

いわゆるキノ抗原についての免疫学的な研究

東京大学医学部物療内科 (主任：堀内淑彦教授)

宮本昭正 齋藤恒子 水野勝之

(受付：10月19日，1971)

わが国では，現在市販されているキノ抗原に対して皮膚反応が陽性である者がかなり多く10% - 17%におよんでいる．しかも室内塵抽出液に対して強い皮膚反応を示しながら，それに含まれている重要な抗原と考えられるダニに対して陽性の反応を示さなかつた者は，キノの抗原抽出液に対して陽性を示す場合が多く，室内塵中にもキノ抗原が混在していることを示し，抗原としてのキノの重要性が推定されている¹⁾．キノ抗原の最も重要な病因的抗原としてはセルシンであると古くから指摘されていた．しかし本論文では市販されているキノ抗原を用いて2，3の検討を行なつたので，その結果を報告する．

切後バルベライザーで粉碎し，エーテルで脱脂したものに，アセトンを加えてミキサーで処理して粉末としたサナギを混じ，これに10倍容量のD P液を加えて48時間抽出し，遠心分離し，上澄液を48時間透析し，透析内液を

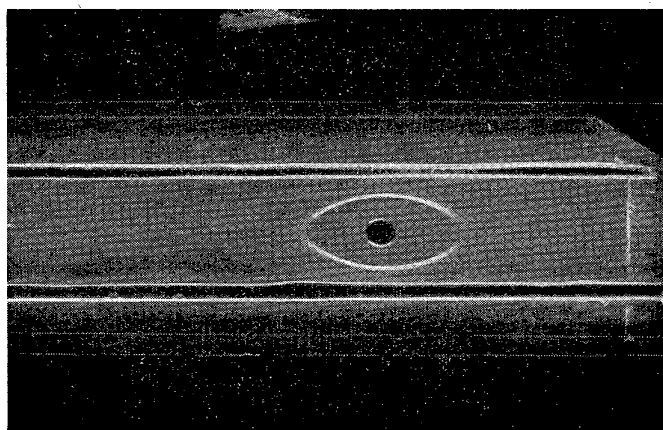


図1．キノ抽出液を用いての免疫電気泳動．中央の穴に抗原液，上下の溝にはウサギA，Bの抗血清を入れた．

材 料

抗原液：

現在市販されているいわゆるキノ抗原を用いた．この抽出液は，マユよりサナギを分離し，マユははさみで細

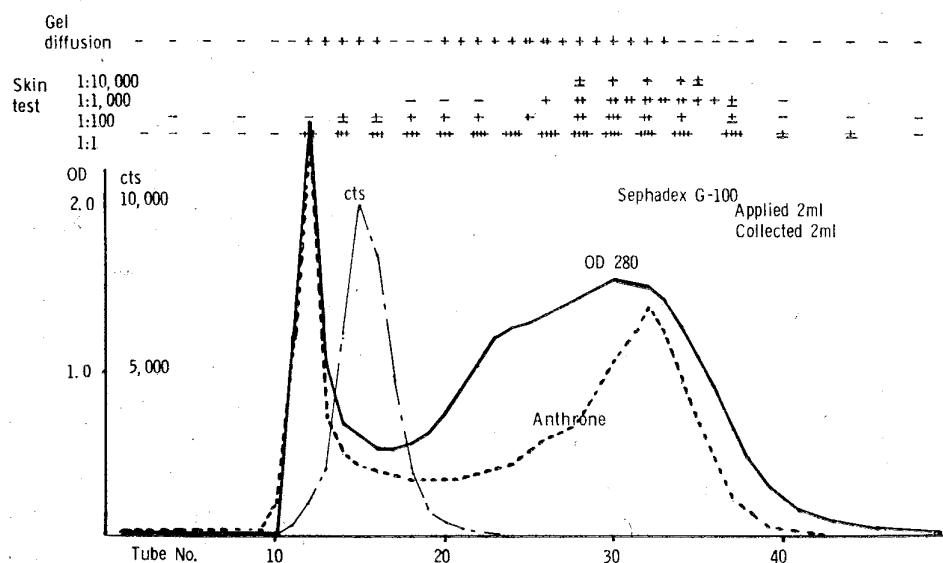


図2．Sephadex G-100によるキノ抗原液の filtration.

