

臓器特異性に関する化学的研究

(脊髄の臓器特異性)

昭和41年11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)

Hiroaki Odajima

Prof Maruta's Surgical Clinic, Shinshu University

Biochemical Institute, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. S. Fujimura)

緒 言

近年横沢^①は脊髄に臓器特異性のあることを、馬・牛及び豚の脊髄を用いて実験し、これら動物の脊髄には血清学的に共通に作用する脂質が存在することを報告した。

著者は更に実験を進め、脊髄に臓器特異性を与える脂質がいかなる種類のものであるかを追及したので、その実験結果を報告する。

実 験 の 部

I 抗血清の調製

馬、牛及び豚3種類の脊髄を用い、それぞれ髄膜及び血管を可及的に除去して、凍結させた後これを摺碎し、10倍量の生理的食塩水を加えて、Glasshomogenizerにて均一な乳液とし、低温室内で約2時間振盪抽出し、一夜放置した後、凝集塊を除去した濾液を遠心沈澱し、その上清をとり、これにその1/10量の正常家兎血清を加えて37°Cに1時間放置したもの3ml宛を以つて、家兎を静脈内注射により3~5回、4~5日間隔で免疫し、最終注射より数日後に抗体価の上昇を確認して全採血し、血清を分離して補体を非働化し、抗血清を調製した。

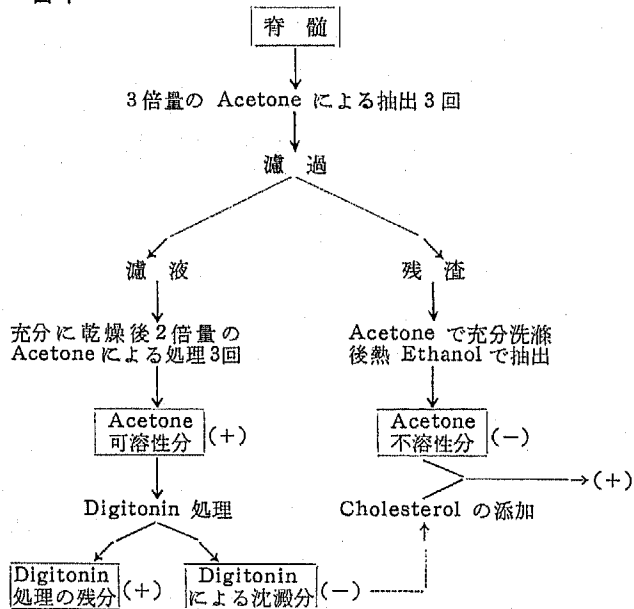
II 脊髄脂質劃分の抗原性

次のような順序で脊髄脂質を分劃

し、これらを抗原として抗脊髄血清との補体結合反応によつて、臓器特異性を有する劃分を追求した(図1)。

各脂質劃分は少量の Ethanol に溶解し、30倍量の生理的食塩水を以つて急速に稀釈し、その後30分乃至1時間半の間に抗原として使用した。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0.5ml、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

図 1



(+): 抗原性あり
(-): 抗原性なし

0.5ml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。表中の卍は完全溶血、-は完全不溶血、+及び卍はその中間の溶血度を示す。対照欄のC₁は抗元を用いずに2倍量の抗血清を用い、これに2単位の補体血清を加えたものである。C₂は抗血清を用いずに2倍量の抗元を用い、これに2単位の補体血清を加えたものである。

1) Acetone 可溶性分及び不溶性分の抗元性

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、40°C、CO₂気流中減圧下にて蒸発乾固し、水分も完全に蒸発させて残渣をとり、これを再び2倍量のAcetoneで抽出し、濾液を同様に蒸発乾固し、この操作を3回反復してAcetone可溶性分を得た。脊髓のAcetone不溶の残渣はAcetone及び水を完全に蒸発させた後、更に充分にAcetoneで洗滌し乾燥してから熱Ethanolで抽出し、この濾液を蒸発乾固してAcetone不溶性分を得た。これら兩劃分をそれぞれ少量のEthanolに溶解し、生理的食塩水で稀釈して、その各々について抗血清と補体結合反応を行なつた。

