

雄鶏の血清蛋白質に関する免疫血清学的研究

田 代 一 男

(畜産学研究室)

Immunoserological Studies on the Cock Serum Protein

Kazuo TASHIRO

(Lab. of Zootechnical Science, Fac. of Education, KAGOSHIMA Univ.)

目 次

第 1 編

雄鶏の成長に伴う血清蛋白質の変動に関する免疫血清学的研究	(83)
緒 言	(83)
第 1 章 初生雛, 中雛ならびに成鶏血清の免疫血清学的特異性に関する研究	(84)
第 2 章 Fraction M および Fraction A の免疫血清学的性状に関する研究	(99)
第 3 章 Fraction M および Fraction A の生成と起源に関する実験的研究	(110)
第 1 節 初生雛, 中雛に対する性 Hormone 投与が, その血清蛋白質, 特に Fraction M および Fraction A の消長に及ぼす影響について	(112)
第 2 節 卵黄囊除去雄雛血清の免疫血清学的特異性に関する実験的研究	(116)
第 3 節 卵黄多給中雄雛血清の免疫血清学的特異性に関する研究	(117)
第 4 節 Fraction M の stage 特異性的性状に関する実験的研究	(118)
第 4 章 第 1 編 総 括	(121)

第 2 編

雄鶏の下垂体 GTH に関する免疫血清学的研究	(124)
第 1 章 抗生殖腺刺激 Hormone 産生に関する史的考察	(124)
第 2 章 抗鶏下垂体 GTH 産生に関する実験的研究	(126)
第 3 章 鶏下垂体 GTH の血中濃度測定に関する免疫血清学的考察	(131)
第 4 章 鶏下垂体 GTH に対する抗血清の中和, 抑制に関する実験的研究	(138)
第 5 章 第 2 編 総 括	(142)
参 考 文 献	(143)
英 文 総 括	(146)

Contents

PART 1

Immunoserological Studies on that Change of serum protein which follows the growth of Cock	
Introduction	(83)
Chapter 1 Studies on the Distinction between the Adult and Baby Chick Serums	(84)
Chapter 2 Studies on the Immunoserological Nature of Fraction M and Fraction A	(99)
Chapter 3 Experimental Studies on the Formation and Origin of Fraction M and Fraction A	(110)

Chapter 4 Summary (Part 1).....	(121)
---------------------------------	---------

PART 2

Immunoserological Studies on the Hypophysial Gonadotropin of Cock

Chapter 1 Reviews on the anti-Gonadotrophic Substance formation	(124)
Chapter 2 Experimental Studies on the anti-Hypophysial Gonadotropin formation of Cock	(126)
Chapter 3 Studies on the Immunoassay for GTH of Cock	(131)
Chapter 4 Experimental Studies on the Method of Inhibition and Neutralization of Antihormone	(138)
Chapter 5 Summary (Part II)	(142)
Literature	(143)
Résumé	(146)

第 1 編

雄鶏の成長に伴う血清蛋白質の変動に関する免疫血清学的研究

緒 言

動物における發育，成長の機序に関する研究，殊に免疫血清学的に血清蛋白の面から追究した研究は古くから数多く報告されている。わが国においても古くは泉（1921）が孵化卵と新鮮鶏卵で免疫した家兎血清は，鶏血清に対する沈降素量に差異のあることを報じ，また渡辺（1922）は哺乳動物胎仔血液と成熟動物血液との血清学的比較研究（第1報，第2報）において，親血球と胎仔血球とは血清学的に凝集反応，溶血反応および沈降反応において差異のあることを認め，しかも胎仔血球は孵化の進むに従って次第に親血球に近似してくることを報告している。おなじく水原（1924）は母体と胎仔との間には，血清蛋白にわずかではあるが，差異があり，胎仔の血清蛋白は母体のそれに比べて種属特異性が強くなく妊娠の進むにつれてその欠陥が補われて母体血清蛋白質の性状に近づき，犬の場合，生後21日で主反応，副反応ともに母体血清の場合と同一になると結論している。その他胎仔から成熟動物に至るまでの血清蛋白質の変動について同様の血清学的手技をもって追究した報告がある。

また近年電気泳動法により成長に伴う血清蛋白分層の変化の研究が盛んとなり，SANDERS et al. (1944)，DEUTSH et al. (1945)，HEIM et al. (1954)などを初めとする多くの研究が発表されるに至った。なかでもBRANDT et al. (1951)，CLEGG et al. (1953)やMOOR (1945)，石垣 et al. (1958)等は初生雛の成長に伴う血清蛋白質 Albumin の変化を電気泳動的に分析し興味ある結果を報告しているが，特に CLEGG et al. (1953)は血清 Albumin と血清 Calcium 量の関係を見る目的で正常な雛血清の電気泳動 Pattern を知る必要から，0，1，2，4週齢の血清を比較検討し，0週齢から第1週齢にかけて Albumin の中には分離しきらないものが混在するようであるが，第2週齢になると二つの峰に分離してくることを指摘している。そして分層比率から求めた Albumin 濃度は各週齢の進むにつれて漸増し，その価は1.63，2.02，2.28，2.48および2.30g./100ml.であり，その増加はこの第1分画の増大によってなされると述べている。また，近年孵卵中の鶏胚血清と，成鶏のそ

れとは明らかに差異があり、孵化の進むにつれて母鶏血清に類似してくること、および、Albuminに先行して泳動する分屑 (F-Fraction) のあることが Moor (1948) や西山 (1956) 等の研究により明らかにされた。さらに石垣 et al. (1958) は孵卵5日から成鶏に至るまでの変化を濾紙電気泳動法を利用して詳細に追跡した結果を発表している。このように鶏の成長発育に関しては免疫血清学的に、電気泳動学的に研究が行われ、あるいは、成長 Hormone や内分泌学的現象との関係などについても多角的に追究されてきている。しかしながら鶏の成長期における下垂体成長 Hormone の存在あるいは役割等については、他の Hormone との関連も合わせて解明されねばならない多くの問題が残されている。すなわち、鶏の成長の各段階には血液成分にどのような特異性があり、またそれが、鶏の成長に関して如何なる意義を有するかなどについても、充分解明されていない実状である。

そこで本実験では、主として免疫血清学的 (一部電気泳動学的) 実験手技を用い、鶏の成長、成熟、繁殖などの諸現象に対応する血清の特異性を確かめ、その生成、起源、及び生理学的意義を追究した。

本研究を行うにあたり、終始懇篤なる御指導を戴き、且つ研究上の便宜を与えられ、さらに校閲の労をとられた九州大学教授岡本正幹博士に深甚の謝意を表す。また実験に際し、物心両面にわたる御援助を戴いた九州大学農学部畜産学第一教室員の方に深く感謝する。なお本研究の一部は鹿児島大学農学部畜産学教室において実施した。いろいろ研究上の便宜を与えられ、且つ有益な助言を賜わった鹿児島大学農学部教授西山久吉博士に厚く感謝の意を表す。

第1章 初生雛・中雛ならびに成鶏血清の免疫血清学的特異性に関する研究*

1 緒 言

第1章においては、まず鶏の成長各期の血清蛋白成分に、血清学的に如何なる特異性があるかを明らかにしようとした。前述の諸報告から初期発育期においては特に1週齢前後に血清蛋白の特異な変動があるのではないかと考えられ、さらに古くは LATIMER (1924), BUCKNER (1918) や WARREN (1953) 等の成長曲線ならびに加藤・西田 (1935) の細胞発生学的研究や、武田 (1960) の GTH 力価の変動に関する諸報告に基づき、成長中の特異的な Stage と思われる三つの Stage すなわち孵化第1日齢雄雛、80~90日齢雄雛、ならびに成雄鶏の3 Stage より血清を取り、それぞれを抗原とした家兎免疫血清を製造して、それらの間の血清学的特異性について実験し、検討を加えた。

2 実験材料および方法

(1)材料**：孵化第1日齢から成鶏に至るまで材料はすべて白色レグホン種雄鶏を用いた。

*本報の大意は1959年および1960年日本畜産学会西日本支部大会において講演発表した。

**材料は九州大学農学部畜産学第1教室、第2教室、福岡食鳥株式会社並びに鹿児島市伊地知種鶏場の御好意によって提供していただいた。附記して謝意を表す。

(2)抗原：孵化第1日齡雄雛血清 (MCSと略称), 80~90日齡雄雛血清 (GCSと略称), および150日齡以上の成雄鶏血清 (ACSと略称) をそれぞれ油性 Adjuvant 処理したものを抗原として使用した。これらの抗原用血清は初生雛においては30~60羽分を混和し, 中雛, 成鶏においては5~20羽分を混和したものをを用いた。Adjuvant 処理はCOHN (1952), HAYASHIDA and LI (1958), 伝染病研究所学友会 (1958), および九州大学医学部医化学教室などの処方 を参考にして基本的に次のように調製, 処理した。

①結核菌* : Tubercle bacillus (死菌) を秤量, 乳鉢に入れる。

②Light paraffin oil : (Bayol F. 60, 274~380 に相当する) 秤量, 乳鉢に入れ, 結核菌と混和しながら30~60分で均質化する。

③ Lanolin anhydricum (Adeps Lanae) : 秤量して追加30分混合する。(これはMannide Oleate-Arlacel-A に相当する)

④上記の混合液を高圧滅菌した後, 秤量した抗原液を追加し60分間混和する (1滴を水中に投下した場合, 油中水滴 (Water in oil) の状態になるまで混和を続ける)。

以上の④②③の量はそれぞれ10:9:1の容量比とし, 結核菌の量は兎1頭1回5mg. を限度とした。

(3)免疫血清の製造 :

上記の抗原液をそれぞれ兎 (2.0kg~3.2kg) の皮下又は筋肉内に3~5日の間隔で4回~5回注入し, 最後の注入日から3週間後に全血採取, 血清分離, 非動化处理したものを免疫血清とし, 防腐剤として1%の割合に1%マーゼニン液 Ethyl mercury thiosalicylate を混和し氷室 (1°C~5°C) に保存した。MCS, GCS および ACS に対する免疫家兎血清をそれぞれ抗 MCS, 抗 GCS, 抗 ACS と略称する。免疫血清の製造には普通 Adjuvant 処理はなされないが本実験では, すべて Adjuvant 処理した抗原液を用いることにした。その免疫 schedule の実例を抗 ACS の場合について示すと次のとおりである。他の抗 MCS, GCS の場合はこれと全く同じである。

抗ACS家兎免疫血清の製造

(イ)抗原液の処方

1. Tubercle bacillus (死菌) : 10mg.
2. Light paraffin oil : 9 cc.
3. Lanolin anhydricum : 2 g.
4. Antigen Serum 10cc.

(ロ)免疫家兎への注射 Schedule

上記の調製抗原液は約20ccになるのでこれを10cc. あて2頭の兎に1回分として筋肉内に注入する。

第1回 昭和34年1月19日10cc.注入 (1頭あたり)

*九州大学医学部戸田株

- 第2回 " 1月22日 10cc. " (")
 第3回 " 1月25日 10cc. " (")
 第4回 " 1月28日 10cc. " (")
 第5回 " 2月1日 10cc. " (")
 全血採取 " 2月22日, 分離, 非動化し氷室に保存する。

(4) 抗原, 抗体反応様式:

いわゆる重層沈降反応様式を用いると同時に最近注目されるようになり OUDIN (1946) により科学的に基礎づけられた寒天ゲル内沈降反応 (OUDIN's serum agar gel technique) を用いた。実際には次の術式を用いた。

すなわち, 最少の蛋白分層数を検出する反応には小試験管 (口径 10mm, 長さ 70mm) を, また拡散距離による拡散公式適用の蛋白分層同定反応試験には沈降反应用毛細試験管 (口径 2~5 mm, 長さ 70mm) を使用した。共に 1% 寒天液 (1% の割合に防腐剤として 1% マーゾニン液を混入) を免疫血清の稀釈に用い (45°C 前後で混和), 倍数稀釈された免疫血清加寒天ゲルの上層に同じく倍数稀釈された抗原液を重層して反応を検した。この場合, 抗体の不要の混和をさけるために抗原液重層の前に 0.8% 寒天液でその試験管壁に薄膜を造成しておくことが必要である。重層されたものは 37°C の定温器内に静置し一定時間ごとに変化を記録した。OUDIN の寒天ゲル内沈降反応平板反応様式については反応検出に好都合と思われる径 60mm, 深さ 13mm の小シャーレを特別にあつらえ, 乾燥滅菌後あらかじめ 0.8% の寒天液で薄膜を造り, さらに径 10mm のゴム円柱を, 抗原と抗血清をおく予定の凹みの距離が 25mm になるように, 計 3 個おいて, 1% 寒天液を 15ml 流し込み完全に凝固した後, 円柱をとりぬき, その凹みに抗血清, 抗原液をそれぞれ一定量 (1 ml.) 注入し, おなじ大きさのシャーレで蓋をし, セロテープで密封して前と同じく定温器内に静置し反応を検した。また径 90mm, 深さ 23mm の普通シャーレの中央に抗血清または抗原液をおき, それを中心として四方に 20mm の位置にそれぞれの抗原液, あるいは抗血清を置く方法もとった。この場合共通の抗原抗体系があれば反応帯は正方形の形をとって, それぞれの抗原抗体反応帯は連結するようになる。(第 5 図参照) なお重層沈降反応における反応判定基準は下記のとおりにした。すなわち重層後,

- 15分以内で沈降輪が出来たもの 卅
 30分以内で沈降輪が出来たもの 卍
 60分以内で沈降輪が出来たもの +
 60分以内で沈降輪の出来ないもの -

結果の表示はすべて 2-4 例の平均とした。

(5) 電気泳動条件:

日立 Tiselius 電気泳動装置 (Micro cell 装置) HTB 2 型, Veronal Buffer pH. 8.5 $\mu=0.1$, 試料の透析時間は 4~6°C で 20~30 時間, 透析後の試料は 2,000 r.p.m で 5~10 分間遠心沈澱し, その上澄液を泳動用とした。その時の蛋白濃度は 1.5% とした。水槽温度は 10°C 以下とし, 電流 4mA, 電圧 120-130V の範囲内で 50 分泳動を行った。

3 実験結果

A. 重層沈降反応による実験結果

1: MCS免疫家兎免疫血清の特異反応

MCSを抗原液として製造した家兎免疫血清の抗原・抗体反応像は第1表のとおりである。この反応 Pattern から少くとも異種蛋白抗原抗体系をも含めて5~6個の反応帯のあることが想定されるが、この免疫血清にGCS及びACSを重層すると第2表及び第3表に見られるように反応系の数にはほとんど差がみられないが反応の程度の弱い領域が見られる。そこで、これらの免疫血清間の特異差

第1表 抗 MCS + MCS 反応

抗原 抗血清		抗原液 稀 釈 度												
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	NaCl
抗血清 稀釈度	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	4	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	8	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	16	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	32	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	64	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	128	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	256	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	512	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	512	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

第2表 抗 MCS + GCS 反応

抗原 抗血清		抗原液 稀 釈 度												
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	NaCl
抗血清 稀釈度	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	4	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	8	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	16	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	32	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	64	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	128	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	256	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	512	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	512	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

第3表 抗 MCS + ACS 反応

抗原 抗血清		抗原液 稀 釈 度												
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480	NaCl
抗血清 稀釈度	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	4	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	8	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	16	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	32	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	64	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	128	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	256	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	512	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍
	512	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍	卍

を検する目的で、この免疫血清をACS及びGCSで吸収した血清について種々反応を試みた。この際は同時に異種抗原抗体系も除去されることになる。吸収には抗血清、抗原系液をそれぞれ等量に混和し、約2時間、37°Cの定温器に静置し、後約12時間氷室に保存したものを遠沈器にて完全に分離した

る。そこでこれらの関係を更に明確にするために、前回と裏返しの反応、つまり各日齢の雄雛血清で抗 MCS を吸収した抗血清に MCS を重層したところ、次のような結果を得た。すなわち 1 日齢、5 日齢ならびに 9 日齢の雄雛血清で吸収した抗血清は陰性反応であるが 13 日齢の雄雛血清で吸収した場合には陽性反応を呈した。これを前回と同様抗体 2 倍液のところで一括して表示すると第 6 表のようになる。

第 6 表 各日齢雄雛血清吸収抗 MCS + MCS 反応 (抗体 2 倍)

抗血清	吸 収 血 清	抗 原 血 清	抗 原 液 稀 積 度										
			10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	NaCl	
抗MCS	1 日 雛	MCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	5 日 〃		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	9 日 〃		—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	13 日 〃		+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
	16 日 〃		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	
	20 日 〃		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	
	25 日 〃		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	
成 鶏	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—			

これらの反応結果から前述のように初生雄雛特有の蛋白分層の存在が明確となり、その消失の時期は孵化後約 2 週齢前後ではないかと推察される。以上の諸反応から、これら血清間の特異性を一括して表示すれば第 7 表のようになる。(抗体 2 倍液)

第 7 表 MCS, GCS および ACS 間の血清学的特異差

抗血清	吸 収 血 清	抗 原 血 清	抗 原 液 稀 積 度										
			10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	NaCl	
抗MCS	ACS	ACS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		GCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		MCS	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—		
	GCS	ACS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
		GCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—		
		MCS	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	—	—		
MCS	ACS	—	—	—	—	—	—	—	—	—			
	GCS	—	—	—	—	—	—	—	—				
	MCS	—	—	—	—	—	—	—	—				

この表から推察されることは、前述のように MCS には MCS 特有の蛋白分層の存在が考えられ、この点で明らかに ACS や GCS と異なった特異性を持っていると言える。同時に又 ACS と GCS の間に何等免疫学的な特異差があるとは考えられない。そこで ACS あるいは GCS と MCS との間にある免疫血清学的特異性を追究するために、抗 ACS、抗 GCS などの免疫家兎血清を製造して種々反応を検査した。

2: ACS 免疫家兎免疫血清の特異反応 (ACS と GCS の間には何等免疫血清学的特異差がないために、抗 GCS 家兎免疫血清についての試験結果の一部は本報告では省略する)

ACS を抗原液として製造した家兎免疫血清の抗原・抗体反応 Pattern は第 8 表のとおりである。この反応 Pattern をみると抗 MCS の場合の Pattern とよく類似した傾向を示し、反応系数も

第 8 表 抗 ACS + ACS 反 応

抗血清	抗原	抗原液 稀 積 度										
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
抗血清稀積度	2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	8	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	16	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	32	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	64	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	128	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—

ほぼ同数のようである。この抗血清にGCSを重層してもほぼ同程度の反応強度を示し、ほとんどその反応域に差がない。すなわち抗原40倍、抗体32倍の領域は強く反応を示し別個の反応系の存在が考えられるが、しかしMCS重層の場合は、第9表のようにその領域における反応は弱い。そこでこれらの抗血清に特異性を附与するために抗ACS、抗GCS家兎免疫血清をACS、GCSあるいはMCSで吸

第 9 表 抗 ACS + MCS 反 応

抗血清	抗原	抗原液 稀 積 度										
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
抗血清稀積度	2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	8	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	16	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	32	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	64	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—
	128	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	—

収して反応させた。ここで抗ACS家兎血清を使用して検討を加えた結果について述べると、ACSで吸収した抗血清に対してはACS、GCSともに反応系はなく、MCSを重層しても陰性反応を呈した。これらの結果からわかるようにACSで吸収すると、どの抗原系液も反応を呈しなくなり、この場合GCSで吸収しても同じ結果になった。そこで次にこの抗ACSをMCSで吸収して反応を検したところ、その反応態度からACSおよびGCSにはMCSで吸収し得ない別個の蛋白分層が残っていると考えられた。抗GCS家兎血清をMCSで吸収した場合も全く同様な反応を呈した。これらの関係を一括して表示すると、第10表のようになる。これらの事実からACS及びGCSの間には何ら免疫学的特異差は見られず、これらの血清とMCSの間には明らかな差異があることがわかる。以上のことから、ACS及びGCSにはMCSにみられない別個の反応系があることがわかる。

そこで次にこれらACS、GCS特有の蛋白分層が出現する時期について検討を加えた。すなわちMCSで吸収した抗ACS家兎血清に各日齢の雄雛血清を順次重層したところ次の結果を得た。すなわち、抗ACSをMCSで吸収した後に、1日、7日、14日、21日、30日、60日及び90日齢の鶏血清を反応させたところ、21日齢雄雛血清の場合に、1時間後に弱い陽性反応が出現し、30日齢雄雛血清でやや弱く、60日齢雄雛血清では親血清とほとんど同一の反応様相を示した。第11表は抗血清2倍液の場合を一括して表示したものである。すなわち、20日齢前後の雄雛血清は既にMCSとしての蛋白構成

第 10 表 MCS, GCS, ACS 間の血清学的特異差

抗血清	吸 収 血 清	抗 原 血 清	抗 原 液 稀 釈 度									
			10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	NaCl
抗ACS	ACS	ACS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		GCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		MCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	GCS	ACS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		GCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		MCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
MCS	ACS	ACS	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	
		GCS	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	
		MCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	GCS	ACS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		GCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		MCS	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

第 11 表 MCS 吸収抗 ACS + 各日齢雄雛血清反応 (抗体 2 倍)

抗血清	吸 収 血 清	抗 原 血 清	抗 原 液 稀 釈 度									
			10	20	40	80	100	200	400	800	1600	NaCl
抗ACS	MCS	1 日 齡 雛	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		7 日 〃	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		14 日 〃	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		21 日 〃	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		30 日 〃	卅	卅	+	+	—	—	—	—	—	—
		60 日 〃	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—	—
		成 鶏	卅	卅	卅	+	+	+	—	—	—	—

を示さず、中雛ならびに成鶏特有の蛋白分層が出現するためにこのような結果が得られたものと考えられる。さらに21日齢前後の変化を確めるために次のような裏がえしの反応を検した。すなわち、おなじく抗ACSを各日齢の雄雛血清で吸収したのち、これにACSあるいはGCSを反応させた。その結果を抗血清2倍液の場合について一括して表示すると第12表のとおりである。

第 12 表 各日齢雄雛血清吸収抗 ACS + ACS 反応 (抗体 2 倍)

抗血清	吸 収 血 清	抗 原 血 清	抗 原 液 稀 釈 度									
			10	20	40	80	100	200	400	800	1600	NaCl
抗ACS	成 鶏	1 日 齡 雛	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—
		7 日 〃	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—
		14 日 〃	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—
		21 日 〃	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—
		30 日 〃	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—
		60 日 〃	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—
		成 鶏	卅	卅	卅	卅	+	+	—	—	—	—

これらの反応結果は前述のMCSの場合と全く対照的であり、ACS及びGCSには、それらに特有の別個の蛋白分層が存在することが明確になり、この蛋白分層が生成、出現する時期は孵化後3週齢前後であると考えられる。

B. 寒天ゲル内沈降反応における実験結果

1: MCS免疫家兔免疫血清の特異反応

MCSを抗原液として製造した抗MCS家兔血清から、前述のように1%寒天液に溶かしたいわゆる抗血清加寒天ゲルを造り、毛細試験管に注入して凝固した後、各抗原系血清を重層すると第1図および第2図のような反応帯が出現する。すなわち、MCSを重層すると4本の沈降帯が一定時間後(3日~5日)出現し、ACSあるいはGCSを重層すると3本の沈降帯が出現する。またACS或はGCSで吸収した抗MCS加寒天ゲルを造り、これにMCSを重層すると1本の沈降帯が残り、ACSあるいはGCSを重層させた場合は何等の反応帯も見られない。これらの所見からMCSにはACSあるいはGCSに存在しない別個の蛋白分層が少くとも1個あり、前述の重層沈降反応の場合と照合して、これらACS、GCSとMCSの間には蛋白質構造上の差異があることは明らかであり、その分層構成の状態は、両者に共通の抗原・抗体系が少くとも3個あり、その他にMCSに特有の反応系が少くとも1個あるということが考えられる。これらの反応は試験管法のみならず特製のシャーレ内における、いわゆる平板寒天ゲル内においても、明らかな反応を示した。すなわち抗MCSに対応するごとくACS、GCSあるいはMCSを一定の所に置くと次に示す第3図、第4図に見られるようにMCSに対しては4本の沈降帯が出現するが、ACSあるいはGCSに対しては3本の沈降帯が出現し、これら血清間に血清学的特異差のあることを明示している。第4図にみられるように1日齢、13日齢には4本の沈降帯が出現するが60日齢ACSにおいては3本の沈降帯が見られる。そこでこのMCS特有の蛋白分層が何時消失するかについて検討を加えた。すなわち、抗MCS家兔血清に1日齢、13日齢、16日