(註) Tube No. 13付近のものと25付近のものとは gel 内沈降反応で隔合しない．

凍結乾燥して得たものである。

抗体：

キヌ抗原液（1：10）と complete adjuvant を同量に混じたもの 3 ml を体重約 3 kg のウサギに毎週 1 回づつ筋注射し、明らかに沈降線が認められるようになったところを見計らって注射後 2 週目に全採血を行なった。そしてこの血清を抗血清としてその後の実験に使用した。この抗血清は図 1 と 6 に見られるようにゲル内沈降反応では 2 本、免疫電気泳動では多数の沈降線を認めた。

実験方法

Sephadex による filtration:

Phosphate buffer で dialyse した 1：2 のキヌの抽出液 2 ml を Sephadex G-100 に apply し、2 ml ずつ集めた。Apply の際 0.01 ml の I^{131} でラベルしたヒトの血清アルブミンを混じて、標識した。濾過して集めたものは OD₂₈₀ で蛋白を測定し、また anthrone で糖成分を測定した。そして、おのおのの eluate を用いて抗キヌウサギ血清とゲル内沈降反応を行ない、また、おのおのの eluate の 10 倍稀釈液を用いてスクラッチ反応を行なった。なお、キヌの抗原液に 20% TCA を等量混じり、沈降した蛋白量を遠沈により取除き、phosphate buffer で dialyse した上澄を上記同様 Sephadex G-100 で filtrate し、同様の検索を行なった。

DEAE cellulose による filtration:

Step-wise elution と gradient elution とをともに用いた。Step-wise elution では pH を 7.0 に調節した phosphate buffer 0.005 M, 0.01 M, 0.05 M, 0.1 M, 0.5 M で eluate し、ついで 2 M の食塩水で eluate し、最後に 0.1 N の NaOH 水を用いて eluate した。Gradient elution は同じく pH を 7.0 にした。Phosphate buffer の 0.005 M と 0.5 M で gradient elution を行ない、ついで 2 M の NaCl で、最後に 0.1 N の NaOH 水を用いて eluate した。

いずれも eluate は OD₂₈₀ で蛋白量を、anthrone で糖成分を測定した。なお gradient elution では ionic strength も測定した。そして前記同様おのおのの eluate の 10 倍稀釈系列で、キヌに対して強く反応をしめした患者にスクラッチ反応を、さらに抗キヌ血清を用いてゲル内沈降反応を行なった。

皮膚反応：

既述のごとく、Sephadex および DEAE cellulose によつて濾過した eluate の稀釈液を用いて皮膚反応を行なったが、その他に 1：10 のキヌ抗原に 20% TCA を等量混じり、沈降した蛋白成分を遠沈で取除き、上清を生食で dialyse した後、10 倍系列の稀釈液を作り、TCA のかわりに生食を等量混じて同様に処理した抗原液を対照にして、スクラッチ反応によりキヌ抗原に対して強く反応をしめした患者 5 名に皮膚反応を行なつてみた。

