtherに溶解して濾過する。濾液を上記の様にNicloux試薬にて酸化 $^{N}/_{25}$ Na-thiosulphate溶液にて滴定する。所要Na-thiosulphate cc.数をCとする。

鹸　化

20cc.の上記Alcohol-Ether浸出液をとり，数滴の飽和NaOH溶液を加へ加熱鹸化する。これを1M燐酸で中和した後8cc.の石油Etherを加えて数分間加温する。これをflaskに移し蒸発させ，Fthereにして10cc.に溶解する。この5cc.をとつて前記と同様にNicloux試薬で酸化した後Na-thiosulphateで滴定する。所要Na-thiosulphate cc数をD_1とする。

総 Cholesterin の除去

上記5cc.のEther溶液に1ccの0.2% Digitonin-Alcohol溶液を添加し水浴上にて蒸発乾固する。残渣をEtherに溶解し濾過する。濾液について同様にNicloux による酸化Na-thiosulphate溶液にて滴定を行ふ。所要Na-thiosulphate cc数をD_2とする。

次の式により各Lipid含有量を計算した。

1) 燐脂質$=\frac{(B-A)T}{2.82}\times\frac{1}{2.5}\times\frac{100}{0.1}$ (mg/dl)

2) 遊離Cholesterin$=\frac{(C-B)T}{3.92}\times\frac{1}{2.5}\times\frac{100}{0.1}$ (mg/dl)

3) 総Cholesterin$=\frac{(D_2-D_1)T}{3.92}\times\frac{1}{2.5}\times\frac{100}{0.1}$

4) 中性脂肪$=\left[(B_1-C)T\times\frac{1}{2.5}\times\frac{100}{0.1}-\text{Cholesterinester}\times 9.8\right]\times\frac{1}{9}$ (mg/dl)

5) 総脂酸$=\frac{(B_1-D_2)T}{3.60}\times\frac{1}{2.5}\times\frac{100}{0.1}$ (mg/dl)

B_1：盲験に於ける所要Na-thisulphate cc数
T：Na-thiosulphate の factor

此の方法により家兎の正常時に於ける血清のLipid各劃分の含有量を測定した後家兎数週間飼養して正常状態に返つた後上記の如く綿羊赤血球による免疫操作を行い溶血素の力価が一定度に達したものゝ血清につきLipidの定量を行い正常時のものと比較した。

その実験結果は第2第3表に示す。

第2表　正常家兎血清の各脂質含有量　(mg/dl)

家兎番号	体重 kg	総脂質	総脂酸	中性脂肪	燐脂質	総Cholesterin	遊離Cholesterin	結合Cholesterin
1	2.4	369	215	70	132	163	55	108
2	2.3	319	195	69	105	134	37	97
3	2.5	359	215	63	110	179	91	88
4	2.4	412	195	101	126	180	56	124
5	2.6	414	203	131	118	175	63	112
6	2.3	409	140	54	138	212	70	132
7	2.1	339	230	74	121	141	43	98
8	2.2	349	140	73	127	154	60	94
平均		383.5	189.1	89.5	122.1	167.2	59.3	106.6

第3表　免疫家兎血清の各脂質含有量　(mg/dl)

家兎番号	体重 kg	総脂質	総脂酸	中性脂肪	燐脂質	総Cholesterin	遊離Cholesterin	結合Cholesterin
1	2.5	459	325	146	33	284	110	174
2	2.5	462	272	143	53	258	107	151
3	2.6	558	153	105	91	304	118	186
4	2.6	596	282	154	130	314	98	206
5	2.8	510	435	132	113	261	131	130
6	2.5	660	260	225	121	305	120	185
7	2.4	568	322	161	88	317	161	150
8	2.4	536	262	181	87	265	122	143
平均		543.6	283.8	155.8	89.5	288.5	120.8	163.6

第4表　免疫前家兎血清の Lipid 含有量　(mg %)

家兎番号	体重 kg	総脂質	総脂酸	中性脂肪	燐脂質	総 Cholesterin	遊離 Cholesterin	結合 Cholesterin
9	2.0	401	170	105	99	204	63	141
10	1.9	344	226	92	111	141	83	58
11	2.1	471	105	144	130	197	93	105
平均		405.3	167	113.6	113.3	180.1	83	101.3