表1,2に見られる如く、脊髓組織の臓器特異的に作用する物質はAcetone可溶性分に移行し、Acetone不溶性分には移行は認められなかつた。Acetone可溶性分はAcrolein反応、Liebermann-Burchard反応が陽性であり、かつMolisch反応及びCdCl₂による沈澱反応が僅かに見られた(表3)。

2) Acetone 可溶性分の分割とその抗元性

上述の定性反応により、活性を有するAcetone可溶性分にはCholesterol, Glyceride、及び痕跡の磷脂質並びに糖脂質の存在を認めた。そこでこれを次のように分割し、その抗元性を検した。

乾燥Acetone可溶性分を少量の温Ethanolに溶解し、10倍量の1%Digitonin-ethanol溶液に加えて更に少量の水を添加し、これを75°Cに30分間放置して、更に室温に一昼夜放置後沈澱物を濾別した。濾液を一旦蒸発乾固して得た残渣をChloroformに溶解し濾過して過剰のDigitoninを除き、この濾液にDigitonin処理による沈澱物の乾燥後Chloroformで充分に洗滌し濾過した濾液を合して蒸発乾固した。一方Chloroformで洗滌した後の沈澱物すなわちCholesterol-digitonideはSchoenheimer²⁾の法により少量のPyridin(5ml/1g)に溶解して分解し、10倍量のEtherを加えてDigitoninを沈澱させ、遠心沈澱後上清を濾過してEther溶液(遊離したCholesterolを含む)をとり、これを蒸発乾固し

表1 Acetone 可溶性分の抗元性

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2 Acetone 不溶性分の抗元性

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	卍	卍	卍	卍	卍	卍
"	牛	卍	卍	卍	卍	卍	卍		卍
"	豚	卍	卍	卍	卍	卍	卍		卍
牛	馬	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	
"	牛	卍	卍	卍	卍	卍	卍		
"	豚	卍	卍	卍	卍	卍	卍		
豚	馬	卍	卍	卍	卍	卍	卍		卍
"	牛	卍	卍	卍	卍	卍	卍		
"	豚	卍	卍	卍	卍	卍	卍		

表3 Acetone 可溶性分の分析結果

Acrolein 反応	Liebermann- Burchard反応	CdCl ₂ によ る沈澱反応	Molisch 反応
+	卍	±	±

た。このAcetone可溶性分のDigitonin処理による残分及び沈澱分を、それぞれ少量のEthanolに溶解し、生理的食塩水で稀釈して、それらの抗元性を検した。

表4に見られる如く、乾燥Acetone可溶性分のDigitonin処理の残分には活性が認められ、定性実験ではAcrolein反応、CdCl₂による沈澱反応、及びMolisch反応が陽性を呈し、したがってGlyceride、磷脂質及び糖脂質の存在が考えられた。表5に見られる如く、Acetone可溶性分のDigitonin処理による沈澱分には活性は認められなかつた。

3) Acetone 不溶性分にCholesterolを添加した場合の抗元性

表 4 Acetone 可溶性分の Digitonin 処理の残分の抗元性

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	-	-	-	-	+	+	+	+
〃	牛	-	-	-	-	+	+	+	+
〃	豚	-	-	-	-	+	+	+	+
牛	馬	-	-	-	+	+	+	+	+
〃	牛	-	-	-	+	+	+	+	+
〃	豚	-	-	-	+	+	+	+	+
豚	馬	-	+	+	+	+	+	+	+
〃	牛	-	+	+	+	+	+	+	+
〃	豚	-	+	+	+	+	+	+	+

表 5 Acetone 可溶性分の Digitonin 処理による沈澱分の抗元性

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	+	+	+	+	+	+	+	+
〃	牛	+	+	+	+	+	+	+	+
〃	豚	+	+	+	+	+	+	+	+
牛	馬	+	+	+	+	+	+	+	+
〃	牛	+	+	+	+	+	+	+	+
〃	豚	+	+	+	+	+	+	+	+
豚	馬	+	+	+	+	+	+	+	+
〃	牛	+	+	+	+	+	+	+	+
〃	豚	+	+	+	+	+	+	+	+

