

Tetracosactide (β^{1-24} ACTH) のアレルギー惹起性

第1報. ウサギに対する Tetracosactideの抗原性について

東京大学医科学研究所アレルギー学研究所

進藤 宙二 伊藤 幸治

慶応義塾大学医学部皮膚科学教室

大城 晶子

德島大学医学部皮膚科学教室

白石 聰

(受付：9月14日，1968)

言 緒

ブタなどの動物の脳下垂体より抽出したACTH製剤は、臨床上しばしばアレルギー症状を惹起する。その原因をACTH以外の不純物に帰する見解もあり¹⁾²⁾³⁾、またACTHの構造そのものに帰する見解もある⁴⁾⁵⁾。

White⁶⁾, Liら⁷⁾⁸⁾ Bell⁹⁾ らによつて明らかにされたACTHの構造式によれば、ACTHは39個のアミノ酸より成る polypeptide で、N末端より数えて1~24、及び34~39のアミノ酸は動物間に共通であり、25~33のアミノ酸に種族差がみられる(表1)。従つて、ヒト以外のACTHをヒトに用いた場合、25~33のアミノ酸の違いによりACTHが抗原性を發揮良る可能性も考えられるわけである。すでに動物実験でACTHのホルモン活性を阻害する抗体を産生し得たという報告が数多くある¹⁰⁾

11) 12) 13)

最近、各動物間に共通の24個のアミノ酸より成るAC

表1 Molecular Structure of Human ACTH

Ser-Tyr-Ser-Met-Glu-His-Phe-Arg-Try-Gly-Lys-Pro-
 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12
 Val-Gly-Lys-Lys-Arg-Arg-Pro-Val-Lys-Val-Tys-Pro-
 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24
 Asp-Ala-Gly-Glu-Asp-GluNH₂-Ser-Ala-Glu-
 25 26 27 28 29 30 31 32 33
 25~33 $\left(\begin{array}{l} \text{Sheep Aba-Gly-Glu-Ala-Ser-GluNH}_2\text{-} \\ \text{Pig Ala-Gly-Ala-Glu-Asp-GluNH}_2\text{-} \\ \text{Leu-Ala-Glu-} \\ \text{Cattle Asp-Gly-Glu-Ala-Glu-Asp-Ser-} \\ \text{Ala-GluNH}_2\text{-} \end{array} \right)$
 Ala-Phe-Pro-Leu-Glu-Phe
 34 35 36 37 38 39

THが合成され、これがACTHとしてのホルモン作用を保持している事が明らかにされた¹⁴⁾。これをヒトに使用すれば、アレルギー症状の惹起を回避出来るのではないかと期待される。以下動物実験により確かめてみた結果を報告する。

材 料

1) NH-ACTH-plain

ブタ脳下垂体より抽出されたものでオランダOrganon社製（第一製薬販売）のものをを用いた。

2) Tetracosactide-plain

3) Tetracosactide-Z

いずれも合成24個のアミノ酸ACTHで、オランダ Organon社製のものである。一般に使用されている略記法により tetracosactide と略した。これは β^{1-24} corticotropin と同一である。

方 法

1) NH-ACTH-plain, 及び tetracosactide-plain による免疫

2500～3000 gの白色ウサギ雄20匹を5匹ずつA,B,C,Dの4群に分けた。

A群にはtetracosactide-plain 1mg(約100単位相当)/kg, C群には NH-ACTH-plain 100単位/kgを incomplete adjuvant と等量に混合して1 ml となし, 毎週1回, 計8回ウサギの foot pads の皮内に注射し, その都度耳静脈より採血し, 更に1週後, A群には tetracosactide-plain 0.1mg/kg, C群には NH-ACTH-plain 10単位/kgを皮下に注射し, 1週後に採血した。

対照として

B群には、tetracosactide-plainの溶解液である生理食塩水をA群と同方法で等量注射し、D群には、NH-AC TH-plainの溶解液である acid solution をB群と同方法で等量注射し、採血した。

血清は、分離後、 -20°C に凍結保存した。

2) Tetracosactide-Z による免疫

2500—3000 gの白色ウサギ雄10匹を2群に分けた。

5匹に tetracosactide-Z 液 1 ml (tetracosactide 1 mg

含有)/kgを,対照として他のウサギ5匹に溶解液1ml/kgを incomplete adjuvantと共に毎週1回 foot pads 及び背部の皮内に注射した. 8回免疫し, 9回目は booster injection として 0.1mg/kgを注射し, 対照のウサギには溶解液 0.1ml/kg を注射した. その1週間後に採血し, 血清を分離して-20°Cに保存した.

3) PCA (Passive Cutaneous Anaphylaxis)

Ovary¹⁵⁾ の法に従った. ウサギ血清 0.1ml を 250~300 g のモルモットの背部皮内に注射し, 4時間後, 抗原 0.5mlと1% Evans blue 液 0.5 ml をまぜて静脈より注射し, 30分後判定した. 抗原量は非特異反応のない量を定めて用いた(後述).

4) Carbodiimide 試薬による tetracosactide 結合ウシ血清アルブミンの作製(図1).

