

第5回 アレルゲン研究会

(受付: 1月12日, 1964)

研究報告並に討議録

日 時 昭和38年10月24日
場 所 於 神 戸 市

研究報告

- | | |
|---|----------|
| 1. アレルゲン・エキスの精製の問題 | 阪大山村内科 |
| 2. アレルゲン・エキスの精製の問題—眼反応の有用性について | 群大第一内科 |
| 3. 室内塵エキスの精製について | 昭和医大第一内科 |
| 4. アレルゲン・エキスの製造方法に関する素朴な疑問
—牛乳アレルゲン・エキスを例として | 千葉大小児科 |
| 5. こんにやく喘息及びまぶし喘息に関する皮内反応成績について | 群大第一内科 |
| 6. アレルギー疾患の皮膚反応成績 | 同愛記念病院 |
| 7. 気管支喘息患児の各種アレルゲンエキスの皮内反応成績 | 広島大小児科 |
| 8. 気管支喘息における皮内反応および減感作療法について2, 3の考察 | 岩手医大光井内科 |
| 9. 喘息発作の強さとアレルゲン皮内反応との関係 | 大阪市小児科 |
| 10. 室内塵エキスの抗原型について | 北大第二内科 |
| 11. 血管運動性鼻炎におけるアレルゲン・テストの検討 | 千葉大耳鼻科 |
| 12. 皮内反応と沈降反応 | 徳島大耳鼻科 |
| 13. 心理的脱感作療法について | 九大心療内科 |
| 14. 日光性皮膚炎について | 九大心療内科 |
| 15. かきの打ち子喘息に関する研究 | 広島県病内科ほか |
| 16. ブタクサ花粉の膜構造 | 大阪市大理学部 |

1. アレルゲン・エキスの精製の問題

大阪大学 山村内科

山村 雄一 熊谷 朗 八倉 隆保

従来から実地に使用されているアレルゲン・エキスの抽出液は、主として Coca の抽出液か、D-P 液 によつて抽出されたものであるが、これらのエキスには必ずしもアレルゲンとしての理想的な性格をそなえているとはいえないことが多い。私共は出来るだけ低分子で、感染原性が少なく、非特異反応の少ない皮内反応用抗原の抽出精製を目的に研究を進めて来たが、従来の中性ないし、弱アルカリ抽出法に対し、材料をまず 0.1 N-HCl にて抽出

し、次いで皮内反応活性因子を Picrate として沈澱させ、更に溶解後アセトン沈澱、透析という操作により各種の皮内反応用抗原を抽出精製し得ることを確認し、更に本法によつて得られた活性因子がほぼ理想的な皮内反応用抗原として十分役立ち得ることを確認している。尚、本法は蛋白性ないし、ペプチッド性の皮内反応用抗原の抽出精製に広く応用しうる方法として推奨し得るものと考えている。

〔I〕ツベリクリン反応活性因子の抽出精製

私共の本抽出法はもともと結核菌菌体よりのツ反応活性因子の抽出精製に起源しているものであつて、本法によつて得られたツ反応活性因子を Tuberculin Active Peptide (TAP) と呼んでいる¹⁾²⁾。その方法は〔図1〕の如くであり、TAPの性状は、total N: 14.7%, 糖反応(―), 水溶性である。