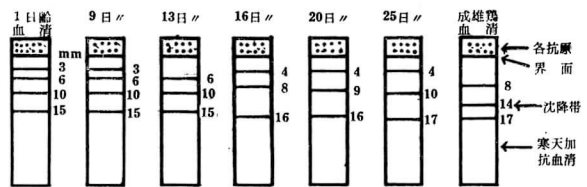
齢、20日齢、25日齢、60日齢及び成鶏血清を反応させて見ると前記重層沈降反応の場合の所見とほぼ同じく、大体2週間前後でこの蛋白分層は消失するものようである。第4図では13日齢までMCS特有のFractionが見られ、第5図では21日齢からすでにBand数は3つに減じ、この場合21日齢雄鶏血清はすでにACSと同じ蛋白構成を呈することを暗示している。

これらの反応像は反応開始後3~4日で出現し、以後は1カ月後も安定した状態を示す。

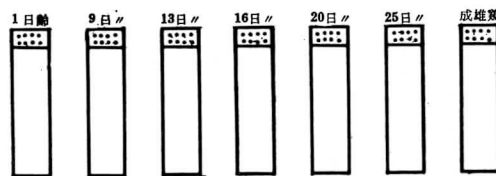
2: ACS, GCS免疫家兔免疫血清の特異反応

寒天ゲルの試験管法において抗ACS、抗GCSにACS、GCSを重層した場合、一定時間後に4本の沈降帯が見られ、MCS

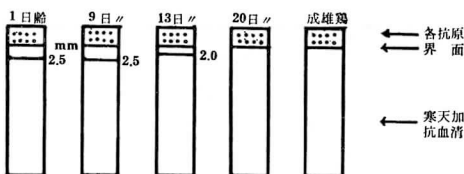
第1図 抗MCS加寒天 gel 試験管内反応 (72時間後の所見)



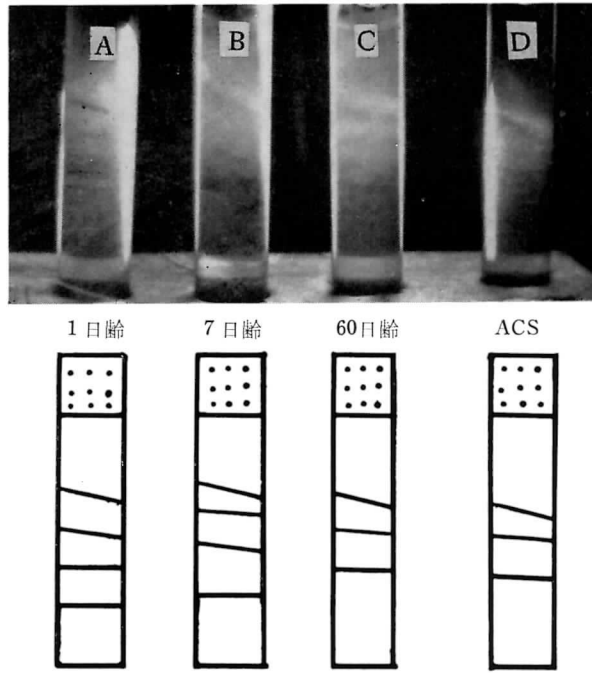
MCS 吸収抗MCS+各日齢雄鶏血清反応



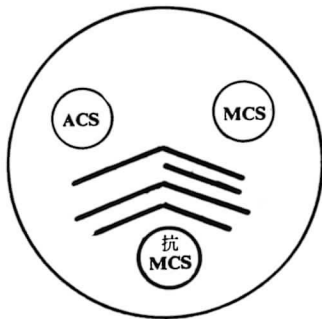
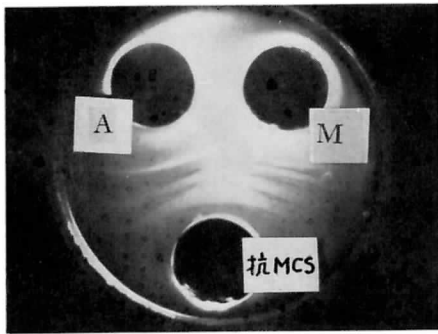
ACS 吸収抗MCS+各日齢雄鶏血清反応



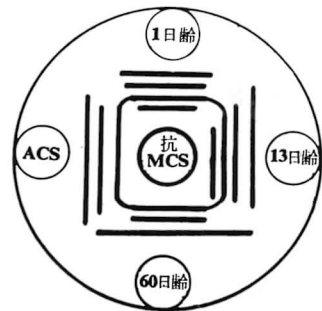
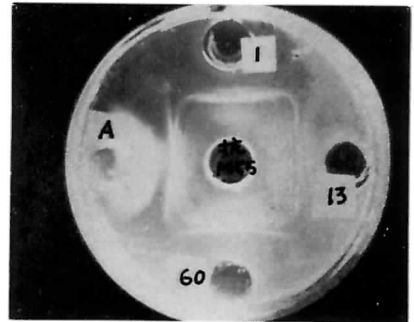
第 2 図 抗 MCS + 各日齡雄雞血清反應



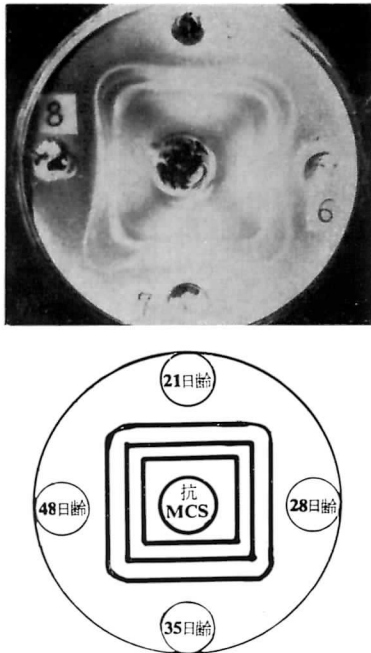
第 3 図



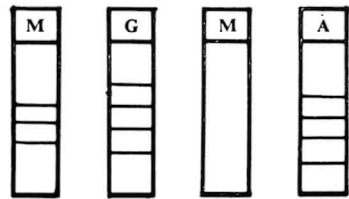
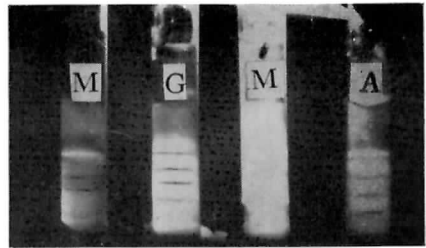
第 4 図



第 5 図



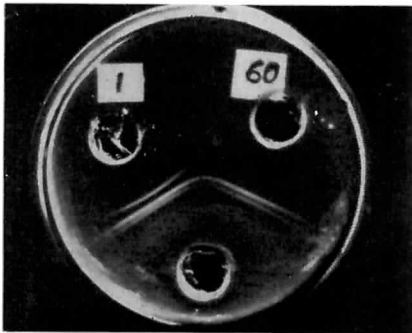
第 6 図 抗 ACS 寒天 gel 試験管内反応



M—M…+MCS 3本の沈降帯
 G—G…+GCS 4本の沈降帯
 A—A…+ACS 4本の沈降帯

●沈降帯のないものは MCS 吸収抗血清である

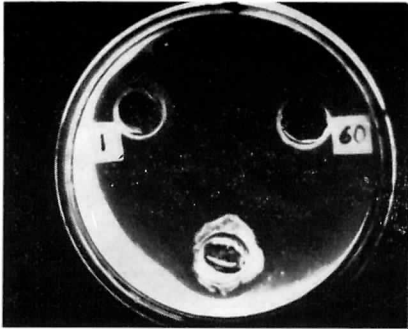
第 7 図



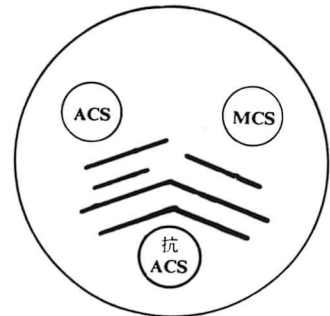
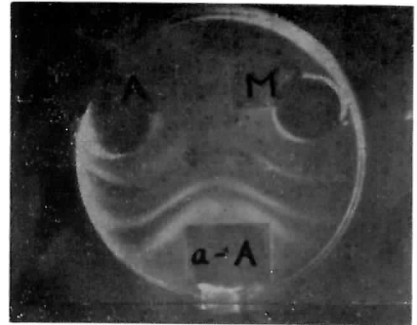
第 8 図



第 9 図

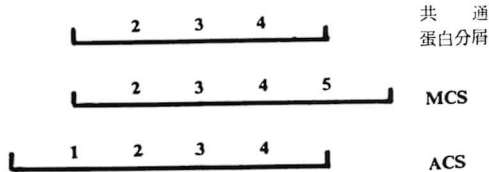
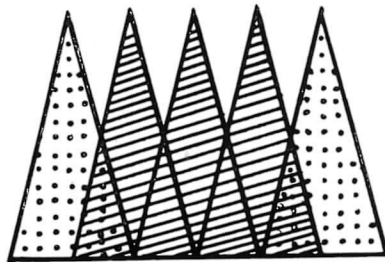


第 10 図



第 11 図 雄鶏血清の蛋白 Fraction

1 2 3 4 5



- 1.....Fraction A
- 1, 2, 3, 4.....ACS Fraction
- 2, 3, 4.....共通 Fraction
- 2, 3, 4, 5.....MCS Fraction
- 5.....Fraction M

を重層すると3本の沈降帯が出現した。さらにこれらの免疫血清をMCSで吸収してACSあるいはGCSを重層させると1本の沈降帯が出現し、MCSを重層させると何等の反応も見られない。これらの反応の数例を次の第6図に示した。これらの所見は、平板シャーレ寒天ゲル内においても同様の反応像を示した。第7図、第8図、第9図および第10図はその反応像である。特に第9図は抗ACSをMCSで吸収すると、それらの反応帯3つが消失し、ACS特異の反応帯のみが残る状態を示したものである。これらの所見を総合すると、前記抗MCSと極めて対照的な性状を示し、ACS、GCSにはMCSに存在しない別個の特有な蛋白分層が少なくとも1個あり、重層沈降反応の結果推察されたように両者間に蛋白質構造上の差異があることがわかる。これらの間には拡散速度にも差がみられた。

そこでこれらの差異がどの時期に生ずるかについて寒天ゲル平板法を用いて検討を加えた。すなわち抗ACSに対し、1日齢、7日齢、10日齢、14日齢、21日齢、28日齢、35日齢の鶏血清を反応させると大体、はやくて14日齢を境として新しい反応帯が出現することがわかった。(1例において、10日齢血清に新しい反応帯が出現した)

これらの反応帯は反応開始後3~4日で出現し、以後は1カ月経過しても全く安定した状態を維持する。すなわち14日齢前後を境としてACS、GCS特有の蛋白Fractionが出現することがわかる。

4 考 察

以上の実験結果からまず第1にいえることは、孵化後の雛血清蛋白は成鶏のそれと異なる成分を有し、免疫血清学的に最少1反応系の特異な抗原・抗体系を有することである。そしてこれは早くて2週齢、おそくとも3週齢までには消失し、それ以後の血清蛋白は成鶏のそれとほとんど差異のない状態を示すが、一方、上述の実験結果から、成鶏には成鶏特有の蛋白Fractionがあり、免疫学的にみて最少1反応系の特異な抗原・抗体系を持つようになるようである。今これらの特異な反応系をそれぞれFraction M (初生雛に特有の蛋白分層) およびFraction A (中雛、成雄鶏に特有の蛋白分層) と名付け、両者に共通の最少三つのFractionとあわせて、鶏血清の免疫血清学的な蛋白構造を第11図のように考えた。すなわち(2)、(3)、(4)の峰がそれぞれに共通のFractionであり、(1)はACS特有のFraction A、(5)はMCS特有のFraction Mを意味している。すなわち図示されるとおりACSは(1)から(4)までのFractionを、MCSは(2)から(5)までのFractionを最少の数として持っていることを意味する。重なりあっている部分は共に濃度の高い血清の場合に、弱い反応系が混入していることを意味する。前述の実験の結果をこの図から考察するならば、抗MCSとはこの(2)、(3)、(4)、(5)の四つの蛋白Fractionを持った血清蛋白を抗原とした免疫家兎血清であり、抗ACSとはこの(1)、(2)、(3)、(4)の四つの蛋白Fractionを持った血清蛋白を抗原とした免疫家兎血清であると言える。この抗MCSをACSで吸収すると、つまり(2)、(3)、(4)、(5)の蛋白Fractionを(1)、(2)、(3)、(4)の蛋白Fractionを持つ血清で吸収すると、(5)のFraction、つまりFraction Mのみが残ると考えられ、抗ACSをMCSで吸収すると、つまり(1)、(2)、(3)、(4)の蛋白Fractionを(2)、(3)、(4)、(5)の蛋白Fractionを持つ血清で吸収すると、(1)のFraction、つまりFraction Aが残ると考えられる。前に述べたように孵化後の雛

血清についての電気泳動的な研究,あるいは哺乳動物における血清学的な研究はかなりの数にのぼるが,孵化後の日齢による変動に関する追跡はほとんど見あたらない。しかし CLEGG et al. (1953) は他の研究目的のためとはいえ,この点について研究し,前に述べたように 0, 1, 2, 3 および 4 週齢の雛血清について電気泳動的に研究し, Component I には第 2 週齢までによく分離し得ない 1 つの峰があることを指摘している。一方 BRANDT et al. (1951) は産卵生理の立場から, 鶏の成長過程における血清蛋白の変動に関する電気泳動的な研究の結果を報告しているが, 問題点と考えられる 2 週齢前後の雛血清についてはふれていない。しかしながら一般に日齢の進むにつれて, 全蛋白濃度及び γ -globulin は増加するとし, 他の諸報告とも一致した結果を得ている。さらに MOOR (1948) が報告しているように産卵鶏血清に特異な Fraction F の存在にも触れ, 卵形成との関係を論じている。

一方, 哺乳動物においては胎仔ならびに幼仔の血清蛋白質の変動に関する研究は多い。一般的には孵化あるいは胎子の成長に伴い, 次第に親の血清蛋白の性状に近づくことを報じ, 水原 (1924) は犬の場合生後 21 日, HEIM et al. (1954) は鶏の場合孵化後 7 日で親と同一の性状に達するとしている。また西山 (1956) は孵卵中の鶏胚血液蛋白について電気泳動的研究を行い, 成鶏の血漿は 6~7 の蛋白組成を持っているが, 孵卵 7 日鶏胚には四つの Peak が見出され, 孵卵日齢の進むにつれて泳動図は次第に成鶏に近づき, 鶏胚特有の Peak も孵化前に消失するとし, 孵化 7 日雛ではほとんど成鶏と変らず, 30 日後は完全に成鶏と同じになったと報告している。しかしながらこれらの報告は親動物特有の蛋白 Fraction の存在, ないしは移行過程についての血清学的特異性については何も触れていない。また石垣 et al. (1958) は濾紙電気泳動法により, 人胎児血清と対比しながら孵卵初期から成鶏に至る過程において, その変動を追跡し, 興味ある結果を得ている。すなわち, 特に泳動図では, 孵卵中には三つの Peak, 孵化時には, 五つの Peak に分離できることを観察し, Tiselius 法が常に分層比率であることの欠陥を指摘し, 各分層濃度 g./dl. を重視すべきことを主張している。さらに血清総蛋白濃度について次のような結果と考察を報告している。すなわち, 孵卵初期 (5 日目) には, 一度高い値を示したのもあったが, 6 日目には全く低値を示し, それより漸時濃度を高め, この傾向は孵化後もさらに強く, ことに卵黄が腹腔内に収容, 吸収されるころからさらに急激に増加し, 埋没卵黄が腹腔内吸収の盛んな孵化後数日間に最高の濃度を示し, その後減少して卵黄の消失したと考えられる孵化後 2 週齢時には孵化後における最低値となり, その後, 総蛋白濃度は再び増加して成鶏のそれと同一になったとし, この事実をおそらく孵化後 2 週齢以降の血清は卵黄に由来するものではなく, 全く外部から摂取した食物由来のものであろうと考察している。

これらの諸報告が孵化後における蛋白 Fraction や濃度変化の時期が著者の血清学的実験結果にみられた Fraction M の消失, Fraction A の出現の時期, つまり初生 2 週齢~3 週齢の時期とほぼ符合する点を重視したい。さらに又一般的に雛の卵黄の完全消失時期は, 前述のように約 2 週齢前後であり, また一方, 加藤 et al. (1953) は孵化後 15 日までは鶏の全生涯を通じて下垂体前葉 α 細胞の最も増殖する時期であると報告しているが, これらの知見をも合わせ考えると, これら特有の二つの

Fraction が卵黄や内生的 Hormone と深いつながりを持っているのではないかと推察される。なお著者の得た電気泳動図は第 12 図のとおりである。

分離された Peak の数は少く、初生第 10 日齢までは 4 峰、20 日齢においては 4～5 峰を分離できた。成雄鶏においては、大体 6 個の Fraction が認められた。BRANDT et al. (1951) や MOOR (1948) などの報告においても、前記 CLEGG et al. (1953) の Pattern と同じように、Peak の変化は認められるが、電気泳動図では、免疫血清学的に得られた特異 Fraction の消長に、はっきりした傾向は認め難い。

以上の諸報告や著者の実験結果から鶏の成長過程における血清蛋白質の変動は大きく二つの時期に区別でき、しかもその差異は予想以上に早いことがわかった。成長の過程においては形態学的にも内分泌学的にも、それ以後の Stage において、かなり著明な変動があるものと思われるが、免疫血清学的にも、これらの変動に関する知見は得られなかった。

免疫血清学的に ACS と GCS の間に特異差を附与出来るかどうかについてはさらに詳細緻密な検討が必要と思われる。

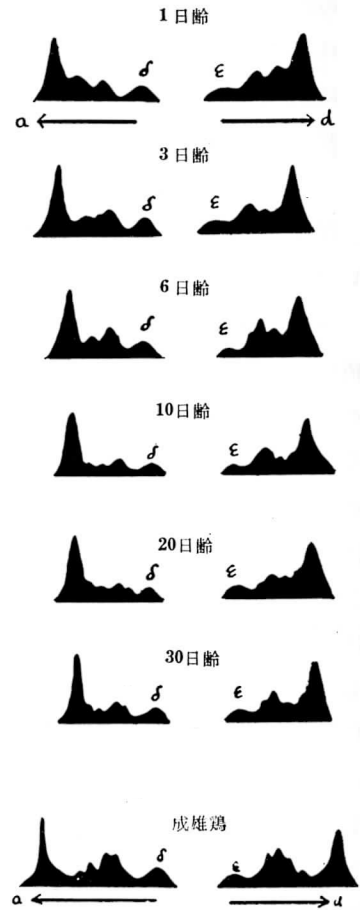
なお Component と Fraction の使いわけについて述べるならば、寒天ゲル内反応における Fraction は一つの Band であり、その中にさらにいくつかの沈降反応に見られるいわゆる沈降輪 (Ring) が含まれているので、これを Component として見るべきではないかと思われる。

なおここで明らかにされた Fraction M 及び Fraction A の血清学的性状について検討を加え若干新しい知見を追加することが出来たが、これについては次章に記述したい。

5 摘 要

家鶏の成長に伴う血清蛋白質の変動を免疫血清学的に追究したところ、初生雄雛血清には中雄雛や成雄鶏血清に見られない特異な蛋白 Fraction (Fraction M と呼称する) が存在し、それは孵化後約 2 週齢まで見られること、ならびに中雄雛や成雄鶏の血清には、初生雄雛に見られない別個の特異な蛋白 Fraction (Fraction A と呼称する) が存在し、それは孵化後約 2 週齢から 3 週齢にかけて出現し、以後は成雄鶏に至るまで検出できることが判明した。特に寒天ゲル内沈降反応術式による試験の結果、初生雄雛、成雄鶏ともにその血清中には血清学的には少なくとも 3 個の共通の蛋白 Fraction が存在し、その他に上記のようなそれぞれに特有の蛋白 Fraction、すなわち、Fraction M および Fraction A が存在するものと考えられるに至った。

第 12 図 各日齢雄鶏血清の電気泳動図



一方、電気泳動学的実験によると、成長に伴い血清蛋白の Peak の分離は増加することが観察されたが、血清学的に検出した各特有の Fraction の消長に関しては何らの知見も得られなかった。使用した抗血清は1日齢雄雛血清、80～90日齢雄雛血清および成雄鶏血清（ともに白色レグホン種）をそれぞれ油性 Adjuvant 処理したものを抗原液として家兎に注入して得た免疫家兎血清である。

第2章 Fraction M および Fraction A の免疫血清学的性状に関する研究*

1 緒 言

著者は第1章において家鶏の成長に伴う血清蛋白質の変動を免疫血清学的に追究し、初生雄雛血清には、中雄雛や成雄鶏血清に見られない特異な蛋白 Fraction (Fraction M) が存在し、それは孵化後2週齢まで見られること、ならびに、中雄雛や成雄鶏の血清には初生雄雛血清には見られない別個の特異な蛋白 Fraction (Fraction A) が存在し、それは孵化後、約2週齢から3週齢にかけて出現し、以後は成雄鶏に至るまで検出できることを報告した。これらの変化は電気泳動的には認め難いものであるが、これら特異の Fraction (M および A) の性状について、特に血清学的性状について検討を加えた結果を報告する。

2 実験材料および方法

(1) Fraction M および Fraction A の製造

第1章記載の抗 MCS, 抗 ACS 家兎血清を製造し、原液等量で ACS 吸収抗 MCS を Fraction M, MCS 吸収抗 ACS を Fraction A とした。

(2) 抗原系には次のものを調製使用した。

なお、使用血清の蛋白濃度はすべて、生理的食塩水で0.4%に規制した。

- ACS …成雄鶏血清（数羽分混合）
- MCS …初生第1日齢雄雛血清（数10羽分混合）
- 卵黄エーテル抽出物（Y物質と略称）

…卵黄 15cc. に 30cc. のエーテルを混和し、約5時間抽出した後、吸引デシケーターで12時間エーテルを排除する。これに 30cc. の生理的食塩水を混和した後、遠沈した上澄液を原液として生理的食塩水で 0.4% の蛋白濃度に規制する。

- 卵白 Albumin (Al と略称)…市販の卵白 Albumin を生理的食塩水で蛋白濃度 0.4% に規制する。
- LHS …産卵鶏血清（数羽分混合）
- CSS …家鶏精清 数回の射出による Sample を混和、生理的食塩水で稀釈したもの。

(3) 抗 LHS（産卵鶏血清免疫家兎免疫血清）の製造

*本報の大意は1961年日本畜産学会西日本支部大会において講演発表した。

免疫操作 (3日間隔, 耳静脈)

第1回注射 LHS 2 cc. + 生理的食塩水 2 cc. = 4 cc.

第2回注射 LHS 2 cc. + 生理的食塩水 2 cc. = 4 cc.

第3回注射 LHS 4 cc.

第4回注射 LHS 5 cc.

最終回の注射日より7日後に全血採取, 血清分離, 非動化处理した。

(4) 抗 CSS (鶏精清免疫家兔免疫血清) の製造

免疫操作 (3日間隔, 耳静脈)

第1回注射 CSS 1 cc. + 生理的食塩水 1 cc. = 2 cc.

第2回注射 CSS 2 cc. + 生理的食塩水 2 cc. = 4 cc.

第3回注射 CSS 3 cc. + 生理的食塩水 4 cc. = 7 cc.

第4回注射 CSS 4 cc. + 生理的食塩水 4 cc. = 8 cc.

第5回注射 CSS 6 cc. + 生理的食塩水 4 cc. = 10 cc.

