

〔原 著〕

結核菌と *Corynebacterium equi* の共通抗原性による アレルギー反応の BSA 系 PCA 反応に 対する干渉抑制に関する研究

名古屋保健衛生大学衛生学部免疫学教室
山本恵申

Key words: allergic reaction due to common antigenicity — inhibition of PCA reaction — *Mycobact.* and *Corynebact.*

(受付: 2月5日, 1981)

緒 言

アレルギー性疾患の治療には、薬剤を用いる薬物療法と、特異的あるいは非特異的抗原の注射によるいわゆる免疫療法など、多くの治療法が考案されている。後者は Otto¹⁾ (1907) により発見された減(脱)感作現象の応用である。

Isaacs²⁾ (1928) は2つの異なつた抗原抗体系のアレルギー反応が続いて起こつた場合、先に起こつた系の反応によつて、他方がいわゆる減(脱)感作の状態となることを述べている。また Ovary³⁾ (1958) はモルモットの背中に2種類の抗血清を混合して皮内注射し、5時間後に一方の抗原液を静脈内に注射して PCA 反応を起こし、その1時間後に他方の抗原液と色素を静脈内に注射した場合、先に起こした PCA 反応によつて後に起きるべき他の系の PCA 反応が抑制されたと報告している。

先に著者⁴⁾ (1979) らは、*Corynebacterium equi* Ko-85 株より抽出した蛋白質を主成分とする CP 分画で感作したモルモットを用い、CP 分画の皮内および静脈内注射により起こる Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction により、BSA 系の PCA 反応が抑制されることを報告した。

今回著者は、結核菌青山 B 株と *C. equi* Ko-85 株との間に共通抗原性⁵⁾ (1980) のあることに注目し、結核

死菌青山 B 株感作モルモットに CP 分画を抗原として投与して Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction を起こさせることにより、BSA 系の PCA 反応が抑制されることを見出したので、その結果について報告する。

材料および方法

I. CP 分画抗原作製法

C. equi Ko-85 株の湿菌 50g を生理食塩液で洗浄して培地成分を除き、ガラス粉 (0.1mm) 30g と 0.01N NaOH 液 20ml を加え、Vivrogen cell mill (Bühler 製, VCM-I) にて5時間磨砕した。磨砕後、さらに 0.01N NaOH 液 1000ml を加え、4-6℃に48時間放置後、ガラス粉を取り除いた上清を 20000G で10分間遠心して菌体破壊成分を取り除いた。その上清に 1N HCl 液を加え、等電点 pH 4.0 で沈殿を起こさせ、4-6℃で一昼夜放置後遠心して上清を除き、沈殿物を蒸留水に浮遊させ、1N NaOH 液を滴下して、弱いアルカリ性 (pH 7.2) として沈殿物を溶かし、不溶物は遠心除去した。この方法を3回繰り返した後、上清を透析膜 (seamless cellulose tubing) で水道水に対して48時間透析後、凍結乾燥を行い 1230mg の CP 分画を得た。

II. 抗 BSA ウサギ血清の作製

1) 免疫方法: bovine serum albumin [(BSA) Armour 社製] 水溶液 (10mg/ml) と 1%硫酸アルミニウムカリウム液を等量混合し、1N NaOH で pH 7.2 に調整した

Abbreviations: BSA bovine serum albumin;
CP *Corynebacterium equi* Ko-85 protein; PCA
passive cutaneous anaphylaxis; DNP-OA dinitro-
phenylated ovalbumin; IgE immunoglobulin E

液を、使用時に滅菌生理食塩水で3倍にうすめて体重3kgの健康雄ウサギに注射した。初回1.0ml腹腔内、3日目1.5ml静脈内、5日目2.0ml静脈内、7日目2.5ml静脈内、10日目3.0ml腹腔内、12日目3.5ml静脈内、14日目4.0ml静脈内、17日目4.5ml腹腔内、19日目5.0ml静脈内に注射し、27日目に全採血した。実験を通じて溶液作製は無菌的に操作し、希釈は滅菌生理食塩水を使用した。