このTAPのツ反応活性は0.25 μ g で 2,000倍旧ツベリクリン反応液 0.1 ml とほぼ等力価であり、現在最も

図1 Tuberculin Active Peptide (TAP) 抽出精製法

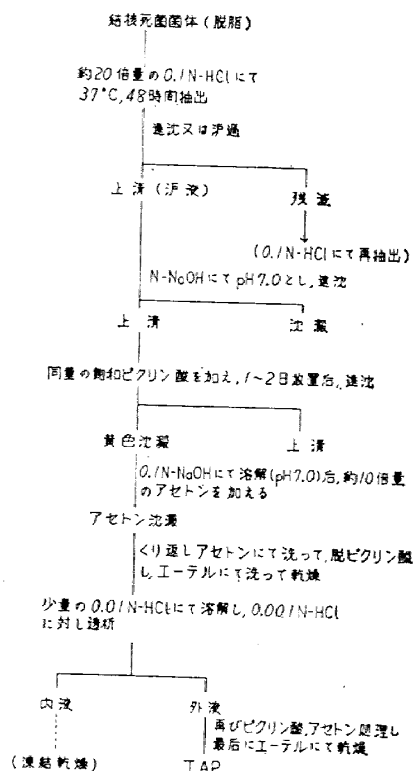
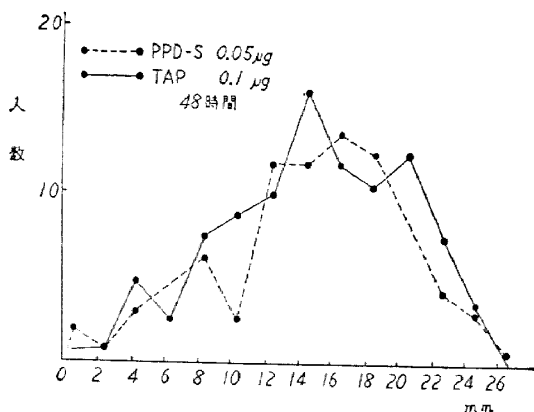


図2 TAPの力価



ツ反応活性の強いとされている PPD-S (Seibert 女史が結核菌培養濾液より抽出したもの³⁾) と比較すると〔図2〕の如く、PPD-S 0.05 μ g とTAPの 0.1 μ g はほぼ等しいことがわかつた。次に、TAPの感作原性を調

図3 TAP免疫モルモットにおける皮内反応 (TAP 1mg, adjuvant 筋注, 10匹)

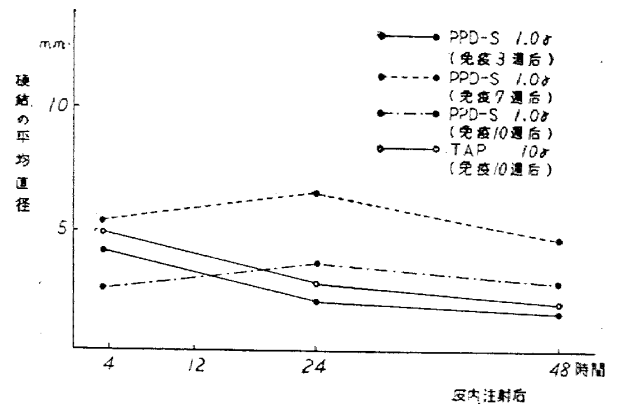


図4 TAP免疫モルモットにおける皮内反応 (TAP 5mg, adjuvant 筋注, 10匹)

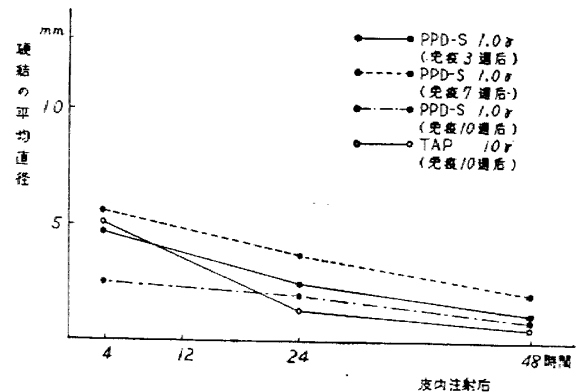


図5 PPD-S免疫モルモットにおける皮内反応 (PPD-S 1mg, adjuvant, 筋注, 10匹)

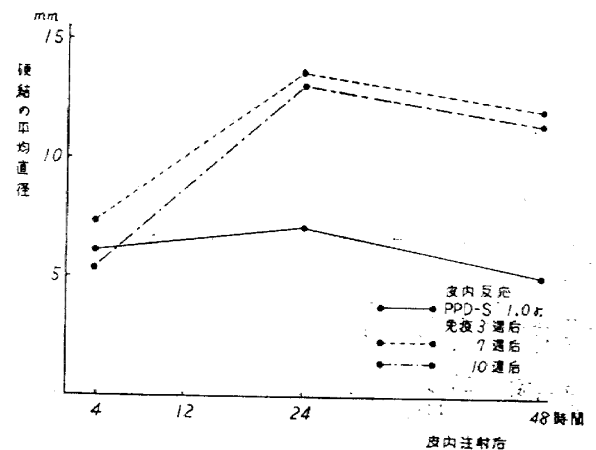
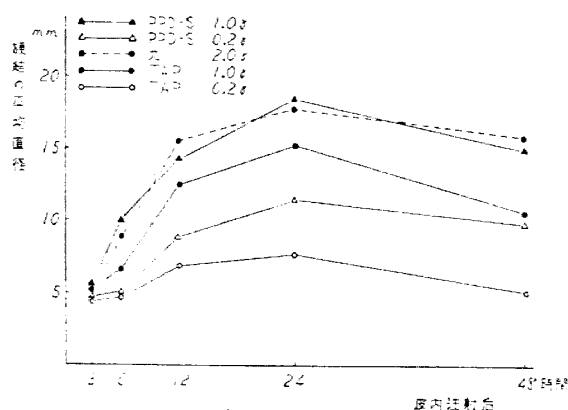