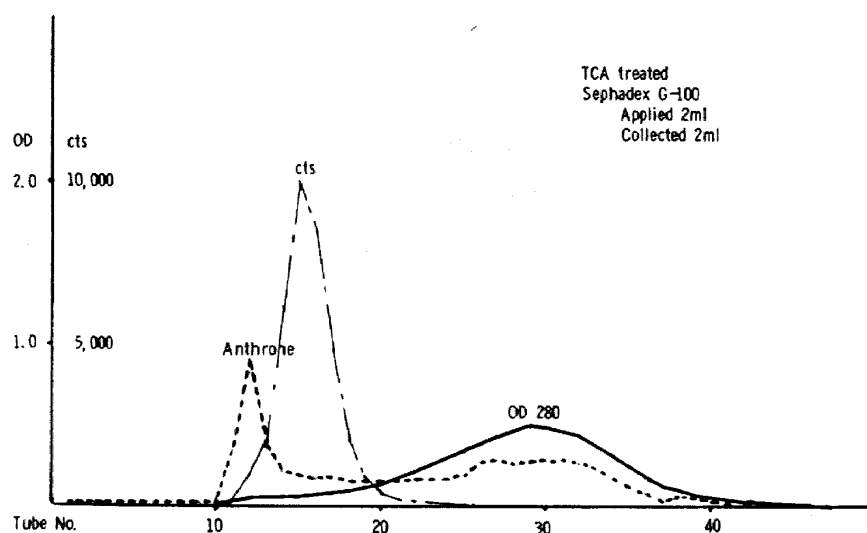


図 3. TCA で処理した後、図 2 と同様に Sephadex G-100 で filtration したものの。

結果

Sephadex による filtration:

Sephadex G-100 を用いての filtration では図2に示したように OD₂₈₀ による蛋白成分も, anthrone による糖成分も同様に二相性の山をしめした。ウサギ抗血清を用いてのゲル内沈降反応では第1の山, 第2の山にほぼ相当して陽性をしめしたが, 反応の強さはピークと必ずしも合致しなかつた。Eluate を用いての皮膚反応では, 抗原性物質は高分子から低分子に至るまで幅広い分布をしめし, 抗原性の強い物質はかなり低分子であることが推察された。ゲル内沈降反応で強い反応をしめした

eluate と皮膚反応で強い反応をしめした eluate とは合致せず明らかな差が認められた。すなわち, ウサギの沈降抗体と反応する抗原の fraction とヒトのレアギンと反応する抗原の fraction とは同一でないことが明らかにされた。

TCA で処理すると OD₂₈₀ での第1の山はほぼ完全に消失し, 第2の山もきわめて小さくなった。Anthrone による糖成分では二相性は消失しなかつたが, 第1, 第2の山はともに低くなり, 蛋白成分とともに糖成分も TCA によつて沈降したことをしめした (図3)。

