

サザエ蛋白の抗原性に関する実験的研究

第1篇 Erythron Allergy を指標とする抗原性分析

三重県立大学内科教室 (主任: 高崎浩教授)

青 木 良 明

(普掲受付: 12月19日, 1960)

緒 言

Pirquet¹⁾ がアレルギーを提唱して以来, 多数の学者の研究により, アレルギーと云う言葉の概念に混乱が生じたが, 「アレルギーとは抗体素因に基づく変った反応性である」と限定すると, その抗体に対応する抗原が必ず存在する筈である. 一般に異種の蛋白が非経口的に投与された場合, その動物に投与された異種蛋白に特異的な抗体が産生される. 従来の実験的アレルギーの研究に主として用いられて来た抗原は脊椎動物の臓器組織或は血清, 及び細菌類, 寄生虫類等に由来する蛋白成分である. そこで著者等は無脊椎動物で最も高等であると考えられている軟体動物の蛋白成分が示す抗原性を追究する事にした.

教室の長谷川²⁾³⁾ はマダコより抽出した蛋白液につき, 新鮮抽出液と煮沸抽出液との示す抗原性を, 血清反応, 組織アレルギーの面から詳しく追求して報告したので, 著者は軟体動物の貝類の代表としてサザエ (*Turbo cornutus*) を選び, その新鮮抽出液に就き, 主として組織アレルギーに示す抗原性を検討した.

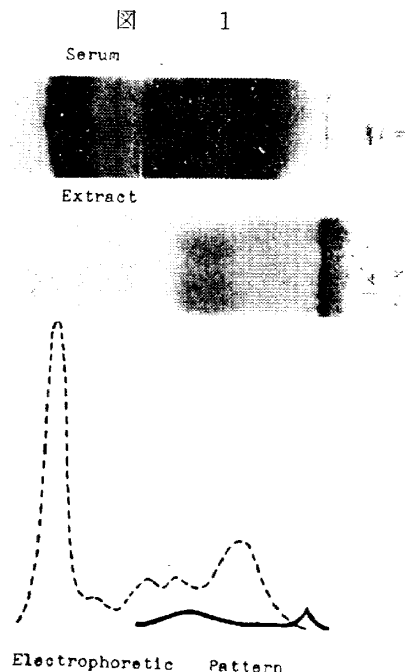
一方 Landsteiner & Simms⁴⁾ が血清学的反応に於ける抗原の特異性を決定する分子群として, Hapten なる概念を提唱したが, 前川^{5)~14)} は多年の組織アレルギーに関する研究より, アレルギーはアレルギー抗原によつてアレルギー抗体が生じ, その抗体素因によつて生体が条件づけられた結果であり, その際のアレルギー抗原は生体内成分, 例えば細胞磷脂質の如き決定分子群と異種蛋白である運搬体とより構成され, この決定分子群たる細胞磷脂質は種属特異性を持たず, 細胞臓器特異性を示す事が明らかにされた. 即ち細胞磷脂質と異種蛋白とを結合させて抗原とし, 実験的アレルギーを起させれば, それぞれの磷脂質の由来する臓器組織に特異的アレルギーを惹起し得る事が前川教授門下によつて証明された^{15)~26)}. 中でも比較的純粋に抽出し得る赤血球磷脂質に就いては, それより惹起せられる Erythron-Allergy

²¹⁾を指標として詳しく抗原分析が行われ²²⁾²⁷⁾, 磷脂質の有効成分はセファリン分屑, 特に Folch の Phosphatidylinositol 分屑にある事が証明された²⁵⁾²⁸⁾. 以上の実験に於ては, アレルギー抗原の決定分子群たる細胞磷脂質と結合し運搬体の役をする蛋白としては, 主としてウシ血清が用いられたが, ウシ血清の外に生卵白²⁹⁾, 卵白アルブミン³⁰⁾, 蛔虫蛋白³¹⁾, 結核菌³²⁾緑連菌³³⁾, シフテリア毒素及びそのアナトキシン³⁴⁾等を用いての実験も行われ, 被験動物にとつて異種の蛋白でさえあればよい事が立証された.

本篇では主として著者の抽出したサザエ蛋白を運搬体とし, 此に赤血球セファリンを結合せしめてウサギに惹起させる Erythron-Allergy を指標とし, サザエ蛋白の抗原性を追究した結果を報告する.