図6 感染モルモット（人型菌）における皮内反応
各群. 10匹. 結核菌 8.7×10^4 (0.5ml) 腹
腔注射10週目に皮内テスト



べた実験の一部を紹介すると⁴⁾, TAP 1 mgないし, 5 mgを Freund's complete adjuvant の形にしてモルモットに免疫し, 日を迫つて TAP, PPD-S をもつて皮内反応を行なつた実験では, ツ反応の陽転は認められなかつた実験では, ツ反応の陽転は認められなかつたが, これに反し, PPD-S 1 mgを同様に免疫した場合にはツ反応の陽転が容易に惹起されることがわかつた. [図3, 4, 5] もちろん, TAPの人型結核菌感染モルモットにおけるツ反応活性は[図6]に示す如く, はつきりと存在している. 以上のことから, TAPは低分子であるため感作原性が少なく, 活性の強さや, 他の抗酸性菌との間の交叉反応の殆んどないことなどの秀れた特性と相まって, 当然旧ツベルクリン液にとつてかわつて臨床的に使用されてしかるべきものと考えている.

〔II〕肺吸虫症の診断用皮内反応抗原の抽出精製

上記の方法を殆んどそのまま肝吸虫症診断液の抽出に使用した. 本法によつて得られた皮内反応活性因子を Paragonimus Active Protein or Peptide (PAP) と呼んでおり, その性状は(表1)の如くである.

この場合には, 透析内液凍結乾燥粉末(PAP内液)と透析外液より得た画分(PAP外液)との両方を用い

表1 PAPの性状

材料: 虫体アセトン粉末 0.6g	収 量	N 量			可溶性
		Total N	Protein N	Protein N/Total N	
内液凍結乾燥粉末	88.2mg (14.7%)	11.4%	6.6%	57.8%	水によく溶ける
外液沈澱粉末	18.2mg (3.03%)	12.9%			弱アルカリにて溶ける

表2 皮内反応の方法と判定規準

方法: 前膊屈側の上 $\frac{1}{3}$ の部位に皮内注射し, 直後と15分後の発赤, 膨疹の縦横径を測定し, その平均値を記録

判定規準

種類	注 射 量	判 定 規 準
VBS抗原	直径4mm程度に皮内注射 (約0.03ml)	腫脹差=15分後膨疹径-直後膨疹径 ≤ 3 mm.....(一) $3 < 5$(±) $5 \leq$(+)
PAP	0.05 ml 皮内注射 (μ g) (径: 約6mm)	15分後膨疹 ≤ 9 mm.....(一) $9 < 11.5$(±) $11.5 \leq$(+)

上記判定規準より得た陽性頻度 (被検者総数 3,201名)

種 類	(+)	(±)	(一)
VBS抗原	278 (8.7%)	188 (5.9%)	2,735 (35.4%)
PAP (内液)	78* (2.4%)	59 (1.8%)	3,064 (95.8%)

* うちVBS (±を示したものの1名, (一)を示したものの3名.

て皮内反応活性を比較検討した.

対象には愛媛県の肺吸虫症多発地域を選び, 皮内反応とともに虫卵検査, 胸部レ線検査を行なつて患者の確認につとめた. その皮内反応実施の要領は(表2)の如くであり, PAPとともに同時に予研から出されているVBS抗原(肺吸虫虫体より Veronal buffered saline にて抽出された皮内反応エキスを)を用いて比較検討した.