TCA 処理後の eluate ではゲル内沈降反応は陰性であつた。

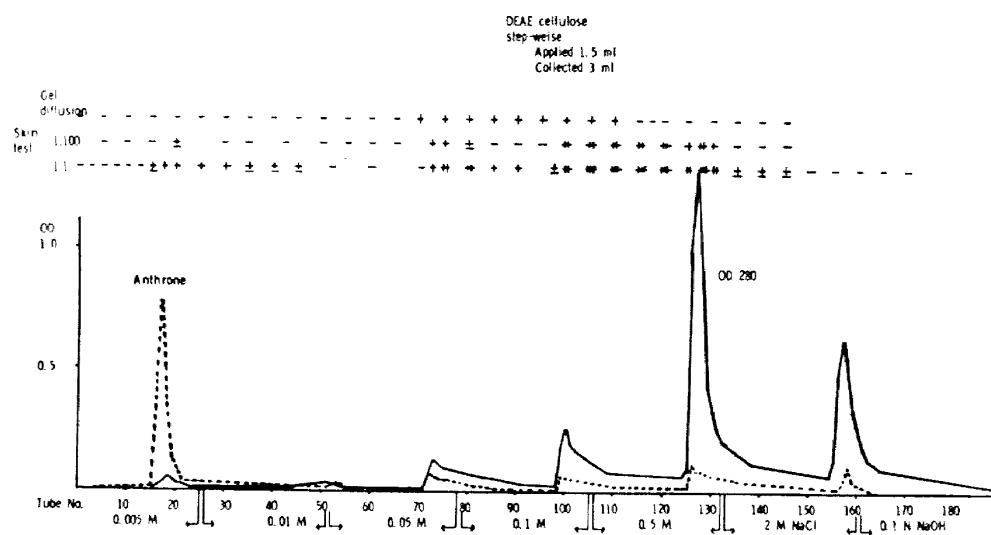


図4. DEAE cellulose による step-wise elution の結果。

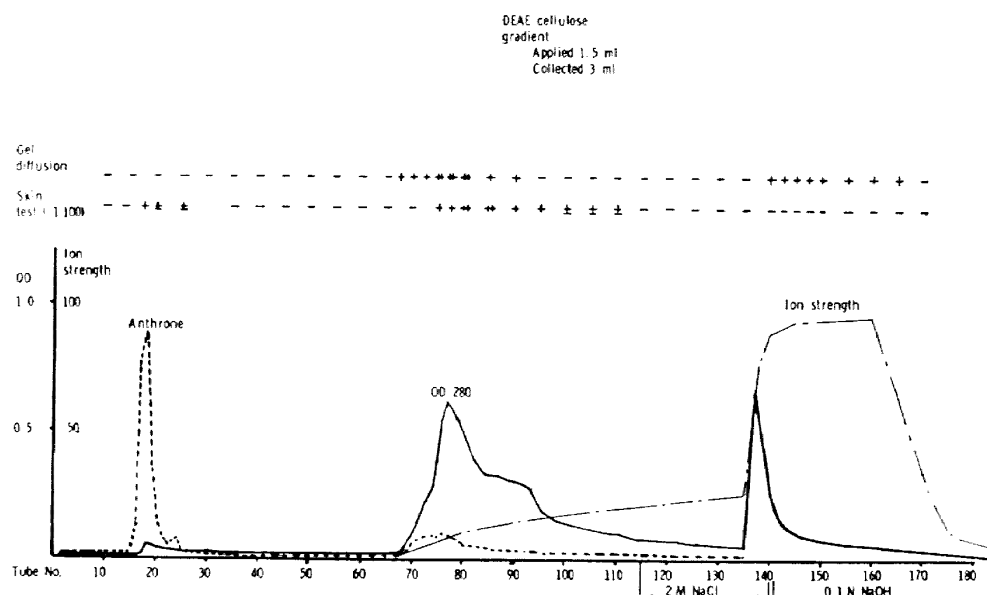
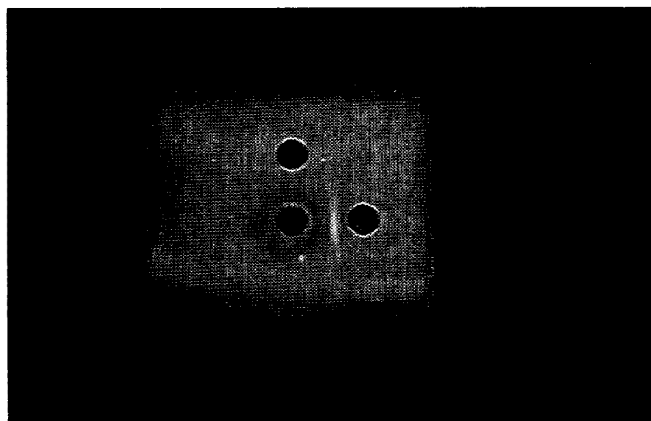


図5. DEAE cellulose による gradient elution の結果。



○---TCAで処理したキヌ抗原
○---キヌ抗原
抗キヌウサギ血清

図6. TCAで処理したキヌ抗原と無処理のキヌ抗原とでの抗キヌウサギ血清に対するゲル内沈降反応。

(註) TCAで処理したものでは沈降線は全く見られない。

抗原稀釈は(1:20)。

表1 TCAで処理したキヌ抗原と無処理のものとの皮膚反応

Case	Ag	Dilution				
		1:20	1:200	1:2,000	1:20,000	1:200,000
1	Non-treated	+++	++	+	—	—
	TCA treated	+++	++	+	—	—
2	Non-treated	+	±	—	—	—
	TCA treated	+	—	—	—	—
3	Non-treated	+++	++	±	—	—
	TCA treated	+++	++	—	—	—
4	Non-treated	+++	++	—	—	—
	TCA treated	+++	++	±	—	—
5	Non-treated	+++	++	+	±	—
	TCA treated	+++	++	+	±	—

