

ホヤ喘息におけるホヤ抗原成分の化学的精製

広島県立広島病院内科

城 智彦 菊地 博通 浜口 美博
折田 良造 河本 寛次

広島大学工学部醸酵工学科

岡 智 兼久 秀典

広島県佐伯郡廿日市町

勝 谷 隆

広島市己斐町

大 塚 正

米子工業高等専門学校

佐藤 静一

(受付: 6月20日, 1970)

はじめに

ホヤ喘息の診断用抗原液としては, Dextrose-Phenol 法によるホヤ抗原液 (1,000倍液), 治療用としては Hollister-Stier 法による抗原液 (100倍液および10倍液) が現在市販されて実用に供されているが, これらの抗原液にふくまれるホヤの抗原成分は化学的に精製されたものではないため, 抗原液の定量的な調製は困難で, その力価は製造番号の異なるたびに大きく変動する悩みがあった。したがって, ある場合には, 抗原液の力価が強すぎて非特異的な皮内反応陽性者がみられたり, 時には皮内反応の検査によつても喘息発作が誘発されることがあるなどの問題があった。

その後, 大阪大学の山村教授, 八倉博士の御好意により, Tuberculin Active Peptide 法¹⁾に準じて調製されたホヤ抗原液がつくられたが, このものは Dextrose-Phenol 法および Hollister-Stier 法抗原液に比較するとかなり精製された抗原液であり, ホヤ喘息患者において, 皮内反応は0.05 mg/ml の濃度のもので特異的に陽性反応を示した²⁾。また, この抗原液では, ホヤ喘息患者血清による Prausnitz-Küstner 反応も陽性で, 減感作療法に使用して著効を奏することが認められたが, Dextrose-Phenol 法抗原液と異なり, 高濃度のもを用いて検査しても, 結膜反応は陰性であった²⁾。

この事実は, ホヤの抗原成分が必ずしも単一ではな

く, 少なくとも皮内反応陽性成分と結膜反応陽性成分の2成分を含んでいる可能性を示すものと思われ, 皮内反応陽性成分を含み, 結膜反応陽性成分を含まない抗原液を用いて, 減感作療法に著効をおさめたことは, 減感作療法のメカニズムを解明する一つの手がかりを与えるものと考えられる。

私どもは, 以上の考慮にもとづいて, まず皮内反応活性成分を精製することを目的として, ホヤより塩析, 除蛋白, ゲル濾過などの操作により, 皮内反応の閾値が0.06 µg/ml 以下という高度に活性な標品をうることができたので, その大要を報告する。

材料と方法

材料: 養殖カキや真珠に付着するホヤには, シロボヤ, エボヤ, ユウレイボヤ, イタボヤ, マホヤおよびネンエキボヤなどがあるが³⁾, これらのうち, 付着する頻度も大きく, 採集にも容易な, シロボヤを材料として選んだ。

抗原活性の測定: ホヤの抗原活性の測定法としては, ホヤ喘息患者を対象として, 検出感度ならびに再現性が高く, 手技も簡単な皮内反応を選んだ。皮内反応に使用するサンプルは, 食塩1%, フェノール0.5%を含むように調製し, その0.02 ml を前腕, 屈側, 皮内に注射し

て、15分後に判定し、生じた紅斑径が9mm以下を(－), 10～19mmを(±), 20～29mmを(+), 30～39mmを(++)、40mm以上を(+++)とした。また、活性を量的に表示する必要がある場合には、サンプルを1%食塩水で希釈し、閾値すなわち反応が(+)から(±)にかわるときの希釈倍数を求めた。

ゲル濾過クロマトグラフィー: Sephadex G-50, G-75, G-200, Sepharose 4B, 6Bのカラムは、すべて1%食塩水で平衡したのち、1%食塩水を用いて溶出を行ない、各分画の容量は2.5mlとした。