最終回の注射日より7日後に全血採取, 血清分離, 非動化处理した。

3 実験結果および考察

(1) 拡散公式適合に関する試験

Fraction M および Fraction A をもったこれら抗血清が寒天ゲル内でどのように拡散するかを知ることは, その性状を知り, また, 化学的同定をするための前提条件といえる。鈴木 (1954) の記述にしたがい, 抗 MCS および抗 ACS 家兔血清加寒天ゲルにそれぞれ MCS, ACS および LHS の各 10 倍液から, 倍数稀釈の抗原系血清を重層させ, 37°C の定温器に静置し, その白濁帯拡散の状態を 60 時間のあいだ観察, 記録した。術式は Bowen 変法によった。いま, 各抗血清と各抗原系との反応で見られる沈降帯拡散の結果を表示すると第 13 表から第 18 表のとおりである。この表で時間は反応開始後の経過時間を, 右の抗原数字は抗原の稀釈倍数を示し, 又, 拡散距離の単位は mm である。また, 数値はすべて 4 例における平均値を示している。これらの数値を基礎にして, 特に抗血清と各抗原系の 10 倍稀釈血清との反応について, その拡散の状態をグラフにとってみると, 第 13 図から第 18 図に示すような直線回帰式が得られた。縦軸は白濁帯の拡散距離 mm, 横軸は拡散時間の平方根であ

第 13 表 抗 MCS + MCS (mm)

時間	抗原	10	20	40	80	160	320
(後)							
3時間		1.1	0.7	0.3	0	0	0
6 "		1.7	1.0	0.8	0	0	0
9 "		1.8	1.5	0.9	0	0	0
12 "		2.5	1.8	1.0	0	0	0
24 "		3.5	2.8	1.9	0.4	0	0
36 "		5.2	4.0	3.2	1.3	0	0
48 "		7.0	5.5	3.7	1.5	0.1	0
60 "		7.7	6.0	4.2	1.9	0.2	0

第 14 表 抗 MCS + ACS (mm)

時間	抗原	10	20	40	80	160	320
(後)							
3時間		1.0	0.9	0.1	0	0	0
6 "		1.5	1.1	0.4	0	0	0
9 "		2.0	1.5	0.5	0.3	0	0
12 "		2.5	1.8	0.8	0.4	0	0
24 "		4.0	3.0	2.0	0.5	0	0
36 "		5.8	4.3	3.5	1.1	0	0
48 "		6.5	5.8	4.9	1.9	0.4	0
60 "		7.9	6.5	5.0	2.3	0.7	0

第15表 抗 MCS + LHS (mm)

時間	抗原	10	20	40	80	160	320
(後)							
3時間		1.4	0.9	0.5	0	0	0
6 "		1.8	1.2	1.0	0	0	0
9 "		2.2	1.8	1.0	0	0	0
12 "		2.5	2.0	1.5	0.8	0	0
24 "		4.0	2.2	2.1	1.3	0.5	0
36 "		5.9	4.5	3.1	1.9	1.2	0
48 "		6.9	5.4	5.0	3.1	1.3	0
60 "		8.2	6.6	6.5	3.7	1.9	0

第16表 抗 ACS + MCS (mm)

時間	抗原	10	20	40	80	160	320
(後)							
3時間		1.0	0.2	0.1	0	0	0
6 "		1.2	0.6	0.1	0	0	0
9 "		2.0	0.8	0.1	0	0	0
12 "		2.1	1.0	0.3	0	0	0
24 "		3.3	2.0	1.5	0.4	0	0
36 "		4.7	3.1	3.0	0.7	0	0
48 "		6.0	4.0	3.5	0.8	0	0
60 "		7.0	4.0	?	1.2	0.1	0

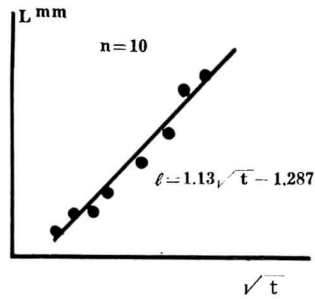
第17表 抗 ACS + ACS (mm)

時間	抗原	10	20	40	80	160	320
(後)							
3時間		0.9	0.3	0	0	0	0
6 "		1.3	0.5	0.2	0	0	0
9 "		2.3	0.8	0.5	0	0	0
12 "		2.8	1.0	0.8	0	0	0
24 "		3.5	1.3	1.4	0.3	0	0
36 "		5.2	2.0	2.3	0.9	0	0
48 "		6.2	2.1	2.4	1.0	0	0
60 "		7.6	2.5	3.8	1.5	0.1	0

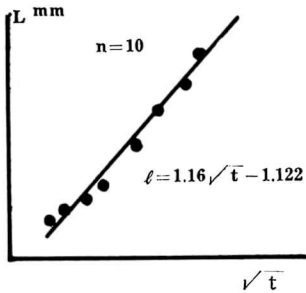
第18表 抗 ACS + LHS (mm)

時間	抗原	10	20	40	80	160	320
(後)							
3時間		1.0	0.5	0.1	0	0	0
6 "		1.3	1.0	0.4	0.1	0	0
9 "		2.2	1.5	0.9	0.2	0	0
12 "		2.3	1.8	1.3	0.3	0	0
24 "		3.3	2.7	1.7	0.9	0	0
36 "		5.0	3.7	2.6	1.0	0	0
48 "		6.5	4.9	3.8	1.7	0	0
60 "		7.8	5.6	4.6	2.0	0.1	0

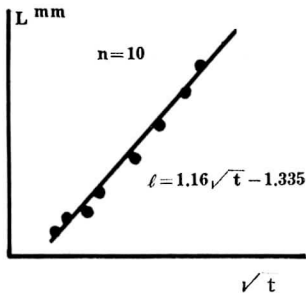
第13図 抗 MCS+MCS



第14図 抗 MCS+LHS



第15図 抗 MCS+ACS



(第16図～第18図は略す。)

る。これらの各図には抗原 10 倍稀釈液のみを示したか、各稀釈抗原系 $n=20, 40, 80, 160$ においても同じ傾向をもつことがわかった。したがってこれらの抗血清の寒天ゲル内沈降反応における拡散速度は、増山等 (1954) のいわゆる拡散公式に適合することがわかった。よって BECKER et al. (1949) の提唱する抗原液置換法による物質の化学的同定も可能と思われたので、卵黄エーテル抽出物質および卵白 Albumin について、実験、考察を試みたところ、いずれの抗体系も Albumin とは関係なく、卵黄物質に関係の深いことが推察されたが、資料不十分のためさらに追加実験の必要があ

り、この実験結果から結論を下すことは早計と考えられた。

(2) 重層沈降反応による試験

(1)の拡散速度からみて卵黄エーテル抽出物質が、Fraction M とかなり関係が深いことが推察されたので、特にこの Y 物質と A1 ならびに産卵鶏血清 (LHS) について種々沈降反応を試みた。まず、Fraction M に Y 物質、A1 ならびに LHS を 10 倍液として (すべて蛋白濃度を 0.4% に規制)、これに倍数稀釈した抗原液を重層したところ、その結果は第 19 表ないし第 21 表のようであった。Fraction M は ACS に、また、Fraction A は MCS にそれぞれ反応しないことは当然であ

第 19 表 f-M + Y 物質 反 応

抗 原 抗 血 清		抗 原 液 稀 釈 度										
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
抗血清 稀釈度	2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	8	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	16	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	32	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	64	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	128	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

り、吸収が完全であることを示している。これらの表でわかるように、Fraction M は A1 とは関係なく、Y 物質と LHS に強い反応を示すが、Y 物質と LHS に対しては、その示す抗原、抗体価が異なり、反応 Pattern が、著しく異なるようである。次に Fraction A に対する反応態度は第 22 表ないし第 24 表のとおりである。すなわ

第 20 表 f-M + A1 反 応

抗 原 抗 血 清		抗 原 液 稀 釈 度					
		10	20	40	80	160	NaCl
抗血清 稀釈度	2	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

第 21 表 f-M + LHS 反 応

抗 原 抗 血 清		抗 原 液 稀 釈 度										
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5210	NaCl
抗血清 稀釈度	2	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	4	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	8	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	16	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	32	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	64	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
	128	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

第 22 表 f-A + Y 物質 反 応

抗 原 抗 血 清		抗 原 液 稀 釈 度					
		10	20	40	80	160	NaCl
抗血清 稀釈度	2	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

第 23 表 f-A + A1 反 応

抗 原 抗 血 清		抗 原 液 稀 釈 度					
		10	20	40	80	160	NaCl
抗血清 稀釈度	2	—	—	—	—	—	—
	4	—	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

わかるように Fraction A にのみ反応を示した。したがって産卵鶏や雄鶏の血清ならびに精清にはともに Fraction A 反応物質が存在することが認められた。

第 26 表 f-A + CSS 反応

抗血清	抗原	抗原液稀積度										
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
抗血清稀積度	2	卍	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—	—
	4	卍	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—	—
	8	卍	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	128	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

さらにまた、抗 MCS, 抗 ACS を Y 物質ならびに Albumin で吸収した血清に、MCS, ACS をそれぞれ重層すると Y 物質で吸収した抗 ACS は ACS にのみ反応し (第 27 表), MCS には反応しない。また、抗 MCS を Y 物質で吸収するとどちらにも反応はみられない。また、Albumin には

第 27 表 Y 物質吸収抗 ACS + ACS 反応

抗血清	抗原	抗原液稀積度										
		10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	NaCl
抗血清稀積度	2	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—	—	—	—	—
	4	卍	卍	卍	卍	卍	卍	—	—	—	—	—
	8	卍	卍	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—
	16	卍	卍	卍	卍	—	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	64	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	128	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Fraction M および Fraction A が存在しないため、吸収することはできない。またこの第 27 表の反応を見ると、特に抗原価が強く現われていることから、Fraction M と Y 物質はかなり密接な関係があることが窺われる。Fraction M および Fraction A に対する各抗原物質の反応態度を一括したのが右の表である。(カッコ内は抗原価を示す)

(3) 寒天ゲル内沈降反応 (平板法)

(2)の重層沈降反応による Fraction M および Fraction A の血清学的性状に関する試験結果から、Fraction M が卵黄物質と極めて密接な関係にあることが推察されたが、これらのことをさらに平板寒天ゲル内反応において観察したところ、次のような結果を得た。

抗原系物質	Fraction M	Fraction A
MCS	+(640)	—
GCS	—	+(160)
ACS	—	+(160)
LHS	+(160)	+(160)
Y 物質(卵黄抽出物)	+(640)	—
Al(卵白アルブミン)	—	—
CSS(鶏精清)	—	+(80)

まず、抗 MCS や抗 ACS 家兎血清と Al や Y 物質との反応系の数を知るために、未吸収の状態では反応させると、第 20 図および第 21 図のようであった。すなわち、Al は何れの抗血清に対しても、反応帯が出現しないが、Y 物質は両方の抗血清に反応帯を示した。しかしながら、抗 MCS に対しては 3 本、抗 ACS に対しては 2 本と、その示す反応帯の数に差異のあることがわかる。次にこれら

の抗血清を吸収して、Fraction M および Fraction A とした血清にこれらを反応させると第 22 図および第 23 図のとおりで、Fraction M に対しては、Y 物質は 1 本の反応系が残るが、Fraction A に対しては全く陰性であった。このことは前表の沈降反応の場合と全く同じ結果で、Fraction M は Y 物質と極めて密接な関係のあることを示している。

(4) 抗 LHS 家兔血清 (抗産卵家鶏血清) による諸反応

MCS, ACS および LHS など鶏の血清蛋白の血清学的構造の関連を知る目的で、抗 LHS 家兔血清を製造し種々実験を試みた。製造された抗血清の抗原、抗体価は第 28 表のとおりである。この抗血

第 28 表 抗 LHS + LHS 反応

抗血清	抗原	抗原液 稀 積 度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀積度	10	卍	卍	卍	卍	卍	—
	20	卍	卍	卍	卍	卍	—
	40	卍	卍	卍	卍	卍	—
	80	卍	卍	卍	卍	卍	—
	160	卍	卍	卍	卍	卍	—

清を、各抗原系で吸収してそれぞれ反応を検した結果を一括して示すと次のとおりである。(カッコ内は抗原価を示す)

- a. MCS 吸収抗 LHS + ...
 - MCS —
 - ACS —
 - LHS +(1000)
- b. ACS 吸収抗 LHS + ...
 - MCS +(1000)
 - ACS —
 - LHS +(1000)

(第28表から第31表参照)

この結果で MCS 吸収抗 LHS に対する MCS の反応が陰性であることは当然としても、これに対する ACS の反応が陰性であることは、かなり複雑な問題を投げかけているように思われる。

すなわち、LHS が第 19 図に示したような蛋白

第 29 表 MCS 吸収抗 LHS + LHS 反応

抗血清	抗原	抗原液 稀 積 度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀積度	10	卍	卍	卍	—	—	—
	20	卍	卍	卍	—	—	—
	40	卍	卍	卍	—	—	—
	80	卍	卍	卍	—	—	—
	160	卍	卍	卍	—	—	—

第 30 表 ACS 吸収抗 LHS + MCS 反応

抗血清	抗原	抗原液 稀 積 度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀積度	10	卍	卍	卍	—	—	—
	20	卍	卍	卍	—	—	—
	40	卍	卍	卍	—	—	—
	80	卍	卍	卍	—	—	—
	160	卍	卍	卍	—	—	—

第 31 表 ACS 吸収抗 LHS + LHS 反応

抗血清	抗原	抗原液 稀 積 度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀積度	10	卍	卍	卍	—	—	—
	20	卍	卍	卍	—	—	—
	40	卍	卍	卍	—	—	—
	80	卍	卍	卍	—	—	—
	160	卍	卍	卍	—	—	—

構成を持つとすれば、MCS で抗血清 (1, 2, 3, 4, 5 全部の Fraction を持つと考えられる) を吸収すると (1) の Fraction は残るはずであり、したがって ACS に対する反応系が出現すると思われるのであるが、沈降反応においても、また第 26 図の平板寒天ゲル内反応においても、共に陰性であった。これらの現象から LHS には Fraction A は割合に少く、抗 LHS を MCS で吸収する時、随伴的に沈澱を起こしたものではないかと考えられた。

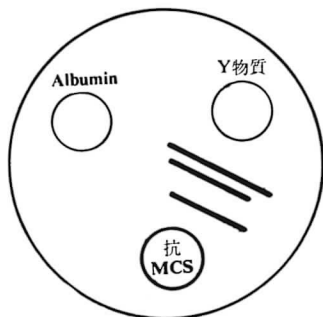
第 24 図は鶏精清と GCS に反応させたものである。精清に対し 2 本、GCS に対し 4 本の沈降帯が見られ、また、第 25 図は Y 物質、ACS, MCS, 精清に反応させたがそれぞれに 2~4 本の反応帯

が出現し、したがって抗 LHS は Y 物質, ACS, MCS ならびに血清のいずれとも関連があることが推察された。

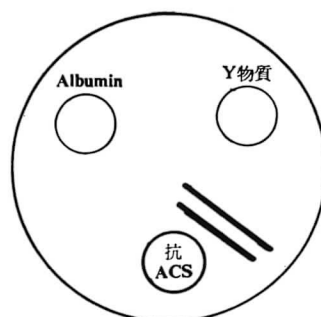
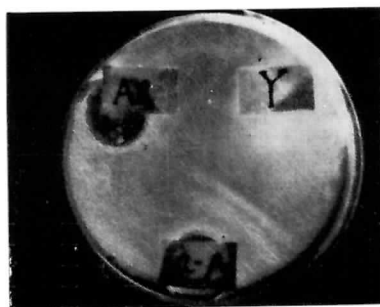
次に MCS あるいは ACS で抗 LHS を吸収した血清について検討を加えた。第 26 図は MCS 吸収抗 LHS に MCS, ACS を作用させたものであるが、共に反応帯は消失している。つまり、MCS, ACS の中で抗 LHS に対して反応を起こさせた抗原、抗体系は MCS で除去されたと考えられる。これは、前に述べた結果とよく一致している。次に、ACS 吸収 LHS に同じく MCS, ACS を作用させると、第 27 図のように MCS に対してのみ強い沈降帯が出現する。これらの諸反応はすべて今まで得られた沈降反応の結果を更に確認することとなった。

このように考える時、前記、MCS 吸収抗 LHS に対する LHS 反応ならびに ACS 吸収抗 LHS に対する MCS 反応がともに陽性(抗原価1000倍)であることは、この反応物質が産卵鶏特有の Fraction に相当するのではないかと考えを起こさせる。すなわち、産卵鶏血清の蛋白質成分は一応、 $(MCS + x) + (ACS + x') = MCS + ACS + (x \sim x')$ と想定することは出来ないだろうか。ともあれ、LHS が Fraction M および Fraction A を共有することは既に述べたとおり間違いないことのようにである。さらに、中でも Fraction M が LHS の蛋白構成にかなり重要な役割を占めていることは、反応の強さと特異性から見て確かなようである。反面、Fraction A の占める割合は少く、産卵鶏血清蛋白の多くの部分が Fraction M + $(x \sim x')$ で構成されているのではないかと考えられるが、しかしこの点、第 24 表に示された Fraction A の LHS に対する反応の強さと矛盾するようであり、これに対する疑点が残された。

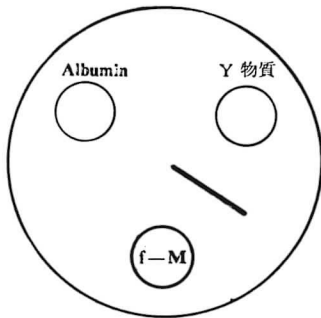
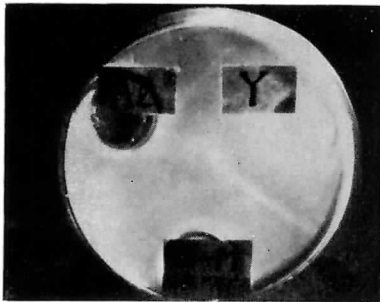
第 20 図



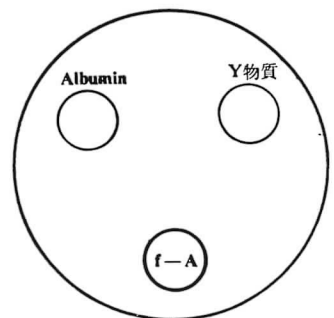
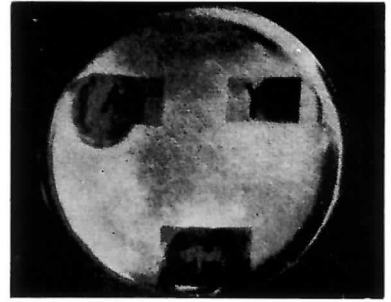
第 21 図



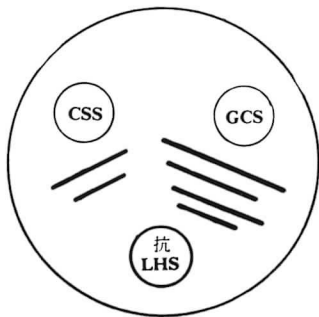
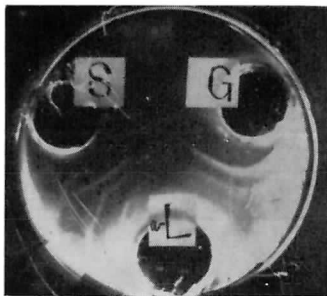
第 22 図



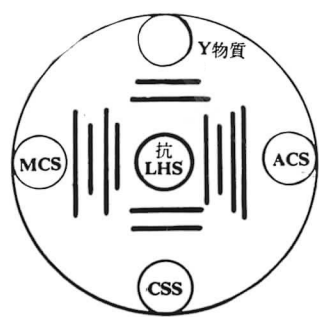
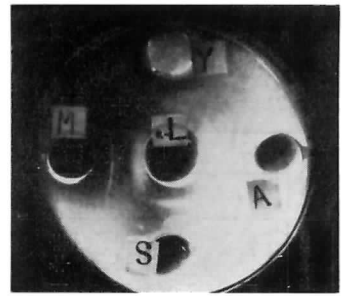
第 23 図



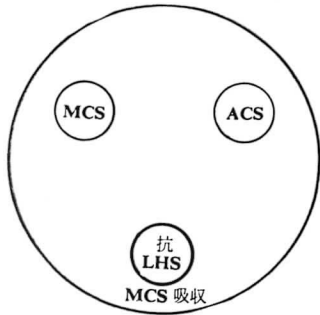
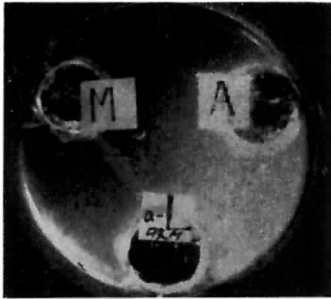
第 24 図



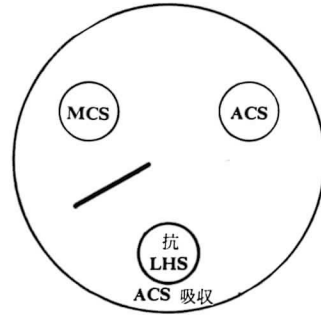
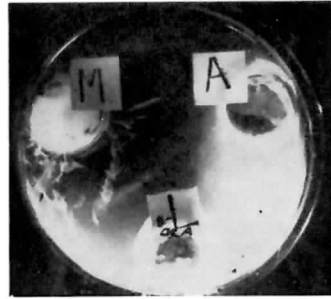
第 25 図



第 26 図



第 27 図



(5) 抗 CSS 家兔血清 (抗鶏精清血清) による諸反応

(4) の抗 LHS について、抗 CSS を製造し、この抗血清に対する諸抗原系の反応を検し、もって ACS, MCS および LHS の血清学的構造の特異性を知ろうと試みた。抗血清の製法は前述のとおりである。

第 32 表 抗 CSS + ACS 反応

抗血清	抗原	抗原液稀釈度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀釈度	2	卍	卍	卍	卍	卍	—
	4	卍	卍	卍	卍	卍	—
	8	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

第 33 表 抗 CSS + MCS 反応

抗血清	抗原	抗原液稀釈度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀釈度	2	卍	卍	卍	卍	卍	—
	4	卍	卍	卍	卍	卍	—
	8	卍	卍	卍	卍	卍	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

得られた抗血清の抗原、抗体価は第 32 表のとおりで、ACS に対し極めて高い抗原価を持った血清が得られたが、MCS に対しては第 33 表のとおりその反応度は弱かった。そこで次に吸収抗血清について、種々、反応を試みたところ、一括して次のような結果を得た。(カッコ内は抗原価を示す)

a. MCS 吸収抗 CSS + $\begin{cases} \text{-LHS} & + (10^4) \\ \text{-ACS} & + (10^4) \\ \text{-MCS} & - \\ \text{-CSS} & + (10^2) \end{cases}$

- b. ACS 吸収抗 CSS + $\begin{cases} \text{ACS} & \text{—} \\ \text{MCS} & \text{—} \\ \text{CSS} & \text{—} \end{cases}$
- c. LHS 吸収抗 CSS + $\begin{cases} \text{ACS} & + (10^2) \\ \text{MCS} & \text{—} \end{cases}$

これらの反応態度からCSSはACSに極めて密接な関連があるように思われるが、特異な点としては陽性反応を呈するものは抗原価がすべて高いことである。なお、第34表ならびに第35表にみられるように、抗CSSをMCSやLHSで吸収しても、なおACSに対する反応系を残すことは、ACSとCSSとの蛋白構成が極めて類似していることを意味するものであると同時に、第36表で見られるようにMCSで吸収したものにLHSに対する反応系が残っていることは、MCSおよびACSがLHSの蛋白構成の一部を占めていることを意味するものと言えよう。又これらの反応からFraction MはCSSと何等関係がないことがわかる。

第34表 MCS吸収抗CSS+ACS反応

抗原 抗血清		抗原液稀釈度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀釈度	2	卅	卅	卅	+	—	—
	4	卅	卅	卅	—	—	—
	8	卅	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

第35表 LHS吸収抗CSS+ACS反応

抗原 抗血清		抗原液稀釈度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀釈度	2	+	+	—	—	—	—
	4	+	—	—	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

第36表 MCS吸収抗CSS+LHS反応

抗原 抗血清		抗原液稀釈度					
		10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	NaCl
抗血清稀釈度	2	卅	卅	卅	+	—	—
	4	卅	卅	卅	—	—	—
	8	—	—	—	—	—	—
	16	—	—	—	—	—	—
	32	—	—	—	—	—	—