第5表　同種赤血球にて免疫した家兎血清の Lipid 含有量　(mg %)

家兎番号	体重 kg	総脂質	総脂酸	中性脂肪	燐脂質	総 Cholesterin	遊離 Cholesterin	結合 Cholesterin
9	2.1	527	230	191	90	246	54	192
10	2.1	385	193	131	89	165	32	133
11		470	310	119	80	276	33	243
平均		460.8	244.3	147	863	239	43	189.3

この同種赤血球にて免疫した家兎血清には勿論溶血素の生成は認められなかつた

第6表　免疫前家兎血清の各 Lipid 含有量　(mg %)

家兎番号	体重 kg	総脂質	総脂酸	中性脂肪	燐脂質	総 Cholesterin	遊離 Cholesterin	結合 Cholesterin
12	2.5	318	205	72	118	130	53	77
13	2.4	338	180	70	107	161	46	115
14	2.3	365	208	88	120	155	64	91
15	2.6	359	188	84	133	142	48	94
16	2.4	351	199	79	117	155	58	97
平均		346.2	196	78.6	119	148.6	53.2	94.8

第7表　Gelatin にて免疫した家兎血清各 Lipid 含有量　(mg %)

家兎番号	体重 kg	総脂質	総脂酸	中性脂肪	燐脂質	総 Cholesterin	遊離 Cholesterin	結合 Cholesterin
12	2.6	375	183	74	128	173	73	100
13	2.6	468	209	98	112	258	90	168
14	2.5	428	233	90	127	212	68	144
15	2.7	484	189	97	126	263	99	164
16	2.5	428	220	99	127	202	81	121
平均		432	206.8	91.6	124	221.6	82.2	139.4

此等の結果から溶血素血清では正常血清に比して明らかに脂質含有量が増加していることを知る。即ち総脂酸，中性脂肪，総 Cholesterin が明らかに増加を示している，Cholesterin では結合型，遊離型は何れも増加を示す。これと反対に燐脂質は稍々減少を来す。

（b）同種血球或は非抗元性蛋白免疫による血清の Lipid の含有量の観察

前実験によつて溶血素血清に於ては正常血清に比して Lipid 含有量が増加していることを知つたが，これが果して抗体生成と直接に関係あるか否かを知るために次の実験を行つた。

家兎についてその正常時の血清の Lipid 各劃分の含有量を測定した後，他の家兎の赤血球を以つて綿羊赤血球の場合と同方法にて免疫した時及び典型的な蛋白質にかゝはらず，抗元性を有しない Gelatin の1%溶液で3回免疫した時の血清中の Lipid 含有量を測定しそれ等を比較検討した。

Gelatin 免疫家兎には勿論 Gelatin に対する抗体の発

生を認めなかつた。

以上の実験により非抗元性の同種血球或は Gelatin の注射により血清内各 Lipid 含有量は，抗体の生成の行はれないにもかゝはらず免疫血清に於けると同様に略同程度に増加していることを知る。

（c） 正常及び溶血素血清の Pseudoglobulin 劃分の脂質含有量の比較

前実験で溶血素はその Pseudoglobulin 劃分に含有されることが明らかであり，且つ免疫血清には Lipid 各劃分が著明に増量していることを知つたのでこの Lipid が溶血素と果して密接な関係があるか否かを知るため先ず，正常血清及び溶血素血清より Na_2SO_4 による塩析法により調製した Pseudoglobulin 劃分中に含まれる脂質を定量比較した。

両種血清より上記の方法で Pseudoglobulin を製し，濾紙間に圧搾して水分を除去した後風乾々燥しその一定量を Soxlet 装置にて Etherを用いて数時間抽出し，Ether 溶液を蒸発乾固し，その重量を以て総脂質量とした。その結果第8表の通りである。

第8表 正常及び溶血素血清 Pseudoglobulin の脂質含有量の比較 （g %）

	正常血清 Pseudoglobulin	溶血素血清 Pseudoglobulin
	3.85	4.94
	3.50	4.37
	4.16	4.49
	4.15	4.49
	3.33	4.51
平均	**3.798**	**4.56**

即ち血清 Pseudoglobulin 劃分に含まれる脂質量は正常血清 Pseudoglobulin 劃分に比し，溶血素を含む Pseudoglobulin 劃分の方に遙かに多くなつている。