方 法

1. サザエ蛋白液の抽出: 死後蛋白の変性する事を防ぐため, サザエをいけすに入れ海中で飼育し, 用に臨み, 生きているサザエの殻を叩き割り, 足の部分のみを取り出して, 水洗細切し, 氷水で軽く洗滌した後, 等重量の冷却した生理食塩水を加え, ミキサーにて3分間処理し, 氷室内に時々振盪しながら24時間放置した後, 3,000回転30分間遠心沈澱を行うと, 上中下層に分離する. 黄色で軽度濁った上層を採り, 2枚のガーゼで濾し, 更に濾紙にて濾過して得た液を抗原液とした. この蛋白液は微黄色で少しく濁濁を示し, pHは6.2~6.4の間にあり, 蛋白濃度は日立製屈折計で測定すると3.8%~4.0%あり, ピクリン酸によるEsbach検査では1.3%を示す. Biuret 反応並びにNessler氏液による発色は共に陽性, NH₃による沈澱は陽性を示す. Lugol 氏液による呈色反応, Fehling氏液に対する還元反応, Molish氏反応等の糖反応は陰性であるが, 終末塩酸濃度1%で10時間の加水分解を行うと, Molish氏反応, 町田³⁵⁾の方法によるUron酸, Hewitt³⁶⁾の方法によるHexosaminの反応共に陽性となり, SO₄²⁻及びFehling



氏液に対する還元性も認められ、多糖類の含有されている事が解る。そして人血清に就いて同様に行つた結果と比較すると、Uron 酸、Hexosamin 共により強く呈色反応を示すことが認められる。又濾紙電気泳動による分層は圖1に示す如く、人血清のβ~γグロブリンに相当する部に1峰を認める。

2. 赤血球セファリンの抽出：赤血球セファリンはウシ赤血球より Bloor³⁷⁾, van Slyke³⁸⁾ 等の方法を改良した前川教室²⁵⁾の方法により抽出した。

3. 実験動物：体重2kg前後の雄性成熟白色ウサギを用い、主として豆腐粕、青草等で飼育、体重安定し、末梢血液所見のほぼ一定した後実験に供した。

4. 注射方法：赤血球セファリン(以下 C_E とす) 1.5mg相当のエーテル溶液を滅菌乾燥試験管にとり、これにエチルアルコール 0.5ml と生理食塩水 0.5ml とを加え振盪しながら水浴上でエーテルとアルコールとを蒸発せしめて、C_E の生理食塩水エムルジョンを作る。これに上記のサザエ蛋白液(以下 E とす)をウサギ体重kg当 2ml の割合に混じて1時間以上室温に放置したものを1回の注射量とした。又 E 単独を用いた場合は、ウサギ体重kg当 2ml を1回量とした。感作にはこれ等1回量を1日1回連続2~5日間、再注射には連続2~3日間、いずれも耳静脈内に徐々に注射した。

5. 検査方法：感作前後及び再注射前後には末梢血液を採取し、赤血球数、血色素量、網赤血球数、栓球数、白血球数とその百分比を検査し、同時に骨髓穿刺液について森田³⁹⁾の提唱する骨髓組織塗抹標本作製し、有

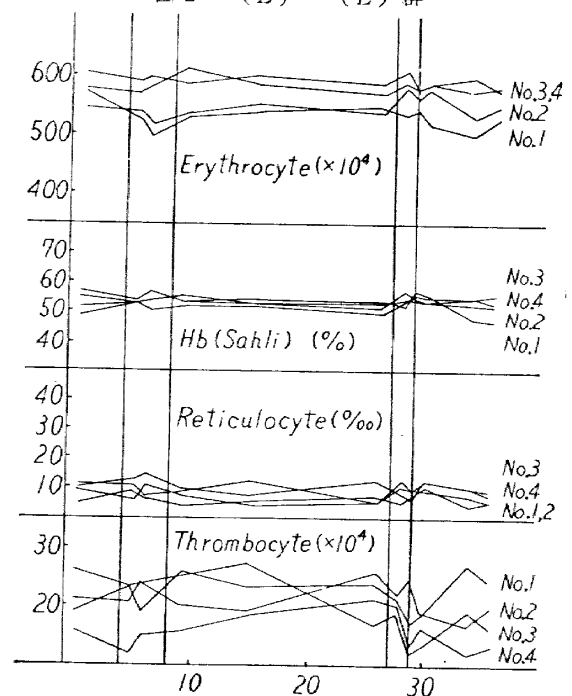
核細胞の百分比を求めた。又再注射の直前には血清を採取し、Eに対する抗体稀釋沈降反応を行い、再注射の都度アナフィラキシー・ショック症状に関して観察した。尚以上の血液学的観察終了後は失血致死せしめ、病理組織学的所見をヘマトキシリン、エオジン染色標本で観察した。