糖類の定量: フェノール硫酸法⁴⁾を用いて糖類の定量を行なった。

除蛋白: 飽和硫安による塩析およびアセトンによる脱脂後、透析によつて塩類を除き、この透析液より次の各方法により除蛋白を行なった。

透析液50mlにクロロホルム25mlと、消泡剤としてイソアミルアルコール1mlを加え、激しく振とうする。これを遠心分離すると、水、蛋白ゲル、クロロホルムの3層に分離するが、水層のみを分離し、再びクロロホルムを加えて同じ処理をくりかえし、蛋白ゲルが膜をつくらなくなるまで、くりかえし行なった⁵⁾。

水飽和フェノールによる除蛋白は⁶⁾⁷⁾、クロロホルムの場合に準じて行なった。

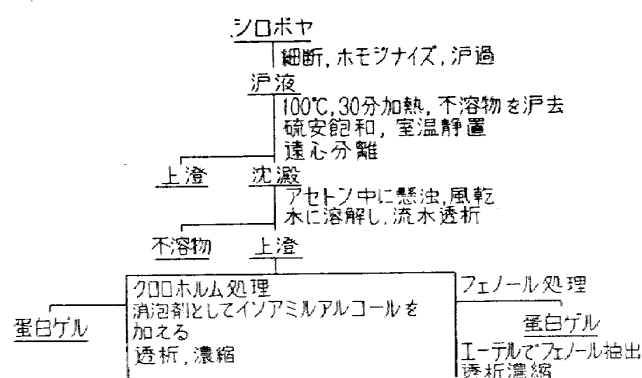


図1. クロロホルムおよびフェノールによる除蛋白。

塩基性醋酸鉛による除蛋白⁷⁾は、透析液50mlに塩基性醋酸鉛飽和液6mlを加え、生じる沈澱を濾去、濾液に醋酸鉛液を滴下しても沈澱のできないことを確認のち、硫化水素を通じて、過剰の鉛を沈澱させて濾去した。

硫酸カドミウムによる除蛋白⁷⁾は次のごとくおこなった。26.2gの硫酸カドミウムとN-硫酸132mlを加えて水で1lとした酸性硫酸カドミウム50mlを、上記塩

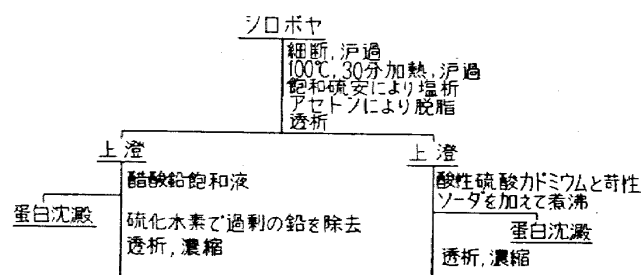


図2. 醋酸鉛および硫酸カドミウムによる除蛋白。

析後の透析液50mlに加え、0.55Nの水酸化ナトリウム液25mlを加えて、5分間煮沸した。ついで生じる沈澱を濾去し、濾液を透析したのち濃縮した。

成績

Dextrose-Phenol 法によりつくられたエボヤ抗原液を、Sephadex G-50 および G-75 を用いて分画した成績を図3に示した。はじめ、抗原活性を示す成分が蛋白系の物質であることを疑つたため、紫外線 280mμ の吸光度を検査した。Sephadex G-50 による分画においては、皮内反応の活性は void volume の位置に溶出し、Sephadex G-75 の場合にも、活性は主として void volume の位置に溶出したが、分画番号20附近にも若干の活性が認められた。なお、この活性は 100°C, 30分間の加熱によつては、影響をうけなかつた。

Dextrose-Phenol 法によるホヤ抗原液に含まれる活性成分の量はきわめて微量であり、今後の研究のための充分量の採集が困難と思われたため、以後はホヤより直接、抗原成分を分離、精製することとした。