（d） Pseudoglobulin 劃分の溶血作用に及ぼす脱脂加熱及び蛋白酵素作用の影響

Pseudoglobulin 劃分の溶血作用に対して，免疫操作によりその中に増加している脂肪が果して，向なる役割を果すかを知る為，溶血素血清 Pseudoglobulin 劃分より蛋白質部分の変性をさけつゝ出来る丈け完全に脂質を除去しその溶血作用に及ぼす影響を観察した。Pseudoglbulin を −15°C以下の温度で少量宛の Alcohl 次いで Ether にて各々数回宛可及的迅速に且つ充分に抽出を行い，残渣を真空中にて速かに乾燥せしめた後少量の食塩溶液に溶解しその溶血作用を検した。次表にその結果を示す。

第9表 脱脂 Pseudoglobulin 劃分の溶血作用

No. of Rabbit	稀釈度（倍数）	25	50	100	200	500	1000	2000
	原	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	−	−
	Pseudoglbulin	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	−

次ぎに Pseudoglobulin 劃分の蛋白質分のみの変性又は分解を行いつゝその溶血作用に及ぼす影響を観察した。

加 熱

溶血素血清より分離した Pseudoglobulin 劃分の食塩水溶液を凝集試験管（1.2cm×7cm）に容れ水浴中にて次に示す各温度に各時間加温しその溶血作用の消長を検した。その結果は第9表に示す。

第9表

加熱温度	加熱時間（分）	Pseudoglobulin溶液稀釈度（倍数） 25	50	100	200	500	1000	2000
60°C	15	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋
	30	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	−
	60	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	−
	90	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	−	−
75°C	15	＋	−	−	−	−	−	−
	30	−	−	−	−	−	−	−
85°C	15	−	−	−	−	−	−	−
対照		＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋

蛋白酵素の作用

蛋白酵素として Merck の Trypsin を用い之を Willstatter 法にて精製して混雑する微量の Lipase 作用を消失せしめたものを実験に供した。この酵素力価を Fludglos 法にて測定した後その一定量を Pseudoglobulin 溶液に pH 8.0 にて一定時間作用せしめた後中和し 56° C 30分間加温して酵素作用を停止せしめその溶血作用を検した対照実験としてはこの酵素液を予め加熱不活性化したものを同様に作用させた Pseudoglobulin 溶液を用いた。その結果を第10表に示す。

溶血素血清 Pseudoglobulin 劃分の溶血作用は低温に於て Alcohl-Ether を用いて混在する脂質を除去してもその溶血作用は消失しない。反対に加熱により蛋白質分を変性せしめることにより，又は Trypsin により分解することにより消失する。即ち Pseudoglobulin の溶血作用はその内に含まれる脂質によるものでなく，

第10表　溶血素血清 Pseudoglobulin 劃分の溶血作用に対する Trypsin作用の影響

Pseudoglobulin 溶液稀釈度	25	50	100	200	500	1000	2000
試験 Ⅰ	＋	－	－	－	－	－	－
対照実験	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋	－
試験 Ⅱ	－	－	－	－	－	－	－
対照実験	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	－	－
試験 Ⅲ	＋	＋	－	－	－	－	－
対照実験	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋

蛋白質分に帰因するものと考へられる。

3)　正常及び溶血素血清の Pseudoglobulin 劃分の比較

前記の実験によつて溶血素は抗血清の Pseudoglobulin 劃分に含まれ，それに含有される脂質は溶血素作用には関係しないことを知つたので免疫によつて血清中に Pseudoglobulin 劃分が増加するや否やを知るため本実験に於ては正常血清及び溶血素血清中の Pseudoglobulin の含有量を測定比較して，之が免疫成立によつて増加しているか否かを検し，更に両種 Pseudoglobulin の Amino 酸組成を分析比較した。

（a）　含有量の比較

正常血清及び溶血素血清の各10倍稀釈溶液に Na_2SO_4 を加へて13.5%濃度とし沈澱を除去した上清液について窒素含有量。

(A)を測定し，次いでこの上清液に更に Na_2SO_4 を加へて21.5%濃度となし，遠心沈澱により分離した上清液について窒素含有量 (B) を測定し，A－Bを以て血清中の Pseudoglobulin 窒素とした。即ち (A－B)×6.25 を以て血清の Pseudoglobulin 含有量を表はす。窒素量は Microkjeldahl 法により測定した。