表 6 Acetone 不溶性分の分析結果

Acrolein 反応	Liebermann-Burchard 反応	Molisch 反応	CdCl ₂ による 沈澱反応	Hack 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
-	-	+	+	+	+

1)の実験において脊髄の Acetone 不溶性分は活性を有しないことが明らかであるが、その定性実験では、Molisch 反応、CdCl₂による沈澱反応及びHack^④の Spot Test において、KI による呈色反応並びに Ninhydrin による呈色反応が陽性であり、Liebermann-Burchard 反応及び Acrolein 反応は陰性であった(表6)。この劃分に等量の Cholesterol (Acetone 可溶性分の Digitonin 処理による沈澱分)を加え、少量の Ethanol に溶解し、生理的食塩水で稀釈して、その抗元性を検し、表7の如き結果を得

表 7 Acetone 不溶性分に Cholesterol を添加した場合の抗元性

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	-	-	-	-	+	+	+	+
〃	牛	-	-	-	-	+	+	+	+
〃	豚	-	-	-	-	+	+	+	+
牛	馬	-	-	-	+	+	+	+	+
〃	牛	-	-	-	+	+	+	+	+
〃	豚	-	-	-	+	+	+	+	+
豚	馬	-	-	-	+	+	+	+	+
〃	牛	-	-	-	+	+	+	+	+
〃	豚	-	-	-	+	+	+	+	+

た。すなわち活性を有しない Acetone 不溶性分は Cholesterol を添加することによつて活性化されることが認められた。

Ⅲ 脊髄よりの脂質の精製及びそれらの抗元性

上述の実験によつては抗脊髄血清と反応する脂質は単一のものではなく、多様性と考えられ、それぞれの単独の脂質劃分の活性を換することは不可能であった。そこで脊髄より Cholesterol, Lecithin, Cephalin, 及び Cerebroside を可及的純粋に精製し、これら脂質の単独並びに種々に組合せたものについて、抗脊髄血清との反応を検した。

これらの脂質は次の方法によつて調製純化した。

a) Cholesterol: 脊髄の Acetone 可溶性分より Digitonin を用いて分離した Cholesterol-digitonide を Chloroform で洗滌した後、Schoenheimer^②の法により Cholesterol を回収し、更に微量残存する磷脂質を除くために、40倍の Pyridin に溶解し10倍量の酸化アルミニウムのカラムを通して精製した。

b) Lecithin: 脊髄の Acetone 不溶性分を Ether で抽出し、濾液を氷室に一夜放置した後、沈澱した糖脂質及び Sphingomyelin を除き、上清を減圧下に濃縮して、再び同様に操作し、上清を乾固して粗 Glycerophospholipid を得た。これを石油エーテルに溶解し、5倍量の Methanol を徐々に加えてしば

表 8 各 脂 質 の 分 析 結 果

		N (%)	P (%)	N : P	Molisch 反 応	Liebermann-Burchard 反 応	Hack の スポット テスト	
							KI による 呈色	ニンビドリン による 呈色
Cholesterol	馬 牛 豚		<0.005		-	卅	-	-
Cephalin	馬 牛 豚	1.76	3.82	1 : 1	-	-	±	卅
		1.78	3.84					
		1.71	3.75					
Lecithin	馬 牛 豚	1.59	3.55	1 : 1	-	-	卅	-
		1.62	3.58					
		1.54	3.47					
Cerebroside	馬 牛 豚	1.70	<0.005	1 : 0	卅	-	-	-
		1.71						
		1.70						

N は Micro-Kjeldahl 法により, P は Allen の法の中村の変法^⑧により定量

らく放置した後, ピペットで上層部をとり, 遠心沈澱により沈澱を除き, 上清を乾固し, 同様操作を反復して粗 Lecithin を得, これより Taurog^④ の法によって夾雑する非コリン燐脂質を除去して精製した。

c) Cephalin 劃分: 脊髄より得た粗 Glycerophospholipid から Folch^⑤ の法により調製した。この劃分には Phosphatidyl ethanolamine の他に, Phosphatidyl serine, Inositol phospholipid, Acetal phospholipid 等が含まれているが, これらを分離せずにこのまま Cephalin 劃分として用いた。以下単に Cephalin と記載した。

d) Cerebroside: 脊髄の Acetone 不溶性分を更に2倍量の Ether で2回抽出し, 吸引濾過して残渣を乾燥し, 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, その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, 不溶物を濾過して除き, この濾液を氷室で冷却し, 析出物をとって Acetone 及び Ether で充分に洗滌して粗 Sphingolipid を得た。これから Carter, Fujino^⑨ の法により Cerebroside を精製した。