図4に示したごとく、シロボヤを約1cm幅に細断し、

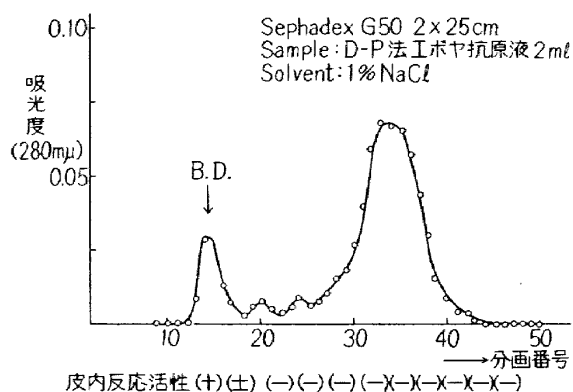


図3上. エボヤ抗原液の Sephadex G-50 による分画。

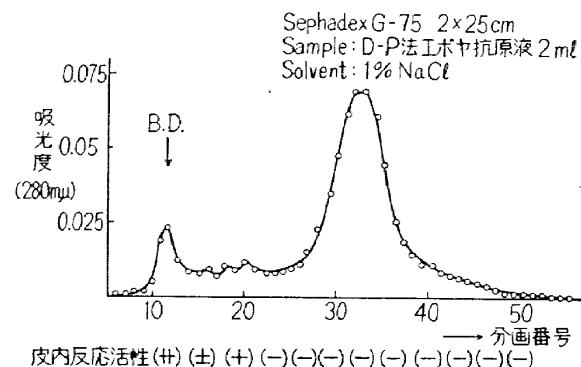
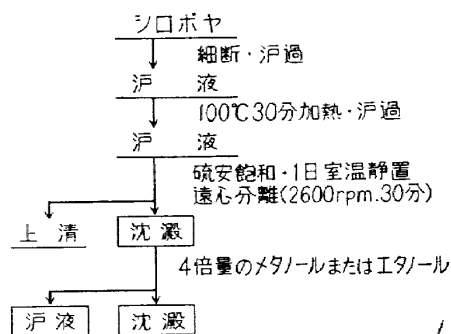


図3下. エホヤ抗原液の Sephadex G-75 による分画.



(□) は皮内反応活性のあることを示す

図4. ホヤ抗原物質の精製(1).

濾過したのち、濾液を 100℃, 30分間加熱し、凝固する成分を濾過によつて除き、さらに、濾液に飽和硫酸を加えて1昼夜室温に静置したのち、上清と沈澱を分離した。皮内反応の活性は沈澱の部分に認められ、上清にはみられなかつた。ついで、活性を含んでいる沈澱を蒸留水に溶解したのち、メタノールまたはエタノールを加え、沈澱と濾液をわけたが、皮内反応の活性は沈澱にも濾液にも存在し、アルコールによる沈澱によつては、活性成分の分離は充分でなかつた。

除蛋白の方法と皮内反応活性の関係を図5に示した。飽和硫酸による塩析の後、アセトンにより脱脂し、透析を行なつて塩類などを除いたのち、前述したごとく、クロロホルム、フェノール、醋酸鉛および硫酸カドミウムによる除蛋白を行なつた。除蛋白後、それぞれ5例のホヤ喘息患者において皮内反応活性を検査すると、クロロホルムで除蛋白したのものにおいて、もつとも強い活性を認めたため、以後の精製にはクロロホルムによる方法を選んだ。

以上の結果にもとづき、3kgのシロボヤをあらたに採

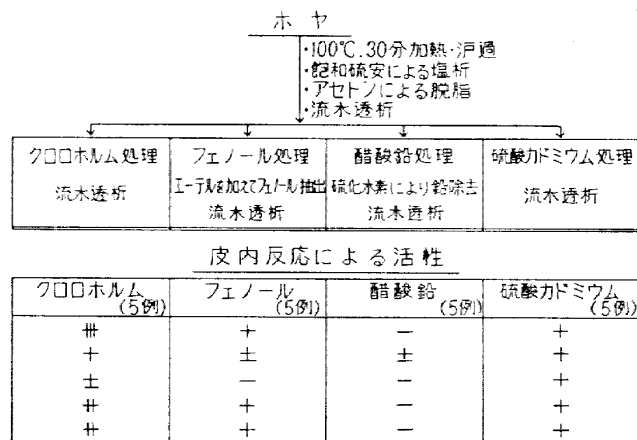


図5. 除蛋白と皮内反応活性.