2) 抗体価の測定：タンニン酸処理赤血球凝集反応(Stavitsky 変法)⁶⁾を用いて測定した。

Ⅲ. 結核菌青山B株によるモルモットの感作

体重250-300gのHartley系健康雄モルモットに、厚生省生物学的製剤基準にしたがつて結核死菌青山B株菌体を流動パラフィンに混合して0.1mg/mlの浮遊液とし、両側大腿筋肉内に0.25mlずつ注射した。6週間後にPPD(日本BCG)の2 μ g/mlおよび0.5 μ g/mlの各0.1mlを、これらのモルモットの剃毛した背部の皮内に注射し、24時間後の硬結の直径がPPD 2 μ g/mlの部位で14-19mmであり、PPD 0.5 μ g/mlによる反応の直径がPPD 2 μ g/mlによる直径よりも4mm以上小さい時、それらを感作の成立したモルモットとした。

Ⅳ. PCA 反応

1) 実験動物：体重250-300gのHartley系、健康雄モルモットの背部の毛を刈り取つて実験した。

2) 抗原：BSA溶液(2.5mg/ml)を抗原として使用した。

3) 色素：1% Evans blue 溶液を使用した。

4) PCA 反応による抗体価の測定：予備実験としてOvary⁷⁾の原法に従つて、抗BSAウサギ血清を1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000倍に希釈し、そのおのおのをモルモットの背部皮内に0.1mlずつ注射し、4時間後に2.5mg/ml BSA溶液0.5mlと1% Evans blue 溶液0.5mlをよく混合し後肢静脈内に注射し、30分後に心臓穿刺により全採血して、皮膚をはく離して、抗BSA注射局所の色素斑について判定した。

その結果、1:500倍希釈で10 $\times$ 10mmの色素斑を示したので、Arthus反応によるPCA反応の抑制実験には抗BSA血清1:500倍希釈液を使用し、latent systemic anaphylactic reactionによるPCA反応の抑制実験には1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000倍希釈抗BSA血清液を使用した。

Ⅴ. Arthus 反応による PCA 反応の抑制

抗BSAウサギ血清を1:500倍に希釈し、その0.1mlを3匹の結核死菌青山B株感作モルモット(以下結核菌感作モルモット)の背部の右側2箇所、左側1箇所の皮内に注射した。2時間後に左側および右側上部の抗BSAウサギ血清注射部位の中心から、上下左右1cm間隔の4箇所に、500 μ g/mlあるいは1mg/mlのCP分画溶液0.1mlずつを皮内に注射した。さらに2時間後に抗原液(BSA 2.5mg/ml) 0.5mlと1% Evans blue 溶液0.5mlを加えよく混合し、後肢静脈内に注射した。30分後に心臓穿刺により全採血して、皮膚をはく離して、抗BSA注射局所の色素斑の縦横の径の平均値(mm)について対照と比較検討した。

色素斑の抑制効果の算定方法は下記により計算した。

$$\% \text{ reduction} = \left(1 - \frac{\text{area of bluing lesion of CP-surrounded-site}}{\text{area of bluing lesion of untreated-site}} \right) \times 100$$

Ⅵ. latent systemic anaphylactic reaction による PCA 反応の抑制

抗BSAウサギ血清を1:500, 1:1000, 1:2000, 1:3000, 1:4000, 1:5000倍に希釈し、各希釈液の0.1mlを結核菌感作モルモットの背部に皮内注射した。4時間後にCP分画溶液(1mg/ml) 0.25ml, BSA溶液(2.5mg/ml) 0.5ml, 1% Evans blue 溶液0.5mlを加えよく混合して(いずれの抗原もanaphylactic shockが起きない程度の量)後肢静脈内に注射した。30分後に心臓穿刺により、全採血して皮膚をはく離して、抗BSA注射局所の色素斑について前記と同様に判定した。

またこの方法の実験では対照実験を同一動物に求められないので、結核菌感作モルモットと非感作モルモットを使用して、次の3群を対照とした。

第1群の対照には、感作モルモットをもちい、抗BSAウサギ血清の各希釈液0.1mlを背部に皮内注射してから、4時間後にBSA溶液(2.5mg/ml) 0.5mlと1% Evans blue 溶液0.5mlと滅菌生理食塩水0.25mlの混合液を後肢静脈内に注射した。