以上4種類の脂質の分析結果は表8に示した。これらの各脂質は Ethanol に2~2.5%に溶解し, 30倍の生理的食塩水で急速に稀釈(但し Cephalin は Ether 溶液より稀釈)し, その後30分乃至1時間半の間に抗元として用いた。Cholesterol 及び Cerebroside は単独使用の場合は安定な乳化体を作

り得ず, これら単独での抗元活性は観察不能であった。そこで Lecithin 及び Cephalin 劃分についてのみ単独に抗元とし, 抗脊髄血清と補体結合反応を行なったが, 表9, 10に示す如く活性は認められなかった。

表 9 Lecithin の 抗 元 性

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	卅	卅	卅	卅	卅	卅
〃	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅
〃	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅
牛	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅
〃	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅
〃	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅
豚	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅
〃	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅
〃	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅		卅

次に上記脂質の2種類を用いた種々の組合せにおいて, その抗元性を検し次の結果を得た。すなわち Cholesterol + Cerebroside (表11), Lecithin + Cephalin (表12a, b) の組合せのみにおいて抗元性が認められた。しかし後者においては Lecithin : Cephalin が, 1:1 の場合には抗補体性が強く, 抗元性が認められなかったが, 抗補体性を抑制するため

表10 Cephalin の抗元性

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	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
牛	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
豚	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表12b Cephalin+Lecithin (1:4) の抗元性

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	卅	卅	卅	卅
"	牛	-	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	-	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅
牛	馬	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
豚	馬	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	-	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表11 Cholesterol+Cerebroside (1:1) の抗元性

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	卅
"	豚	-	-	-	-	-	-	卅	卅
牛	馬	-	-	-	-	+	卅	卅	卅
"	牛	-	-	-	-	+	卅	卅	卅
"	豚	-	-	-	-	+	卅	卅	卅
豚	馬	-	-	-	+	卅	卅	卅	卅
"	牛	-	-	-	+	卅	卅	卅	卅
"	豚	-	-	-	+	卅	卅	卅	卅

表13 Cholesterol+Lecithin (1:1) の抗元性

抗体産生 抗元	試験管内 抗元	補体単位				対照	
		2	4	6	8	C ₁	C ₂
馬	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅
牛	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅
豚	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表12a Cephalin+Lecithin (1:1) の抗元性

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	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	+	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
牛	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
豚	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表14 Colesterol+Cephalin (1:1) の抗元性

抗体産生 抗元	試験管内 抗元	補体単位				対照	
		2	4	6	8	C ₁	C ₂
馬	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅
牛	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅
豚	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅
"	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅

に Lecithin を増量して 1:4 にするとわずかに抗元性が認められた。

Cholesterol + Lecithin (表13), Cholesterol + Cephalin (表14), Cerebroside + Lecithin (表15), 及び Cerebroside + Cephalin (表16) 等はいずれ

も抗元性は認められなかつた。

次に上記脂質の3種類を用いた種々の組合せにおいて、その抗元性を検し次の結果を得た。すなわちいずれの組合せにも抗元性が認められた。緒方法の Wassermann 抗元の組成が Cardiolipin : Lecithin

表15 Cerebroside+Lecithin (1:1) の抗元性

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

表16 Cerebroside + Cephalin (1:1) の抗元性

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

表17 Cephalin+Lecithin+Cholesterol (1:4:20) の抗元性

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	卅	
"	牛	-	-	-	-	+	卅		
"	豚	-	-	-	-	+	卅		

: Cholesterol が 1:4:20 であることから, Cephalin : Lecithin : Cholesterol を 1:4:20 にして抗元として用いたところ, 著明に抗元性が認められ (表17), 同様に Cephalin + Lecithin + Cerebroside (表