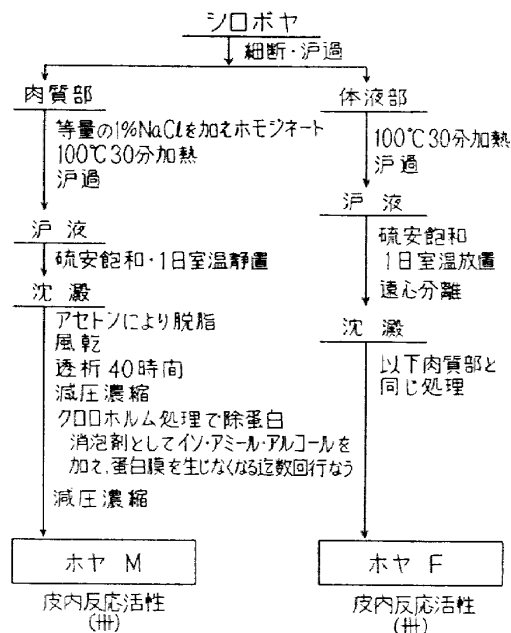


図6. ホヤ抗原物質の精製(2).

集し、これを細断、濾過して肉質部と体液部にわけ、肉質部はこれをホモジナイズしたのち、それぞれについて加熱、濾過、硫酸塩析、アセトン脱脂、透析およびクロロホルムによる除蛋白を行なつた。肉質部よりえられた活性成分をホヤM、体液部よりえられた成分をホヤFとすると、これらは、いずれも強い皮内反応活性を示すことが認められた。

ホヤMおよびホヤFにおいて、紫外線吸収スペクトルをしらべると、図7に示すごとくであつた。すなわち、ホヤM、ホヤFともに、波長がほぼ 260mμ のところに吸収のピークが認められ、このことから、一応、ホヤMおよびホヤFは、核酸系の成分を含んでいることが推定

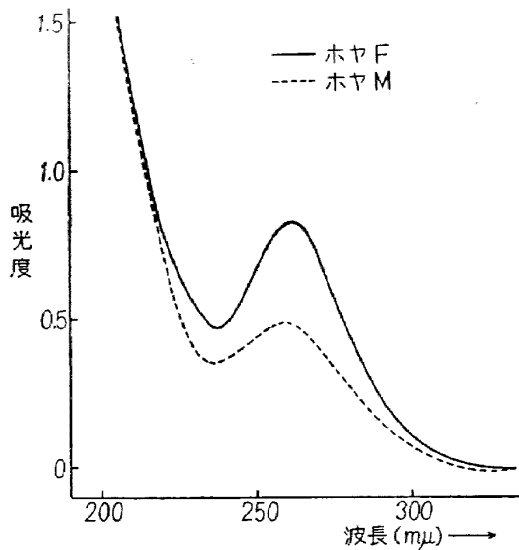


図7. ホヤFとホヤMの紫外線吸収スペクトル。

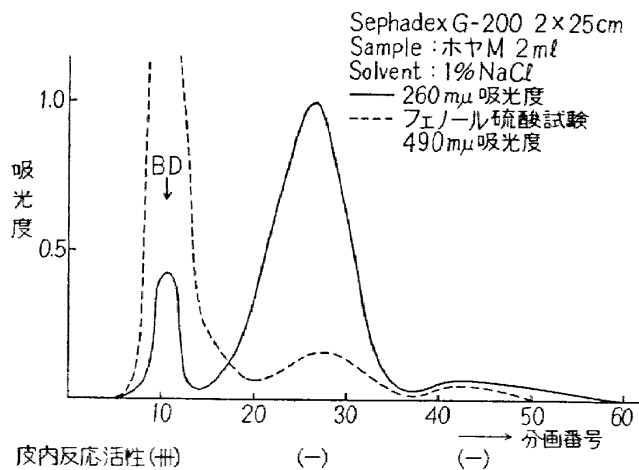


図8. ホヤMの Sephadex G-200による分画。

された。

次に、ホヤMおよびホヤFよりさらに不活性英雑物を除去する目的で、分子篩による分画を試みた。図8はホヤMを Sephadex G-200 により分画した成績を示した。各分画について、核酸系の成分を検出する目的で紫外線 260mμ による吸光度と、糖質を検出する目的でフェノール硫酸試験を行ない、490mμ による吸光度を検査した。