第2群の対照には、非感作モルモットをもちい、抗BSAウサギ血清の各希釈液0.1mlを背部に皮内注射してから、4時間後にCP分画溶液(1mg/ml) 0.25ml, BSA溶液(2.5mg/ml) 0.5mlおよび1% Evans blue 溶液0.5mlを混合して後肢静脈内に注射した。

第3群の対照にも非感作モルモットをもちい、抗BSAウサギ血清の各希釈液0.1mlを背部に皮内注射してから、4時間後にBSA溶液(2.5mg/ml) 0.5ml, 1%

Evans blue 溶液 0.5ml と滅菌生理食塩水 0.25ml の混合液を後肢静脈内に注射した。

上記3群とも、30分後に心臓穿刺により全採血して、皮膚をはく離して色素斑について判定した。

成績

I. CP 分画で起きる Arthus 反応による PCA 反応の抑制

方法の項で述べたVの方法で判定すると、Table 1, および Fig. 1 に示すように、CP 分画溶液 100 μ g で惹起した Arthus 反応により、PCA 反応は対照と比較して 80-99%抑制された。

CP 分画溶液 50 μ g で惹起した Arthus 反応による抑制効果は、6-42%と非常にひらきがあつたが、1例に42%の抑制効果が認められたことは、CP 分画 50 μ g でもある程度抑制するものと考えられた。

非感作モルモットをもちいての、CP 分画による皮膚反応はみられなかつた。

II. CP 分画で起きる latent systemic anaphylactic reaction による PCA 反応の抑制

方法の項で述べたVIの方法で判定すると、Table 2, Fig. 2 および Fig. 3 に示すように、PCA 反応の青色斑が直径 5mm 以上を示したのは、対照群では抗 BSA ウ

Table 1 Effects of skin reactions elicited by CP^a on PCA reactions^b in guinea pigs

Groups of animals	No.	CP injected μ g	% reduction of PCA reaction ^c
<i>M. tuberculosis</i> sensitized	1	100	80
		50	42
	2	100	86
		50	22
	3	100	99
		50	6
unsensitized	4	100	10
		50	7
	5	100	9
		50	4
	6	100	5
		50	4

a: Aqueous solution of *C. equi* strain Ko-85.

b: The reaction was elicited by intracutaneous injections of 1:500 diluted anti-BSA rabbit serum followed by challenge with BSA.

c:

$$\% \text{ reduction} = \left(1 - \frac{\text{area of bluing lesion of CP-surrounded-site}}{\text{area of bluing lesion of untreated-site}} \right) \times 100$$

サギ血清500倍希釈から4000倍および5000倍希釈までであつた。

結核菌感作モルモット群に BSA 溶液 (2.5mg/ml) 0.5

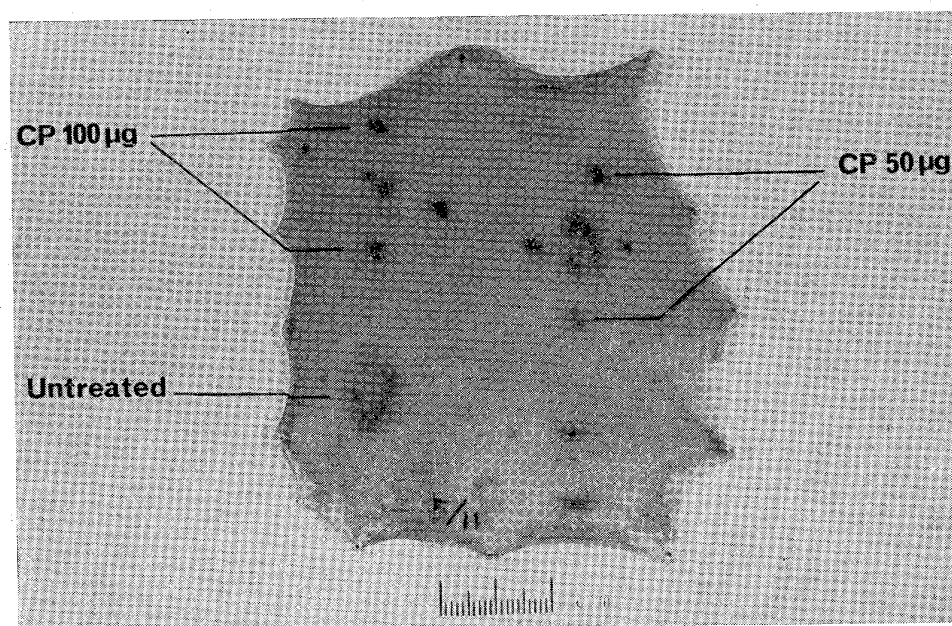


Fig. 1. Effects of skin reactions of Arthus type induced by CP fraction of *C. equi* strain Ko-85, on the PCA reactions elicited by BSA-anti-BSA system.