表18 Cephalin+Lecithin+Cerebroside (1:4:10) の抗元性

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		卅
"	豚	-	-	-	-	+	卅		卅
牛	馬	-	-	-	+	卅	卅	卅	
"	牛	-	-	-	+	卅	卅		
"	豚	-	-	-	+	卅	卅		
豚	馬	-	-	卅	卅	卅	卅	卅	
"	牛	-	-	卅	卅	卅	卅		
"	豚	-	-	卅	卅	卅	卅		

表19 Cholesterol+Cerebroside+Lecithin (1:1:1) の抗元性

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	-	-	-	-	-	-		

表20 Cholesterol+Cerebroside+Cephalin (4:4:1) の抗元性

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		
"	豚	-	-	-	-	-	卅		
豚	馬	-	-	-	-	卅	卅	卅	
"	牛	-	-	-	-	卅	卅		
"	豚	-	-	-	-	卅	卅		

18) においても抗元性が認められ, 又 Cholesterol + Cerebroside に更に Lecithin または Cephalin を加えたもの (表19, 20) においても, 著明に抗元性

が認められた。

IV 吸収試験

上述の実験結果からは未だ脊髄の臓器特異性がいずれの脂質割分に帰因するかは的確には決定し得なかつた。そこで抗脊髄血清に対して、脊髄の各脂質の単独並びに種々に組合せたものを用いて吸収試験を行ない、臓器特異性を誘起する脂質割分の決定の一助にしようとした。

吸収試験は次のような方法で行なつた。抗脊髄血清1容に各脂質の乳化体10容を加えて (Cholesterol 及び Cerebroside 単独の場合は、それらの Ethanol 溶液1容に1倍稀釈抗血清30容を加えて) 充分混和し、氷室中に48時間放置後、高速遠心沈殿機 (1万回転、30分間) により上清を分離し、これを抗血清として補体結合反応を行なつた。この結果は表21~31に示す。

Lecithin 及び Cephalin は単独では添加した抗血清から再び完全に分離除去できないため、吸収試験の実施は不能であつた。Cholesterol 単独で吸収した抗血清はなお Cholesterol+Cerebroside, Cephalin + Lecithin + Cholesterol Cephalin + Lecithin + Cerebroside 及び脊髄の生理的食塩水抽出液に対する抗体を残していた (表21)。Cerebroside 単独で

表21 Cholesterol で吸収した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位					対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁ C ₂
Cholesterol + Cerebroside	-	-	-	-	-	+	++
Cephalin + Lecithin + Cholesterol	-	-	-	+	++	++	++
Cephalin + Lecithin + Cerebroside	-	-	+	++	++	++	++
生理的食塩水抽出液	-	-	-	+	++	++	++

吸収した抗血清は Cephalin + Lecithin + Cholesterol 及び脊髄の生理的食塩水抽出液に対する抗体は残存していたが、Cholesterol + Cerebroside, Cephalin + Lecithin + Cerebroside に対する抗体は殆んど完全に除去されていた (表22)。

Cholesterol + Cerebroside で吸収した抗血清は Cephalin + Lecithin + Cholesterol 及び脊髄の生理的食塩水抽出液に対する抗体は残存し、Cholesterol + Cerebroside 及び Cephalin + Lecithin + Cerebroside に対する抗体は殆んど完全に除去されていた (表23)。

表22 Cerebroside で吸収した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位					対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁ C ₂
Cholesterol + Cerebroside	+	+	+	+	+	+	++
Cephalin + Lecithin + Cholesterol	-	-	-	+	++	++	++
Cephalin + Lecithin + Cerebroside	+	+	+	+	+	+	++
生理的食塩水抽出液	-	-	+	++	++	++	++

表23 Cholesterol + Cerebroside (1:1) で吸収した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位					対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁ C ₂
Cholesterol + Cerebroside	+	+	+	+	+	+	++
Cephalin + Lecithin + Cholesterol	-	-	+	++	++	++	++
Cephalin + Lecithin + Cerebroside	+	+	+	+	+	+	++
生理的食塩水抽出液	-	-	+	++	++	++	++