260mμ、490mμともに、それぞれ3つのピークを示したが、皮内反応の活性は void volume に相当する最初の山にのみ認められた。したがって、ホヤMまたはホヤFを Sephadex G-200で分画し、その void volume に溶出する分画だけをあつめれば、比較的低分子の不活性英雑物を除去することが可能である。

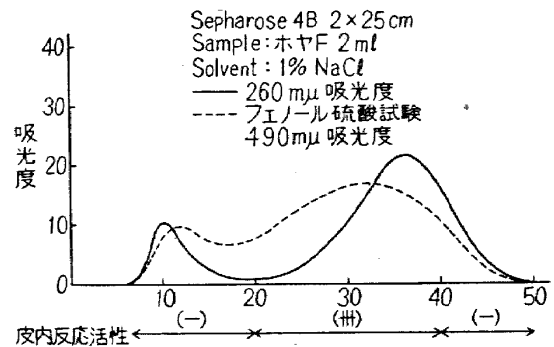


図9上. ホヤFの Sepharose 4B による分画。

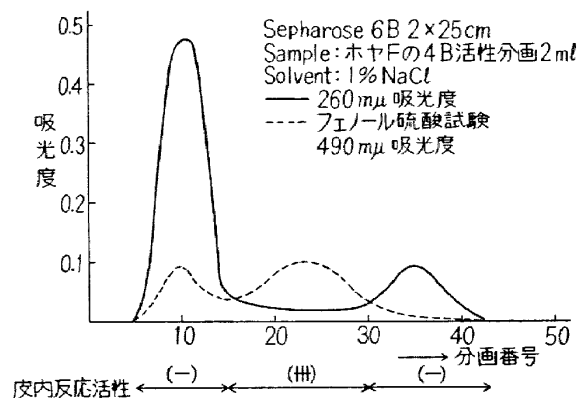


図9下. Sepharose 4B 活性分画の Sepharose 6B による分画。

ホヤFを Sepharose 4B および6Bにより分画し、Sephadex G-200の場合と同様、260mμ および 490mμ による吸光度を検査したものを図9に示した。

Sepharose 4B による分画では、260mμ、490mμとも、それぞれ2つのピークが認められたが、ホヤ喘息患者における皮内反応の活性は、分画番号20から40のピークに認められた。したがって、Sepharose 4B による分画を行ない、void volume の部分をすてると、巨大分子の不活性英雑物を除去することができる。

Sepharose 4B により皮内反応が活性を示す分画をあつめ、これをさらに Sepharose 6B にかけて分画すると、図に示したごとく、皮内反応の活性は、中間部分である分画番号15ないし30の部分に認められた。この部分では 260mμ の吸収はほとんど除去されており、糖反応のピークの1つと一致していた。

以上の成績を要約したものを図10に示した。私どもは、ホヤより加熱、濾過、硫酸による塩析、アセトンによる脱脂、脱水、透析およびクロロホルムによる除蛋白を行なつて、ホヤの抗原活性をほとんど失うことなく、蛋白、糖質、塩類など、固形成分の大部分を除去した。

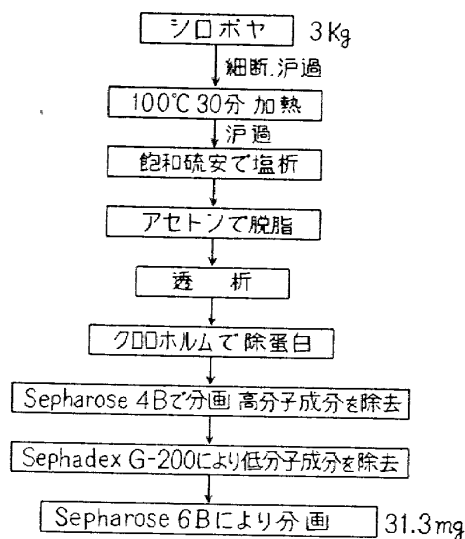


図10. ホヤ抗原物質の精製 (3).