この結果を第11表に示す。

第11表　正常家兎及び家兎溶血素血清の Pseudoglobulin 含有量の比較　(g %)

	正常血清	溶血素血清
	0.482	0.628
	0.451	0.617
	0.463	0.629
	0.448	0.639
	0.456	0.609
平均	0.460	0.6244

（b）　両種 Pseudoglobuliu 及び精製溶血素の Amino 酸組成の比較

正常家兎血清及び家兎溶血素血清より Na_2SO_4 塩析法により分離した Psendoglobulin 及び精製した溶血素について，比較的蛋白質の特性に著しい影響を与えると考へられる Amino 酸，Trypsin，Tryptophan，Arginiu，Cystin，及び Hystidin の定量を行い之等を比較検討した。溶血素の精製には溶血素血清より分離した Pseudoglobulin の１%食塩水溶液に３%の濃度に充分に洗滌した綿羊赤血球を加へて37°Cに一時間，時々静かに攪拌しつゝ放置した後，遠心沈澱によつて赤血球を集め之れに３倍量宛の５%葡萄糖溶液にて56°Cに於て20分間宛３回抽出する。抽出液を集めて加圧の下に Collodium 膜にて透析する。この一定量につき窒素量を測定しそれに 6.25を乗じて Pseudoglobulin の濃度とする。Amino 酸の定量は Pseudoglobulin 溶液に５倍量の 6N 塩酸を加へて24時間煮沸して加水分解し，之を減圧濃縮して塩酸を除去した後少量の一定の水に溶解した。Cystin の定量には熱塩酸によるその分解を妨ぐため加熱加水分解時間を４時間とした，Tyrosin は Folin の Phenol 試薬法[12]，Tryptophan は P. Dirnethylaminobenzaldehyd 法[13]，Arginin は坂口氏法[14]，Cystin は Folin法[15]，Histidin は Pauli 法[16]により夫々定量した。

その結果は第12表に示す。

第12表　正常家兎及び家兎溶血素血清の Pseudoglobulin 及び精製溶血素の組成 Amino 酸　(g %)

Amino酸種類	正常家兎血清 Pseudoglobulin	家兎溶血素血清 Pseudoglobulin	精製溶血素
Tyrosin	3.7	3.4	3.2
Tryptophan	4.3	4.5	4.3
Cystin	1.7	1.8	1.9
Hystidin	2.1	2.6	—
Arginin	4.7	4.9	—
平均	3.3	3.44	

以上の結果から綿羊赤血球免疫家兎血清は正常家兎血清に比較して Pseudoglobulin含有量が可成り増加している。而して両種 Pseudoglobulin及び赤血球による吸収により精製した溶血素の組成 Amino 酸の含有量は本実験で分析した限りの Amino 酸に於ては著しい相異を示さない。

4)　正常家兎及び家兎溶血素血清の Pseudoglobulin の免疫学的差

前の実験に於て正常家兎血清及び家兎溶血素血清より分離した Pseudoglobulinはその数種の組成 Amino

第13表　　補体結合反応

家兎番号	抗体誘起質	抗体検査質	補体単位 2	4	6	8	対照試験 血清＋補体	検査質＋補体
2	溶血素血清 Pseudoglobulin	同左	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋
3	〃	〃	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋
4	〃	〃	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋
2	〃	正常家兎血清 Pseudoglobulin	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋
3	〃	〃	＋＋	＋＋	＋＋	＋＋	＋	＋
4	〃	〃						

酸の含有量によつて区別することは困難であつた。本実験にては両者の間に免疫学的差異を認め得るや否やを検した。

溶血素血清 Pseudoglobulin の 1％食塩水溶液毎回 1.0cc. にて家兎を 3～5 回，1 週間毎に耳静脈内注射により免疫を行い，最後の注射より 1 週間後に採血して抗体生成有無を補体結合反応により検した。