Table 2 Effects of latent systemic anaphylactic reactions on PCA reactions in guinea pigs^a

Groups of animals		Challenged with	PCA titer ^b
<i>M. tuberculosis</i> sensitized	1	BSA+CP	500
	2	BSA+CP	1000
	3	BSA+CP	1000
	4	BSA only	4000
	5	BSA only	5000
	6	BSA only	5000
unsensitized	7	BSA+CP	4000
	8	BSA+CP	4000
	9	BSA+CP	5000
	10	BSA only	4000
	11	BSA only	4000
	12	BSA only	5000

a: *M. tuberculosis* sensitized and unsensitized guinea pigs were injected id. with different dilutions of anti-BSA serum. After 4 hr, these animals were challenged iv. with 1.25mg of BSA mixed with or without CP.

b: PCA titer was expressed as the reciprocal of the highest dilution of the serum resulting in a reaction of 5 mm in diameter.

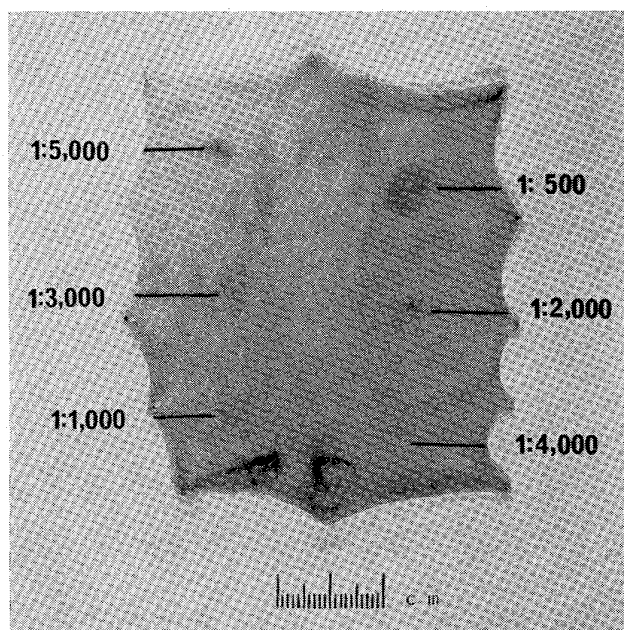


Fig. 2. Effects of systemic CP-anti-*M. tuberculosis* reactions on the PCA reactions elicited by BSA-anti-BSA system. Guinea pigs sensitized with *M. tuberculosis* were challenged with a mixture of CP and BSA.

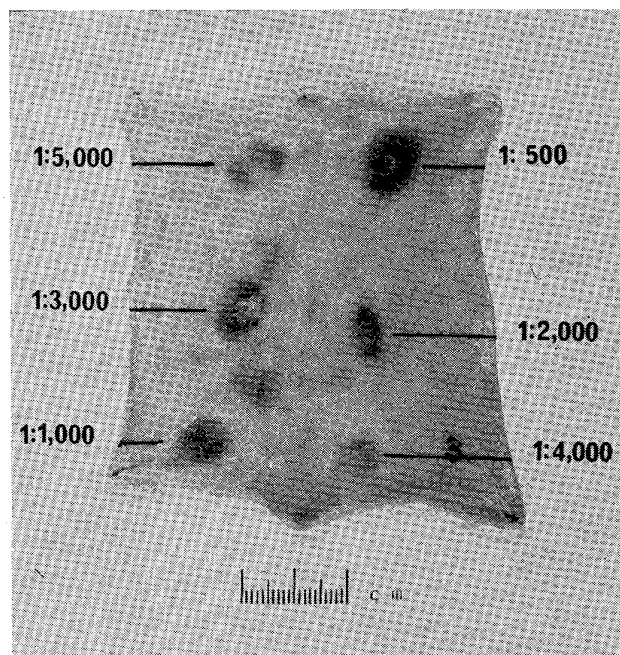


Fig. 3. Effects of systemic CP-anti-*M. tuberculosis* reactions on the PCA reactions elicited by BSA-anti-BSA system. Guinea pigs sensitized with *M. tuberculosis* were challenged with BSA only.