以上の観察から、ACSとCSSとは同種の蛋白成分を持っていると言える。したがって、Fraction Mが卵黄物質や、産卵鶏の特異成分と極めて密接な関係があることと対照的に、Fraction Aは成雄鶏や精清と密接な関連があることが考えられる。このことからFraction Mが卵黄 Vitellin に関係があり、Fraction Aが雄性 Hormone に

由来する物質と関連があることが推察されるが、この点については、さらに次章において追究したい。

4 摘 要

Fraction M, Fraction A, 抗LHSならびに抗CSSを製造し、Fraction M および Fraction A の血清学的性状につき検討を加えたところ、大要次のような結果を得た。

(1) Fraction M および Fraction Aの寒天ゲル内における抗原、抗体系による反応帯の拡散速度は、増山等の拡散公式に適合する。従って、このことから抗原液置換法により抗原物質の化学的同定も可能と思われ、この点について検討したところ資料不十分ではあるが、Fraction M が卵黄抽出物に極めて密接な関係があることが推定された。卵白 Albumin は何れの Fraction にも関係ない

ことが明白となった。

(2) 重層沈降反応による試験から Fraction M は卵黄抽出物に、また、Fraction A は精清と特に密接な関係にあることが想定された。また、LHS には Fraction M および Fraction A が共に存在することが認められた。

(3) 平板法による寒天ゲル内沈降反応においては、未吸収抗 MCS, 抗 ACS は卵黄抽出物に対し、それぞれ3本と2本の沈降帯を示すが、吸収して特異性を附与された Fraction M に対しては1本の沈降帯を残し、Fraction A に対しては何等の反応帯も出現しなかった。また、Albumin は何れの抗血清および Fraction に対しても、前と同様反応を示さなかった。

(4) 抗 LHS 家兎血清に対する各抗原系の反応結果から特に LHS の蛋白構成が論議され、LHS は Fraction M および Fraction A を共に持っているが、それだけでなく、別成分(x~x') の存在することが考察され、成分の変性についても論及された。寒天ゲル内(平板)反応においても全く同様の結果を得た。

(5) 抗 CSS 家兎血清に対する各抗原系の反応結果から察すると、CSS と ACS の蛋白構成は極めて類似していると言える。

(6) 上記の結果から Fraction M は卵黄蛋白と、また、Fraction A は精清や ACS, LHS など繁殖期の成鶏血清にのみ存在することから、雄性 Hormone に由来する物質と、それぞれ関連があるように考えられた。

第3章 Fraction M および Fraction A の生成と起源に関する実験的研究

緒 言

前章において、Fraction M が卵黄蛋白に、また Fraction A が雄性 Hormone に対し密接な関連があるのではないかと推論したが、本章ではこの点について血清学的に検索した結果を報告する。

産卵鶏血清の特異性については、すでに古くから多くの人々により研究されている。このことは単に鶏だけではなく、総べての繁殖期にある卵生あるいは卵胎生動物にも同様に認められている。この産卵鶏血清の特異性は、磷蛋白の存在によるものとされ、LASKOWSKI (1938) はこの磷蛋白の抗原性が Vitellin と同じである点から、これを血清 Vitellin と名付けた。その後この産卵血清に特異的な血清 Vitellin の生産器官、消長等に関する多くの報告がなされている。

わが国でも佐々木 (1932)、細田 (1950~1958)、広江 (1955) の報告がある。又、佐久間 (1924) は繁殖期中の魚類にのみ認められる特異的な血清蛋白が、卵黄中の蛋白と血清学的に同一な性質を持っている点から考えて、血清中のものは卵黄に由来したものと考えた。その後 KNITTI et al. (1937) を初めとする多くの人々により、血清 Vitellin は内生的な Estrogen の作用により、肝臓において生産され、血流を介して卵巣に蓄積され Lipovitellin となるための前階物質と考えられるに至り、さらに注射された Estrogen の作用により、肝臓において生産されることが実験的に証明

されるに至った。元来血清 Vitellin は卵巣に蓄積されて卵黄の主蛋白質成分となるものと考えられており、一方、血清 Vitellin の性状を詳しく知るためにも、卵黄 Vitellin の性状およびそれら両者間の関係を知る必要がある。現在までのところ卵黄中には Lipovitellin, Livetin, Phosvitin および Lipovitellenin の四つの磷蛋白が存在するとされ、免疫化学的に見た場合、血清 Vitellin にはあたかも Lipovitellin と Phosvitin が一つの蛋白分子として存在しているのではないかと考えられている。又最近 TANABE et al. (1961)は、産卵鶏血清と卵黄には共通の二つの蛋白 Fraction が存在することを明らかにしている。

以上のことから著者の想定する Fraction M と血清 Vitellin との密接な関係は、Estrogen 注射雛血清中における Fraction M の消長によって証明されるのではないかと考えられ、この点について実験を計画した。

さらに又、若し Fraction A が雄性 Hormone に関連があるとすれば、初生雛に雄性 Hormone を大量投与した場合に Fraction A に反応を示す物質が検出出来るのではないかと考えのもとに雄性 Hormone 投与試験を行った。

その他、卵黄囊除去雛の血清についても実験観察を試みた。すなわち、もしも特異蛋白 Fraction M が卵黄由来のものだとすれば、ごく早期に卵黄囊を除去した場合、その雛の血清中から、この特異蛋白 Fraction M が消失するのではないかと考えられるので、この点を確認するための実験を行った。前にも述べたように、この卵黄囊の完全消失時期とされる孵化後 2 週齢前後の雛まで、その血清中に Fraction M が検出されることから、このことは容易に推察されるところである。

次にこの Fraction M が生理的状态で完全に消失していると考えられる 23 日齢雛血清に卵黄を多給した場合、どのような変化が起こるかについて検討を加えた。産卵鶏では卵黄形成のために多量の Lipoprotein が血清中に存在するが、その中に含まれる脂肪酸は飼料から容易に移行することが、古くからよく知られている。おそらくは飼料から吸収された脂質も一部はすぐ卵黄形成に用いられると思われ、雄鶏にこのような機構があるかないかは興味のある問題である。本間 et al. (1958) は腹腔に卵黄を注射した場合、卵黄はそのままの形で、血中に移行することを認めているが、卵黄を中雄雛に多給した場合、卵黄蛋白に由来する Fraction M が検出できるかどうかは極めて興味のあることであるが、今回は少羽数 (5 羽) の例ではあるが、このことについて検討した結果を報告する。

さらにまた Fraction M は産卵鶏血清の特異蛋白分層と比べるとかなり単純な構成を持っていると思われるけれども、雛の発育に対し、この Fraction M は極めて重要な生理的役割を果しているのではないかと考えられ、Fraction M が雛の発育初期に欠除するか、あるいは生物学的に不活性化された場合、しかもそれが Stage 特異的なものとした場合、ある程度、発育阻害要因として作用するのではないかと考えられたので、この点についても免疫学的に検索を試みることにした。

第1節 初生雛，中雛に対する性 Hormone 投与が，その血清蛋白質，特に Fraction M および Fraction A の消長に及ぼす影響について

1 実験材料および方法

(1) 実験材料：白色 レグホン 1 日齢 雄雛および同じく 23 日 齢雄雛，各試験区 10 羽，成雄鶏 2 羽。

(2) 使用 Hormone の種類および量，投与回数

a： 1 日齢雄雛，23 日齢雄雛および成雄鶏に対し，Estrogen (Diethyl stil bestrol) 15mg. (成雄鶏は 30mg.) を 1 羽当り 1 回投与後 7 日目 (成雄鶏は 2 週後) に放血，血清分離を行い，供試した。血清は全部実験区ごとに混和して使用したが，これらの血清は採血時にはそれぞれ 7 日齢，30 日齢，および成雄鶏の血清となっている。

b： 1 日齢雄雛に対し，Androgen (Testoviron-Depot Schering) を 1 羽当り 2 mg., 連日 3 回，計 6 mg. 投与。孵化 7 日齢時において放血，血清分離を行い，供試した。血清は混和して使用したが，採血時は 7 日齢雄雛となっている。

c. 対照雛はそれぞれ 10 羽とし，無処理のままである。血清は混和して使用したが，採血時には，一群は 7 日齢雄雛，一群は 30 日齢雄雛となっている。

2 実験結果および考察

(1) Estrogen 投与試験

重層沈降反応による実験結果について Fraction M および Fraction A に対し，Estrogen を注射した雛血清を反応させた結果を抗体 2 倍液でとりまとめると第 37 表のとおりである。

第 37 表 Fraction M および Fraction A に対する Estrogen 注射鶏血清の特異反応 (抗体 2 倍)

抗原系 \ 抗原稀釈	Fraction M								Fraction A							
	10	20	40	80	160	320	640	NaCl	10	20	40	80	160	320	640	NaCl
Estrogen 注射 7 日齢雄雛血清	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	卅	卅	+	-	-	-	-	-
対照無処理 7 日齢雄雛血清	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Estrogen 注射 30 日齢雄雛血清	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	卅	卅	+	-	-	-	-	-
対照無処理 30 日齢雄雛血清	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	+	-	-	-	-	-
Estrogen 注射 成雄鶏血清	卅	卅	+	+	-	-	-	-	卅	卅	卅	-	-	-	-	-
対照無処理 成雄鶏血清	-	-	-	-	-	-	-	-	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-

Fraction M に対しては各対照区に示されたとおり，7 日齢雄雛においては勿論反応系が存在するはずである。又，30 日齢雄雛の鶏血清に対しては，もともと Fraction M は存在しないが，Estrogen を注射した 30 日齢雄雛および成雄鶏の血清に Fraction M に対する反応系が出現したことは，極めて注目すべきであり，Fraction M が Estrogen 投与によって産出される血清 Vitellin

と類似の性状を持った物質ではないかとの推論が当を得ていたことを立証するものと言える。又、Estrogen を注射した7日齢雄雛は、対照無処理の7日齢雄雛血清に比べ、Fraction M に対して、より高い抗原価を示していることも面白い。又、Fraction A に対しては、すでに述べたように、7日齢雄雛血清にはその反応系がなく、30日齢雄雛血清および ACS にはもちろん、反応系が存在するが、Estrogen を投与した7日齢雄雛血清中には弱いながら(20倍)反応系が出現した。これは産卵鶏血清(LHS)が、Fraction M および Fraction A を共に持っていることを考えると当然のことと言える。従ってこのことから Estrogen は Fraction A 対応物質の産生にも関与しているものと考えられる。一方、成鶏血清の Fraction A の反応度は Estrogen の注射によって弱まるので、ここにかかなり複雑な Hormone の作用が考えられ、この場合、Estrogen 投与は Fraction A に対しては、Fraction M と違って、相乗的作用はなく、むしろ抑制的に作用していることが推察される。

以上のことから Fraction M は Estrogen 注射によってできた卵黄 Vitellin と類似の蛋白分層であると言えよう。これらの変化は Estrogen 投与の1日齢、30日齢雄雛および成雄鶏血清が対照雄雛血清と比べて肉眼的色調が著しく相異し、産卵鶏血清の色調とは区別がつかないほどよく似ていることでも容易にその関連性が首肯出来る。

(2) Androgen 投与試験

次に Androgen を投与した結果をとりまとめると第38表のとおりである。

第 38 表 Fraction M および Fraction A に対する Androgen 注射鶏血清の特異反応(抗体2倍)

抗原系	抗血清 抗原稀釈	Fraction M								Fraction A							
		10	20	40	80	160	320	640	NaCl	10	20	40	80	160	320	640	NaCl
Androgen 注射 7日齢雄雛血清 対照無処理 7日齢雄雛血清	}	—	—	—	—	—	—	—	—	卅	—	—	—	—	—	—	—
		卅	卅	卅	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

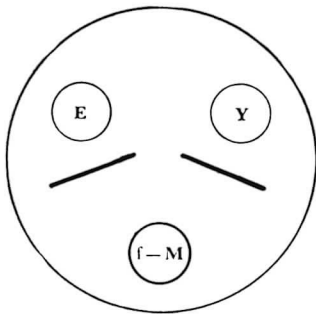
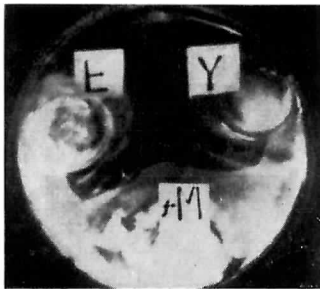
いずれも Fraction M および Fraction A に対し、Androgen を注射した7日齢雄雛血清を反応させたものである。前に述べたように7日齢雄雛血清は Fraction M に対し反応系を有し、Fraction A には反応系を持っていないが、ここに示したように、Androgen を注射した7日齢雄雛(採血時)血清においては弱い程度ではあるが、10倍抗原価まで陽性反応が検出出来たことは極めて注目すべき点と思われる。さらに興味のあることは7日齢雄雛血清においては、Fraction M に対する反応系が出現すべきであるにもかかわらず、反応は陰性であった。このことについては特に資料、材料を種々調製し、繰り返し実験を行ったが、Fraction M に対する反応系の検出は出来なかった。この現象に対しては、Androgen を幼雛に大量投与した場合(この場合1日齢雄雛1羽に2mg、当り3回、計6mg投与)、Fraction M 存在の裏付けとなる卵黄 Vitellin の産生に対し、Androgenic な物質が抑制する作用を発現するのではないか、あるいは卵黄由来の血清蛋白質の吸収または変性を促進せしめるのではないかとも考えられるが、興味のある点である。これら Androgen 注射7日齢雄雛血清中に弱いながら Fraction A の出現を見、逆に Fraction M が消失したことは、

多くの問題を含んでいるように思われる。今後さらに例数をふやし、緻密な計画のもとに追試し、その機序について検索する必要がある。

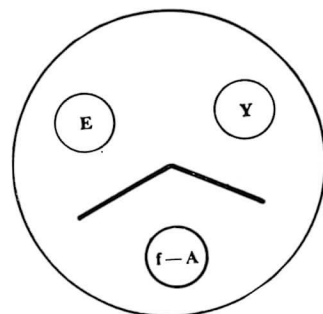
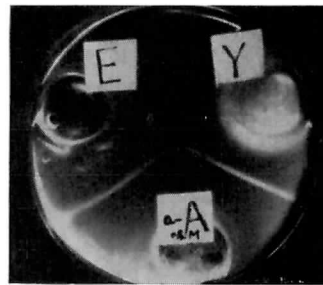
以上の事実から、血清学的には Fraction M は Estrogen 由来の血清 Vitellin の性状とよく一致し、また、Androgen 注射によって、その血清蛋白質の中に Fraction A に反応を示す蛋白 Fraction の出現が明らかとなった。

これらの関係は、平板式寒天ゲル内反応においても明らかに観察された。すなわち第 28 図および第 29 図は Fraction M および Fraction A に Estrogen 注射鶏血清と後で述べる Yolk 多給鶏の血清を反応させたものであるが、ともにはっきりした反応帯が出現している。第 31 図は抗 LHS に Androgen 注射雄雛血清と Yolk 多給中雛血清を反応させたものがあるが、Androgen 注射 7 日齢雄雛に 2 本、Yolk 多給 33 日齢雄雛血清に 4 本の沈降帯が出現した。第 30 図は、Estrogen 注射 7 日齢雄雛の血清は Fraction M および Fraction A に対する反応態度を異にしていることを示しているが、この点注目すべきである。

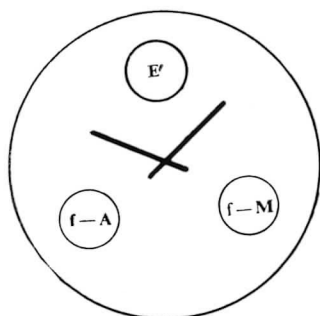
第 28 図



第 29 図

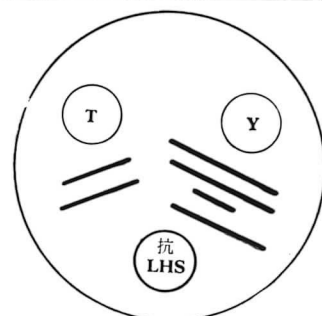


第 30 図



註： E : Estrogen 注射 30 日齡雄雛血清
 E' : Estrogen 注射 7 日齡雄雛血清
 T : Androgen 注射 7 日齡雄雛血清
 Y : Yolk 多給 33 日齡雄雛血清
 S : 雄鷄精清 (CSS)
 G : 中雄雛血清 (GCS)
 f-M : ACS 吸収抗 MCS
 f-A : MCS 吸収抗 ACS
 a-L : 抗産卵鷄血清

第 31 図



3 摘 要

(1) 初生雄雛 (1 日齡) に Estrogen を注射し 7 日目 (7 日齡) に放血して得た血清について、Fraction M および Fraction A の検出を行ったところ、Estrogen 注射 7 日齡雄雛血清においては Fraction M に対して対照 7 日齡雄雛血清の約 2 倍の抗原価を示す反応が現われた。また、Fraction A に対しても対照雛は陰性であるのに対し、約 20 倍稀釈まで陽性反応を見た。

Estrogen 処理雄雛および成雄鷄血清は産卵鷄の特異血清の色調と區別出来ない程によく似た特異性を表わしている。又このことは産卵鷄の血清蛋白質構成成分は ACS + MCS + (x~x') ではなからうかとの前章の考察に符合すると考えられる。

(2) 23 日齡雄雛に Estrogen を注射し 7 日目 (30 日齡) に放血して得た血清について Fraction M および Fraction A の検出を行ったところ、Fraction M は対照 30 日齡雄雛血清には検出されないが、Estrogen を注射した 30 日齡雄雛に Fraction M に作用する抗原系 (抗原価 80 倍) を検出出来た。又 Fraction A に対しては、対照の無処理雛が約 40 倍の抗原価を示すのに対し、Estrogen 処理雄雛はその 1/2 の価を示し、何か抑制的作用が考えられる。

(3) 成雄鷄に Estrogen を注射し 14 日目に放血して得た血清について Fraction M および Fraction A の検出を行ったところ、Fraction M に対しては約 40 倍のところまで検出された。(無処理雄鷄は反応はない) 又 Fraction A に対しては無処理雄鷄が抗原価 160 倍を示すのに対し、Estrogen 処理雄鷄については約 1/4 の 40 倍の価を示し何か抑制的作用が考えられる。

(4) 1 日齡雄雛に大量の Androgen を投与し、投与開始後 7 日目に放血して得た血清につい

て、Fraction M および Fraction A の検出を行ったところ、Androgen 注射7日齢雄雛血清中には Fraction M に対応する反応系が全く見られず、Fraction A に対応する反応系の出現を見た。このことは Androgen が Fraction M の発現を抑制あるいは卵黄由来血清蛋白質の吸収、変性を促進せしめるためではないかと考えられ、これに対し、対照無処理7日齢雄雛血清には出現しないところの Fraction A が Androgen 処理7日雛血清に検出出来たことは、Fraction A が血清学的には雄性Hormone と関連が深いことを意味していると言える。

第2節 卵黄嚢除去雄雛血清の免疫血清学的特異性に関する実験的研究

1 実験材料および方法

供試雛はすべて白色レグホン雄雛で、孵化第2日齢時に卵黄嚢を完全に除去した。除去は腹側を約0.5～1.0cm. 切開して卵黄嚢を引きだし、Yolk stoak の部分を結さつし、完全にこれを除去した後、腸管をかん納し、腹壁を縫合した。

このようにして卵黄嚢が完全に除去された初生雄雛を普通の完全育雛飼料で対照雛とともに飼育し、除去後、7日目に屠殺放血、血清を分離して、反応試験に供した。したがって、供試血清は孵化後、9日を経過した雄雛血清(MCS)ということになる。なお供試雛は10羽であるが手術中に1羽、手術後4日目に1羽、計2羽死亡し、残りの8羽分の血清を混和して試験に供した。

2 実験結果および考察

卵黄嚢除去9日齢雛血清と Fraction M および Fraction A との反応を第39表に示した。Fraction M に対し対照の9日齢雄雛血清は抗原価80を示すのに対し、試験雛血清は10倍士の反応を

第39表 Fraction M および Fraction A に対する Yolk sac 除去雛血清の反応 (抗体2倍)

抗原系	抗血清		Fraction M						Fraction A							
	抗原	稀釈	10	20	40	80	160	320	NaCl	10	20	40	80	160	320	NaCl
Yolk Sac 除去 9日齢雄雛血清 対照無処理 9日齢雄雛血清	}	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
		卅	卅	卅	+	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

呈した。この反応から卵黄嚢の除去によって MCS の中にある特異蛋白 Fraction M は除去後7日目は消失したか、あるいは消失はしなくとも大部分が消失しかけていることを知ることが出来る。

また、Fraction A に対する卵黄嚢除去9日雛血清の反応は、そのいずれにも反応系は全く認められない。

このことから Fraction M は卵黄由来の特異蛋白 Fraction であることは確実だと思われ、今までの実験で得られた実験結果をさらに確証したと言える。寒天ゲル内反応ではこの反応は Fraction M に対応する反応系が弱い程度ながら出現している。

3 摘 要

卵黄囊除去雄雛血清の特異性について特に初生雄雛血清の特異 Fraction と思われる Fraction M の消長について実験的研究を行ったところ次のような結果を得た。すなわち、卵黄囊を除去した7日目（孵化後9日齢）の雄雛の血清中には Fraction M に対応して反応する蛋白 Fraction の大半が消失していることがわかった。このことから MCS に特異的に見出される Fraction M は卵黄蛋白由来の特異蛋白 Fraction であることが確認された。

また、Fraction A に対しては何らの反応も示さないことからこの Fraction A は卵黄蛋白とは関連がないものと思われる。

第3節 卵黄多給中雄雛血清の免疫血清学的特異性に関する研究

1 実験材料および方法

白色レグホン 23 日齢雄雛，5羽をその必要飼料の 1/2 を卵黄におきかえた飼料で 10 日間飼育し，33 日齢に達した時に，全血採取，分離された血清を混和して試験に供した。新鮮な卵黄（卵白部は出来るだけ完全に除去）80g. と市販の完全配合育雛飼料 80g.，計 160g. をこねあわせ，5羽1日分の飼料として，10 日間連続給与した。当初食いつきが悪く相当量食べ残しがあつたが（日齢に対し給与量がやや過量であった），3日頃より，よく食べるようになった。反応は重層沈降反応ならびに平板寒天ゲル内反応によって検した。

2 結果および考察

第 40 表 Fraction M および Fraction A に対する Yolk 多給雄雛血清の反応（抗体 2 倍）

抗原系	抗血清 抗原稀釈	Fraction M							Fraction A						
		10	20	40	80	160	320	NaCl	10	20	40	80	160	320	NaCl
Yolk 多給 33日齢雄雛血清	}	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-
对照無処理 33日齢雄雛血清		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

卵黄多給雄雛血清は第 40 表に示されるように Fraction M に対し，予想以上に強い反応が現われた。対照区の 30 日齢雄雛では勿論反応はない。又，Fraction A に対しては，卵黄多給 33 日雄雛血清は抗原価 40 倍まで反応を示し，正常の場合と変わらないが Estrogen 注射の場合とは少し反応 Pattern が異なっている。（第 37 表参照）。

これらのことから吸収された卵黄蛋白からすみやかに Fraction M に対応する成分が形成されるものと見られる。第 28 図，第 29 図および第 30 図は Fraction M および Fraction A に対し，Estrogen 注射 30 日齢雄雛血清および卵黄多給 33 日齢雄雛血清を反応させたものであるが，Fraction M に対しても Fraction A の場合と同じ様に一本の沈降帯が出現した。しかしながら第 30 図にみられるようにその反応帯の状態から Estrogen を注射した場合，Fraction M と Fraction A に対する血清反応の態度は一樣ではないことがわかる。それは反応帯が連結しないで交叉しているこ

とから推察されたことであり、この点はまた重層沈降反応の結果からも推察されたのであるが、その機構の複雑さを示していると言える。

3 摘 要

孵化後 23 日を経過した白色レグホン雄雛をその必要量の 50% を卵黄におきかえた飼料で 10 日間飼育したのち、その雛の血清蛋白質の変化を免疫血清学的に追究したところ次のような結果を得た。すなわち、2 週齢前後までの雄雛血清に特異的に存在する Fraction M がかなり高い価で卵黄多給の 33 日齢雄雛血清中に検出された。