表24 Cholesterol + Lecithin (1:1) で吸収した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位					対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁ C ₂
Cholesterol + Cerebroside	-	-	-	-	-	-	++
Cephalin + Lecithin + Cholesterol	-	-	+	++	++	++	++
Cephalin + Lecithin + Cerebroside	-	-	+	++	++	++	++
生理的食塩水抽出液	-	-	-	+	++	++	++

はなお Cholesterol + Cerebroside, Cephalin + Lecithin + Cholesterol, Cephalin + Lecithin + Cerebroside 及び脊髄の生理的食塩水抽出液のすべてに対する抗体が残存していた (表24)。Cholesterol + Cephalin で吸収した抗血清は Cholesterol + Cerebroside 及び脊髄の生理的食塩水抽出液に対する抗体は残存しているが、Cephalin + Lecithin + Cholesterol, 及び Cephalin + Lecithin + Cerebroside に対する抗体は殆んど完全に除去されていた (表25)。

Cerebroside + Lecithin で吸収した抗血清は

表25 Cholesterol+Cephalin (1:1) で吸
取した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位						対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
Cholesterol+Cerebroside	-	-	-	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cholesterol	+	+	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cerebroside	+	+	+	+	+	+	+	+
生理的食塩水抽出液	-	-	+	+	+	+	+	+

Cephalin+Lecithin+Cholesterol 及び脊髄の生理的食塩水抽出液に対する抗体は残存し, Cholesterol+Cerebroside 及び Cephalin+Lecithin+Cerebroside に対する抗体は殆んど除去されていた(表26)。Cerebroside+Cephalin で吸収した抗血清は

表26 Cerebroside+Lecithin (1:1) で吸
取した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位						対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
Cholesterol+Cerebroside	+	+	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cholesterol	-	-	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cerebroside	+	+	+	+	+	+	+	+
生理的食塩水抽出液	-	-	+	+	+	+	+	+

Cholesterol+Cerebroside, Cephalin+Lecithin+Cholesterol, Cephalin+Lecithin+Cerebroside とは反応しないが, 脊髄の生理的食塩水抽出液とは弱く反応した(表27)。

表27 Cerebroside+Cephalin (4:1) で吸
取した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位						対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
Cholesterol+Cerebroside	+	+	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cholesterol	+	+	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cerebroside	+	+	+	+	+	+	+	+
生理的食塩水抽出液	-	+	+	+	+	+	+	+

Lecithin+Cephalin で吸収した抗血清は 添加した脂質を完全に分離除去できず, 抗補体性が増加するので吸収試験は不能であつた。

Cephalin+Lecithin+Cholesterol で吸収した抗血清は Cholesterol+Cerebroside 及び脊髄の生理的食塩水抽出液に対する抗体は残存し, Cephalin+Lecithin+Cholesterol 及び Cephalin+Lecithin+Cerebroside に対する抗体は完全に除去されていた(表28)。Cephalin+Lecithin+Cerebroside または

表28 Cephalin+Lecithin+Cholesterol
(1:4:20) で吸収した抗血清による補体
結合反応

試験管内抗原	補体単位						対照	
	2	4	6	8	10	12	C ₁	C ₂
Cholesterol+Cerebroside	-	-	-	-	-	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cholesterol	+	+	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cerebroside	+	+	+	+	+	+	+	+
生理的食塩水抽出液	-	-	-	+	+	+	+	+

Cholesterol+Cerebroside+Cephalin で吸収した抗血清は, 上記脂質を種々に組合せた抗原及び脊髄の生理的食塩水抽出液のいずれにも反応せず(表29, 30), Cholesterol+Cerebroside+Lecithin で吸収した抗血清も, 上記種々の抗原と殆んど反応しなかつた(表31)。

以上の吸収試験において, Cholesterol+Cerebroside に反応しなくなつた抗血清は Cholesterol+Cerebroside に Lecithin または Cephalin を加えたものにも反応しなかつた。また各脂質単独並びに種々

表29 Cephalin+Lecithin+Cerebroside
(1:4:10) で吸収した抗血清による補体
結合反応

試験管内抗原	補体単位				対照	
	2	4	6	8	C ₁	C ₂
Cholesterol+Cerebroside	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cholesterol	+	+	+	+	+	+
Cephalin+Lecithin+Cerebroside	+	+	+	+	+	+
生理的食塩水抽出液	+	+	+	+	+	+