その結果は第 3 表に示す。

次表中に於て家兎を免疫する為注射に用いた物質を抗体誘起質，免疫血清中に抗体の有無を検する為に血清反応に於て用いた物質を抗体検査質と記した。

家兎溶血素血清 Pseudoglobulin は正兎に対して抗元性を有しない。即ち溶血素血清 Pseudoglobulin は正常家兎に対して抗元性を有せず，両種 Pseudoglobulin は免疫学的にも区別し難いものである。

総括並に考察

免疫抗体の化学的本態を知るため，先づ家兎を緬羊赤血球にて免疫して得た溶血素血清を用いて実験を行つた。従来免疫抗体は免疫血清中の Globulin 劃分中に移行すると考へられているが，著者は之れを溶血素について確かめ，尚ほ Globulin を更に Euglobulin と Pseudoglobulin に分劃する時の溶血素の動向及び血清中の各蛋白質劃分が溶血素の作用に対して如何なる補助的効果があるや否やを検した。

即ち Na_2SO_4 塩析法によつて免疫血清を Euglobulin (Na_2SO_4 13.5％にして塩析) Pseudoglobulin (Na_2SO_4 21.5％にて塩析) 及び Albumin (Na_2SO_4 全飽和にて塩析) の 3 劃分に分かつと，溶血素による溶血反応は Pseudoglobulin 劃分にのみ認められ，他の劃分には全く認められず，且つ Euglobulin, Albulin 劃分を単独に又は同時に Pseudoglobulin 劃分に添加しても何れもその溶血作用に影響を与へないことを観察した。即ち溶血素は免疫血清中の Pseudoglobulin 劃分にのみ存在し，他の劃分は之を含まず又 Pseudoglobulin の該作用を補助する作用をも有しない。

電気泳動法によつて血清蛋白質を分劃し，抗体の移動傾向を調べた実験は多く行なはれているが，動物により，又同じ動物でも抗元の種類によつて差はあるが常に Globulin 劃分に，更に大部分は γ-Globulin に含まれる。家兎では一般の抗元で免疫した時には殆んど常に γ-Globulin に移行し稀には β-Globulin に行くと言はれる。之はおそらく Pseudoglobulin と全一劃分と思はれる。各種免疫血清中には Lipid の含有量が増加していることは前記の通りであるが，この事実より免疫血清中の Lipid が抗体と直接関係ある如く考へる学者もある。実際に溶血素血清に於ても Lipid の各種のもの殊に中性脂質，総 Cholesterin の増量が著しい。併し血清中の Lipid の増加は Gelatin の如き非抗元性の蛋白質，又は同種族の血球で動物に免疫操作を施こす時には，抗体は生成されないにも抱はらず著明に起る処から，これは抗体の生成とは無関係な現象と思はれる。又免疫抗体の含有される Pseudoglobulin 劃分に Lipid の増量が認められるが，溶血素血清より Na_2SO_4 塩析法によつて分離した Pseudoglobulin 劃分から可及的に蛋白質の変性を避けて，Alcohol Ether にてその Lipid を除去してその溶血素価は減少を来さないし，尚且つ Pseudoglobulin に Lipase の混在が認められなくなるまで精製した Trypsin を作用せしめて分解を行うと溶血作用は消失する。又免疫血清 Pseudoglobulin 劃分水溶液を 75°C に 15分以上加熱するとその溶血作用は殆んど完全に失はれる。此等の事実から考へれば溶血素中に含まれる溶血素は Lipid 以外のもので而かも加熱並びに蛋白酵素に破壊される点より見て蛋白性物質と考へられる。

次ぎに正常並びに免疫溶血素血清について夫々の Pseudoglobulin の含有量を測定すると，免疫血清に於

ては正常血清の約1倍半の増加を認めた。此の溶血素血清中に増加しているPseudoglobulinと正常血清中のPseudoglobulinとの質的相異の有無を知るため，第一に両Pseudoglobulin水溶液を酸水解により分解し蛋白質の化学的性質に著しい影響を与へると思はれるAmino酸である。Histidin, Tryptophan, Arginin, Cystin, Tyrosinについてそれ等の含有量を定量比較した。又同時に溶血素を更に溶血素血清より精製したものについても同様実験を行つた。免疫抗体の精製は電気泳動による方法，塩析法，Alcohol法，吸着法等行はれているが，著者は対抗する赤血球に吸收せしめ之れより5%葡萄糖溶液を以て抽出することによつて精製し，その水溶液の窒素含有量より溶血素の濃度を算出したものに就いても同様の実験を行つた。その結果上記Amino酸含有量に関しては溶血素Pseudoglobulinと正常血清Pseudoglobulinとの間更に精製溶血素の間に於ては差異を認めることは出来なかつた。