その結果,

図7 肺ジストマ症患者群 (既往者, 現患者) における反応分布図

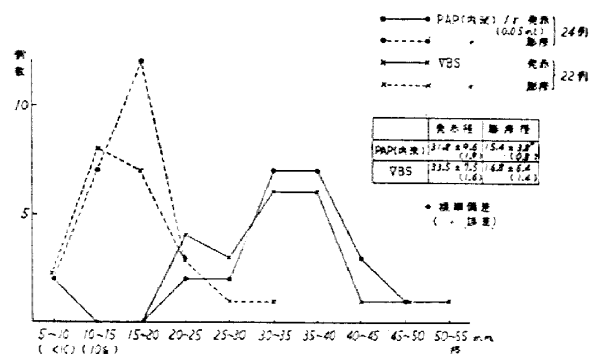


図8 PAPの透析内液と外液の活性相関 (患者群13例)

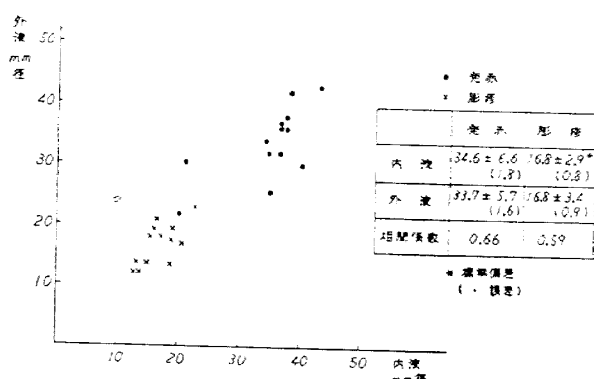


表3 PAP反応液の量的関係 (PAP (内) 1 γにて反応陽性の例について)

氏名	VBS	PAP (内) 1 μg	PAP (0.1 μg)		患者確認の有無
			(内)	(外)	
K. Y	32.5 (11)	30 (12.5)	9 (9)		現患者
N. K	30.5 (14.5)	32.5 (18.5)	27 (12)		既往者
I. I	27 (11)	37.5 (13)	11 (7.5)		不明
K. S	32.5 (11)	28 (12)	5 (5)		"
K. S	32.5 (11.5)	35 (14)		6 (6)	"
K. N	27 (10)	27 (10)		5 (5)	"
K. M	27 (12)	32 (14)		7 (7)	"
K. S	22 (12)	21 (13.5)		10.5 (8.5)	"
Y. T	20 (8)	27 (16)		20 (10)	既往者
K. M	22.5 (8.5)	34 (14)		25.5 (10.5)	"
I. K	28 (15)	28 (11.5)		8 (8)	"
K. Y	32 (14)	31 (13)		37 (12)	"
K. S	22 (12)	21 (13.5)		10.5 (8.5)	"

発赤 (膨疹) mm.

1) VBS抗原に対しては本対象の8~9%が陽性を示したに対し, PAP (内液) では2~3%にすぎないこと, 及びPAP (内液) 陽性者は殆んどすべてがVBSでも陽性であること.

2) 患者群での活性の比較では, VBSがPAPよりも大きな反応を示すこと (図7).

3) PAPの内液画分と外液画分の活性はほぼ等しいこと (図8).

4) 特異的有效反応を得るためのPAPの皮内反応量としては1 μg が適当であること (表3).

5) PAPの皮内反応活性は耐熱性であること (表4).

6) PAP (内液) 陽性者の中にもPAP (外液) に

は陰性を示すものがあり, PAP (外液) 反応はより患者に特異的であること (表5, 6)

7) PAP反応はVBS反応とともに肺吸虫症治癒後にも陽性に出現すること.

8) PPT (PAP抽出法に少し Modification の入ったもの) には非特異反応の少ないこと (表7).

PAPには以上の様な特性があり, 肺吸虫症のスクリ

表4 PAPの熱処理による影響無処置PAP (内) に陽性の例について

氏名	無処置PAP (内)	加熱 (100°C, 30分)		患者確認の有無
		PAP (内)	PAP (外)	
I. M	20 (13)	11 (10)		既往者
K. I	23 (13)	28.5 (13.5)		不明
K. H	35 (17.5)	36.5 (17)		"
K. A	23.5 (13.5)	26 (8.5)		"
A. T	31 (13)	31 (10)		"
K. M	42.5 (16.5)		40.5 (13)	"
Y. T	27 (16)		27 (12.5)	既往者
K. M	34 (14)		29.5 (11)	"
I. K	28 (11.5)		17 (10)	"
K. Y	31 (13)		44 (14.5)	"
I. I	37.5 (13)		40.5 (14.5)	"

反応液は各々 (1 γ 0.05ml) 発赤 (膨疹) mm.