以上のことから、卵黄を多給した場合、卵黄中に含まれる Fraction M 対応物質はすみやかに吸収されて血清中に移行するものと考えられる。しかし、その反応様相から推察すると Yolk 多給の場合と Estrogen 注射の場合とは同じ陽性反応でもその生理的機構が必ずしも同一でないことが指摘される。

第 4 節 Fraction M の Stage 特異性的性状に関する実験的研究

1 実験材料および方法

材料はすべて白色レグホン 1 日齢雄雛で実験区分は次のとおりにした。

- A 群 抗 MCS 注射区 (Fraction M を含有する抗血清) 10 羽
- B 群 正常家兎血清注射区 10 羽
- C 群 生理的食塩水注射区 5 羽

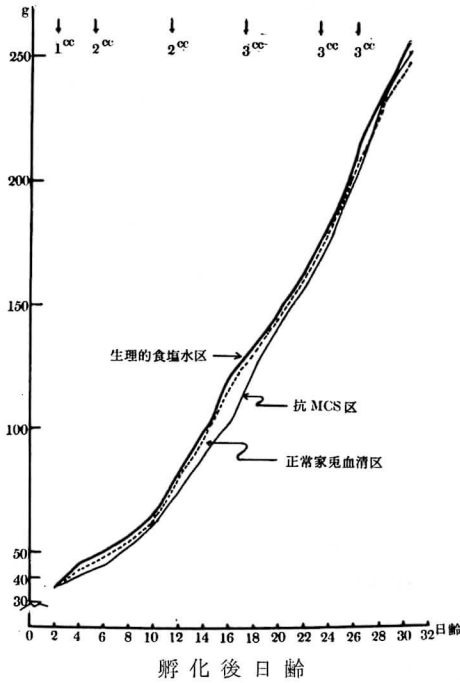
全羽数を同一育雛室に収容し、総べて同一条件のもとに 30 日間飼育し、その間、隔日に体重を測定し、その体重増加率によってこれらの試験区間の差異を検討した。免疫血清、正常家兎血清、生理的食塩水の注射時期、注射量は次のとおり、全く同時に同一量投与した。(免疫血清、家兎血清は原液のまま投与)

注射時期：2, 5, 11, 17, 23, 26 日齢時、1 羽 1 回注射量：1, 2, 2, 3, 3, 3^{cc}

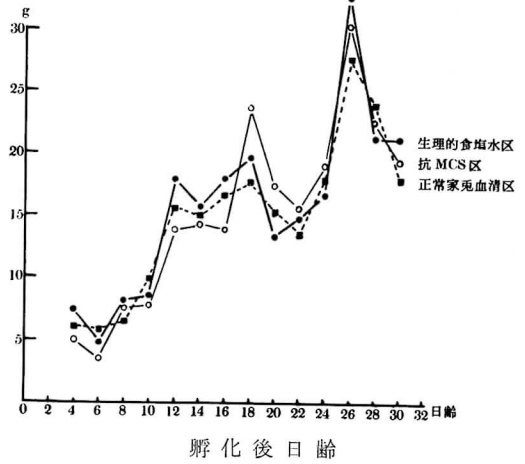
2 実験結果

全群の隔日体重測定値の表から成長曲線グラフを作ると第 32 図のとおりである。この図からは総体的にあまり差はないように見えるが、14 日齢から 16 日齢のところ若干の發育遲滞が窺われる。隔日平均増体量は第 33 図のとおりである。又これらの各週齢時(週末)における増体量を出すと、第 34 図のような棒グラフが出来る。第 2 週齢時には他区に比べて免疫血清区の雛の發育がかなりおこなわれていることがわかるが、さらに第 3 週齢時になると免疫血清は続けて投与されたのにかかわらず、逆に他区より、増体量が増している。この関係をさらに第 35 図、第 36 図のように表現した。これは免疫血清区および正常家兎血清区をそれぞれ基準にして、他区との平均体重を比較したものである。ともに 14 日齢～16 日齢前後に抗血清区における發育の遲滞が見られる。これを統計的に処理したところ次のような結果となった。すなわち初体重における各群間には t 検定による差は認められなかったので、各週齢時に於ける増体量を t 検定によって比較したところ、第 2 週齢時において家兎免疫血清区(抗 MCS 区)は他の 2 区に対しそれぞれ 5% 水準の有意差をもって發育遲滞を認めたが、他の週齢時においては何れも差異はなかった。

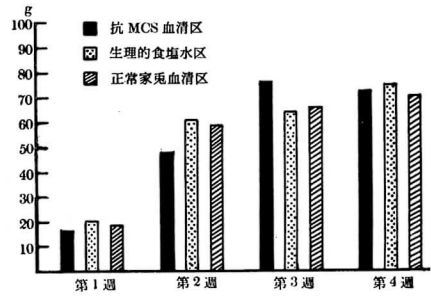
第32図 成長曲線(体重): 矢印と cc は注射時とその容量を示す



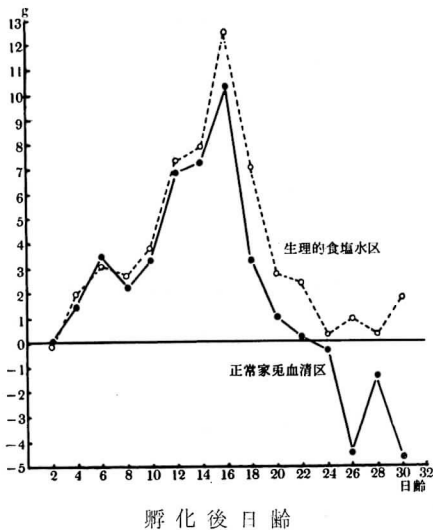
第33図 各区隔日平均増体重



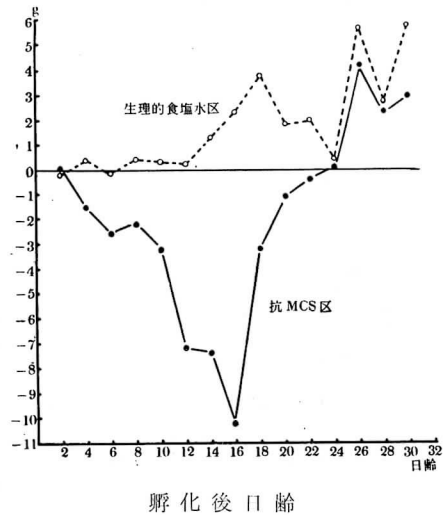
第34図 各週齢時における各区の増体量



第35図 免疫血清区(基線)と他区との平均体重の差



第36図 正常家兔血清区(基線)と他区との平均体重の差



3 考 察

抗 MCS は未吸収の免疫血清であるが、その中にはもちろん Fraction M が存在する。Fraction M の化学的性状については明確にはわからないが卵黄由来の血清蛋白であることは間違いない事実である。実験の結果から判断すればこの免疫血清は 2 週齢前後の雄雛に発育阻害要因物質として作用していることが考えられる。そしてまた、3 週齢から 4 週齢にかけて相当量（1 回 3 cc づつ 2 回）の抗血清が投与されたにもかかわらず発育遅滞はなく、むしろはねかえりの他区より増体量が増したことは、一見奇異に感じられる。これは若し Fraction M に免疫学的 Stage specificity があるものとすれば Fraction M が存在するところの 1 日齢から 2 週齢前後の雄雛血清に対しては、この抗 MCS が血中の Fraction M 対応物質を変性、あるいは不活性化するためではないかと考えられ、これに反し 3 週齢、4 週齢雄雛血清に対して抗 MCS を連続投与しても影響が見られないのは、この Stage になると雛血清は MCS ではなく、ACS の蛋白構成を示すことからその血中に Fraction M に対応する蛋白 Fraction が存在しないためなら雛の発育に影響するところがないことによるものとは考えられないだろうか。

石川（1954）は両棲動物において、初期発生時の免疫化学的、組織化学的解析を行い、初期胚に特異的な Stage 特異性のあることを報告し、また、井上（1951～1954）も両棲類の初期胚において、胚発生機構に関する一連の免疫化学的研究において、特にその第 4 報において次のように報告している。すなわち、両棲類の初期胚（Large oocyte, Blastula, Gastrula, Neurula および Tailbud の 5 stage）をそれぞれ Homogenate し、遠沈後、採取した上澄液（S-fraction）と沈澱のうち 10% 食塩水可溶性物質（V-fraction）とに分け、家兎免疫血清を造り、この 10 種の抗血清中に各 Stage の胚を 15 時間浸して飼育した結果、S-fraction は Stage 特異性を持ち、殊に抗-GS は Gastrulation を、抗-NS は Neurulation を阻止したと報告している。これは胚発生機構でしかも両棲類という特殊性はあるが、同じような観点から、Fraction M がそのような性質をもつものであるかどうかを知ることは雛の初期栄養に関する基礎的な知見の一つともなるのではないと思われる。

卵黄蛋白の初期栄養における意義についてはそれを除去した影響を検討すればいいわけであるが、これについては岡本 et al.（1952）、SLOAN（1936）の報告がある。したがって免疫血清学的にはその特異成分の Stage 特異性的性状と、血清中における生物学的不活性の問題等について考察することにとどめたが、さきに述べた実験結果から、これらの報告と類似の Stage 特異性的性状が Fraction M にあることが推察された。なお、この Fraction M が山田（1947）の報告するような成長規定能を持つほど強い因子であるかどうかについてはさらに検討を要する点である。

本報告は一回の試験例であるのでさらに試験羽数を増し、免疫血清の投与量、間隔、回数等厳密に検討して追試するの必要を感じず、本実験遂行にあたっては、実験計画によってはかなり大量の抗血清が準備されねばならず（本実験に使用した抗血清は約 150cc. である）、やむを得ず 1 回の観察例について考察することにした。

4 摘 要

白色レグホン雄雛に第2日齢から30日齢に至る間、前後6回にわたって1羽当り1cc, 2cc, 2cc, 3cc, 3cc, 3cc, 計14ccの抗MCS家兎血清を投与し、抗血清が雛の發育におよぼす影響を免疫学的に検討した。試験区は、抗血清投与区、正常家兎血清投与区それぞれ10羽、生理的食塩水投与区5羽、計25羽である。体重の測定は隔日になされた。

結果は次のとおりである。

(1) 抗血清投与区は約1週齢から、次第に發育がおくれ、2週齢になって、他の区との間にかなりの差を生じ、統計的にも有意の差が見られるようになった。(5%水準 t 検定)

(2) 第3週齢になると抗血清が続いて投与されているにもかかわらず増体量が急激に上昇し、むしろ他の区より、すぐれた發育を示した。

(3) 以上のことから、Fraction M は免疫学的に見て Stage Specificity があることが考えられ、このことは、Fraction M がもはや存在しなくなったと思われる3週齢や4週齢の雛では抗血清が続いて投与されても、發育阻害作用がないことから理解できる。

第4章 第1編総括

雄鶏の發育、成長および生殖などの諸現象と血清蛋白質の変動との関連を主として免疫血清学的に内生的 Hormone 代謝の観点から追究するために本実験を行った。

まず第1章においては1日齢雄雛血清、80～90日齢雄雛血清および成雄鶏血清をそれぞれ数羽から10数羽分ずつ混和し、これを油性 Adjuvant 処理したものを抗原液として家兎に注入して得た免疫血清を血清反応に使用した。

結果を要約すれば次のとおりである。

すなわち、初生1日齢の雄雛血清で免疫した家兎血清を、成雄鶏血清で吸収した上澄液の中には、孵化1日齢から14日齢前後の雄雛血清に反応を起こす抗体系が存在することが明らかとなり、これを仮に Fraction M と呼称することにした。また、中雄雛あるいは成雄鶏血清で免疫した家兎血清を初生雛血清で吸収した上澄液の中には、孵化後2週齢から3週齢以降の雄雛および成雄鶏の血清に反応を起こす抗体系が存在することも明らかとなり、これを仮に Fraction A と呼称することにした。

また、同じく血清学的手技である寒天ゲル内沈降反応を応用し、種々検索を試みたところ、初生雄雛血清、成雄鶏血清に共通の最少3つの蛋白 Fraction が存在し、その他にそれぞれの血清に特有の蛋白 Fraction、つまり、Fraction M と Fraction A が最少1つずつあることが明白となった。したがって、初生雛および成雄鶏の血清蛋白質の構造を第II図のように想定した。また、中雄雛から成雄鶏に至る過程の血清学的変化について追究したが、何等の変化もつかみ得なかった。すなわち、中雄雛と成雄鶏の間にはその血清蛋白質の構造については免疫血清学的には差異がないことがわ

かった。なお、側面的に各日齢鶏血清について電気泳動的検討を加えたが、この場合、Globulinの部分に別個の Component の分離が 20 日齢を境に観察されたが、特異 Fraction の出現、消退の状態は明らかにされ得なかった。

次に、第 2 章においてはこの Fraction M および Fraction A の血清学的な性状について追究した。

これらの特異蛋白 Fraction の性状を知るために、Fraction M, Fraction A, 抗産卵鶏血清, 抗鶏精清などを製造し、さらに、抗原系物質として、ACS, MCS, 卵黄エーテル抽出物, 卵白 Albumin, LHS, CSS などを使用した。

結果を要約すると次のとおりである。

すなわち、寒天ゲル内における反応帯の拡散速度は抗 MCS, 抗 ACS とともに拡散公式に適合して直線回帰を示し、このことから各 Fraction の化学的同定も可能と思われたが、一部の実験により、Fraction M が卵黄抽出物に極めて密接な関係を持って、いることが推定された。さらに重層沈降反応および寒天ゲル内沈降反応により、Fraction M は卵黄抽出物および産卵鶏血清と強く反応を示し、このことから初生雄雛血清、卵黄、産卵鶏血清はともに共通の蛋白 Fraction を持つことが明らかになった。一方、Fraction A は Albumin や MCS には全く関係なく、鶏精清や産卵鶏血清と陽性反応を呈し、特に CSS は ACS と反応 Pattern が酷似し、CSS は ACS と同種の蛋白を含んでいることがわかった。このように Fraction A は成熟期の鶏の精清、産卵中の鶏血清、ACS に常に存在する蛋白 Fraction であることから、雄性 Hormone と深い関係があるのではないかと推察された。

また、産卵鶏の血清は Fraction M および Fraction A を共有していることが明らかとなり、産卵鶏血清の蛋白質構成の問題が論議された。すなわち、抗 MCS, 抗 ACS による反応結果から産卵鶏の血清は ACS と MCS の各蛋白 Fraction を合わせたものと考えたが、その後の抗 LHS による重層および寒天ゲル内沈降反応の結果から、この考え方は修正され、産卵鶏の血清には (MCS + ACS) の他に (x~x') の成分が存在することが推論された。この(x~x')成分は、すでに多くの報告があるように、複合燐蛋白質に該当するのではないかと考えられる。

さらにこの実験過程において一つの疑点が残された。それは、Fraction M は LHS の蛋白構成にかなり重要な役割を占めていると考えられ、これに対し、Fraction A の占める割合は少く、産卵鶏血清蛋白の多くの部分が Fraction M +(x~x') で占められているのではないかと考えられるが、しかしこの点、第 24 表に示された Fraction A の LHS に対する反応の強さと矛盾すると考えられたことである。

さらにまた、抗 CSS による反応結果から、ACS と CSS が極めて類似の蛋白構成を示していることを確認し、Fraction M は CSS と何等関係のないことも確認された。これらのことから、Fraction M は卵黄 Vitellin に関係があり、また Fraction A は精清や ACS, LHS など、繁殖期の成鶏血清にのみ存在することから、雄性 Hormone に由来する物質と関連があることが推察された。

そこで第3章においては、Hormone 投与や、Yolk Sac 除去の影響、卵黄多給雄雛の血清学的特異性に関する問題、さらにFraction M が雄雛の初期発育に果す生理学的な役割等について検討を加えた。結論からいえばこの計画された4つの実験の結果はいずれも初めの推察とほぼ一致した結果を得たといえる。

すなわち、雄雛、成雄鶏に Estrogen を投与すると Fraction M に対応する物質が出現し、Androgen を幼雛に投与すると Fraction A に対応する物質が出現することがわかった。また、卵黄嚢を除去すると Fraction M が消退し、逆に卵黄を多給された中雄雛の血清中に意外に多くの Fraction M が検出されたことなど極めて興味深い結果を得た。

しかしながら、この実験によって Hormone の作用に関するいくつかの問題が提起された。すなわち Estrogen 投与は Fraction M に対して相乗、共働的に、また Fraction A に対して、拮抗、抑制的に作用するのではないかと考えられた。また、Androgen を1日齢の雄雛に大量注射すると、注射7日後の雛の鶏冠は正常時に比べて著しく増大(重量)し、精巣は逆に萎縮することが観察された。この場合、血清中には Fraction M 対応物質は全く見られず、かわって Fraction A の対応物質が検出された。これは無処理の場合と全く逆の現象であり、大量の Androgen 投与が Fraction M 対応物質を消失させたことは極めて注目すべき現象といわねばならない。

さらにまた、ここで問題となるのは、LHS と MCS の血清学的差異の問題である。Fraction M が産卵鶏の特異蛋白 Fraction の中で、どのような位置に、どのような形と割合で存在しているかを知ることが、極めて興味のある点であるが、血清反応の結果から、いまこのことを中心に要約してみると次のとおりである。

すなわち、Fraction M に陽性反応を呈する抗原系は、幼雄雛血清、産卵鶏血清、卵黄抽出液、Estrogen 注射雄鶏および卵黄多給雄雛血清などであり、抗産卵鶏血清に陽性反応を呈する抗原系は、MCS、ACS および LHS 等である。この抗血清(抗LHS)をMCSで吸収するとLHSのみが反応系を残し、ACSで吸収するとMCS、LHSともに反応系を残した。この反応から、産卵鶏血清の中でACS特有の蛋白 Fraction の占める部分は、割合に少ないのではないかと考えられた。そしてMCSで吸収した場合、随伴的にACS Fraction も除去されたと考えられないだろうか。このことが一つの問題点として残されたがいずれにしても Fraction A の量は少ないのではないかと推察された。

また、産卵鶏特有の血清蛋白質の主体が Lipoprotein を初めとする複合蛋白体であるとすれば、それはさきに述べた(x-x')の中に含まれていると考えられる。その場合、雄性 Hormone の投与に対応して出現する物質の存在場所が問題になるが、おそらく Fraction A そのものの中に含まれていると考えることが妥当だと思われる。

また、雌性においても Androgen が鶏冠を支配していることを考えると、Androgenic な物質は産卵鶏にも、また雄鶏にも常に存在することから、Androgen が Fraction A の発現に関与していることが容易に推察される。ともあれ(x-x')の部分が、産卵鶏血清の特異蛋白の主要成分では

ないかと考えられるが、この成分と MCS との関連、ならびに、Fraction A と雄性 Hormone との関連については、さらに基礎的な研究を遂行する必要がある。

次に抗 MCS 投与が 1 週齢から 2 週齢の雄雛の發育をある程度阻害することが明らかにされ、Fraction M は雛の初期發育に重要な生理学的役割を果していることがわかった。しかしそれが發育規定能を持つほど強力な蛋白 Fraction であるようには思われえないが、この点についてはさらに追加実験の必要があると考える。

第 2 編 雄鶏の下垂体 GTH に関する免疫血清学的研究

第 1 章 抗生殖腺刺激 Hormone 産生に関する史的考察

著者は本論文の第 1 編において雄鶏の成長に伴う血清蛋白質の変動を、内生的 Hormone 代謝の観点から免疫血清学的に追究した結果について報告した。その中で、Estrogen と Androgen に関連する血清蛋白質の性状について考察を加えたが、成長過程における下垂体成長 Hormone や生殖腺刺激 Hormone は、一般動物の場合無視出来ぬ存在である。ことに性成熟期前後は、内分泌機構の複雑性、すなわち成長の停滞、停止や生殖腺の機能等に関連する問題などから、注目すべき Stage と思われるが、いまだ解明されない多くの問題が残されている。しかも鶏の場合、現在のところ下垂体成長 Hormone の存在は疑問視されている状態であって、哺乳類とはちがった特異性があることも推測されている。

そこで第 1 編に引続き、成長過程における下垂体生殖腺刺激 Hormone の消長について免疫血清学的検索を試みることにした。この場合、生殖腺刺激 Hormone の抗原性の有無が問題となるので、まずこの点に関する現在までの研究の概要について文献的考察を加えた。

蛋白体高分子 Hormone が抗原性を持つかどうか、すなわちいわゆる抗 Hormone を産生するかどうかについては、今日まで、種々論議されて来た。SELYE & COLLIP (1933—1934) は、生殖腺刺激物質を長期間動物に注射していると、動物の血清中にその物質の作用に拮抗する働きをもったものが出現して、その結果、続けて注射しても生殖腺刺激効果が得られなくなり、かえって生殖腺は退縮すると報告している。またこのような動物の血清(抗血清)と共に、同じ生殖腺刺激物質を同時に他の動物に注射すると、その効果が減弱したり、現われなくなったりすることを明らかにした。BACHMAN et al. (1934) も下垂体あるいは妊娠尿中の生殖腺刺激物質を連続投与すると、その作用を抑制する物質が産生されることを報じ、さらに、SAMUEL et al. (1933—1934) や FELLOW (1940) 等もラットや人の下垂体生殖腺刺激物質で同様の結果を得たと報告している。

以上はいずれも、1930 年から 1940 年の間における研究であるが、このように下垂体 Hormone の連続投与の結果ひきおこされる作用、すなわち、Hormone の生物学的活性の減衰作用については、もともと EVANS や彼の共同研究者達が成長 Hormone において最初に見出したことであるが、COLLIP (1935—1940) はこのような血清中に存在する拮抗物質を抗 Hormone (Anti-Hormone)

と名付けた。

この物質は、それを産生した動物の体内において、投与された Hormone の生物学的反応を阻止するのみでなく、他の無処理動物にあらかじめ投与しても同様に Hormone に対する生物学的反応を阻止することが判明している。また抗 Hormone 作用については、種属特異性も述べられており FLUHMAN (1934) は下垂体性腺刺激物質を長期間ラッテに投与して得た抗 Hormone には明らかな種属特異性のあることを報じ、また ALLISON et al. (1953) も同様な報告をしている。この点について KUPPERMANN et al. (1941) は羊の抗 GTH 家兎血清は哺乳動物の性腺刺激物質の作用を抑制するが、鶏の下垂体 GTH 物質の作用を抑制することは出来ないとし、また、鶏の抗 GTH 家兎血清は鶏の下垂体の生殖腺刺激作用を抑制するが、羊の下垂体 GTH 物質に対しては効果的でなかったと報告している。これに反して NALBANDOV (1958) はその著書の中で、生殖腺刺激 Hormone は Hormone capacity の面では種属特異性はなく、ある種の動物から得られた Hormone は概して、他種動物の生殖腺に対しても、刺激効果を持つと述べており、ただ、動物の種によってその効果の程度が極めて多様であるとしている。また、同じ論文の中で蛋白体 Hormone を長く投与した場合には、いわゆる抗 Hormone が産生されると述べ、抗 Hormone の産生の程度は動物の種により、また、使用された Hormone の純度により異なるとし、兎は極めて早く抗体を造るが、鶏は極めておそく造るか、あるいは全然造らないと述べている。

このように抗 Hormone の産生については、肯定的報告が多いが、これらの現象に対して COLLIP (1934—1935) は抗 Hormone の機序について次のように考察している。すなわち、その物質は Hormone に対する拮抗的作用を有する一種の“Hormone”であり総ての Hormone には、それぞれ拮抗する抗 Hormone が存在し、両者の均衡により正常な内分泌機能が営まれるが、この均衡に破綻を生じ、抗 Hormone が増加した場合には内分泌機能は低下し同時に血中に抗 Hormone の存在が認められるに至るとし、もし体外から Hormone が入ると、生体にはこの均衡を維持する為に抗 Hormone の産生が増加する。すなわち正常条件下では Hormone と抗 Hormone は均衡して抗 Hormone の存在は認められないが、均衡の破綻を生じた場合には血流中に抗 Hormone が認められるに至ると説明している。