DEAE cellulose による filtration :

DEAE cellulose による step-wise elution でははじめに糖成分の高い山がみられ、その後の山では OD₂₈₀ による山が molarity を変えるごとに高くなってきた。糖成分も同じような消長をしめした。ゲル内沈降反応は第

1のピークでは陰性であつた。皮膚反応は第1のピークでも認められたが、強い反応は molarity を高くした際の eluate により明瞭に認められた(図4)。同様な結果は gradient elution でもみられた(図5)。

皮膚反応:

キヌの抽出液を TCA で処理してウサギ抗血清とゲル内沈降反応を行なつてみると沈降線はまったく認められなかつた(図6)。しかるに、皮膚反応では対照に用いた抽出液とはほぼ同じ力価をしめした(表1)。

考 案

アレルギー性疾患の病因的抗原としてキヌはかなり古くから認められている²⁾³⁾。特にわが国では古くから養蚕業が盛んであつて、日常生活においても絹織物と接する機会は少なくない。そのせいか市販されているキヌの抽出液に対して皮膚反応が陽性をしめす率はかなり高く、キヌはわが国においては重要な病因的抗原の1つと考えられる⁴⁾⁵⁾。キヌの病因的抗原としてはセルシンが古くから指摘されているが、それに対して疑問を持つてゐるものもある⁶⁾。ともあれわれわれは、市販されているキヌの抽出液について種々の検討を加えてみた。興味あることには Sephadex や DEAE cellulose による elution の結果であつて、抗ウサギ血清に対して行なつたゲル内沈降反応陽性の eluate とヒトに対する皮膚反応陽性の eluate とは必ずしも同一でないということで、ウサギの沈降抗体に対する抗原の局在と、ヒトの皮膚感作抗体に対する抗原の局在とは必ずしも同一ではないということである。同様なことは異種の動物間でもいえることで、動物実験の結果がヒトにすぐ適応できないことの1例であろう。なお皮膚反応を陽性にきたす eluate はかなり広範囲に分布していて、キヌ抗原の複雑性をしめした。

一方ヒトに対して特に強い抗原性を有する物質の分子量は、68,000 よりもかなり小さいものであることが推察された。なお、TCA でほとんどの蛋白成分を除いてもヒトに対しての皮膚反応の抗原性はほとんど減少をきたさないことから、キヌ抗原の病因的抗原は、蛋白成分よりはむしろ多糖類が全体となしていると考えられる。

これらの結果は、室内塵抽出液や室内塵抗原の重要成分であるダニの抽出液についてわれわれがすでに行なつた検討結果ときわめて類似しているものであるし⁶⁾、即時型反応には多糖類がかなり重要であるという結果が得

られたカビ類の抗原の検索結果ともある程度よく合致する結果である⁷⁾。

総 括

市販されているキヌ抗原を用いて Sephadex G-100と DEAE cellulose による分画を行ない、そのおのおのの eluate を用いて、抗キヌウサギ血清に対する沈降反応とキヌに対して強く反応をしめした患者での皮膚反応を行なつてみた。ウサギの沈降抗体に対して反応をしめす抗原の局在と、ヒトの皮膚反応を陽性たらしめる抗原の局在とは必ずしも一致しなかつた。TCA で蛋白を除いたキヌ抗原では抗キヌウサギ血清に対する沈降反応はまったく消失したが、ヒトに対する皮膚反応の力価にはほとんど変化がみられず、即時型の皮膚反応に関与する抗原は、キヌでは主として多糖体ではなかろうかという結果が得られた。