Goodfriend ら¹⁶⁾の方法に従った. Carbodiimide 試薬は 1-cyclohexyl-3-(2-morpholinyl-(4)-ethyl) carbodiimide metho-*p*-toluenesulfonate ("Morpho CDI",

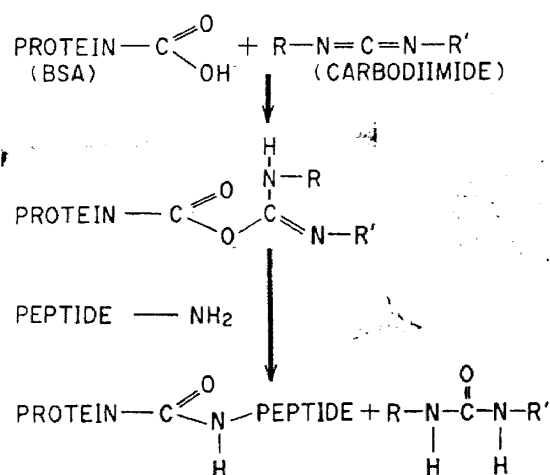


図1. Conjugation of peptide with carbodiimide (Morpho CDI).

Aldrick 社)を使用した.

5) Radioimmuno-electrophoresis

Yagi ら¹⁷⁾の方法の two step method を用いた. NH-

表2 Procedure of Immunization with ACTH

Antigen	Rabbit No.	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10 week
A) 24-Peptide ACTH	1	died several hours after injection										
	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	3	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	4	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	5	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
B) Saline	11	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	12	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	13	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	14	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	15	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
C) Porcine ACTH	6	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	7	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	8	*	*	*	died by shock							bled
	9	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	10	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
D) Acid Solution for Porcine ACTH	16	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	18	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	19	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	20	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled
	21	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	bled

* 0 week bleeding only

* 1-8 bled and immunized with incomplete adjuvant

* 9 week booster injection

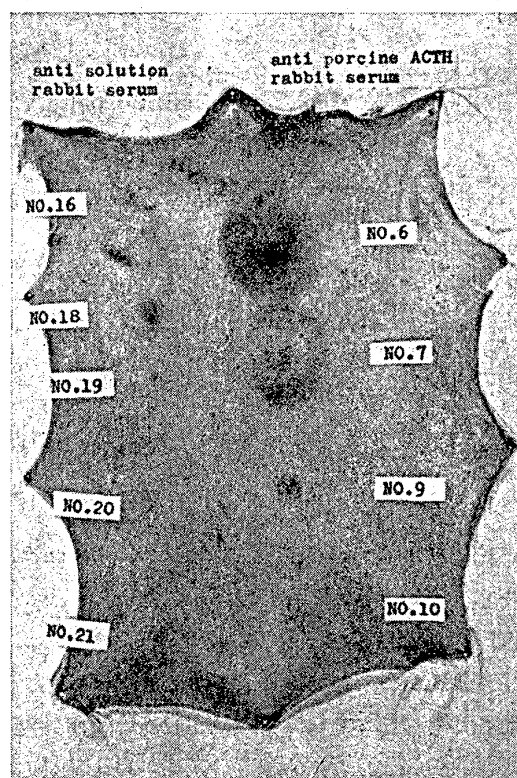


写真 1.

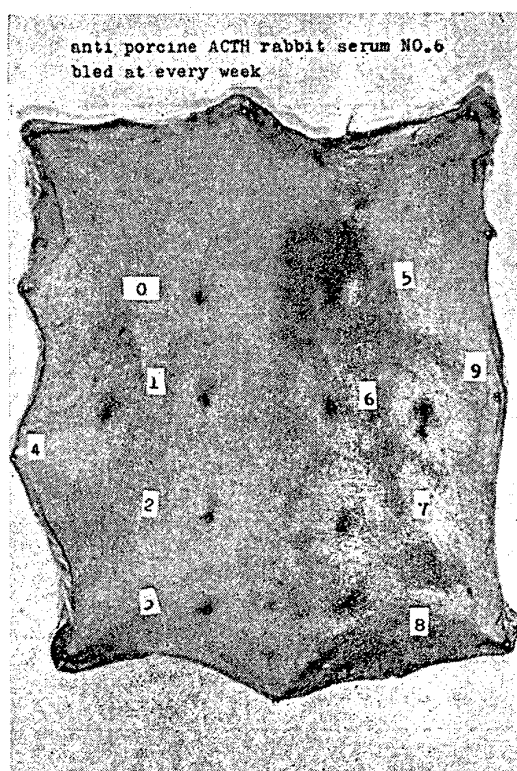


写真 2.

