

Title	ニワトリ卵白リゾチームの免疫化学的研究
Author(s)	新家, 荘平
Citation	
Issue Date	
Text Version	none
URL	<a href="http://hdl.handle.net/11094/28505">http://hdl.handle.net/11094/28505</a>
DOI	
rights	
Note	

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/repo/ouka/all/>

氏名・(本籍)	新 家 莊 平 しん か そう へい
学位の種類	医 学 博 士
学位記番号	第 386 号
学位授与の日付	昭 和 38 年 3 月 25 日
学位授与の要件	医 学 研 究 科 病 理 系 学位規則第5条第1項該当
学位論文題目	ニワトリ卵白リゾチームの免疫化学的研究
論文審査委員	(主 査) (副 査) 教 授 天 野 恒 久 教 授 山 村 雄 一 教 授 米 田 正 彦

### 論 文 内 容 の 要 旨

#### 〔目 的〕

鶏卵白リゾチーム (HL) は一本の polypeptide より成る分子量最小の抗原性酵素蛋白であり、その酵素作用は、基質として、*M. lysodeikticus* を用いた場合家兔免疫血清によって完全に中和される。更にそのアミノ酸配列の大部分が決定されたので蛋白の酵素活性中心や抗原決定群の化学的構造の研究、更には抗体の性状、その産生機構の解析には最適のものと考えられる。この理由から当教室では、この酵素蛋白の免疫化学的研究を始め、まず HL に対する抗血清中には少なくとも2種類の特異性の異なった中和抗体の存在する事をしめし、従って均一な低分子の蛋白においてさえ少なくとも2種類以上の特異性の異なった抗原決定群の存在する事を明らかにしたが、更にこれらの抗原決定群の微細構造を解析するとともに、非中和性抗体の存在の有無をも明らかにするために以下の実験を行なった。

#### 〔方法及成績〕

##### 1) HL の部分分解 Peptide.

HL を pepsin 消化 (PH 1.62, 40°C, 1 hour) する事によって、最早酵素活性, enzymoid の性質及び抗 HL 血清と沈降反応を起す能力のない部分分解 peptide を得たが、これは抗 HL 血清と HL との沈降反応を最高40%阻止した。(他の抗原抗体系の沈降反応には影響を与えない)。しかしこれは抗血清の HL 中和能を全く阻止しなかった。以上の事から非中和性抗体の存在が考えられるが、一方抗 HL 血清と HL の系でみられる沈降反応は HL に含まれる不純物乃至不活性化された HL によるものであり、かつ活性 HL に対する中和抗体は非沈降性である可能性も考えられるのでこれを確めるため次の実験を行った。

##### 2) 中和された沈降物より活性 HL の回収。

抗体過剰域及び当量域における沈降物を PH3.0 で分離したのち、100°C, 15分 加熱して抗体を変

性させ（HLはその条件では安定）HL活性を測定したところ約80%の活性が回収されたが上記両域の上清からは活性は全く証明されなかった。この事と、抗HL血清とHLとはGel内沈降反応で一本の線しかしめきない事から、HLは抗HL血清と反応し中和されて沈降する事が証明されたが、これにより上記peptideと反応した抗体は、HLにより生じた沈降性であるが非中和性の抗体である事が明らかになった。

### 3) HL活性を有する抗原抗体結合物のGel-filtrationによる証明

以上により非中和性抗体の存在が明らかになったが、更にこれを確かめるため抗原過剰域の上清をSephadex G-75のgel-filtrationにかけて、HL活性を有する可溶性抗原抗体結合物のpeakを得た。対照として正常家兎血清について同様の事を行なったが活性のあるpeakは認められなかった。これにより非中和性抗体の存在が確認された。

### 4) 超遠心による活性HL-抗体結合物の証明。

上記のSephadex G-75で得た血清蛋白分画をSwinging bucket type rotorを用いlinear density gradientのsucroseのmedium中で超遠心し（38000rpm, 4.0°C, 18.5 hrs.）分画したところ、HL活性は遊離HLの外に約7S及び4Sの血清蛋白分画の位置に認められた。約4Sの分画はAlbuminに相当するが、あらかじめAlbuminを除いた場合も同じ位置に活性が認められたので、この4S相当の活性は低分子量の抗体によるものではないかと考えられた。