成 績

第1実験 (E) — (E) 群

No. 1, No. 2, No. 3, No. 4 に E のみで連続5日間の感作を行い、No. 1, No. 2 は19日後に、No. 3, No. 4 は33日後にそれぞれ連続3日間、同抗原による再注射を行った。

図 2 (E) — (E) 群

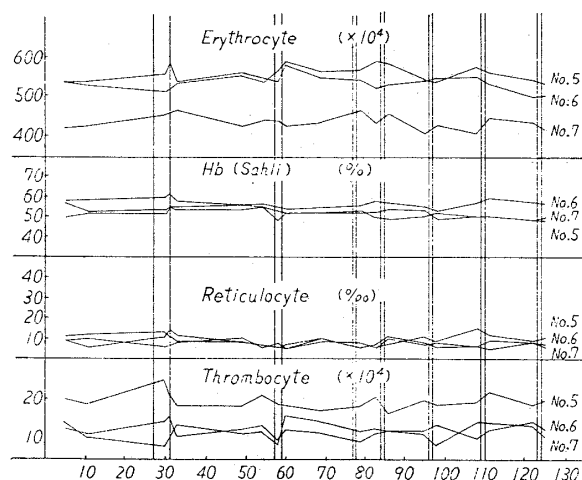


その血液学的検査の成績は圖2に示す如く、赤血球数、血色素量、網赤血球、栓球数共に著明な変動はなく、白血球数は感作後、再注射後共に多少増加の傾向にあるが、その百分比には一定の変動を示さない。骨髓像にも再注射前後で認むべき変動はない。又再注射完了後10~15日後にそれぞれ失血致死せしめ、主要臓器の病理解剖学的検査を行つたが、特記すべき変化は認められない。

第2実験 (E) — (E) を繰返した群

No. 5, No. 6, No. 7 に E のみで連続5日間の感作を行い、26日後に同抗原による連続3日間の第1回再注射を行つた。その後更に18日を経て同抗原による連続2日間の第2回再注射を行い、その後6~13日の間隔で同抗原による連続2日間の第3, 第4, 第5, 第6回の再注射を行つた。

図3 (E)を繰返した群



その血液学的所見は図3に示す如く、赤血球数は感作前後においては殆んど変動なく、第1回再注射の直前値と再注射後の最低値とを比べても僅かの動揺を示すに過ぎない。第2回再注射以後も注射前後の差は常に極めて軽微であるが、注射回数を重ねると感作前に比し次第に軽度の減少傾向をとる。

血色素量の変動も、赤血球数の変動に伴い僅かの増減を示すが再注射回数を重ねると軽度の減少傾向をとる。

網赤血球や栓球数にも全経過を通じ殆んど変動を認めない。

白血球数は感作後も再注射も一般に増加の傾向をとるが、その百分比には一定の変動は認められない。

骨髓像にも著明な変化なく、再注射完了後10日で失血致死せしめ、主要臓器につき病理解剖学的検査を行った結果では、1例に軽度の腎糸球体の膨化と Bowman 氏囊の肥厚を認める外、特記すべき変化は見られない。

第3実験 (E+CE) - (E+CE) 群

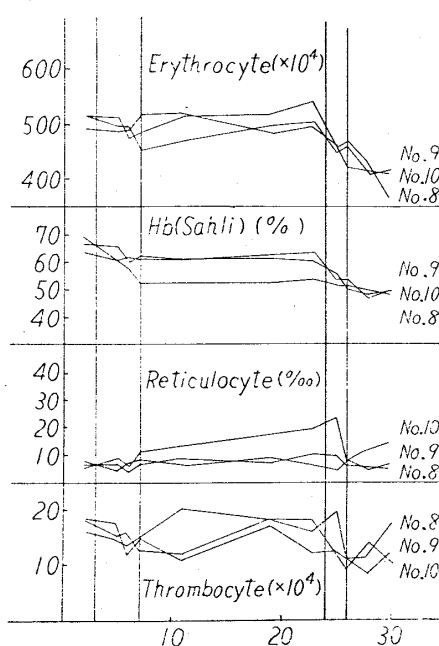
No. 8, No. 9, No. 10にEとCEを混じたものを抗原とし連続5日間の感作を行い、17日後に同抗原による連続3日間の再注射を行った。