表30 Cholesterol + Cerebroside + Cephalin (4:4:1) で吸収した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位				対照	
	2	4	6	8	C ₁	C ₂
Cholesterol + Cerebroside	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Cephalin + Lecithin + Cholesterol	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Cephalin + Lecithin + Cerebroside	卅	卅	卅	卅	卅	卅
生理的食塩水抽出液	卅	卅	卅	卅	卅	卅

表31 Cholesterol + Cerebroside + Lecithin (1:1:1) で吸収した抗血清による補体結合反応

試験管内抗原	補体単位				対照	
	2	4	6	8	C ₁	C ₂
Cholesterol + Cerebroside	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Cephalin + Lecithin + Cholesterol	卅	卅	卅	卅	卅	卅
Cephalin + Lecithin + Cerebroside	卅	卅	卅	卅	卅	卅
生理的食塩水抽出液	+	卅	卅	卅	卅	卅

に組合せた抗原を用いて吸収した抗血清と試験管内抗原とで、馬・牛及び豚3種類について交叉反応を行なつたが、各表(21~31)に示したものと全く同様の結果を得た。

考 按

脊髄には種々の複合脂質が多量に含まれており、磷脂質として主なものは、Lecithin, Cephalin, Sphingomyelin 等であるが、その他 Cephalin 割分中には数種の磷脂質が混在していることがわかつており、糖脂質として主なものは、Cerebroside, Ganglioside 等である。脊髄に含まれる Cerebroside としては Galactocerebroside のみが発見されているが、山川ら^⑦の Labeled Hexose を用いた研究では、Kerasine の糖の中に2~3%の Glucose が検出されている。また脊髄以外の臓器においても Galactocerebroside が発見されており、牧田^⑧はヒト腎よりとつた Ceramide monohexoside (Cerebroside) の糖は Glucose:Galactose が1:1であることを証明している。その他 Arabinose を持つ Cerebroside も奥原^⑨によつてヒト脳中から見いだ

されている。

Ganglioside もその構成員である Hexose 並びに Hexosamine の種類と数に違いはあるが、脳脊髄以外の臓器からも見いだされている。

Cerebroside の抗原性に関しては Rapport^⑩, 山川ら^⑪の研究があり、Rapport^⑩は脳の Cerebroside に Cholesterol+Lecithin (1:1) を種々の割合に加えて抗原とし、抗脳血清との補体結合反応によつて、その臓器特異的の活性を認めており、Cerebroside 1に対し Cholesterol+Lecithin (1:1) を150倍加えたものでもなお活性があると報告している。

Lecithin 及び Cephalin の抗原性も古くから研究されているが^{⑫⑬}、その特異性が疑われている。緒方ら^⑭は癩血清が Cephalin 割分 + Lecithin (適当な混合比) と強く凝集反応をおこすことを報告している。

著者の実験によつて、馬・牛及び豚の脊髄を実験材料に用いたかぎりでは、脊髄は臓器特異性を有することが明らかである。従来眼水晶体^⑮、腎臓^⑯、甲状腺組織^⑰等の臓器特異性は、これらの組織が血清学的に共通の蛋白質を含み、しかもこの蛋白質の分子中に化学構造の一致した比較的小さい Polypeptide 鎖を有することに帰因するといわれている。これに反し横沢^⑱らは脊髄及び脳の臓器特異性は特種蛋白質の存在に帰因するものではなく、臓器特異的脂質の存在によるものと報告している。

著者の実験の目的はこの臓器特異的脂質の本性を明らかにすることであるが、本実験の結果のみによつては直ちにこれを決定することは不可能である。脊髄組織内においては種々の脂質がそれぞれ独立に遊離して存在するとは考えられず、これらの幾つか或いは全部、或いは更に各種蛋白質が強弱さまざまな結合状態において存在するものであり、その上わずかの条件の変化がこの結合状態に著しい影響を及ぼすことは当然考えられることである。したがつて脊髄組織の生理的食塩水抽出液による免疫において生ずる抗体が、個々の脂質に対応するものであるか、或いは上記成分の結合体に対応するものであるかは、容易には断じられない。