文 献

- 1) Miyamoto, T., Oshima, S., Mizuno, K., Sasa,

- M. and Ishizaki, T.: Cross-antigenicity among six species of dust mites and house dust antigens. *J. Allergy*, 44, 228, 1969.
- 2) Clarke, J.A. and Mayer, G.P.: A case of hypersensitiveness to silk *J.A.M.A.* 80, 11, 1923.
- 3) Weiner, A.: Bronchial asthma due to silk. *J. Allergy* 28, 325, 1957.
- 4) 松村龍雄, 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ゲン診断と特異療法に関する研究, *アレルギー* 18, 912, 1969.
- 5) 小林節雄: 養蚕に関係した気管支喘息の抗原物質に関する研究. *アレルギー* 2, 447, 1970.
- 6) Miyamoto, T., Oshima, S. and Ishizaki, T.: Antigenic relation between house dust and a dust mite, *Dermatophagoides farinae*, Hughes 1961 by a fractionation method. *J. Allergy* 44, 282, 1962.
- 7) Kabe, J., Aoki, H. and Miyamoto, T.: Antigenicity of fractions from extracts of *C. albicans*: the immediate and delayed type respiratory response in guinea pigs, *J. Allergy* 47, 59, 1971.

IgE in Atopic Dermatitis and Chronic Urticaria

Takashi Yasue, Atsuko Yasue, Kenshiro Sasada and Shinpei Hoshino

Department of Dermatology, Nagoya National Hospital

IgE in the sera isolated from patients with atopic dermatitis and chronic urticaria and IgE fixed to the skins of those patients were examined with single radial immunodiffusion method, reversed type allergic skin reaction by anti-IgE serum and fluorescent antibody technique. In patients with atopic dermatitis, marked increase of IgE level in the sera were noticed (68.2%), especially in those patients combined with bronchial asthma, allergic rhinitis and allergic urticaria. But in patients with chronic urticaria, increase of IgE level in the sera were rarely found, and the degrees were not so conspicuous. In the former, no correlation was found between the IgE level in the sera, and the onsets or the durations of the disease and the severities of the dermatitis. In those patients with atopic dermatitis proved high IgE level in the sera, mild to moderate degrees of eosinophilia were noticed, but skin tests by inhalent and ingestent allergens in those patients were negative except those by some inhalent allergens in the patients combined with bronchial asthma or allergic rhinitis and those by buckwheat allergen in the two patients combined with urticaria sensitive to buckwheat. In a patient with urticaria sensitive to buckwheat, the reaginic activity to buckwheat of the serum was lost by absorption of the serum with anti-IgE serum. As to the sizes of the wheals and the erythemas, there was no difference between the patients with atopic dermatitis and chronic urticaria and the control normal individuals, and there was no correlation between the IgE level in the sera and the sizes of the wheals and the erythemas.

Studies on Experimental Myopathy

Report 1. The Specificity of Striation-binding Antibody

Takeo Onishi

The Second Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School

(Director: Prof. Kiyoshi Hiraki)

Ten years have passed since a new concept that myasthenia gravis belongs to the group of autoimmune disease, was proposed. Thymus abnormality and muscle striation-binding antibody have been extensively studied as the possible causes of the disease, and yet no decisive conclusion is obtained up to this moment. The present paper is concerned with the study about the immunological specificity of striation-binding antibody.

To detect striation-binding antibody by means of fluorescein antibody technique, human skeletal muscle and rat skeletal muscle were used throughout as substrates. After the muscles were fixed with ethylalcohol, they were stained, directly or indirectly, by fluorescein isothiocyanate (FITC) in carbonate-bicarbonate buffer (pH 9.1) and FITC in water (pH 6.5) respectively. Positive fluorescence binding to the muscle striation was observed in each case. Further study on the site of fluorescence localization, however, revealed that A-band was specifically stained when a combination of myasthenic sera and FITC conjugated carpine anti-human gammaglobulin serum or FITC-water alone were applied to the muscles, and that the rest were staining I-band.

After fractionating Fab and Fc portions of IgG derived from myasthenic sera as well as normal human sera, the author examined striation-binding capacity of each and discovered that Fab portion obtained from myasthenic sera was specifically sticking to A-band. And yet there had been no conclusive evidence suggesting this particular fraction was inflicting injurious effect upon neuromuscular junctions simply by attaching to them.