しかしこの COLLIP の考える抗 Hormone 産生の機序についての概念は、必ずしも肯定されているわけではない。例えば FELLOW (1940) は自然の条件下においては、人および家兎血清中には抗 Hormone は認められなかつたと報告しているし、さらに近年になって、いわゆる、抗 Hormone は単なる免疫学的抗体に過ぎないとする考え方も出て来た。すなわち、Hormone 抽出液に含まれる不純蛋白が抗原として働いて産生されるとするものである。

これは最近、Hormone 製剤の純度が高まるにつれて、抗 Hormone 様作用が減弱されて来ていることから、このような説が有力になって来たとも言える。つまり免疫学的抗体説と言われるものである。わが国では最近堀江 (1959) がこの免疫学的抗体説を肯定するような報告をなしている。すなわち PMS を家兎、牛、鶏に注射して得られた抗血清中の拮抗物質を血清学的に追究し、作用 Hor-

hormoneと抗血清との間に起こる沈降物質は Antihormone とは全く別個のもので、これらの反応によっては抗 Hormone を証明することが不可能であり、この機序の解明が待たれるとしている。

以上の報告は、多くの研究者達の業績のごく一部にすぎないが、現在においては、抗 Hormone 産生説に対しては、その機序は別として一般に高分子蛋白質の Hormone の連続長期投与の場合に出来る拮抗物質の中に抗 Hormone が産生されることを認める報告が多く見られるようになった。わが国においても、最近になってようやくこれらの報告に接するようになった。

徳山 et al. (1958) は治療の目的で Armour 製の豚下垂体 FSH を長期間投与した女子4例に抗 Hormone すなわち、正確には抗 FSH が産出されたことを観察している。また、吉野 (1958) は絨毛性 Gonadotropinにおける実験で Gonadotropin の精製程度とは無関係に抗 Hormone が産生され、この際、抗 Hormone 作用は抗血清と生殖腺刺激 Hormone を混合して一定時間おいた場合に発現されるとし、さらに、抗 Hormone は沈降反応によっては、証明し難いある種の免疫抗体ではないかと推測している。

同じく安田 et al. (1961) は山羊に74日間PMSを注射して、58日以降の血清中に抗 Hormone の産生を確認している。さらに、堀江 (1961) ならびに堀江 et al. (1961) は山羊ならびにマウスにおいてPMS長期投与の結果、抗 Hormone の産生を見た報告し、また、中原 et al. (1960)、中原 et al. (1961) は牛におけるHCGに対する抗 Hormone 産生について発表している。なお、最近になってTSHについて、あるいはGHについても、種々、免疫学的定量法が試みられるようになったが、このことは、抗 Hormone 産生の確認がなくては考えられぬことである。また、家畜の臨床的分野においても現実の問題として、抗 Hormone の問題が大きく取り上げられようとしている。

第2章 抗鶏下垂体 GTH 産生に関する実験的研究*

1 緒 言

前章において考察したように、一般に蛋白質 Hormone の長期投与は、その投与動物体内に抗 Hormone を産生することが知られ、また、抗体産生能については、動物の種によって著しく差異のあることが報告されている。著者は前にも述べたように、鶏の成長過程における生殖腺刺激 Hormone (以下GTHと略称する)の消長を免疫学的に検知することを目的とし、その基礎的実験として抗 Hormone の産生について検討を加えたのでその結果を報告する。

2 実験材料および方法

(1) 鶏下垂体前葉粗剤(以下便宜的にCHGと略称することにする)の製法

屠殺直後の鶏下垂体前葉を採取し、ただちに Acetone に浸漬した後、Acetone 乾燥粉末として氷室に保存したものをCHGとして試験に供した。この場合500～600羽から得られた下垂体前葉 Acetone 乾燥の粉末を混合して使用した。

*本報告の概要は1960年日本畜産学会大会において講演発表した。

(2) 抗 CHG 家兔免疫血清の製造

抗 CHG 血清の製造は前編記載の方法に準じ、すべて油性 Adjuvant 処理したものを抗原液として 2.5~3.0 kg の雄家兔に投与した。

その処法は次のようである。

1. Tubercle bacillus (死菌) : 10mg.
2. Light paraffin oil : 9 cc.
3. Lanolin anhydricum : 2 g.
4. Antigen solution : 10cc. (生理的食塩水 10cc.の中に CHG 20mg.を溶かした
もの)

上記の調製抗原液は約 20cc.となるので、これを 10cc.あて、2頭の兔に一回分として筋肉内に分注した(詳細については前編参照)。同一の兔に約 3日~4日間隔で 4回注入し、最後の注入日から 3週間後に全血を採取し血清を分離して非動性にし 1%の割合に 1%マーズン液を添加して、氷室に保存したものを抗 CHG 家兔免疫血清として試験に供した。

なお比較のために鶏を免疫動物とした場合も試験されたがその抗血清の製法は前記と全く同様である。使用した鶏は雄鶏(白レグ10カ月齢)である。さらに正常の方法(Adjuvant処理しない)で免疫した家兔血清についても比較試験を実施したので併わせてその結果も報告する。

(3) 実 験 方 法

Test Hormone としての CHG の GTH 力価(雛単位—c.u.で標示)を Bio-assay し、次に抗血清 + CHG 区で得られた GTH 力価(c.u.)を比較し、その抑制された割合(抑制率)で抗 Hormone 産生の有無を判定する方法をとった。

Bio-assay の方法としては、中条・今井(1956—1961)、BRENNEMAN(1945)の方法によった。方法は、Acetone 乾燥粉末粗剤を生理的食塩水中に溶解せしめた Preparation を白色レグホン雄雛の頸部に孵化後 24 時間目から 12 時間ごとに 5 回注射した。1羽当り CHG 投与総量は 1 mg.とする。この間、餌や水は与えず孵化後 96 時間目に殺して精巣重量を測定した。この場合 GTH 含量の評価は精巣重量増加率(Increase rate)に基づく雛単位(chick unit—c.u.)を用いた。すなわち増加率は

$$\frac{\text{処置群精巣重量} - \text{対照群精巣重量}}{\text{対照群精巣重量}} \times 100 \text{ で、\%として表わし、c.u.は5例以上の平均において、増加}$$

率 35%をもって 1 c.u.とした(c.u./mg.)。

抗血清の注射要領は、雛の頸部一側に CHG を他の一側に一定量の抗血清を同時に投与する方式を取った。また、抗 Hormone 力価は抑制率で算出したがその方法は次のとおりである。

$$\text{抑制率\%} = (a - b) / a \times 100 \dots\dots \text{I. R と略称}$$

ただし

a : CHG のみ注射した雛の精巣重量

b: CHG と抗血清とを注射した雛の精巢重量

なお一般に生物検定に使用する雄雛の Hormone 感受性から見た遺伝的均一性は、その結果の判定を左右する極めて大きな要素と言えるが、限られた材料であるため、同一種鶏場より同一系統群から孵化した雄雛を使用し、羽数と実験回数を増すことによってできるだけ均一度に対する欠陥を補うようにつとめた。

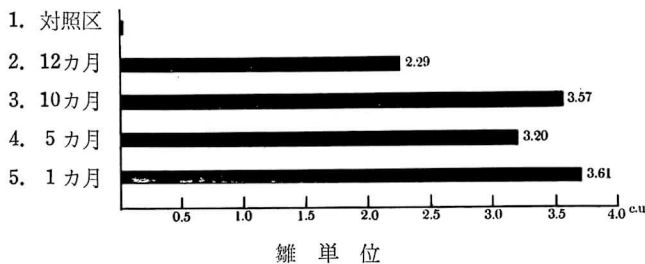
3 CHG の貯蔵期間と GTH 力価の変動

実験期間が長期間にわたるために同じ Sample (CHG) を長期間保存して実験に供しなければならない場合が多く起こるが、この場合、貯蔵期間によって CHG の GTH 力価が変動しては実験結果の比較が困難である。そこで、この一連の実験期間中、度々その GTH 力価の検定を行う必要があった。1960年11月に実施した結果をここに示すと、第41表および第37図のとおりであった。

第41表 貯蔵期間と下垂体 GTH 力価の変化

区 分 (1区 10羽)	精巢重量 ± 標準偏差 mg.	雛 単 位 c.u./mg.
1 生理的食塩水	3.60 ± 0.74	—
2 12カ月貯蔵 (1959年福岡市で採取した材料)	6.48 ± 1.58	2.29
3 10カ月貯蔵 (1960年鹿児島市で採取した材料)	8.11 ± 1.63	3.57
4 5カ月貯蔵 (1960年福岡市で採取した材料)	7.64 ± 2.30	3.20
5 1カ月貯蔵 (1960年鹿児島市で採取した材料)	8.16 ± 1.50	3.61

第37図 貯蔵期間と鶏下垂体 GTH 力価



この結果から見ると新鮮材料を Acetene 乾燥粉末にして 1~4°C の氷室に保存した場合 10 カ月間経過しても GTH 力価に変動はないことがわかる。第37図はこの結果を c.u./mg. でグラフ化したものである。

しかし今回は安全のため 8 カ月以上経過した CHG は除外した。

4 実験結果および考察

第1回ないし第3回の Bio-assay の結果は第42表、第43表および第44表のとおりであった。第38図、第39図および第40図は各試験区の c.u をグラフで表現したものである。第42表は1959年5月、第43表は同じく10月、第44表は同じく12月に実施したものである。

第 4 2 表

試 験 区	羽 数	精巢重量±標準偏差	雛単位 c.u./mg.	I.R %
1 対 照 (生理的食塩水)	10	mg. 3.67 ± 0.89	—	43.02
2 CHG 1mg.	5	8.53 ± 1.90	3.78	
3 CHG 1mg. + 抗血清 2cc.	5	4.86 ± 1.53	0.94	
4 CHG 1mg. + 抗鶏血清 2cc.	5	8.90 ± 2.82	4.07	
5 CHG 1mg. + 正常免疫家兔血清 2cc.	5	8.36 ± 1.63	3.65	

第 4 3 表

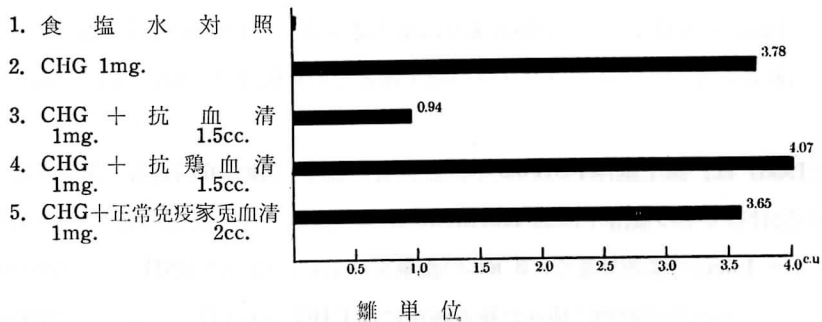
試 験 区	羽 数	精巢重量 ± 標準偏差	雛単位 c.u./mg.	I.R %
1 対 照 (生理的食塩水)	8	mg. 3.85 ± 1.199	—	53.61
2 CHG 1mg.	10	8.53 ± 1.713	3.48	
3 CHG 1mg. + 抗血清 1.5cc.	10	3.98 ± 0.430	0.09	

第 4 4 表

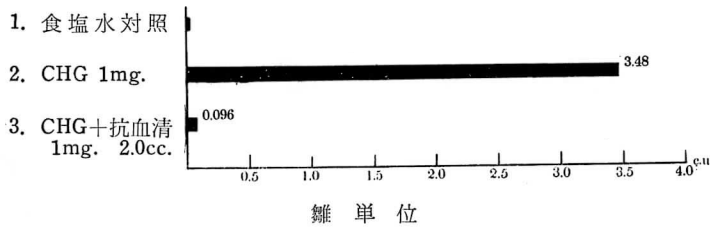
試 験 区	羽 数	精巢重量 ± 標準偏差	雛単位 c.u./mg.	I.R %
1 対 照 (生理的食塩水)	10	mg. 3.80 ± 1.034	—	40.60 49.09
2 CHG 1mg.	10	8.25 ± 2.193	3.34	
3 CHG 1mg. + 抗血清 1cc.	5	4.90 ± 0.917	0.83	
4 CHG 1mg. + 抗血清 2cc.	5	4.20 ± 0.510	0.35	
5 CHG 1mg. + 抗鶏血清 1cc.	5	6.81 ± 1.631	2.25	
6 CHG 1mg. + 抗鶏血清 2cc.	5	7.60 ± 1.594	2.85	

CHG 区に対する抗血清区の抑制率は抗血清量によって異なるが、それぞれ、43.02 %、53.61 %、40.6 %、49.09 %であった。これは抗 Hormone の産生を示すものと言えよう。また、第42表、第44表のように鶏を免疫動物として使用した場合には、その抗血清にはCHGのGTH力価に対する抑

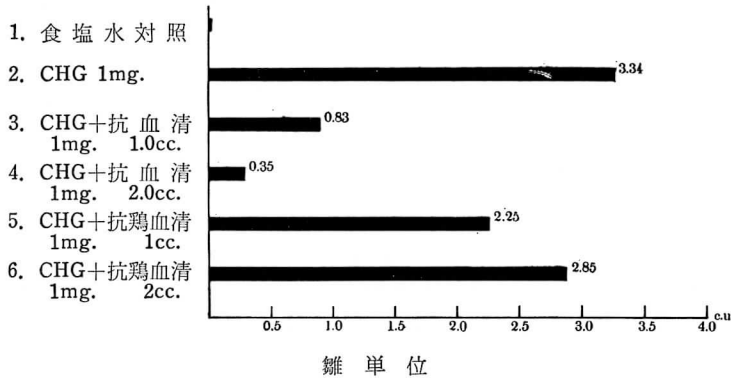
第 38 図 抗 Hormone 産生試験 A



第 39 図 抗 Hormone 産生試験 B



第 40 図 抗 Hormone 産生試験 C



制効果はなかった。よって、鶏血清中には抗 Hormone の産生はなかったものと思われる。

また、正常免疫家兎血清区 (Adjuvant 処理しない抗原) にも第 42 表, 第 38 図の 5 区に見られるように抗 Hormone の産生は見られなかった。また, 第 44 表, 第 40 図に示すように抗血清を 1 cc. 併用した区で 40.6% の抑制率を示し, 2 cc. 併用区では 49.09% の抑制率を示した。すなわち抗血清の量が増すにつれて Hormone 力価に対する抑制率が大きくなっている。

以上 3 回にわたる実験結果からみると, どの場合も, 抗血清投与区は Test Hormone に対し 40% 以上の抑制率を示している。また雛単位標示によっても, どの場合も c.u./mg. 2.5 以上の差を示している。このことから CHG 拮抗物質の中には抗 Hormone が含まれていることは確かであると言える。一方, 重層沈降反応による試験も試みたけれども, 何れの場合も不可能であった。これは, 沈降反応を行うには, 抗原系 (CHG) の粒子があまりにも大きすぎたために重層が困難であったことによるものと考えられる。また, 抗血清の投与量が増すほどその抑制率は一般に高まる傾向が認められた。

徳山 et al. (1958) は, 豚下垂体 FSH 0.5 単位と患者の血漿 (連日 60 日間, 豚下垂体 FSH, 50 Armour 単位を注射してその血清中に抗 Hormone が産生されている患者の血漿) を同時に幼若雌ラットに注射すると 1.0cc. では効果なく, 3.0cc. の血漿を注射した場合は FSH の作用が完全に阻止されたと報告している。鶏を免疫動物に使った抗血清中には CHG の GTH を抑制する物質が産生され

ないようであるが、その免疫鶏血清の電気泳動 Pattern では γ -Globulin が著しく増加していることが窺われ、抗体が γ -Globulin 部に含有されるとすれば、この例から抗体は出来るが抗 Hormone とは全く別個のものであるという考え方も出てくるがさらに検討を要する点である。

5 摘 要

鶏の下垂体前葉 GTH の抗原性有無について家兎免疫血清を使用し、雛単位法による Hormone 力価の抑制率によって検討を加え、次のような結果を得た。

- (1) CHG と同時に抗血清 1～2 cc. を投与すると、どの場合も GTH 力価が 40～50% 抑制されることがわかり、抗 Hormone が産生されていると考えられた。
- (2) 抗血清を 1.0cc. 投与した場合より 2.0cc. 投与した場合の方が Hormone 力価の抑制率が高かった。
- (3) 鶏を免疫動物に使用した場合、電気泳動 Pattern では、その血清中に抗体の産生が推察されたが、Bio-assay の結果からは、抗 Hormone の産生はないものと推察された。
- (4) 抗原液を油性 Adjuvant 処理しなければ高い抗原抗体価を持った抗血清は得られない。

第3章 鶏下垂体 GTH の血中濃度測定に関する免疫血清学的考察*

1 緒 言

現在のところ各種の Hormone 定量は、その大半がいわゆる生物学的検定法によってなされていると言っても過言ではない。これに対し、近年 HAYASHIDA et al. (1958) は牛の成長 Hormone 検定について免疫学的定量を試み、高度に免疫した家兎の抗血清（抗 Hormone）で、1 μ g. の成長 Hormone を検知することに成功したと報告している。彼等はその中で高度に純化された牛下垂体成長 Hormone の抗原性の問題に触れ、抗原を Adjuvant 処理することによって、極めて高い抗原抗体価を持った抗血清が得られるとし、ここに下垂体 Hormone の免疫学的定量法の基礎が確立されたと述べている。わが国においても、最近この抗原性を持った Hormone に対し、Immuno-assay 法による検定についての報告が見られるようになった。著者も、このような見地から、鶏下垂体 GTH について検討を加えてきたが、特に鶏下垂体 GTH の場合、純粋な Hormone の製剤や吸収操作等の問題が解決されねば Immuno-assay はかなり困難ではないかと思われるが、今日まで得た知見を中心として、ここに一つの考察を試みることにした。

2 実験材料および方法

(1) 免疫血清（抗 CHG + MCS）

免疫血清は正確には抗 GTH と称すべきであるが、下垂体前葉製剤を抗原として使用しているため、抗 CHG とし、さらに抗原の性状からの普通の重層沈降反応試験が困難であるため、免疫操作実施中における抗体価を知る目的も含めて、初生雄雛血清（MCS）に CHG を溶かしたものを Adjuvant

*本報告の大要は1961年日本畜産学会大会において講演発表した。

処理して、抗原液とし、それによって得た家兎免疫血清であるために、このように抗 CHG + MCS とした。

(2) 試験方法

上記のようにして得た抗 CHG + MCS の抗 Hormone 抑制率を Bio-assay 法により知り、抑制率 45%以上の抗血清を実験に供した。この場合 MCS には生殖腺刺激物質は含有されていないとされているので、抗 Hormone 抑制率にはなんら影響は与えないものと考えてよい。著者の実験によっても、初生雄雛から得た下垂体前葉の中には、Bio-assay の結果からは生殖腺刺激物質は全く認められなかった。そこでこのかなりの量の抗 Hormone を含有する抗血清を未吸収のまま、あるいは MCS で吸収して重層沈降反応および寒天ゲル内沈降反応などに供した。使用した抗原系は次のとおりである。

1. MCS (初生雄雛血清)
2. ACS (成雄鶏血清)
3. LHS (産卵鶏血清)
4. MCS分画液*
5. ACS分画液*
6. LHS分画液*
7. CHG (下垂体前葉粗製剤)

*各血清の分画液は Vennig (1950) の Alcohol 沈澱法によって得られた懸濁液に生理的食塩水を加え、蛋白濃度を 2%に規制したものである。これらの各分画 Fraction を Fraction-G と称する。

3 実験結果および考察

1. 重層沈降反応による結果

a: 未吸収抗血清に対する ACS, MCS の反応結果は第 45 表および第 46 表のとおりである。

第 45 表 抗 (CHG+MCS)+ACS 反応

抗血清	抗原						
	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	NaCl
10	卅	卅	卅	卅	+	-	-
20	卅	卅	卅	卅	-	-	-
40	卅	卅	卅	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-

第 46 表 抗 (CHG+MCS)+MCS 反応

抗血清	抗原						
	10	10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	NaCl
10	卅	卅	卅	卅	+	-	-
20	卅	卅	卅	卅	-	-	-
40	卅	+	-	-	-	-	-
80	-	-	-	-	-	-	-

抗体価 40 倍、抗原価 1000 倍の領域においては両者間に共通の反応 Pattern を示し他の領域にわずかばかりの差異を示している。

b: 次にこの抗 (CHG+MCS) を MCS で吸収した抗血清に MCS, ACS, LHS を重層させたところ MCS は完全に吸収されて反応陰性であるが ACS ならびに LHS に対しては弱ながらもほぼ同じ様な反応系を残していることがわかる。(第 47 表および第 48 表参照)

さらにこの MCS 吸収抗 (CHG+MCS) 血清に対し Vennig 法によって得た Alcohol 沈澱物を生理的食塩水で蛋白濃度を 2.0%に規制したものを抗原 2 倍液とし (Fraction-G) 以下倍数稀釈液

第 47 表 MCS 吸収抗 (CHG+MCS)+ACS 反応

抗原	2	4	8	16	32	64	NaCl
抗血清							
2	+	+	+	+	+	+	-
4	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-
16	+	-	-	-	-	-	-

第 48 表 MCS 吸収抗 (CHG+MCS)+LHS 反応

抗原	2	4	8	16	32	64	NaCl
抗血清							
2	+	+	+	+	+	-	-
4	+	+	+	+	+	-	-
8	+	+	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-

第 49 表 MCS 吸収抗 (CHG + MCS) + 分画血清反応

分画血清	ACS 分画血清							MCS 分画血清					LHS 分画血清						
	抗原 稀釈	2	4	8	16	32	NaCl	2	4	8	16	32	NaCl	2	4	8	16	32	NaCl
2		+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
4		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

を造り、それぞれを反応させたところ第 49 表に見られるような結果を得た。すなわち、MCS 分画血清は全く陰性であるが、ACS と LHS 分画血清には極めて弱いながら陽性反応を見た。さらに ACS は LHS より若干反応度が強かった。

次に、この吸収抗血清に対し、25 日齢、40 日齢および 100 日齢の雄鶏血清を重層させたところ第 50 表のような結果を得た。すなわち 25 日齢、40 日齢雄鶏血清には陰性を示し、100 日齢雄鶏に対し、弱い陽性反応を示した。

第 50 表 MCS 吸収抗 (CHG + MCS) + 各日齢雄鶏血清反応

日齢血清	25 日 齢 血 清							40 日 齢 血 清					100 日 齢 血 清						
	抗原 稀釈	2	4	8	16	32	NaCl	2	4	8	16	32	NaCl	2	4	8	16	32	NaCl
2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
4		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-
8		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2. 寒天ゲル内沈降反応 (平板法) 試験結果

未吸収の抗血清と各抗原系物質を反応させると次の第 41 図および第 42 図のようになる。第 41 図および第 42 図はともに抗 CHG + MCS に ACS および MCS を作用させて、丁度前編で示したように、MCS および ACS に対する反応系が出現した時の反応図である。反応開始後 3 日で 3 ~ 4 本の反応帯がみられる。おそらく抗血清の抗 MCS Fraction が反応を示したものではないかと考えられる。

また第 43 図および第 44 図は同じ抗血清に MCS, ACS および CHG 1 mg. を食塩水 1 cc. にとしたものを反応させたものである。反応開始後 7 日目の所見であるが MCS, ACS にそれぞれ 6 ~ 8 本の沈降帯が見られるのに反し、食塩水にとした CHG 1 mg. は反応を現わさない。これは CHG 中の抗原系物質が食塩水に溶出することが出来なかったためではないかと考えられる。MCS, ACS に 6 ~ 8 本の沈降帯が出現したことにより、それぞれの血清中には、抗 CHG + MCS に対応する蛋白

Fraction が少くとも 6～8 本あるのではないかと考えられる。第 43 図に見られるように、この場合、MCS に対応する Fraction が多いことがわかる。

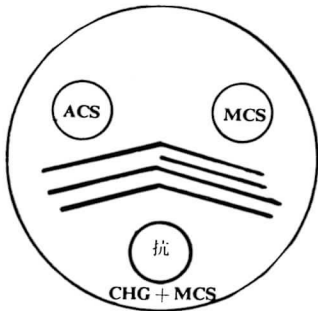
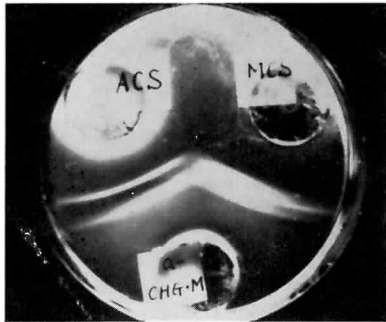
以上の所見から血清蛋白と下垂体蛋白には反応出現に遅速があることが推察された。

