

臓器特異性に関する化学的研究

(脊髓の臓器特異性)

— 統 報 —

昭和42年3月15日 受付

信州大学医学部 丸田外科教室
信州大学医学部生化学教室 (主任: 藤村紫郎教授)

小田 島 弘 明

Chemical Studies on the Organ Specificity

(Organ Specificity of Spinal Cord)

— Further Report —

Hiroaki Odajima

Prof. Maruta's Surgical Clinic, Shinshu University
Biochemical Institute, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. S. Fujimura)

緒 言

脊髓の血清学的臓器特異性は脊髓組織内の特殊蛋白質の存在に帰因するものではなく、血清学的に共通に作用する或る種の脂質の存在によるものであることは、既に横沢^①によつて報告されていた。更に著者は前報^②において、脊髓の臓器特異性には Cholesterol, Cephalin, Lecithin 及び Cerebroside 等が関与し、これらの脂質は単独では抗脊髓血清に対し活性は認められないが、種々に組合せた場合に、その中の数種類の組合せにおいて著明に活性が認められたことを報告した。

一方脳の臓器特異性に関しては藤村^③、桜井^④、Rapport^⑤らの報告があり、Rapport^⑤は脳の Cerebroside に Cholesterol + Lecithin (1:1) を加えたものを試験管内抗原とし、抗脳血清との補体結合反応において、その臓器特異的の活性を認め、脳に臓器特異性を与える脂質の一つは Cerebroside であると述べている。桜井^④は脳の Cerebroside に Cholesterol のみを加えたものでも著明に活性を認めており、脳の Cerebroside に Cholesterol を加えたものに Schlepfer として豚血清を用いて家兔を免疫し、脳の生理的食塩水抽出液と臓器特異的に反応する抗血清を得たと報告している。

著者の先の実験^②においても、脊髓より抽出精製した Cholesterol と Cerebroside の混合物が抗脊髓血清と臓器特異的に反応することが認められたので、脊髓の Cholesterol と Cerebroside を用いて家兔を免疫し、その抗血清を以つて脊髓の Cholesterol +

Cerebroside 及び生理的食塩水抽出液との反応を検したので、その実験結果を報告する。

実験の部

I Cholesterol 及び Cerebroside の抽出精製

a) Cholesterol: 馬、牛及び豚3種類についてそれぞれの脊髓組織粥に3倍量の Acetone を加えて数時間振盪抽出し、Acetone を替えてこれを3回反復して濾液を集め、蒸発乾固して水分も完全に蒸発させ、残渣を再び3倍量の Acetone に溶解し、不溶物を除いた濾液を蒸発乾固し、この操作を2回反復して Acetone 可溶性分を得た。この Ethanol 溶液 (2g/100ml) 1容を、1% Digitonin-ethanol 溶液 (75°C に加温) 10容に加え、少量の水を添加して75°C に30分間放置し、更に室温に一昼夜放置した後、濾過して沈澱物 (Cholesterol-digitonide) をとり、この沈澱物を Chloroform で十分に洗滌した後、Schoenheimer^⑥ の法により Cholesterol を遊離させて回収し、これを更に微量に残存する磷脂質を除くために40倍の Pyridin に溶解して10倍量の酸化 Aluminium の Column を通して精製した。

b) Cerebroside: 馬、牛及び豚3種類についてそれぞれの脊髓の Acetone 不溶の残渣を Ether で十分に抽出し、吸引濾過して残渣を乾燥させ、これに2倍量の90% Ethanol を加えて60°C で抽出し、熱時濾過して濾液を常温に一夜放置して析出物を取り、これを再び90% Ethanol で60°C で抽出し、不溶物を除いた濾液を氷室で冷却して析出物を取り、これを

表 1 Cholesterol 及び Cerebroside の分析

		N (%)	P (%)	Molisch 反 応	Liebermann-Burchard 反応	Hack ^② のスポットテスト	
						KIによる呈色	ニンヒドリンによる呈色
Cholesterol	馬 牛 豚		<0.005	-	卅	-	-
Cerebroside	馬 牛 豚	1.70 1.71 1.70	<0.005	卅	-	-	-

N は Micro-Kjeldahl 法により, P は Allen の法の変法^①により定量

Acetone 及び Ether で充分洗滌して粗 Sphingolipid を得た。これから Carter, Fujino^①の法により Cerebroside を精製した。

以上の方法で脊髄より得た Cholesterol 及び Cerebroside の分析結果は表 1 に示した。

表 2 脊髄の Cholesterol+Cerebroside (1:1) と抗脊髄血清による補体結合反応

抗体産生 抗 元	試験管内 抗 元	補 体 単 位						対 照	
		2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
馬	馬	-	-	-	-	-	-	卅	卅
"	牛	-	-	-	-	-	-		卅
"	豚	-	-	-	-	-	-		卅
牛	馬	-	-	-	-	+	卅	卅	
"	牛	-	-	-	-	+	卅	卅	
"	豚	-	-	-	-	+	卅	卅	
豚	馬	-	-	-	+	卅	卅	卅	
"	牛	-	-	-	+	卅	卅	卅	
"	豚	-	-	-	+	卅	卅	卅	