- 淡褐色ゼラチン状の外見をもつ固形物
- 分子量は10万前後と推定される
- 蛋白質・核酸・多糖類あるいはこれらの複合体であることが推定される
- 活性

(1) 皮内反応閾値	(2) 結膜反応
10×10 ⁴ : 2名	12名に実施して全例陰性
100×10 ⁴ : 1名	(D-P法シロボヤ抗原液では4名陽性)
200×10 ⁴ : 6名	
400×10 ⁴ : 3名	(3) 吸入試験
800×10 ⁴ : 4名	1名に行ない陰性
1600×10 ⁴ : 2名	(4) P-K反応
	2名に行ない2名陽性

図11. ホヤ精製抗原の性質。

さらに、この半精製抗原液を Sepharose 4B による分子篩にかけて、巨大分子の不活性英雑物を除去し、ついで Sephadex G-200 により分画して、比較的低分子の英雑物を除去した。紫外線 260 mμ の吸収は Sepharose 4B 処理で半減し、Sephadex G-200 処理で大部分除去された。この活性分画を、さらに Sepharose 6B により分画して、残存する高分子および低分子の英雑物を除去し、えられた活性分画を透析後に減圧乾固すると、ホヤの抗原成分は固形物として、シロボヤ 3 kg より 31.3 mg がえられた。

以上の方法によりえられたホヤ精製抗原は、淡褐色、ゼラチン状の固形物で、水に容易に溶け、その分子量はゲル濾過クロマトの挙動よりみて、約10万と推定される。

精製処理による抗原活性の損失はわずかで、従来つくられたいずれの抗原液よりも皮内反応の活性は高く、皮内反応の閾値は、症例によつては 1,600 万倍以上 (0.06

μg/ml 以下の濃度) であつた。症例数はなお充分ではないが、Prausnitz-Küstner 反応は2例に実施して2例とも陽性、結膜反応は12例全例が陰性であつた。

この物質の化学的成分については目下検索中であり、詳細は次の機会に報告するが、精製過程における諸成績よりみて、蛋白質、核酸または多糖体誘導体あるいはこれらの複合体である可能性はいずれも依然として残されているものと考えられる。

考 案

減感作療法の効果を高めるためには、特異性の高い治療が行なわなければならないが⁸⁾、一般の気管支喘息においては、発症原因が複雑で、真に特異的な減感作療法を行なうことは困難であり、家屋塵抗原液などの混合抗原による特異性のひくい治療が行なわれているにすぎない。

私どもは、ホヤ喘息患者において、皮内反応を指標としてホヤの抗原成分の化学的精製を試み、従来えられたどの抗原液よりも活性の高い1つの抗原成分を精製したが、このものでは、Tuberculin Active Peptide 法抗原液の場合と同様²⁾、ホヤ喘息患者における皮内反応は陽性、結膜反応は陰性で、患者血清による Prausnitz-Küstner 反応は陽性であつた。すなわち、ホヤ喘息を診断するための皮内反応において、Dextrose-Phenol 法抗原液では 1,000 倍液、Tuberculin Active Peptide 法抗原液では 5 万倍液が使用されるのに対し²⁾、今回えられた抗原液では 10 万～100 万倍のもので充分であり、しかも 1 万倍程度の高濃度のものを使用した場合にも、非特異的な陽性反応を示すものはほとんどみられなかつた。一方、結膜反応においては、Dextrose-Phenol 法抗原液では 10 倍液を使用して陽性であつたのに反し、Tuberculin Active Peptide 法抗原液では 500～5,000 倍液で陰性²⁾、今回の抗原液でも、1 万倍のものをを用いて陰性であつた。