その血液学的所見は図4に示す如く、

赤血球数は感作前に比し感作後は、No. 9で $518 \rightarrow 471 \times 10^4$ と 47×10^4 、No. 10では $519 \rightarrow 485 \times 10^4$ と 34×10^4 の僅かな減少を示すが、再注射後は、No. 8で $498 \rightarrow 364 \times 10^4$ と 134×10^4 、No. 9は $501 \rightarrow 412 \times 10^4$ と 89×10^4 、No. 10は $542 \rightarrow 415 \times 10^4$ と 127×10^4 とそれぞれ著明な減少が認められる。本貧血は各例共再注射開始直後より始まり、大体再注射完了後5~7日間で極期に達する。

血色素量は感作後にはNo. 8が69%→53%、No. 9は

図4 (E+CE) - (E+CE) 群



64%→61%、No. 10は67%→61%と僅かな減少を認めるが、再注射後はNo. 8が54%→49%、No. 9が61%→49%、No. 10が64%→48%と比較的著明な減少を示す。

網赤血球は感作後No. 8において軽度の増加を認め再注射前迄徐々に増加し、感作前6%が再注射前20%となる。No. 9, No. 10は感作後殆んど変動を認めない。再注射後はNo. 8で20%→6%、No. 9で11%→6%と少しく減少し、No. 10は7%→15%とやや増加を示す。然し再注射後の著明な貧血の進行時にも、少くとも著しい増加は認められない。

白血球数は感作によつても再注射によつても共に増加の傾向を示すものがあるが、百分比には殆んど変化は認められない。

栓球数は感作後に軽度の減少を示すが、再注射後の貧血時には著明な減少がみられる。

骨髓像では表1に示す如く、赤芽球百分比が再注射後全例において減少し、淋巴球百分比の相対的増加が認められ、単球、形質細胞、網状織細胞の百分比も一般に増加の傾向をとる。即ち赤芽球系の形成低下が認められる。

又再注射完了後7日で失血致死せしめ、主要臓器につき病理解剖学的検査を行ったが、特記すべき変化は認められない。

抗体価並びにアナフィラキシー・ショック

i. 抗体価：以上各群の家兎より再注射直前に採取した血清につき、それぞれ対応抗原に対して検した抗体稀

表1 (E+C_E) - (E+C_E) 群

ウサギ番号		10	
検査月日		28/9	5/10
再注射		前	後
前赤芽球		0.2	0.2
大赤芽球	塩基性	1.6	2.0
	多染性	5.2	2.8
	正染性	0	0
正赤芽球	塩基性	0.4	1.6
	多染性	40.0	23.2
	正染性	1.8	0.4
赤芽球計		49.4	30.2
骨髓芽球		0.4	1.0
好中球	前骨髓球	0.4	0.4
	骨髓球	4.8	5.8
	後骨髓球	5.0	3.6
	桿核球	12.0	9.6
	分節核球	10.4	6.4
好酸球	前骨髓球	0	0
	骨髓球	0.2	0
	後骨髓球	0.8	0
	桿核球	0	0
	分節核球	0	0.4
好塩基球		0	0
骨髓性細胞計		34.4	27.4
単球		0.6	4.2
淋巴球	大	2.6	8.2
	小	12.8	21.8
形質細胞		0.2	4.2
網状織細胞		0.2	1.0
巨核球		+	+
赤芽球/骨髓性細胞		1.44	1.10

表2 血清抗体価

群	ウサギ番号	感作抗原	血清抗体価	
			E	E+C _E
I	1	E	2 ²	
	2		2 ³	
	3		2 ³	
	4		2 ²	
II	5	E	2 ²	
	6		2 ²	
	7		2 ²	
III	8	E+C _E		2 ²
	9			2 ²
	10			2 ²