表 3 脊髄の Cholesterol+Cerebroside (3:1) と抗脊髄血清による補体結合反応

抗体産生 抗 元	試験管内 抗 元	補 体 単 位						対 照	
		2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
馬	馬	-	-	-	-	-	-	卅	卅
"	牛	-	-	-	-	-	-		卅
"	豚	-	-	-	-	-	-		卅
牛	馬	-	-	-	-	-	-	卅	
"	牛	-	-	-	-	-	-		
"	豚	-	-	-	-	-	-		
豚	馬	-	-	-	-	-	-	卅	
"	牛	-	-	-	-	-	-		
"	豚	-	-	-	-	-	-		

II 抗血清の調製

先の実験^②において調製した抗脊髄血清と脊髄より得た Cholesterol + Cerebroside との補体結合反応では, Cholesterol : Cerebroside が 1 : 1 よりも 3 : 1 の方が活性が著明 (表 2, 3) であることから, 上述の方法で馬, 牛及び豚 3 種類について同種の脊髄より得た Cholesterol と Cerebroside を 3 : 1 に混合し, この Ethanol 溶液 (20mg / 1ml) 1 容に, 生理的食塩水で 3 倍に稀釈した豚血清 30 容を加えてよく混和し, この 5 ml 宛を以つて家兎を 5 日間隔で 4 回静脈内注射により免疫を行なつた。この最終注射より 7 日後に全採血して血清を分離し, 補体を非働化して抗血清を調製した。

III 上記抗血清による補体結合反応

補体結合反応は Browning 法により, 一列の試験管にそれぞれ 10 倍稀釈抗血清を 0.5 ml, 補体血清を順次 2, 4, 6, 8, 10, 12 単位, 及び抗原 (溶血防止下量の半量) を各々に加え, 37°C で 1 時間反応させた後各管に 0.5 ml の感作血球を加えて, 再び 37°C で 1 時間 (15 分毎に振盪) 置いた後その溶血度を検した。表中の (卅) は完全溶血, (-) は完全不溶血, (+) 及び (卅) はその中間の溶血度を示す。対照の C₁ は抗原を用いずに 2 倍量の抗血清に 2 単位の補体血清を加えたもの, C₂ は抗血清を用いずに 2 倍量の抗原に 2 単位の補体血清を加えたものである。

上記抗血清は表 4 に示す如く馬, 牛及び豚 3 種類のいずれの脊髄の Cholesterol + Cerebroside と著明に反応し, 更に表 5 に示す如くこれら 3 種類のいずれの脊髄の生理的食塩水抽出液とも著明に反応することが認められた。

結 論

1) 馬, 牛及び豚 3 種類の脊髄を用い, 同種の脊髄の Cholesterol と Cerebroside との混合物で豚血清

表 4 脊髄の Cholesterol + Cerebroside (3:1) で豚血清を Schlepper として家兎を免疫して得た抗血清と、脊髄の Cholesterol + Cerebroside (3:1) による補体結合反応

抗体産生 抗 元	試験管内 抗 元	補 体 単 位						対 照	
		2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
馬	馬	-	-	-	-	-	-	卍	卍
"	牛	-	-	-	-	-	-		卍
"	豚	-	-	-	-	-	-		卍
牛	馬	-	-	-	-	-	-	卍	
"	牛	-	-	-	-	-	-		
"	豚	-	-	-	-	-	-		
豚	馬	-	-	-	-	-	-	卍	
"	牛	-	-	-	-	-	-		
"	豚	-	-	-	-	-	-		

表 5 脊髄の Cholesterol + Cerebroside (3:1) で豚血清を Schlepper として家兎を免疫して得た抗血清と、脊髄の生理的食塩水抽出液による補体結合反応

抗体産生 抗 元	試験管内 抗 元	補 体 単 位						対 照	
		2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
馬	馬	-	-	-	-	-	-	卍	卍
"	牛	-	-	-	-	-	-		卍
"	豚	-	-	-	-	-	-		卍
牛	馬	-	-	-	-	-	-	卍	
"	牛	-	-	-	-	-	-		
"	豚	-	-	-	-	-	-		
豚	馬	-	-	-	-	-	-	卍	
"	牛	-	-	-	-	-	-		
"	豚	-	-	-	-	-	-		

を Schlepper として家兎を免疫して得た抗血清は、いずれの脊髄の Cholesterol + Cerebroside 及び生理的食塩水抽出液とも著明に反応することが認められた。

2) 以上の実験結果から脊髄に臓器特異性を与える脂質性抗原の少くとも一つは Cholesterol + Cerebroside であると考えられる。

稿を終るに臨み、本研究を信大医学部生化学教室において行なうことに種々の御配慮を賜った丸田公雄教授、並びに本研究に対し直接の御指導と御校閲を賜った藤村紫郎教授に衷心より謝意を表します。また種々の御援助をいただいた生化学教室の諸先生方に深く感謝致します。

文 献

①Yokozawa, Y.: Med. J. Shinshu Univ., 2: 347, 1957
 ②小田島弘明: 信州医誌, 15: 533, 1966
 ③Fujimura, S.: J. Biochem., 34: 233, 1941
 ④桜井武彦: 第39回日本生化学会総会にて発表(京都, 1966年11月)
 ⑤Rapport, M. M. and Joffe, S.: Nature, 197: 60, 1963
 ⑥Schoenheimer, R. and Dam, H.: Z. physiol. Chem., 215: 59, 1933
 ⑦Carter, H. E. & Fujino, Y.: J. Biol. Chem., 221: 879, 1956
 ⑧Hack, M. H.: Bioch. J., 54: 602, 1953
 ⑨大村京生: 実験化学講座23, 生物化学 I, 531頁, 昭32, 丸善株式会社