第二に溶血素Pseudoglobulinと正常Pseudoglobulinとの免疫学的差異の有無を知るため，正常家兎を溶血素Pseudoglobulinの1%水溶液を以て3回乃至5回免疫したが抗体Pseudoglobulinに対しても亦正常家兎Pseudoglobulinに対しても抗体の生成を認めることが出来なかつた。

即ち溶血素Pseudoglobulinは正常Pseudogloglobulinとは化学的にも免疫学的にも相異を認めることは出来なかつた。

結　論

抗体の化学的本態を明らかにする目的を以て抗体として家兎血清中の抗緬羊赤血球溶血素を使用し此の化学的観察を行い次の結論を得た。

1) 溶血素は抗血清をNa_2SO_4で分劃する時にはPseudoglobulin劃分のみに移行し，他の劃分は溶血素作用に関して全く無関係である。

2) 溶血素血清の各種脂肪含有量は正常血清に比して燐脂質を除き一般に著明に増加している。又Na_2SO_4塩析法により分離したPseudoglobulin劃分に移行する脂質も全様に増加している。併しこの事実は溶血素生成には直接関係を有するものではなく，非抗元性蛋白質たるGelatin又は同種赤血球にて家兎を免疫する時にも認められる。

3) 正常家兎血清に於ては溶血素家兎血清に比してそのPseudoglobulinは著明に増量している。

両血清から分離したPseudoglobulin及び赤血球による吸着によつて精製した溶血素はその組成Amino酸たるTyrosin, Tryptophan, Cystin, Histidin及びAsginin に関してはその含有量に殆んど差異を認められない。

4) 溶血素家兎血清Pseudoglobulinを以て正常家兎を免疫するもそれに対する抗体の発生を認めない。

即ち溶血素は正常血清Pseudoglobulinと化学的にも亦免疫学的にも殆んど区別することが困難な蛋白質である。

(稿を終るに当り藤村教授の御指導を深謝する)。

参考文献

①Behring, Kitazato, Deutschemed, Wschr, 16, 1113 (1890). ②R. Pfeiffer, Issaeff, Z. Hyg. 17, 355 (1894). ③R. Pfeiffer, Z. Hyg, 18, 1 (1894). ④J. Bordet, Ann, Inst, Pasteur, 9, 462 (1895). ⑤M. Gruber, H. E. Durham, Münch, Med, Wschr, 43, 285 (1896). ⑥R. Kraus, Wein, Kein, Wschr, 10, 736 (1897). ⑦J. Mellanby, Proc, Roy, Soc, B. 80, 399 (1908). ⑧M. Eisler, M. Spiegel-Adolf, Biochen, Z. 204, 28 (1929). ⑨小酒井光次 J. Immunol, 3. 109 (1918). ⑩Danysz-Michel, M. Laskownicki, St, CR. SOC, Biolo, Paris 91 (1924). ⑪Inoesco-Mihaiesti, C. Dambovicanu, A. C. R, SOC, Biolo, Paris, 104 (1932). ⑫Marie, A. C. C. R. SOC. Biolo, Paris, 88 (1923). ⑬Bloor, WR. J. Biol, Chem, 77. 53 (1928). ⑭O. Folin, J. Biol. Chem, 73, 627 (1927). ⑮J. R. Spies, D. C. Chambers, Anal, Chem, 21, 1249 (1949). ⑯S. Sakaguchi, J. Biochem, 5. 25 (1925). ⑰O. Folin, A. D. Marenzi, J, Biol, Chem, 83, 109 (1929). ⑱M. T. Hanke, K. K. Kosseler, J. Biol, Chem, 43, 527 (1920).

Chemical Studies on Antibodies

I. On Hemolysine

Koji Teduka
Biochemical Institute, Medical Faculty,
Shinshu University, Matsumoto

The author studied to clarify the chemical nature of the antibody, using antisheep corpuscle hemolysine and the following results were obtained.