このように、皮内反応と結膜反応の成績の間に解離のみられたことは興味ある点であつて、アレルギー性喘息の抗原診断にあたつては、使用される抗原液の製法の相異により、検査方法を考慮する必要があることを強調したい。

結膜反応と吸入誘発試験の間には相関があるとの報告もみられるので^{9), 10), 11)}、このたびえられた抗原液におい

でも、吸入誘発試験が陰性であることも考えられないではない。今回の抗原液による減感作療法の効果については、目下検討中で結論がえられていないが、ホヤ喘息患者において、同じような反応態度を示した Tuberculin Active Peptide 法抗原液が著効を奏したことから、同様に有効であることが期待される。皮内反応だけが陽性を示し、結膜反応も、吸入誘発試験も陰性で、減感作療法に使用可能な抗原液がつくられ、その化学的本態が明らかにされるならば、減感作療法施行時に発作の誘発を恐れる心配がなくなるという治療上の大きな利点があるだけでなく、アレルギー性喘息の発生機序や減感作療法の機転を、分子レベルで解明する手がかりがえられるものと思われる。

気管支喘息の原因抗原に関する化学的解析は、2, 3の職業性喘息においてわずかではあるが手がけられており、コンニャク喘息およびまぶし喘息では蛋白またはその複合体¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾、絹喘息では絹糸の外層を形成する蛋白質である sericin が抗原成分としてあげられている¹⁵⁾。このたびの私どもの抗原活性成分の化学的本態や結膜反応陽性成分との異同などについては、目下研究継続中であるので、次の機会により明らかにして報告する。

むすび

ホヤ喘息患者において、皮内反応を指標として、ホヤの抗原活性成分を化学的に精製した。

ホヤより加熱、濾過、硫酸塩析、アセトン脱脂、透析、クロロホルムによる除蛋白およびゲル濾過クロマトグラフィなどの操作により、従来つくられたいずれの抗原液よりも安定、強力、均質で、精製された抗原活性成分を分離することができた。

このものの収量は、シロバヤ 3 kg より約 30 mg で、淡褐色、ゼラチン様の外観を呈し、水によくとけ、分子量は約 10 万と推定された。この成分の化学的実体については、引きつづき検討中である。

ホヤ喘息患者における本抗原成分による皮内反応閾値は、症例によつては 1,600 万倍以上 (0.06 μg/ml 以下の濃度) で、Prausnitz-Küstner 反応は陽性、結膜反応は陰性であつた。

(本論文の要旨は第 67 回日本内科学会総会において発表した。)

文 献

- 1) 八倉隆保：皮内反応抗原の精製と、その臨床的応用、特にブタクサ花粉皮内反応抗原と、肺吸虫症診療用皮内反応抗原について。大阪大学医学雑誌 16, 191, 1964.
- 2) 城 智彦, 折田良造, 浜口美博, 勝谷隆, 大塚正：ホヤ喘息に関する研究, 第 9 報, Dextrose-phenol 法および Tuberculin Active Peptide 法により作製したホヤ抗原液の使用成績。アレルギー 18, 871, 1969.
- 3) 瀬戸内海の生物相, 52, 向島臨海実験所, 大学印刷株式会社, 広島, 1963.
- 4) 安部章蔵, 酒井宏美：菓子類の糖質構成の研究, 第 1 法, フェノール硫酸法の再検討。日本食品工業学会誌 14, 20, 1967.
- 5) Sevag, M.G., Lackman, D.B. and Smolens, J.: The isolation of the components of streptococcal nucleoproteins in serologically active form. J. Biol. Chem. 124, 425, 1938.
- 6) Kirby, K.J.: A new method for the isolation of ribonucleic acids from mammalian tissues. Biochem. J. 64, 405, 1956.
- 7) Fujita, A. und Iwatake, D.: Bestimmung des echten Blutzucker ohne Hefe. Biochem. Z. 242, 43, 1931.
- 8) 城 智彦, 菊地博通, 浜口美博, 折田良造, 河本寛次, 勝谷 隆, 大塚正：減感作療法における使用抗原液の特異性と治療効果の関係について。アレルギー投稿中。
- 9) 宮本昭正：喘息患者に於ける皮膚反応, 眼反応, 並びに誘発試験の臨床的価値とその相関性。アレルギー 9, 968, 1960.
- 10) 村中正治, 北村芳太郎, 荒木英済, 牧野莊平, 広瀬俊一, 岡本重幸, 井上喜美雄, 吉田赳夫：気管支喘息におけるアレルギーに対する抗体検索試験の臨床的意義の検討。アレルギー 14, 343, 1965.
- 11) 金子由之助：こんにやく喘息の起因抗原に関する研究。アレルギー 15, 819, 1966.
- 12) 七条小次郎：気管支喘息。日本内科学会雑誌 57, 731, 1968.
- 13) 浦野 恭：まぶし喘息の起因抗原に関する研究。アレルギー 15, 881, 1966.
- 14) 佐藤祐司, 小林節雄, 七条小次郎：まぶし喘息に関する研究。第 1 報。まぶし喘息の臨床的知見補遺。アレルギー 17, 610, 1968.
- 15) 松村竜雄, 館野幸司, 藤井 均, 由上修三, 木村利定, 戸所正雄, 仁平敬子：小児気管支喘息のアレルギー診断と特異療法に関する研究, II, 絹による吸入性喘息。アレルギー 18, 912, 1969.