### 5) Sephadex G-200による活性HL-抗体結合物の解析

上記の事実を更に追求するために、抗原過剰域上清の血清蛋白分画をG-200のGel-filtrationにかけたところ、やはりAlbumin相当の位置に活性が認められた。（対照実験ではそこに活性はない）。なおこれがHLに特異的なものによる事を確かめるために、HL-抗体の特異的沈降物に過剰の抗原を加へて、それを溶解して、同じ操作を行なったところ、やはりAlbuminの位置に活性が認められた。以上により低分子量の非中和性抗体の存在する事が強調された訳だが、もしそうであるならば中和能をもつ低分子の抗体も認められるであらう。しかし、あらかじめG-200で抗HL血清を分画して、それぞれの中和能を調べたところ、中和能は7S相当のGlobulin分画以外には認められなかった。従って、低分子の活性結合物が実際に、非中和性抗体に由来するものか否かについてはまだ問題があり、目下その本態を追求している。

### 〔総括〕

HLをpepsin消化することによって活性に関係のない抗原決定群を有する部分分解peptideをえたが、このことから抗HL血清中には非中和性抗体の存在する事が明らかになった。更に抗原抗体結合物の種々な解析から7S抗体より低分子の抗体様のglobulinの存在する事が見出された。

## 論文の審査結果の要旨

ニワトリ卵白より完全に単一成分として精製したリゾチームの免疫化学的研究については、すでに我が教室の岸口、齋木の業績があるが、それらは中和抗体に関するものであった。著者の研究は非中和性抗体に関するものである。

著者は最初から非中和性抗体が家兔免疫血清にふくまれることを予想して研究を初めたものではなく、蛋白分解酵素でリゾチームを部分分解して中和抗体をブロックするが、抗血清とは沈降反応を行ないポリペプチドの分離を志した。種々の酵素を種々の条件で試みた結果、ペプシン作用の特定条件下で沈降反応を阻止するが中和抗体はブロックしないポリペプチドの分画を二つ得た。所期の目的は未だ達成させないが、この沈降反応のみを阻止するポリペプチドが真にリゾチームから由来したものか、純粋と思ったりリゾチーム標品の中に混入した他の混入蛋白に由来したものかを問題とした。

使用したリゾチーム標品はゲル内沈降反応において常に一本の沈降線を与へるところから、阻止される沈降反応系がその沈降線を与へるものであることをまず明確にした。これが不純物の反応系なら、リゾチーム抗リゾチーム系は非沈降性であることになるので、完全中和されている沈降反応の当量域及び抗体過剰域の沈澱と上清から抗体を変性させて活性リゾチームの回収を試み、いずれにおいても沈降物からのみ回収されることを証明したので、上記ポリペプチドはリゾチーム系の沈降反応を阻止したことを証明した。

この様なポリペプチドが沈降反応のみを阻止し、中和反応を阻止し得えない点から非中和性抗体が家兔血清中に含有されることが結論されるので、その存在を実験により確認することを試みた。それは Sephadex G75 なる分子量4万を境とする分子篩（リゾチーム分子量 14500、抗体のそれは16万）によって抗原過剰域の沈降上清をクロマトレ、抗体と結合したリゾチーム活性を証明した。この事実は更に蔗糖の線状濃度勾配をつくった遠心管中での水平な超遠沈によっても正しいことが再確認された。

この超遠沈の実験において正常家兔血清を使用した対照では認められないが、免疫血清とリゾチームの混合を行った場合にのみアルブミン分画中にもリゾチーム活性が認められた。この事実は奇妙なもので更に追求したところ、分子量はアルブミンと同じ位だがグロブリンの性状の蛋白とリゾチームが結合していることが明らかになった。この事は更に分子量 20万 を境とする Sephadex G200 のクロマトによって更に確認された。この物質は他の抗原による家兔免疫血清にもないことを証明したが、中和抗体についてはその様な大きさのものが証明されないので、未だ低分子抗体とは断定していない。

以上の研究は、抗原蛋白質によって産出される抗体は極めて多様なものであることを明らかにし免疫学に種々の問題を提起したもので寄与するところ大なるものと確信する。