表5 PAPの内液と外液の比較

内液に (+) 又は (±) を示した51例について
外液にて再テスト患者数 (現患者+既往者)
: 51例中15例

	外液 (1 μg)		合計	51名	名	患者確認率 13/23 (56.5%)
	+	±				
内液 (1 μg)	21	7	23			
合計 51名	19	32	15	4	0	患者の見逃し 内液 (+) 1名→ (±) 1名→ 外液 (±) (1)
患者確認率 14/32 (43.8%)						

表6 患者確認率の比較

抗原	被検者数	陽性者数	うち患者数	確認率 (%)	見逃し数
VBS	3,201	278	22	7.9	2
PAP	内液	3,201	78	27.9	2
	外液	51	23	56.5	2

表7 肺吸虫皮内反応抗原の非特異反応

疾患	反 应 抗 原 人数	肺吸虫抗原						顎口虫 抗原			日本住 血吸虫 抗原		
		VBS			PPT								
		+	±	-	+	±	-						
顎口虫症	10	6	1	3	0	0	10	10	0	0			
日本住血 吸虫症	7	0	1	6	0	0	7				7	0	0
気管支喘息	6	3	3	0	0	0	6						
蕁 麻 疹	8	4	2	2	0	0	8						
肺吸虫症	24	23	0	1	23	0	1	0	1	23			

表8 RAPの諸性状

収 量	1.5g→16mg (1.1%)
Total N	10.7%
Protein N	7.2%
糖	7.0%
特異的有効反応量	2.0~0.2 µg
その他	水によく溶ける 活性は耐熱性

表9 RAPとブタクサ花粉 No. 70との比較(鳥居製)(正常人について)

抗原	一回注射 total N 量(µg)	例数	範囲 (mm)		発 赤 (mm)			膨 疹 (mm)		
			発赤	膨疹	M	S-D	S-E	M	S-D	S-E
ブタクサ花粉 No. 70	0.16	48	≤20	≤8	7.4	5.1	0.7	4.4	1.1	0.2
RAP	0.21	15	≤15	≤7	6.3	3.3	0.9	4.1	0.9	0.2

M: 平均値 S-D: 標準偏差 S-E: 標準誤差

表10 RAP及びブタクサ花粉 No. 70 の両者に陽性を示した喘息患者について

患者	ブタクサ花粉 No. 70		RAP	
	Total N (µg)	0.16	0.21	0.02
J. U	18 (14)	23 (17)	24 (15)	
T. H	20 (9)	24 (8)	20 (8)	
H. K	21 (10)	22 (9)	20 (9)	
Y. T	20 (10)	21 (10)	21 (8)	
K. M	22 (11)	23 (14)	22 (13)	

発赤(膨疹) mm.

ーニング・テスト用には極めて便利な皮内反応液であることがわかった。

〔III〕ブタクサ花粉皮内反応抗原の抽出精製

枯草熱やアレルギー性鼻炎, 気管支喘息などの原因因子となるブタクサ花粉のアレルゲンは花粉の蛋白画分に含まれていることが知られているが, この皮内反応活性因子をやはり上記の方法により抽出精製した。材料にはわが国にて産した Short ragweed pollen を用い本法によつて得られた皮内反応活性因子を Ragweed Active Protein or Peptide (RAP) と名づけた。RAPの諸性状は(表8)の如くであり, この場合には, 透析外液からの収量が悪いので, もつぱら内液凍結乾燥粉末を用いて研究を行なつた。即ち, RAPを生理的食塩水にて溶解して, その0.02 ml を前腕曲側に皮内注射し, 15分後に発赤径, 膨疹径の横縦径の平均値を測定した。

結果として,

1) 正常人では, RAP反応は発赤15mm, 膨疹7mm以上にとさるが, (表9)これ以上の反応を示した喘息患者についての活性の比較では, RAPの皮内反応活

表11 RAPとブタクサ花粉No. 70との比較(反応陽性喘息患者群について)

抗 原	一回注射 total N 量(µg)	例数	発赤 (mm)			膨疹 (mm)		
			M	S-D	S-E	M	S-D	S-E
ブタクサ花粉 No. 70	0.16	7	20.6	2.3	0.9	10.3	3.6	1.4
R A P	0.21	16	22.0	5.2	1.3	9.5	2.6	0.6