Chemical Purification of Allergenic Substance in Sea-squirt Asthma

Toshihiko Jyo, Hiromichi Kikuchi, Yoshihiro Hamaguchi, Ryoza Orita and

Kanji Komoto

Internal Medicine, Hiroshima Prefectural Hiroshima Hospital

Satoru Oka and Hidenori Kanehisa

Department of Fermentation Technology, Faculty of Engineering, Hiroshima University

Takashi Katsutani

Hatsukaichi-machi, Saeki-gun, Hiroshima-ken

Tadashi Otsuka

Koi-machi, Hiroshima-shi

Seiichi Sato

Yonago Technical College

As the first step for investigating mechanism of the sensitization and the hyposensitization therapy in sea-squirt asthma, the allergenically active substance in skin test was extracted from sea-squirt body and highly purified.

The aqueous extract from sea-squirt body was heated at 100°C for 30 min. to remove a majority of proteinous impurities, and then salted out by saturation with ammonium sulfate. After dialyzing the precipitate, the non-difusible portion was treated with chloroform repeatedly to remove remaining proteinous impurities. The aqueous solution thus subpurified was subjected to farther purification by the gel-filtration chromatography. After impurities having very high molecular weight was removed as the fraction excluded from Sepharoe 4B column, the most allergenic activity was recovered as the fraction excluded from Sephadex G-200 column. The active fraction was again chromatographed on Sepharose 6B column to remove the remaining higher and lower molecular weight impurities. The fraction having intermediate molecular weight (about 10^5) was dialyzed and evaporated in vacuo, and 31 mg of a gelatin-like amorphous solid was yielded from 3 kg of sea-squirt body.

This preparation showed positive reaction at the concentration as low as 0.06 µg/ml in skin test for the patients, but no activity for conjunctival test.

Study on Mixed Culture of Lymphocytes by a New Fixed Staining Method (Particularly on Immaturity Tendency of the Cells in the Lymphnodes and the Thymus)

Minao Hayashi

Dept. of Microbiology and Immunology, Nippon Medical School

(Chief: Prof. Yoshitami Kimura)

Dept. of 2nd Surgery, Nippon Medical School

(Chief: Prof. Kiyoshi Saito)

The Ordinarily employed method in which the immaturity ratio of lymphocytes in mixed culture is judged based on the size of the cells is sometimes unsatisfactory in its reproducibility. The author thought that one of the reasons would be swelling of cells in fixed staining, and proposed a method in which cells were transferred to be subjected to fixed staining in a wet state, without drying them. According to the said method, the number of the immature cells can be successfully counted more accurately: it may be