吸収試験においても、或る種の結合体に対する抗体が、当該結合体の持つ有力成分単独によつても吸収され得ることが考えられるので、本実験における如く、Cerebroside 単独で抗体が吸収され得た場合でも、直ちに Cerebroside に対する抗体が産生されており、したがつて Cerebroside が臓器特異的脂質であると断定することは早計である。

なお本実験においては上述以外の脂質、例えば Sphingomyelin, Ganglioside 及びその他の複合脂質については全くふれていないので、これらが脊髄の臓器特異性と如何なる関係にあるかは不明である。

結 論

- 1) 馬、牛及び豚3種類の脊髄を用いて家兔を免疫し、臓器特異的に反応する抗血清を得た。
- 2) この抗血清と臓器特異的に反応する脊髄脂質成分の追及により、Cholesterol がなくても活性を有する割合と、Cholesterol を添加することによつて活性化される割合があることを知つた。
- 3) Cholesterol, Lecithin, Cephalin 及び Cerebroside 等の精製したものは単独では活性が認められなかつた。
- 4) これらの脂質を種々に組合せたものうち、Cholesterol+Cerebroside, Cephalin+Lecithin+Cholesterol, Cephalin+Lecithin+Cerebroside, 及び Cholesterol+Cerebroside に Lecithin または Cephalin を加えたものに強い活性が認められ、Cephalin+Lecithin には弱いながら活性が認められた。
- 5) 抗脊髄血清を Cholesterol 単独または Cholesterol+Lecithin で吸収しても、いずれの抗原に対する抗体も除去されず、Cerebroside 単独、Cholesterol+Cerebroside, Cholesterol+Cephalin, Cerebroside+Lecithin, Cerebroside+Cephalin, 及び Cephalin+Lecithin+Cholesterol 等で吸収すると、それぞれに対応する抗体は除去されるが、組合せの異なる抗原及び脊髄の生理的食塩水抽出液のいずれかに反応する抗体が残存することが認められた。
- 6) 抗脊髄血清を Cephalin+Lecithin+Cerebroside, 及び Cholesterol+Cerebroside に Lecithin または Cephalin を加えたもの等で吸収すると、上記脂質を種々に組合せた抗原及び脊髄の生理的食塩水抽

出液のいずれにも反応しなくなることが認められた。

7) 脊髄の臓器特異性は Cholesterol, Lecithin, Cephalin, Cerebroside 等が互いに関与し合つて現われるということが考えられるが、それが如何なる機転によるかは明らかでない。

稿を終るに臨み、本研究を信大医学部生化学教室に於いて行なう事に種々の御配慮を賜つた丸田公雄教授、並びに本研究に対し直接の御指導と御校閲を賜つ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
- ②Schoenheimer, R. and Dam, H. : Z. physiol. Chem., 215 : 59, 1933
- ③Hack, M. H. : Bioch. J., 54 : 602, 1953
- ④Taurog, A. et al : J. Biol. Chem., 155 : 19, 1944
- ⑤Forch, J. : J. Biol. Chem., 146 : 35, 1942
- ⑥Carter, H. E. & Fujino, Y. : J. Biol. Chem., 221 : 879, 1956
- ⑦Yamakawa, T. and Nishimura, S. : Japan. J. Exp. Med., 36 : 91, 1966
- ⑧Makita, A. : J. Biochem., 55 : 269, 1964
- ⑨奥原英二 : 第28, 29回日本生化学会総会講演, 東京 (1955, 11), 福岡 (1956, 11),
- ⑩Rapport, M. M. and Joffe, S. : Nature, 197 : 60, 1963
- ⑪Yamakawa, T. and Taketomi, T. : J. Biochem., 54 : 444, 1963
- ⑫Wadsworth, A. et al : J. Immunol., 26 : 25, 1943
- ⑬Klopstock, F. : Zbl. Bakt., 104 : 435, 1927
- ⑭緒方富雄・他 : レブラ, 24 : 421, 1955
- ⑮Hara, T. : J. Biochem., 43 : 263, 1956
- ⑯Horie, S. : Med. J. Shinshu Univ., 5 : 47, 1960
- ⑰Oana, Y. : Med. J. Shinshu Univ., 4 : 123, 1959
- ⑱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