ml, CP 分画溶液 (1mg/ml) 0.25ml および 1% Evans blue 溶液 0.5ml を混合し、後肢静脈内注射した群では、青色斑が 5mm 以上を示したのは、抗 BSA ウサギ血清 500倍希釈と 1000倍希釈までであり、PCA 反応が抑制されていた。

上記の成績より、動物の個体差はあるが、PCA 反応が latent systemic anaphylactic reaction により抑制される事実がわかった。

考察および結論

Otto¹⁾ (1906) により減(脱)感作現象が発見されて以来、この減(脱)感作療法について多くの研究報告がある。

Isaacs²⁾ (1928) は、2つの異なった系のアナフィラキシー反応を起こすことにより、一方の反応が減(脱)感作を受けて抑制されることを記載している。Ovary³⁾ も、2種類の系の PCA 反応を用いて、モルモットの背部の同じ場所で時間的にずらして PCA 反応を行つた場合に、先に起こした PCA 反応の強さにより後に起きる PCA 反応が抑制されると報告している。

また Cooke⁴⁾ らは、枯草熱患者および正常者をブタク

サ花粉の抽出物（アレルゲン）で頻回に感作すると、皮膚固着性はないが受身移入されたレアギンと当該抗原との結合を阻止する抗体 blocking antibody（遮断抗体）を見つけたと報告した。

石坂⁹⁾（1966）は、ブタクサ花粉症患者の血清より、即時型アレルギーに関与している免疫グロブリン E（IgE）を発見した。そこで減（脱）感作療法においても、遮断抗体の産生のみでなく、IgE 抗体産生を抑制することに意義ありとの考え方が出ている¹⁰⁾。足立らは、マウスに dinitrophenylated ovalbumin (DNP-OA) を注射すると、抗 DNP-OA IgE 抗体を産生することを利用して、DNP-OA でマウスを感作した後に、*Corynebacterium equi* Ko-85 株菌体を投与することにより IgE 抗体産生を抑制したことを、ラットの PCA 反応を用いて確認している。

先に著者らは、*C. equi* Ko-85 株より抽出した CP 分画で感作したモルモットに、CP 分画の 50 μ g, 100 μ g および 250 μ g を皮内あるいは静脈内注射することにより起こる Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction によつて、BSA 系の PCA 反応が抑制されたことを報告した。

また著者⁵⁾は、結核菌青山 B 株と *C. equi* Ko-85 株との間に、遅延型アレルギー反応で共通抗原性のあることを報告している。今回、結核菌感作モルモットに大量の CP 分画を皮内注射することにより、弱い局所の発赤と点状出血が現れる即時型反応を観察した。このことは、CP 分画には遅延型反応を起こす抗原性と即時型反応を起こす抗原性の 2 種類の面があることを示すものである。

今回著者は、CP 分画で起きる Arthus 反応と latent systemic anaphylactic reaction によつて BSA 系の PCA 反応が抑制されることを知った。これは、対応する抗原による Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction でなくとも、共通抗原性をもつた抗原によつて起きる Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction でも、それがあつた程度強くおきた場合他のアレルギー反応が抑えられることである。

また結核菌感作モルモット血清について間接赤血球凝集反応、溶血反応を用いて抗体価を測定したが、この抗体価と Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction によつて起きる BSA 系 PCA 反応の抑制の程度との間には、この実験の範囲内では明らかな相関は認められなかつた。

以上のように、CP 分画による Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction によつて BSA 系の PCA 反応が抑制されたが、PCA 反応、Arthus 反応および latent systemic anaphylactic reaction は同時あるいは短時間内に惹起されているので、この抑制が減（脱）感作療法の遮断抗体によるものとは考えにくい。また BSA 系の抗原または抗体に CP 分画が直接作用して抗原抗体反応を抑制することも考えにくいので、この抑制現象は Isaacs（1928）が記載している非特異的脱感作現象による干渉現象と考えられる。