M: 平均値 S-D: 標準偏差 S-E: 標準誤差

表12 RAPの熱処理による影響(喘息患者について比較)

患者	処理	RAP { Total N = 10.7 µg/ml Protein N = 7.2 " } 0.02 ml 皮内注射	
		濾過膜通過	加熱 (100°C10分)
K. K		5 (5)	5 (5)
S. S		5 (5)	6 (5)
T. T		5 (5)	5 (5)
H. K		20 (8)	24 (8)
M. T		18 (7)	20 (7)
H. N		20 (8)	25 (8)
Y. T		12 (8)	25 (8)
R. Y		28 (12)	22 (7)
J. U		22 (16)	23 (17)

発赤(膨疹) mm.

表13 各種精製皮内反応抗原の性状

種 類	略 称	材 料 (g)	収 量 (mg) (%)	Total N (%)	Protein N (%)	特異的有效反応量 (μ g)
結 核 菌	T A P	100	300 (0.3)	14.7		0.25
肺 吸 虫	P A P (1)	0.6	88.2 (14.7)	11.4	6.6	1.0
	P A P (0)		18.2 (3.0)	12.9		1.0
(A)	R A P	1.5	16 (1.1)	10.7	7.2	2.0 ~ 0.2
ブタクサ	(B)	10	6.8 (0.07)	12.7		
花 粉	(C)	10	6.6 (0.07)	13.0		
赤 松 花 粉		20	11.9 (0.06)	12.0	8.2	
杉 花 粉		2.0	3.0 (0.2)			
ガマノホ花粉		2.0	20 (1.0)	11.7	9.7	
Aspergillus		10	10 (0.1)	16.0		8.4
Cryptococcus		10	3.0 (0.03)			
小 麦 粉		10	40 (0.4)	14.7	9.2	
ソ バ 粉				16.1		10.7
鶏 卵 (金)				12.6	8.6	
コンニャク		50	605 (1.2)	15.4		
マ ヒ コ				14.3		

性は Total N 量で比較すると、約 1/10 で No. 70 反応液 (鳥居薬品製, D-P 液抽出法) とほぼ等力価である (表 10, 11)。

2) R A P 反応液を無菌化する目的で、細菌濾過膜を通す一方、100°C、10 分間の加熱を行なったが、加熱しても皮内反応活性は影響されなかった (表 12)。

以上の如く、本法によつて抽出精製された皮内反応抗原は、比較的低分子で、感作原性の少ないこと、乾燥粉末として永らくの保存に便利なこと、粉末量ないし total N 量で活性量を表現出来ること、皮内反応活性は耐熱性であること、そして本法は比較的簡単な操作で比較的収量が良く、再現性に豊むことなど数々の長所を有していると言える。

そして本法は他の材料からの蛋白性ないし、ペプチッド性の各種の皮内反応抗原の抽出精製にも統一的に応用し得る方法と考えられ、我々には (表 13) の如き材料からも抽出に成功しているが、目下これらの活性などについて研究中である。

主用文献

- 1) S. Morisawa, A. Tanaka, K. Shojima and Y. Yamamura: Biochim. Biophys. Acta, 38 : 252, 1960.
- 2) Y. Okada, S. Morisawa, K. Shojima, S. Nakashima and Y. Yamamura: J. Biochem., Im Press, 1963.

- 3) F.B. Seibert and J.T. Glenn: Amer. Rev. Tuberc., 44 : 9, 1941.
- 4) S. Someya, O. Hayashi and Y. Yamamura: Amer. Rev. Resp. Dis., 86 : 542, 1962.
- 5) 石井洋一, 森沢成司: 福岡医学雑誌, 52 : 594, 1961.

追加 国立相模原病院アレルギー・センター 杉田和春

1. ブタクサの crude のものと R A P との比較は、N 量のみで比較できるとお考えでしょうか。

2. アレルゲン・エキスの精製により有効な成分が失われることはないでしょうか。

3. House Dust でも同じようにお考えでしょうか。

回答

1. 一応の基準として N 量はよいと考えていますが完全であるとは思っていません。

なお、現在 ragweed pollen の抗原性は現在文献的には蛋白性のものとなつています。

2. 失われることがあると思います。

3. House Dust はいろんなものがまざっているので手をつけません。

追加 九大小児科 合屋長英, 松田健一郎

山村教授の方法で、喘息患児の House-Dust の Acid-Peptide を抽出し、また別の方法で Polysaccharide も抽出した。それぞれ 0.2% を皮内反応抗原として用い、