1) When the antiserum ig fractionated with Na_2SO_4, the hemolytic antibody moves only into the pseudoglobulin fraction, and the other fractions, such as albumin and euglobulin, are all inactive in hemolytic reaction.

2) The lipid content of the antiserum increases as compared with that of normal serum. But this

fact has no relation with the formation of hemolysine, for the increase can be seen even after the injection of nonatigenic protein such as gelatin or corpuscles of the same species.

3) The pseudoglobulin fraction of normal or immunized rabbit serum and the purified hemolysin indicate no differences concerning with the amino acid content such as tryptophan, arginine, histidine, cystine, and tyrosine.

4) The pseudoglobulin of immunized rabbit serum is not antigenic against normal rabbits.

Thus the hemolysine could not be distinguished from the pseudoglobulin of normal serum chemically or serologically.

プロトロンビンおよび不安定因子に関する研究

I. 不安定因子の測定法について

昭和32年5月1日受付

信州大学医学部松岡内科教室（指導：松岡松三教授）
荻　原　洋　三

緒　言

プロトロンビンがトロンビンに転化する際に，トロンボプラスチン，カルシウムイオンの他に血漿中の因子の存在が必要であることは，今日一般に認められる所である。こゝにいう不安定因子とはトロンビン形成に必要な血漿因子の一つであつて，Quick①が1943年に Component A of Prothrombin として始めて提唱し，後に Owren が V因子②又は Proaccelerin③，Seegers 等④⑤が Plasma Ac-Globulin と言つたが，現在では一般には不安定因子⑥またはV因子の名称で代表せられているものである。

不安定因子の測定法に関しては，Quick&Stefanini⑦，Stefanini⑧，Wolf⑨，Lewis & Ware⑩及び松岡，大屋⑪等によつて種々の方法が報告されているが，その測定に際して最も問題となる所は，不安定因子の消失した，すなわち不安定因子を含まない一定の血漿を如何にして得るかという事である。Quick⑦は蓚酸血漿を氷室に保存すると約2週間で不安定因子の消失した血漿を得るとし，Wolf⑨は37°Cの恒温槽に24時間保存した蓚酸血漿が，不安定因子の消失した一定の血漿として使用し得ると言つている。著者は，氷室に保存し保存日数を一定にした場合の血漿の不安定因子の消失の程度を，37°Cの恒温槽に24時間保存した血漿の場合と比較検討し，併せて不安定因子を測定する方法を考案したので報告する。

保存血漿の不安定因子の態度

（1） 氷室保存による血漿の不安定因子の消失の検討

Quick⑦は2週間以上氷室に保存した蓚酸血漿は，不安定因子の消失した一定の血漿であると述べているが著者の測定した健康者12例の氷室保存血漿の松岡一段法⑫⑬によるプロトロンビン時間の推移は表1及び図1に示した如く，2週間では20.2～38.6秒の間に，3週間では22.4～57.9秒の間に散在し，一定の不安定因子消失血漿を得る事が甚だ困難である。一方，Wolf⑨も言つている様に，如何に氷室保存とは言え長期に亘る保存は，血漿蛋白の変質，細菌感染等の危険が当然考慮されなければならない。従つて氷室保存血漿を用いて行う不安定因子の測定法は不適当と考える。

表1　蓚酸血漿氷室保存によるプロトロンビン時間の推移

実験例			氷室保存日数 / 才	前	7日	10日	14日	21日
上	○	♂	25	13.5″	23.0″	24.2″	25.5″	25.9″
小	○	♂	30	13.8	30.0	35.2	38.6	43.7
中	○	♂	28	13.2	20.1	20.9	22.0	26.2
今	○	♂	28	13.2	25.3	28.7	30.0	57.9
大	○	♂	16	13.3	19.7	20.2	27.8	49.6
望	○	♂	28	14.8	21.2	21.4	32.9	53.3
安	○	♂	30	14.1	15.6	17.6	25.0	39.5
西	○	♀	19	14.2	18.2	19.7	20.2	22.4
丸	○	♀	19	13.6	24.0	24.5	27.4	28.3
丸	○	♀	23	13.8	19.3	20.5	27.1	26.5
衣	○	♀	22	13.5	16.4	18.4	22.5	24.5
太	○	♀	28	15.0	16.2	20.9	24.2	34.1