この干渉現象の理論・説明については、今後の研究にまつべきところが多いが、アレルギー症状の治療法の進歩に貢献するものと考えている。

稿を終るに際し、ご校閲をいただいた東京大学名誉教授、元名古屋保健衛生大学衛生学部免疫学教室、進藤宙二教授、横浜市立大学医学部細菌学教室、田所一郎教授、ならびにご指導、ご校閲いただいた名古屋衛生技術短期大学血清学教室、芳賀邦夫教授に謝意を表します。

文 献

- 1) Otto, R.: Zur Frage der Serum-Ueberempfindlichkeit. Münch. Med. Wochenschr. **54**, 1665-1670, 1907.
- 2) Isaacs, M.L.: Nonspecific desensitization. Arch. Pathol. Lab. Med. **5**, 1029-1039, 1928.
- 3) Ovary, Z.: Immediate reactions in the skin of experimental animals provoked by antibody-antigen interaction. Prog. Allergy **5**, 473-478, 1958.
- 4) Sindo, T., Haga, K., Yamamoto, Y., Hayashi, Y. and Ozawa, K.: Studies on the interference between the allergic reactions caused by different antigen-antibody systems. Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. **59**, 447-451, 1979.
- 5) 山本恵申, 林 譲, 芳賀邦夫: 結核菌青山 B 株と *Corynebacterium equi* Ko-85 株との間の免疫学的交差反応性について. 日細菌誌 **35**, 423-429, 1980.
- 6) Stavitsky, A.B.: Micromethods for the study of proteins and antibody. I. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood

- cells. II. Specific applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.* **72**, 360-367, 368-375, 1954.
- 7) Ovary, Z. and Bier, O.G.: Quantitative studies on passive cutaneous anaphylaxis in guinea pig and its relationship to the Arthus phenomenon. *J. Immunol.* **71**, 6-11, 1953.
 - 8) Cooke, R.A., Barnard, J.H., Hebal, S. and Stull, A.: Serological evidence of immunity with coexisting sensitization in a type of human allergy (hay fever). *J. Exp. Med.* **62**, 733-750, 1935.
 - 9) Ishizaka, K., Ishizaka, T. and Hornbrook, M.M.: Physico-chemical properties of human reaginic antibody. IV. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity. *J. Immunol.* **97**, 75-85, 1966.
 - 10) Asherson, G.L., Zembala, M., Perera, M.A., C.C., Mayhem, B. and Thomas, W.R.: Production of immunity and unresponsiveness in the mouse by feeding contact sensitizing agents and the role of suppressor cells in the Peyer's patches, mesenteric lymph nodes and other lymphoid tissues. *Cell. Immunol.* **33**, 145-155, 1977.
 - 11) Adachi, H., Yabuuchi, K., Ozawa, K., Sindo, T. and Tadokoro, I.: Effect of aerobic and anaerobic *Corynebacteria* on reaginic antibody response in mice. *Microbiol. Immunol.* **22**, 53-56, 1978.

INHIBITING EFFECT ON PCA REACTION DUE TO BSA
CAUSED BY ALLERGIC REACTIONS BY THE COMMON ANTIGENIC
FACTOR BETWEEN *MYCOBACTERIUM* AND
CORYNEBACTERIUM

Yoshinobu Yamamoto

Department of Immunology, School of Hygiene, Fujita Gakuen University

It has previously been reported that the interference phenomenon between two different antigen-antibody reactions in vivo occurring simultaneously was observed and also that the common antigenic factor between *M. tuberculosis* (AOYAMA-B) and *C. equi* (Ko-85) was elucidated serologically both in vitro and in vivo. In the present report, the interference between the allergic reactions caused by two different antigen-antibody systems was studied in guinea pigs sensitized with cells of *M. tuberculosis* (AOYAMA-B).

Certain allergic reactions of the Arthus type elicited by a common antigenic factor between *M. tuberculosis* (AOYAMA-B) and *C. equi* (Ko-85) inhibited the passive cutaneous anaphylaxis (PCA) induced by bovine serum albumin (BSA) and anti-BSA rabbit serum. The PCA reaction caused by BSA system on animals sensitized with *M. tuberculosis* was also inhibited by simultaneous intravenous challenge of BSA and the CP fraction as evidenced by definite reduction of PCA titer due to BSA antigen-antibody system.