皮 内 反 応 の 成 績

	Peptide	Coca 抽 出 処 理	Polysacch.	NaCl
K. K	$\frac{9 \times 9}{30 \times 30}$ (++)	○ $\frac{6 \times 6}{30 \times 30}$ (++)	$\frac{5 \times 5}{15 \times 13}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{15 \times 14}$
K. T	$\frac{6 \times 6}{35 \times 30}$ (++)	○ $\frac{9 \times 9}{35 \times 30}$ (++)	$\frac{5 \times 5}{8 \times 8}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{10 \times 10}$
T. Y	$\frac{6 \times 6}{25 \times 25}$ (+)	○ $\frac{11 \times 11}{34 \times 34}$ (++)	$\frac{6 \times 6}{30 \times 25}$ (+)	$\frac{5 \times 5}{10 \times 10}$
O. K	$\frac{6 \times 7}{25 \times 20}$ (+)	○ $\frac{7 \times 7}{30 \times 30}$ (++)	$\frac{7 \times 7}{10 \times 8}$ (—)	$\frac{7 \times 7}{9 \times 7}$
H. F	$\frac{6 \times 6}{12 \times 12}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{25 \times 25}$ (+)	$\frac{6 \times 6}{0}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{0}$
M. T	$\frac{8 \times 8}{10 \times 10}$ (—)	● $\frac{8 \times 8}{40 \times 35}$ (++)	$\frac{6 \times 6}{0}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{0}$
U. K	$\frac{6 \times 7}{20 \times 20}$ (+)	● $\frac{8 \times 8}{24 \times 22}$ (+)	$\frac{6 \times 6}{0}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{0}$
T. M	$\frac{5 \times 5}{14 \times 13}$ (—)	● $\frac{6 \times 6}{20 \times 20}$ (+)	$\frac{7 \times 7}{10 \times 8}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{9 \times 7}$
S. K	● $\frac{6 \times 6}{25 \times 22}$ (+)	● $\frac{7 \times 7}{28 \times 28}$ (+)	$\frac{6 \times 6}{0}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{0}$
T. K	$\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	○ $\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	$\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	$\frac{5 \times 5}{0}$
K. B	$\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	● $\frac{8 \times 8}{25 \times 25}$ (+)	$\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	$\frac{5 \times 5}{0}$
M. U	$\frac{6 \times 6}{0}$ (—)	● $\frac{6 \times 6}{20 \times 20}$ (+)	$\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{0}$
K. S	$\frac{6 \times 6}{10 \times 10}$ (—)	○ $\frac{8 \times 8}{30 \times 30}$ (++)	$\frac{6 \times 6}{6 \times 6}$ (—)	$\frac{6 \times 6}{10 \times 10}$
S. T	○ $\frac{6 \times 6}{0}$ (—)	○ $\frac{10 \times 10}{30 \times 25}$ (+)	$\frac{6 \times 6}{0}$ (—)	$\frac{5 \times 5}{0}$
M. T	○ $\frac{6 \times 6}{20 \times 20}$ (+)	○ $\frac{6 \times 6}{16 \times 19}$ (±)	$\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	$\frac{5 \times 5}{0}$
S. K	● $\frac{10 \times 10}{30 \times 30}$ (++)	● $\frac{10 \times 10}{35 \times 40}$ (++)	$\frac{6 \times 6}{10 \times 10}$ (—)	$\frac{0}{6 \times 6}$
K. Y	$\frac{8 \times 9}{20 \times 25}$ (+)	$\frac{6 \times 6}{25 \times 25}$ (+)	$\frac{5 \times 5}{0}$ (—)	$\frac{5 \times 5}{0}$
S. K	$\frac{6 \times 6}{20 \times 20}$ (+)	$\frac{6 \times 6}{20 \times 20}$ (+)	$\frac{5 \times 5}{8 \times 8}$ (—)	$\frac{0}{5 \times 5}$

● 誘発試験陽性 ○ 誘発試験陰性

Peptide 系の物質に作用が強いことを知った。

なお Acid-Peptide 1000倍液で誘発試験を行い、皮内

反応陽性者3例中2例が誘発され、皮内反応陰性者1名は誘発されなかった。