次に同じ抗血清に ACS と ACS 中の生殖腺刺激様物質を分画した液 (Fraction-G) とを作用させたところ、第 45 図のような結果を得た。ACS の 6 本に対し F-G は 4 本に減少している。この場合 Vennig の分画法で完全に抗血清に対し特異性を持った物質が得られるとは考え難いが、このような現象は第 46 図および第 49 図においても明らかに示されている。この第 46 図の混合の意味は Alcohol 沈澱法によって得られた最終段階の懸濁液を生理的食塩水と混合して、蛋白濃度を 2% にしたものを 24 時間氷室に放置後できる上澄液と沈澱部を混合したという意味である。また第 51 図および第 52 図で示しているように、上澄液も混合液と全く同じ反応帯を示すことから、抗血清に反応を示す抗原系は全く上澄部に移行していることがわかる。また、第 49 図の抽混も全く同じ意味である。沈降反応においては、この上澄液を抗原系として使用したことは言うまでもない。第 47 図は同じ抗血清に Alcohol 沈澱法で分画した ACS および MCS を作用させたものであるが、MCS に比べて ACS の方がはっきりした沈降帯が一本多く出現していることがわかる。さらに第 48 図は LHS と PS (Pullet Serum) を作用させたものであるが、LHS と PS とは、反応 Pattern に差異が見られる。第 50 図は抗 CHG + MCS を MCS で吸収した上澄液に、それぞれ ACS の Fraction-G (Alcohol 分画血清) と対照例 (c) として MCS を反応させたものである。この際何れも明確な沈降帯は出現しなかったが、ACS の Fraction-G に対し、淡い白濁帯が出現し、対照の MCS (c) にはどのような現象も起こらなかった。

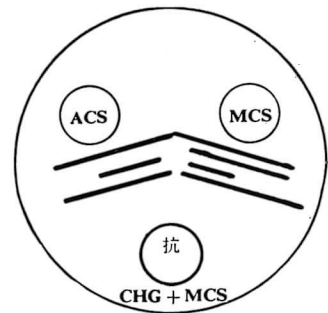
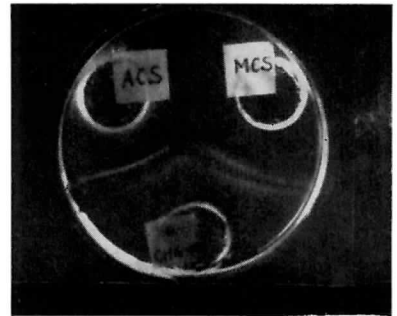
以上述べて来た重層沈降反応ならびに寒天ゲル内沈降反応試験における諸結果から、抗 CHG + MCS は極めて強い抗原性のあることがわかり、これは MCS, ACS および LHS 等に対し 6～8 本の抗原、抗体系を有することがわかった。それは MCS に対応する諸抗原の反応系の他に鶏下垂体前葉に由来する蛋白質の反応系が加わって出現したものと考えられる。そしてこの未吸収の抗血清に対する MCS, ACS, LHS, あるいは Alcohol 沈澱法で分画した各血清蛋白には、それぞれ反応態度に特異性がみられた。さらに吸収した抗血清による試験では血清あるいは抗原系物質により明らかな特異性を現わし第 53 図に見られるように MCS に反応なく、ACS, LHS およびこれらの Alcohol 分画による沈澱物に対してのみ陽性反応を呈したことは興味深い。さらにまた、25 日齢、40 日齢の雄雛血清に反応なく、100 日齢雄鶏血清のみ僅かながら陽性反応が出たことは、寒天ゲル内沈降反応において、第 50 図のように不鮮明ながら、鶏下垂体前葉物質に対して Fraction-G が作用したことと合わせて意義深い現象と考えられる。

いうまでもなくこれらの反応は鶏下垂体前葉抽出物という極めて複合された抗原系であるために、以上述べたことが、生殖腺刺激物質に対する特異反応であるとは考えられないのであるが、この抗血清の中から非特異的抗原物質を完全に除去することが可能になればこれらの反応は生殖腺刺激物質に特異的と言うことになる。前述の HAYASHIDA et al. (1958) は抗牛成長 Hormone に特異性を附

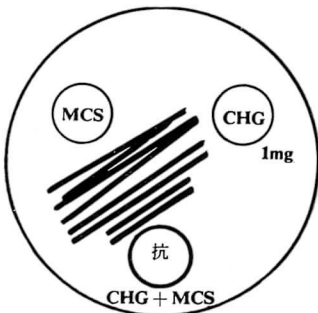
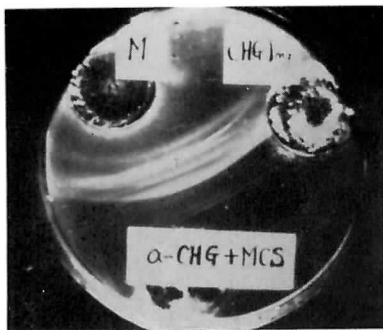
第 41 図



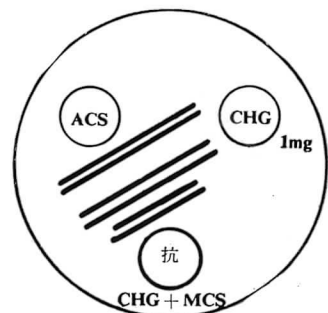
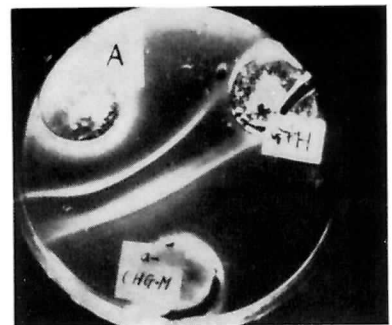
第 42 図



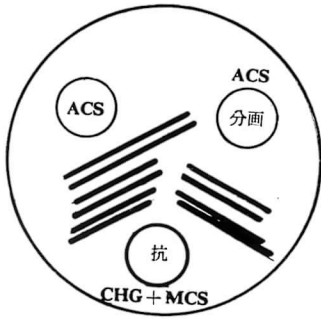
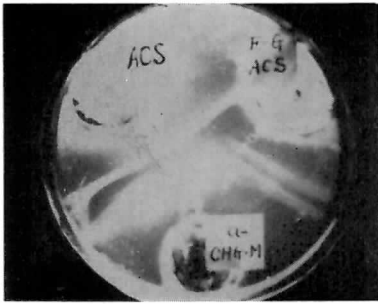
第 43 図



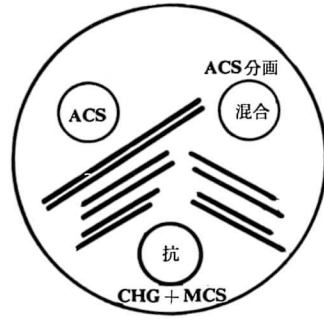
第 44 図



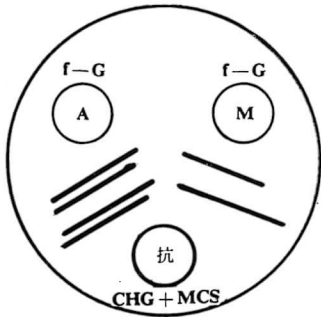
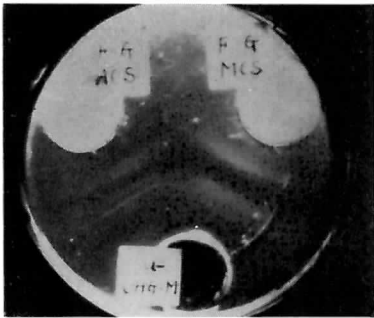
第 45 図



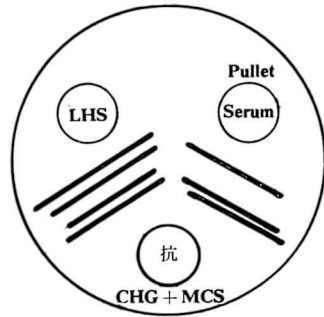
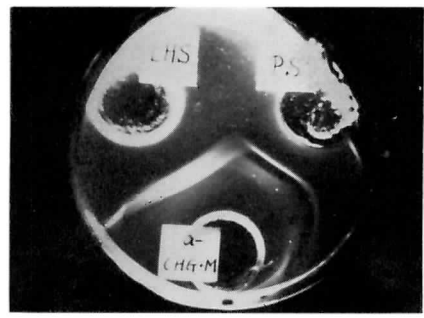
第 46 図



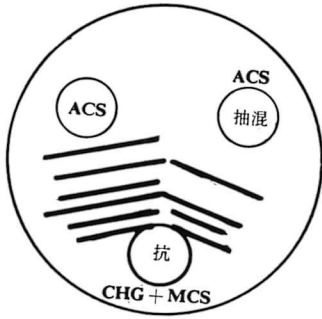
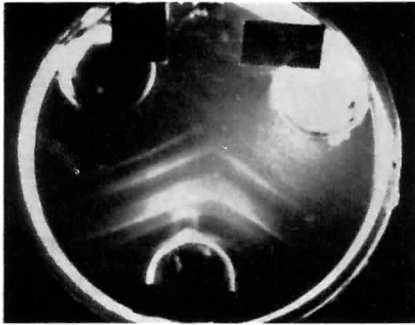
第 47 図



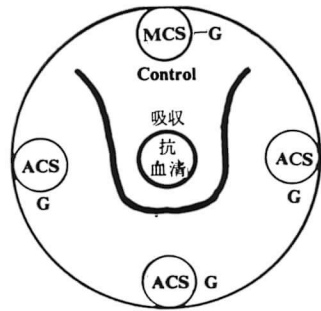
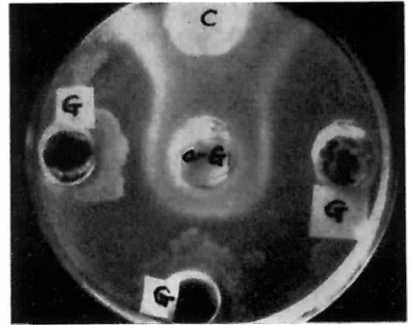
第 48 図



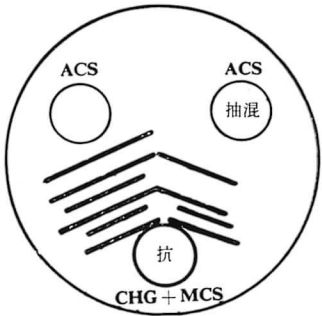
第 49 图



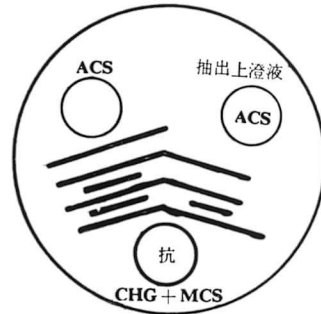
第 50 图



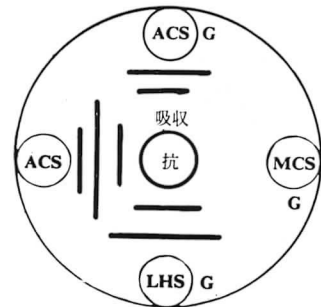
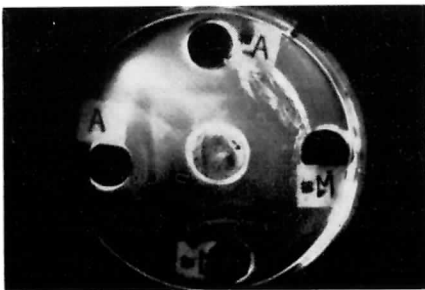
第 51 图



第 52 图



第 53 图



与するために TSH, ACTH, FSH あるいは γ -Globulin 等で抗血清を吸収することによって成長 Hormone の検出を行っている。このような考え方からすれば抗血清の抗 GTH 力価を常に一定にし、かつ、特異性が附与出来、しかも血清の生殖腺刺激物質分画の純度を高めることが出来れば、鶏の場合、相当の困難性はあるが、免疫学的 Hormone 検定の可能性はあるものと考えられる。

4 摘 要

鶏下垂体前葉 Acetone 乾燥粉末粗剤を初生雄雛血清にとかし、Adjuvant 処理したものを抗原液として家兎免疫血清を製造した。これを抗 CHG + MCS 家兎免疫血清として免疫学的 Hormone の検定の方法を見出すことについて検討した。結果は次のように要約される。

(1) 重層沈降反応試験において、MCS 吸収抗 (CHG + MCS) は ACS, LHS, 分画 ACS および LHS ならびに 100 日齢の雄鶏血清にそれぞれ弱い陽性反応を起こした。

(2) 寒天ゲル内沈降反応試験において、未吸収の抗 (CHG + MCS) は ACS に 6 本, MCS に 7 ~ 8 本の反応帯を示し、さらに分画 ACS に 4 本, 分画 MCS に 2 本 (白濁帯) の反応帯が出現した。また, LHS と PS はそれぞれ反応態度が異なる。

Alcohol 分画血清においては、生殖腺刺激様物質のほとんどが懸濁液の上澄部に移行することが示された。さらに、吸収抗血清においては、ACS および LHS の分画血清は陽性反応を示し、MCS 分画血清は陰性であった。

(3) これらの抗原系反応は、鶏下垂体前葉抽出物に対する特異反応であって、GTH に対するものではない。

(4) 以上の結果から、鶏下垂体生殖腺刺激 Hormone の免疫学的検定 (Immuno-assay) は、現在のところ困難であるが、抗 CHG 家兎血清から非特異性物質を完全に除去することができて、しかも抗血清中の抗 GTH 力価を常に一定にしておくこと、および、血清中の生殖腺刺激物質分画の純度を高めることなどができれば免疫学的検定も可能になるものと考えられる。

第 4 章 鶏下垂体 GTH に対する抗血清の中和、抑制に関する実験的研究*

1 緒 言

第 1 章および第 2 章において述べたように蛋白質 Hormone の長期投与は、一般に、抗 Hormone を産生することが知られ、また、特に、油性 Adjuvant 処理した抗原を兎に投与した場合、4 ~ 5 回の注射で、抗血清の中に高度の力価を持った抗 Hormone の産生が観察された。この抗 Hormone は、これを指標として血清中の Hormone 濃度を測定することが考えられる反面、特に臨床的には、当該 Hormone の長期連続投与が困難となり、Hormone 施用上の一大障害となっている。そこで著者は、この産生された抗 Hormone の活性を減弱せしめる方法について、種々、検討を加えて来たところ、抗 Hormone を含んだ抗血清に抗原性のあることがわかり、Hormone と抗・抗血清と

*本報告の大意は 1961 年日本畜産学会大会において講演発表した。

を併用すると、抗 Hormone の活性を相当程度抑制する作用のあることが判明したので、ここにその結果を報告する。

2 実験材料および方法

(1) 抗血清の製造

抗血清は、前編ならびに前章に述べたような方法で製造し、Bio-assay により、Hormone 力価に対する抑制率をあらかじめ測定した。

(2) 抗・抗血清の製造

Hormone 力価抑制率 45%以上の抗血清を製造し、前述の術式に従って、これを Adjuvant 処理したものを抗原液として 2.5~3.0kg の雄兎に 4 回筋肉内注射し、最後の注射から 3 週間後に採血し、血清分離、非動化したものを第 2 次抗血清(抗・抗血清と称する)として試験に供した。その処方ならびに Schedule の一例を示すと次のとおりである。

処方及び分量	第 1 回 (1960. 2. 25)	第 2 回 (1960. 2. 28)	第 3 回 (1960. 3. 2)	第 4 回 (1960. 3. 5)
Tubercle bacillus(死菌)	10 mg.	10 mg.	10 mg.	10 mg.
Right Paraffin oil	10 cc.	8 cc.	8 cc.	8 cc.
Lanolin anhydricum	2 g.	2 g.	2 g.	2 g.
Immune serum	9 cc.	9 cc.	10 cc.	10 cc.

(註. いずれも、免疫家兎 2 頭 1 回分の量である。)

3 月 26 日免疫動物(家兎)を全血採取し、ただちに血清分離、非動化し、マーズニン液を添加して、氷室保存し、供試した。

(3) 実験方法

食塩水投与区、CHG 投与区、第 1 次抗血清投与区、抗・抗血清併用区等に分けて、前章に述べた 96 時間 Test 法(Bio-assay法)で実施した。抗血清については、抗 Hormone 産生の程度を抑制率(I·R)にて示し、抗・抗血清については、抗 Hormone の中和ないし、回復能を中和率(N·R)で表わすことにした。中和率の算出は次のとおりである。

$$\left(\frac{a-c}{b-c}\right) \times 100\% = N \cdot R\%$$

ただし $\begin{cases} a - \text{抗・抗血清投与区の精巢重量} \\ b - \text{CHG 投与区精巢重量} \\ c - \text{抗血清区精巢重量} \end{cases}$

3 実験結果および考察

(1) 第 1 回試験(1960年 3 月実施)

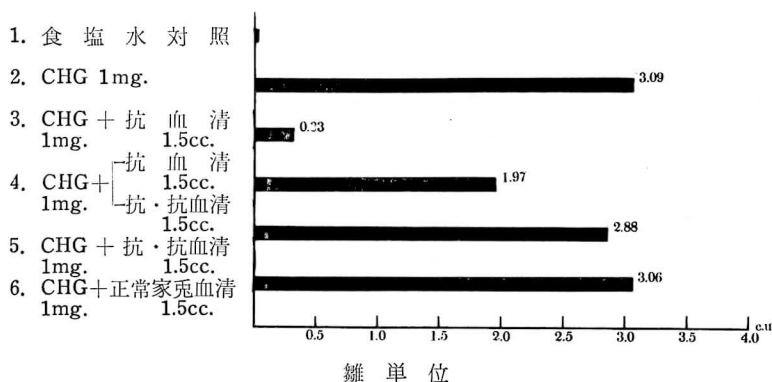
第 1 回試験の結果を第 51 表および第 54 図に示した。この表から、第 3 区の抗血清は、抑制率 46.45%の力価の抗 Hormone を持っているが、CHG を投与した雛に抗血清および抗・抗血清を同時に投与した第 4 区では、中和率 59.32%となって抗 Hormone の活性を抑制することが知られた。

第 51 表 第 1 回 抗 Hormone 中 和 試 験

試 験 区 分	例 数	精巢重量±標準偏差 mg.	雛単位 $\frac{c.u.}{mg.}$	I. R. N. R. %
1. 生理的食塩水対照	10	3.66 ± 0.490	—	
2. CHG 1 mg. 投与	10	7.62 ± 1.871	3.09	
3. CHG 1 mg. + 抗血清 1.5cc.	10	4.08 ± 1.025	0.33	I · R=46.45
4. CHG 1 mg. + 抗血清 1.5cc.	10	6.18 ± 0.587	1.97	N · R=59.32
5. CHG 1 mg. + 抗・抗血清 1.5cc.	5	7.36 ± 1.364	2.88	
6. CHG 1 mg. + 正常家兔血清 1.5cc.	5	7.58 ± 1.082	3.06	

第 54 図はこれらの関係を c.u./mg. でグラフによって示したものである。

第 54 図 第 1 回 抗 Hormone 中 和 試 験



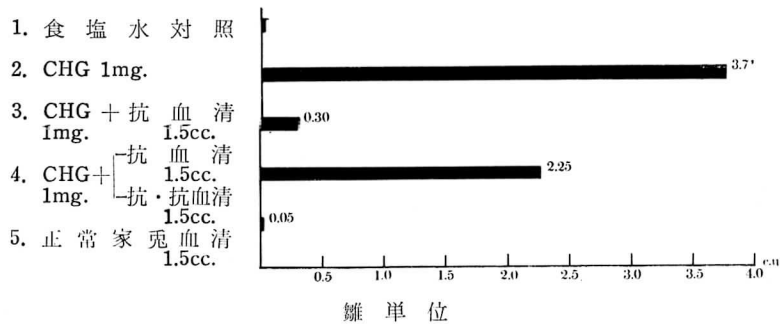
(2) 第 2 回試験結果 (1961年 2 月実施) 前回に引続き今まで得られた結果をさらに追認するために新しく製造した抗血清および抗・抗血清を使用して実験を行った。結果は第 52 表および第 55 図に示した。

第 52 表 第 2 回 抗 Hormone 中 和 試 験

試 験 区 分	例 数	精巢重量±標準偏差 mg.	雛 単 位 c.u./mg.	I · R N · R %
1. 生理的食塩水対照区	10	4.66 ± 0.906	—	
2. CHG 1 mg. 投与区	10	10.82 ± 1.396	3.71	
3. CHG 1 mg. + 抗血清 1.5cc.	10	5.18 ± 0.883	0.30	I · R=52.13
4. CHG 1 mg. + 抗血清 1.5cc.	10	8.05 ± 0.933	2.25	N · R=50.89
5. 正 常 家 兔 血 清 1.5cc.	10	4.78 ± 0.917	0.05	

このように抗血清の GTH 力価抑制率が強かったためか、この抗血清の中和率は 50.89% と、前回よりも抗・抗血清の作用は弱かったが、何れも、相当程度の中和作用のあることが知られた。正常家兔血清中には、GTH 物質あるいはそれを抑制するような働きはないものといえる。これらの関係を雛単位で表わしたものが第 55 図である。

第 55 図 第 2 回 抗 Hormone 中和試験



以上の二つの実験例から抗血清を Adjuvant 処理して兎に投与した場合、この抗血清は抗原性を持つことがわかり、これにより出来た抗血清の中には、かなりな程度の第1次抗血清中和作用を持つ物質が産生されることがわかった。

このように、ある種の抗原によって産生された抗体（第1次抗体）が抗原性を持っていて、それによって出来た第2次抗体が第1次抗体に対し、拮抗性あるいは中和能を示すことは、極めて重要な意味を持っている。この現象については、多くの報告には接しないが、曾根 et al. (1958)* は、抗血清の抗原的性状についての諸報告を解説している。現在のところでは、これらの現象に関する抗原・抗体反応の理論的機序については多くの問題が残されているが、このように抗血清が抗原性を持つ場合のあることについては、現在、肯定されているところである。

上記の実験結果から、第1次抗体に抗原性があり、これにより産生された抗血清が第1次抗体に反応を示すことが明らかに認められ、これが、抗 Hormone 力価を減弱せしめる作用のあることがわかったが、その抑制率は、せいぜい 60% 前後（中和率で標示）であった。しかしながら、この程度の抑制率でも、抗生殖腺刺激物質に対し作用することは、極めて重視すべき点と思われる。それは、さらに強力な抗・抗 Hormone の製造が決して不可能とは考えられないからである。そして、もし、それが可能になれば、蛋白体 Hormone 施用上の大きな障害の一つが取り除かれることになると考えてよいのではなかろうか。そのためには、出来るだけ強い抗原・抗体価を持った抗血清を得ることが第一の条件と言える。その点、COHN (1952) の報告による抗原の Adjuvant 処理など、今回の実験結果から見ても、極めて効果的な方法の一つと考えられる。

4 摘 要

(1) CHG の GTH 力価に対し抑制率 45% 以上の抗血清を抗原液とし、これを Adjuvant 処理したものを家兎に投与して得た第2次抗血清（抗・抗血清）は第1次抗血清に対し拮抗、中和的作用のあることがわかった。

(2) 抗 Hormone に対する抑制あるいは中和能を中和率で標示すれば、二つの実験例において、

* 原著：カバット・マイヤー；実験免疫化学

それぞれ 59.32 % および 50.89 % であった。

(3) さらに中和率を高めることが出来れば、蛋白体 Hormone 施用上の障害の一つを取り除くことが可能と思われる。

第5章 第2編総括

雄鶏の成長に伴う血清蛋白質の変動を内生的 Hormone 代謝の観点から追究した結果については、既に第1編において述べた。その際、発育成長の段階を三つの Stage に分けて、それぞれの Stage の血清を抗原として、それらの間にある血清学的特異差を明らかにし、それぞれに特有の蛋白 Fraction は Estrogen や Androgen と関連性が深いことについて報告したが、さらにその他の要素として、特に鶏の成長過程における下垂体 Hormone の存在は重要視されねばならないと考えられる。しかし鶏においては下垂体成長 Hormone の存在は明らかにされていないので、成長と性成熟との関連から、ここに下垂体生殖腺刺激 Hormone の消長について免疫血清学的に考察しようとした。まず鶏下垂体の生殖腺刺激物質の抗原性の有無についての基礎的知見が得られていない状態であるので、この点について検討することにした。