釋沈降反應の抗体價は表2の如くて沈降素價の上昇は軽い。

ii. アナフィラキシー・ショック：第1回再注射直後に軽度の呼吸困難をNo. 1, No. 2に來した程度で、著明なショック症状の発現は殆んど見られない。

考 按

著者がサザエの足より抽出して抗原に用いた抽出液は、濾紙電気泳動法により常に人血清のβグロブリンとγグロブリンとの中間の移動度を示す1峰を認め、加水分解により始めて糖反應陽性となり、Uron 酸, Hexosamin の量も人血清に比し多い事が見られるから、長谷川²⁾がマダコに就いて検討した結果と類似し、軟体動物に共通した粘性多糖類を比較的多く含む蛋白液と考えられる。

この抗原液でウサギを感作すると、抗体價は比較的低いが沈降素は產生される。然し再注射によるアナフィラキシー・ショック症状は極めて軽く、血液学的にも組織学的にも特徴的な変化は見られない。

この抗原液に赤血球セファリンを混じて抗原とし、ウサギに感作再注射を行うと、再注射により著明な貧血を認め、骨髓では赤芽球系細胞の形成低下を示し、網赤血球も貧血の進行時著明な増加を示さず、服部²²⁾が赤血球磷脂質とウシ血清とを用いて惹起した Erythron-Allergy の病像とよく一致する。従つてサザエより抽出した蛋白液は赤血球セファリンを混ざる事によりアレルギー抗原となり、特異的組織アレルギーである、Erythron-Allergy を惹起し得る事が確認された。

結 論

サザエの足部より生理食塩水で抽出した液の抗原性を、主として Erythron-Allergy を指標としてウサギにつき検討して次の結果を得た。

1. サザエの足部の生理食塩水抽出液は濾紙電気泳動で人血清のβとγグロブリンの中間に位する1峰を示し、比較的粘性多糖類を多く含む。

2. 該抽出液でウサギを感作すると沈降素が產生される。

3. 再注射によるアナフィラキシー・ショック症状の発現は殆んどなく、血液学的にも組織学的にも特徴的な変化は見られない。

4. 赤血球セファリンと混じて抗原とすると Erythron-Allergy を惹起する。

尚本論文の要旨は昭和34年10月、第9回、同35年10月第10回日本アレルギー学会総会において発表した。

文献は第3篇末尾に一括す。

Experimental Studies on the Antigenicity of Turbo Cornutus protein

I. On the Antigenicity in Erythron-Allergy

Yoshiaki Aoki

The First Department of Internal Medicine (Prof. Dr. H. Takasaki)

School of Medicine, Mie Prefectural University, Tsu

In an attempt to ascertain the antigenicity of Mollusca protein, experimental studies have been made in rabbits with extracts of the muscle of the wreath shell.

The protein pattern of this extract was observed as a simple band between β and γ globulin of human serum in paper electrophoresis. When the rabbits were sensitized with the Turbo extract, precipitin against this extract was detected in serum of all rabbits. When experimental allergies were produced with the mixture of this extract and red cell cephaline as an antigen, severe anemia were found transiently after the reinjection, i. e. Erythron-Allergy was occurred, but anaphylactic shock syndrome were hardly observed.

Experimental Studies on the Antigenicity of Turbo Cornutus Protein

II. On the Antigenicity in Liver Allergy

Yoshiaki Aoki

The First Department of Internal Medicine (Prof. Dr. H. Takasaki),

School of Medicine, Mie Prefectural University, Tsu

In order to investigate the antigenicity of extracts from Turbo cornutus in tissue allergy, several experiments were performed in rabbits using the mixture of Turbo extracts and liver phosphatide for sensitization and reinjection.

After the reinjection, severe anemia and the disturbances in liver function were observed, as Cobalt-, Lugol- and C.C.F.- tests became positive and urinary urobilinogen increased. Remarkable histological changes in the liver were seen, i. e. the swelling of liver cells, pale cytoplasm with many granules and vacuoles.

It is thought that Turbe extracts have higher affinity for liver cells in tissue allergy than ox serum, and that the different degree of the affinity between Turbo extracts and ox serum may be due to higher contents of mucopolysaccharides in Turbo extracts than in ox serum.

The anemia observed after reinjection had hypoplastic characters in nature, but partly some hemolytic pattern, was seen.

Experimental Studies on the Antigenicity of Turbo Cornutus Protein

III. On the Anemia in Liver Allergy Produced with Turbo Extracts and Liver Phosphatide

Yoshiaki Aoki

The First Department of Internal Medicine, (Prof. Dr. H. Takasaki)

School of Medicine, Mie Prefectural University, Tsu

Experiments were planned to determine the pathogenesis of the anemia in liver allergy described previously (in II nd report).