一般に蛋白体 Hormone に対する抗 Hormone 産生の有無については、なお、論議の余地があるとされているので、第1章においては、これに関して主として文献的考察をなし、抗 Hormone 産生が肯定される傾向にあることを指摘した。

第2章においては、前後3回にわたる実験の結果から、鶏下垂体 GTH に対する抗 Hormone の産生を、Bio-assay 法で、確認することができた。抗原としては鶏下垂体前葉 acetone 乾燥粉末を油性 Adjuvant 処理したものをを用い、実験方法は、中条や BRENNAN の Bio-assay 法によった。抗 Hormone 産生の程度は、Test hormone 投与区に対する、抗血清併用区の抑制割合（抑制率）によって標示した。

下垂体前葉粉末と同時に抗血清 1～2 cc. を雄鶏に投与すると、どの場合でも GTH 力価が 40～50 % 抑制されることがわかり、また抗血清は 1 cc. より 2 cc. 投与した方がその抑制率が高いことがわかった。また鶏を免疫動物に使用した場合や、抗原血清を油性 Adjuvant 処理しない場合は、このような抗 Hormone の産生は証明され得なかった。

次に、この抗 Hormone を一つの指標として、血中 Hormone 濃度の免疫学的検定法を試みた。免疫経過中における抗体価測定の必要もあって、下垂体粉末を MCS の中にとかしたものを抗原液とし、得られた抗血清を使用して重層沈降反応や寒天ゲル内沈降反応の術式によって検定を試みた。結果は第3章において述べたように、ある程度の特異性反応を見ることが出来たけれども、鶏下垂体前葉生殖腺刺激 Hormone の免疫学的検定 (Immuno-assay) は現在のところ困難であると考えられた。

しかしながら、抗 CHG 血清から特異性物質を完全に除去することができて、しかも抗血清中の抗 GTH 力価を常に一定にしておくこと、および血清中の生殖腺刺激物質分画の純度を高めることな

どの条件がみたされれば免疫学的検定も可能になるものと考えられる。なかでも未吸収の抗 (CHG + MCS) に対する MCS, ACS, LHS, あるいは, Alcohol 沈澱法で分画したこれらの各血清蛋白には, それぞれ反応態度に特異性がみられたことや, MCS で吸収した抗 (CHG + MCS) に対して血清あるいは抗原系物質が明らかに特異性を現わし, MCS に反応なく ACS, LHS およびこれらの Alcohol 沈澱法によって分画されたところの沈澱物に対してのみ陽性反応を呈すること, さらにまた, この抗血清は 25 日齢や 40 日齢の雄雛血清に反応なく, 100 日齢の雄鶏血清に弱い程度ながら陽性反応を示した点などは特に免疫学的検定法に対する可能性を暗示しているといえよう。

また一方, 抗 Hormone の産生は Hormone の投与試験ないしは治療の目的で Hormone を投与する場合の最も大きな障害の一つとなっている実状である。そこで, この抗 Hormone を中和する方法について種々検討を加えたところ抗血清を Adjuvant 処理することにより, 抗 Hormone を含んだ抗血清に抗原性のあることが明らかとなり, それらに関する 2 回の実験結果ならびに考察を第 4 章において述べた。

すなわち抗 Hormone の抑制, 中和の程度を中和率で表現することにしたが, その値は, 約 50~60% 程度であった。抗・抗血清の投与量や抗原価をさらに高めるなどの方法をとれば, さらに強力な抗 Hormone の抑制, 中和作用が発現されるものと考えられ, 臨床的応用の面でも, 極めて重要な意義を持つことになり, 蛋白体 Hormone 施用上の大きな障害の一つを取りのぞくことも可能と思われた。

参 考 文 献

- ABE, T., TANABE, Y., KANEKO, T., MOGI, K. & T. HOSODA, 1958. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., **98**: 703.
- ALLISON, A. C. & J. A. MORTON, 1953. J. Clinical pathology, **6**: 314.
- BACHMAN, C., J. B. COLLIP & H. SELYE, 1934. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **32**: 544.
- BECKER, E. L. & J. MUNOZ, 1949. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **72**: 287.
- BLUMENTHAL, H. T., K. HSIEH & T. WANG, 1954. Amer. J. of Pathology, **30**: 771.
- BRANDT, L. W., ROBERT, E. CLEGG & A. C. ANDREWS, 1951. J. Biol. Chem. **191**: 105.
- BRENNEMAN, W. R., 1945: Endocrinology, **36**: 190.
- BUCKNER, G. D., WILKINS, R. H. & J. H. KASTLE, 1918. Amer. J. Physiol., **47**: 393.
- BURMESTER, B. R. & N. F. WAITERS, 1955. Poultry Sci., **34**: 1414.
- CARTER, R. D., R. N. RISNER & H. Y. YACOWITZ, 1955. Poultry Sci., **34**: 1407.
- CARTER, R. D., R. N. RISNER & H. Y. YACOWITZ, 1953. Poultry Sci., **32**: 892.
- COHN, MELVIN, 1952. Methods in Medical Research, **5**: 271.
- COLLIP, J. B., 1934. Am. J. Physiology. **109**: 22.
- COLLIP, J. B., 1935. Ann. Int. Med., **9**: 150.
- COLLIP, J. B., 1940. Am. J. Obst. & Gynec., **39**: 187.
- DAVID, A. LIBBY, J. MEITES & P. J. SCHAIKLE, 1955. Poultry Sci., **34**: 1329.
- 伝染病研究所学友会編, 1958. 細菌学実習提要, p. 252. 東京。
- DEUTSH, H. F. & M. B. GOODLOE, 1945. J. Biol. Chem., **161**: 1.
- FELLOWS, M. D., 1940. Endocrinology, **26**: 369.

- FLUHMAN, C. F., 1934. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **32**: 1595.
- HAWARD, R. E., LOIS, HALLMAN, S. SIEGEL & D. M. BERGENSTAL, 1958. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **98**: 24173.
- HAYASHIDA, T. & C. H. LI, 1958. The Anatomical Record, **130**: 313.
- HAYASHIDA, T. & C. H. LI, 1958. Endocrinology, **63**: 487.
- HEIM, W. G. & A. M. SCHECHTMAN, 1954. J. Biol. Chem., **209**: 241.
- 平井秀松・島尾和男, 1954. 電気泳動法—理論と医学的応用, 112. 東京。
- 広江一正・正木淳二・茂木一重・細田達雄, 1955. 日本畜産学会報, **26**: 別号の2, 9.
- 細田達雄, 1958. 日本畜産学会報, **29**: 135.
- 細田達雄, 1955. 医学と生物学, **32**: 147.
- 細田達雄・金子忠恒・茂木一重, 1953. 農技研報告, **5**: G83.
- 細田達雄・金子忠恒・茂木一重, 1953. 農技研報告, **7**: G109.
- 細田達雄・金子忠恒・茂木一重, 1950. 日本畜産学会報, **21**: 115.
- 細田達雄・金子忠恒・茂木一重, 1952. 日本畜産学会報, **22**: 75.
- 本間運隆, 1960. 家畜繁殖研究会誌, **6**: 41.
- 本間運隆・佐藤孝二・土田耕造・富田武, 1958. 家畜繁殖研究会誌, **4**: 125.
- 本間運隆・富田武・大川隆徳, 1957. 家畜繁殖研究会誌, **3**: 71.
- 本間運隆・富田武・大川隆徳, 1958. 家畜繁殖研究会誌, **3**: 95.
- 本間運隆・富田武・大川隆徳, 1958. 家畜繁殖研究会誌, **3**: 143.
- 本間運隆・佐藤孝二, 1958. 家畜繁殖研究会誌, **4**: 65.
- 本間運隆・加藤俊三・五島治郎, 1960. 日本畜産学会報, **30**: 392.
- 本間運隆・加藤俊三, 1960. 家畜繁殖研究会誌, **5**: 136.
- 堀江董久, 1959. 畜産の研究, **13**: 126.
- 堀江董久, 1961. 日本畜産学会報, **32**: 別号, 21.
- 堀江董久・相馬正, 1961. 日本畜産学会報, **32**: 別号, 21.
- HSEIH, K., M., T. Y. WANG & H. T. BLUMENTHAL, 1952. Endocrinology, **51**: 298.
- 隠岐和之・岩坪治雄・能原雄一・吉田常雄, 1961. 日本内分泌学会雑誌, **37**: 1.
- 石川太刀雄, 1954. 細胞化学シンポジウム, **3**: 35.
- 石垣房治, 野見山一生, 1958. 日本畜産学会報, **28**: 335.
- 泉仙助, 1921. 東京医学会雑誌, **35**: 6.
- 井上和子, 1951. 動物学雑誌, **60**: 15.
- 井上和子, 1952. 動物学雑誌, **61**: 74.
- 井上和子, 1953. 動物学雑誌, **62**: 114.
- 井上和子, 1954. 動物学雑誌, **63**: 167.
- 井上和子, 1954. 動物学雑誌, **63**: 416.
- 今井清・中条誠一, 1958. 家畜繁殖研究会誌, **3**: 135.
- 加藤嘉太郎・西田司一, 1935. 日本畜産学会報, **8**: 16.
- KNITTI, R. E., FRIKSON, C. C., MADDEN, S. C., RIKERS, R. E. & G. H. WHIPPLE, 1937. J. Exper. Med., **65**: 455.
- KUPPERMAN, H. S., C. H. MELLISH & W. H. MOSHAN, 1941. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., **48**: 79.
- LASKOWSKI, M., 1938. Biochem. J., **32**: 1176.
- LATIMER, H. B., 1924. J. of Agri. Research, **29**: 363.
- LIBBY, D. A., J. MEITES & P. J. SCHAIKLE, 1955. Poultry Sci., **34**: 1329.
- LORENZ, F. W., 1954. Vitamins and Hormones, **12**: (Condensed in Japanese by J. YAMADA) 畜産

の研究, 10 : 1243.

- 水原 豊, 1924. 日本婦人科学会雑誌, 19 : 73, 527, 623.
- McKINLEY, W. P., W. F. OLIVER, W. A. M. & R. H. COMMON, 1953. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 84 : 346.
- MOOR, D. H., S. C. SHEN & C. S. ALEANDER, 1945. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 58 : 307.
- MOOR, D. H., 1948. Endocrinology, 42 : 38.
- 中尾 健・中村悦郎・大森義仁, 1957. 生理と薬理 脳下垂体ホルモン, 東京。
- 中条 誠一・今井 清, 1956. 家畜繁殖研究会誌, 2 : 41.
- 中条 誠一・今井 清, 1957. 家畜繁殖研究会誌, 3 : 49.
- 中条 誠一・今井 清, 1961. 家畜繁殖研究会誌, 6 : 97.
- 中原達夫・山内 亮・片岡敏明・円山八十一, 1960. 第49回日本獣医学会議演要旨, p. 17.
- 中原達夫・山内 亮・片岡敏明・金田義宏, 1961. 第51回日本獣医学会議演要旨, p. 33.
- NALBANDOV, A. V., 1958. Reproductive physiology. SAN FRANCISCO.
- 西山久吉, 1956. 日本畜産学会九州支部大会講演要旨, p. 2.
- NISHIYAMA, H., 1954. Jap. J. Zootech. Sci., 25 : 102.
- NISHIYAMA, H., 1957. J. of the Fac. of Agri., Kyūshū Univ., 11 : 63.
- NISHIYAMA, H. & T. FUJISHIMA, 1961. Mem. Fac. Agri. KAGOSHIMA UNIV. 4 : 27.
- 岡本正幹・石神信男, 1952. 日本畜産学会九州支部大会講演要旨, p. 1.
- PARKS, A. C. 1960. Marshall's Physiology of Reproduction. Vol. One, Part two, 622. London.
- SANDERS, E., I. F. HUDDLESON & P. J. SCHAIKLE, 1944. J. Biol. Chem., 155 : 467.
- SASAKI, K., 1932. J. Immun. 23 : No. 1.
- SAMUEL, L. LEONARD, 1933~4. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 31 : 1157.
- 佐久間兼信, 1924. 日本産婦人科学会雑誌, 19 : 35.
- 佐伯 誠一, 1925. 日本産婦人科学会雑誌, 20 : 293.
- 鈴木成美, 1954. 細胞化学シンポジウム, 3 : 121.
- STURKIE, P. D., 1954. Avian physiology, p. 312. New York.
- STURKIE, P. D., 1958. Poultry Sci., 37 : 495.
- 進藤寅二, 1956. 血清反応とその実際, p. 36. 東京。
- 進藤寅二, 1956. 血清学の新しい見方と考え方, p. 112. 東京。
- SELYE, H., J. B. COLLIP & D. L. THOMSON, 1933~4. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 31 : 487.
- SELYE, H., J. B. COLLIP & D. L. THOMSON, 1933~4. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 31 : 566.
- SELYE, H., C. BACHMAN, D. L. THOMSON & J. B. COLLIP, 1933~4. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 31 : 1113.
- SLOAN, H. J., 1936. Poultry Sci., 15 : 23.
- 曾良忠雄・川出由己・山本 正(釈), 1958. カーバット, マイヤー共著, 実験免疫化学, p. 153. 東京。
- 武田 晃, 1960. 家畜繁殖研究会誌, 6 : 1.
- 田代一男, 1959. 第11回日本畜産学会西日本支部大会講演。
- 田代一男, 1960. 鹿大教育研究紀要, 12 : 65.
- 田代一男, 1960. 日本畜産学会報, 31 : p. 51. 別号。
- 田代一男, 1961. 日本畜産学会報, 32 : p. 22. 別号。
- TANABE Y. T. ABE, T. KANEKO & T. HOSODA, 1961. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 106 : 506.
- TIENHOVEN, A. V., 1959. Reproduction in Domestic Animals. Vol. 2. p. 314. New York.
- 徳山一郎・小野 猛・安藤朔己・渡辺 斌・住吉孝之・井上謙次郎, 1958. 内分泌と代謝,

1 : 47.

- WARREN, D., 1953. Practical Poultry Breeding, p. 131. U. S. A.
 WHITNEY, J. E., L. L. BENNETT, C. H. LI & C. H. EVANS, 1948. Endocrinology, **43**: 273.
 渡辺卓郎, 1922. 日本微生物学会雑誌, **16**: 1237.
 渡辺卓郎, 1922. 日本微生物学会雑誌, **16**: 1375.
 山森吉治, 1925. 日本婦人科学会雑誌, **20**: 554.
 山田常雄, 1947. 動物学雑誌, **57**: 124.
 吉野英明, 1958. 第3回不妊学会総会講演。
 安田泰久・保坂安太郎, 1961. 家畜繁殖研究会誌, **6**: 113.

Immunoserological Studies on the Cock Serum Protein

KAZUO TASHIRO

(Lab. of Zootechnical Science, Fac. of Education, KAGOSHIMA Univ.)

Résumé

Part I

Immunoserological Studies on that Change of serum protein which follows the growth of Cock

Studies on the relations between such phenomena as the growth and reproduction of cock and the change of serum protein were performed chiefly immunoserologically from the viewpoint of metabolism of endogenous hormone.

The results obtained are summarized as follows:

In the first chapter, the change of serum protein following the growth of cock was investigated immunoserologically. And the following facts were revealed; in MCS (1-day-old male chick serum) there is a specific protein fraction termed Fraction M that cannot be noticed in GCS (growing male chick serum) and ACS (adult cock serum), and the fraction continues to be recognized till it is about two weeks after hatching; in GCS and ACS there is another specific protein fraction termed Fraction A which cannot be noticed in MCS, and it appears during a period from about two to three weeks after hatching and afterwards it can be detected till it becomes an adult cock.

Further the following facts were found as a result of agar gel precipitin ring test; there are immunoserologically at least three kinds of fraction in cock serum through the whole career from hatching till it becomes an adult cock; and there are in each stage specific protein fractions such as Fraction M and Fraction A, consequently from these facts the construction of serum proteins of MCS and ACS was supposed as shown in Fig. 11.

No immunoserological specificity can be noticed between GCS and ACS.

On one hand, each cock serum of various ages was electrophoretically investigated, but the existence of the specific protein fractions mentioned above could not be made clear.

In the second chapter, the serological nature of Fraction M and Fraction A was

investigated.

In order to examine the serological nature of the above mentioned specific protein fractions (M and A), anti-LHS (laying hen serum) and anti-CSS (cock semen serum) were prepared, and ACS, MCS, egg yolk Extracts, Albumin, LHS, CSS were used as antigenic substance.

The results obtained are summarized as follows:

Judging from the fact that the migration velocity of precipitin band in agar gel precipitin ring test shows linear regression, both in anti-MCS and anti-ACS, in conformity with migration formula, the chemical identification of each Fraction seemed possible. From the fact that Fraction M showed positive reaction to egg yolk extracts and LHS, it was presumed that Fraction M was very closely related to egg yolk extracts, and the fact made it clear that MCS, egg yolk and LHS have common protein fraction.

On the other hand, it was found that Fraction A had nothing to do with albumin and MCS, showing positive reaction to CSS and LHS, and that reaction pattern was so similar that both ACS and CSS have the same construction of proteins.

It was made clear from the above description that LHS holds Fraction M and Fraction A in common, then LHS was considered to be a union of both protein fractions of ACS and MCS, but the result of a later experiment caused the presumption to be modified and had it considered that LHS has a component ($x \sim x'$) besides (MCS+ACS). It is considered that Fraction M or Fraction M + ($x \sim x'$) plays a pretty important part in the construction of LHS proteins, and that a comparatively small proportion is occupied by Fraction A.

It is confirmed that, from the result of reaction by anti-CSS, ACS and CSS shows a protein construction very similar to each other, and further that Fraction M has nothing to do with CSS.

From these facts, it was presumed that Fraction M is closely related to egg yolk vitellin, and these facts showing that Fraction A is noticed in nothing but semen serum, ACS, LHS and so forth, led the author to presume that the Fraction A is related to a substance produced by Androgen.

In the third chapter, therefore, the effects caused by sexual hormone injection, the removal of yolk sac, problems concerning the immunoserological specificity of serum of male chick dieted with much yolk and the physiological roles played by Fraction M in the earlier stage of chick were investigated. The results are summarized as follows:

When Estrogen is injected into chicks and adult cocks, substance corresponding to Fraction M appears; when Androgen is injected into male day old chicks, substance corresponding to Fraction A appears; when yolk sac is removed, Fraction M makes regress and inversely, a surprisingly great quantity of Fraction M was noticed in the serum of chick dieted with much yolk.

This experiment raised several problems concerning the effect of hormone. That

is to say, when Estrogen is injected into the cock, Fraction M is supposed to have synergism and Fraction A has antagonism to Estrogen. When a much dose of Androgen is injected into the male day old chick, it is observed that its comb increases remarkably in weight a week after the injection compared with that at a normal stage, and that the testes, on the other hand, becomes atrophied. In this case, no substance corresponding to Fraction M is noticed in the serum, while some substance corresponding to Fraction A is noticed. This fact is a reverse phenomena to a normal chick serum in a case where no treatment is given, which is a very important fact.

The point to be debated here is a serological difference between LHS and MCS.

It was previously mentioned that the construction of protein of laying hen serum was supposed to be $ACS + MCS + (x \sim x')$. Thereupon it is a very interesting point to know in what position and form and proportion the Fraction M exists in the protein fraction of laying hen.

The following are the summarized results obtained from serum reaction :

Antigenic substances showing positive reaction to Fraction M are MCS, LHS, egg yolk extracts, estrogen-treated Cock serum, serum of male chick dieted with much yolk and so forth, while antigenic substances showing positive reaction to anti-LHS are MCS, ACS and LHS. When the anti-LHS is absorbed by MCS, LHS proved positive fraction; when the anti-LHS is absorbed by ACS, both MCS and LHS proved positive fraction.

From these reactions, it is considered that a comparatively small proportion is occupied by protein fraction proper to ACS in LHS. When the anti-LHS is absorbed by MCS, will it not be considered that ACS fraction is removed accompanyingly? This point is left unsolved.

If the main constituent of serum protein proper to laying hen is protein complex of Lipoprotein, it is considered that it may be contained in $(x \sim x')$. It is a question to find where is a substance appearing correspondingly to Androgen injection, and probably it seems proper to think that it is contained in Fraction A itself.

In any case, the $(x \sim x')$ component is considered to be the main component of a specific protein of LHS, and it will be necessary that the relation between this component and MCS, and between Fraction A and Androgen will be fundamentally investigated.

From the finding that anti-MCS injection impedes the growth of chick of 1~2 weeks old in a certain degree, it is confirmed that Fraction M plays a physiological role in an earlier growth of chick. But it has not been elucidated by the author in detail whether it is so important protein fraction as to control the growth of chick.

Part II

Immunoserological Studies on the Hypophysial Gonadotropin of Cock

The result obtained by investigating the change of serum protein that accom-

panies the growth of cock from the viewpoint of metabolism of endogenous hormone has already been mentioned in Part I.

There it was reported that the phase of growth was divided into three stages and using the serum at each stage as antigen, the specific serological difference between the stages was elucidated and that the protein fraction proper to each stage was deeply related to Estrogen or Androgen. The existence of pituitary growth hormone as a great element having a share in the growth of an animal cannot be ignored. As the existence of growth hormone in the cock was not made clear, the level of GTH (Gonado-trophic hormone) in blood was going to be immunoserologically investigated fundamentally.

Now, as whether the gonadotrophic substance of cock pituitary gland had antigenicity or not had not been fundamentally elucidated, the author has mad up his mind to examine that point.

As it is said that there is much to be debated whether there is anti-hormone formation for protein hormone, the problem was considered bibliographically in the first chapter and it was pointed out that the formation of antihormone was inclined to be affirmed.

In the second chapter, it was reported that anti-hormone formation for cock hypophysial gonadotrophic hormone had been affirmed by means of bio-assay. The cock anterior pituitary acetone dried powder which had been suspended in oil adjuvant was used as antigen. When a cock was injected with 1~2cc. of antiserum at the same time with anterior-pituitary acetone powdered preparation, it was noticed that 40~50% of gonadotrophic activity was inhibited in any case and that antiserum was higher in its inhibitory action in a case of 2cc. injection than 1cc.

When a cock was used as an animal for immunization or when antigenserum was not suspended in oil Adjuvant, such antihormone formation could not be proved.

The author attempted an immunoserological assay of hormone contained in blood with antihormone as an index.

From the necessity of measuring antibody titer in the process of immunization, the anterior pituitary powder which was dissolved in MCS was used as antigenic liquid, and immunoassay was attempted by means of the technique of precipitin ring test and agar gel precipitin test, by using immune rabbit serum obtained.

The result showed, as reported in the third chapter, that a certain degree of specific reaction could be noticed, and the immunoassay of cock gonadotrophic hormone was considered to be difficult for the time being. But immunoassay for GTH is thought possible if any specific substance could be removed from anti-CHG rabbit serum and if such conditions could be fulfilled as the constancy of anti GTH activity in antiserum and the raising the purity of the fractionation of gonadotrophic substance.

On the other hand, it was generally accepted that frequent injection of protein hormone would produce an antibody, namely, antihormone, which fact was confirmed

by the author in his experiment. The fact has been one of the greatest obstacles in injecting protein hormone for test or for the object of curing. Therefore, when several kinds of investigation were made as to the method of neutralizing the anti-hormone, it was made clear by treating with serum in an adjuvant manner that the anti-serum containing antihormone has proper antigenicity.

The results obtained by experiment in twice and some discussions concerning them were reported in the fourth chapter.

What is to say, when the inhibition of antihormone and degree of neutralization were expressed by the percentage of neutralization, the titer was found to be 50~60% or so.

If some method of increasing the amount of anti-antiserum injected and heightening the antibody titer is to be employed, it seems that a more effective inhibition of antihormone and neutralizing action will appear, and the method will have a very important meaning in the way of clinical application and thereby it is thought possible to remove one of the obstacles to application of protein hormone.