ACTH-plain は生理食塩水や borate buffer に不溶性の部分があり、ここでは soluble な部分のみを使用した。

結 果

1. 免疫過程におけるウサギの状態 (表 2)

tetracosactide-plain を注射した A 群 5 匹のうち 1 匹が第 1 回目の注射後、数時間を経て死亡した。原因は不明である。

NH-ACTH-plain を注射せる C 群 5 匹のうち、1 匹が第 4 回目の注射をしている間に anaphylactic shock 様症状を示し死亡した。NH-ACTH-plain は incomplete adjuvant と混合しても流動状態であり、皮内注射でも吸収が早いため anaphylactic shock を起したものと推定される。

溶解液のみで注射した B 群、D 群には異常なかつた。tetracosactide-Z で免疫せる 5 匹のウサギは異常なく、その placebo で免疫せる 5 匹のウサギのうち 1 匹は 5 回目、1 匹は 6 回目の注射後数時間を経て死亡した。原因は不明である。

2. PCA

1) NH-ACTH-plain による PCA

3 匹のモルモットの皮内に、NH-ACTH-plain で免疫せるウサギ及びその溶解液で免疫せるウサギの血清を 0.1ml ずつ注射し、4 時間後に NH-ACTH-plain 12.5 単位、1.25 単位、0.125 単位を Evans blue と共にそれぞれ一匹ずつ静脈注射した。

12.5 単位を静注したモルモットは脱力症状を示し、PCA は陰性であり、又 0.125 単位を静注したモルモット PCA 陰性であつた。1.25 単位を静注したモルモットののみ PCA 陽性であつた。陽性を示したウサギ血清は NH-ACTH-plain で免疫せるウサギ No. 6 と No. 7 の血清のみで他のウサギの血清は陰性であつた (写真 1)。

モルモットに静注する NH-ACTH-plain を 1.25 単位と定めて 3 匹のモルモットに同様の PCA を行なつたが同様の結果であつた。

4 回目の免疫注射を行なつた際ショック症状で死亡したウサギの注射前の血清は PCA 陰性であつた。

2) NH-ACTH-plain に対するウサギ抗体の出現時期

No. 6 のウサギより 1 週ごとに採血して得た血清 0.1 ml ずつモルモットの皮内に注射し、NH-ACTH-plain を抗原として PCA を行なつた。写真 2 のごとく、すでに

最初の注射から1週後に採血した血清でPCAが陽性にみられる。

3) Tetracosactide-plain によるPCA

Tetracosactide-plainで免疫せるウサギ, およびその溶解液のみで免疫せるウサギの血清を0.1 ml ずつモルモットの背部皮内に注射した。同じ血清を4匹のモルモットに注射し, 4時間後tetracosactide-plain 0.75mg, 0.125mg, 0.0125mg, 0.00125mgをそれぞれ1匹ずつのモルモットに Evans blue と共に静脈注射した。0.75mgを注射したモルモットは全身の血管が拡張し, 皮膚全体に色素の漏出がみられたので, PCAの抗原量としては不適當であつた。それ以下の0.125mg, 0.0125mg, 0.00125mgでは血管拡張はみられなかつた。これらの抗原量を用いたPCAは陰性であり, 0.125mgを抗原量とし, 他の3匹に同様のPCAを行なつたがすべて陰性であつた(写真3)。

4) 異なる抗原によるPCA(写真4)

抗NH-ACTH-plain 抗体をモルモット皮内に注射し tetracosactide-plainを Evans blue と共に静注したが陰性であり, また tetracosactide-plain で免疫したウサギ血清をモルモット皮内に注射し, NH-ACTH-plain を静注してもやはりPCA陰性であつた。

また, 抗NH-ACTH-plain抗体をモルモット皮内に注射し, 3.5時間後に tetracosactide-plain 0.125mgを静注し, その30分後に NH-ACTH-plain 0.125単位を Evans

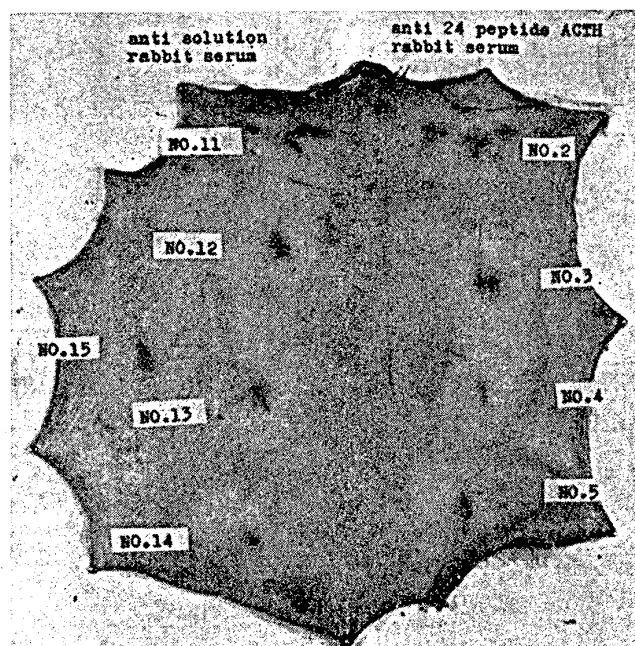


写真3.

blue と共に静脈注射したが, tetracosactide-plain によるPCA抑制はみられなかつた。

5) ブタ血清によるPCA(写真5)

Tetracosactide-plain で免疫せるウサギ血清, NH-ACTH-plain (ブタ) で免疫せるウサギ血清, 抗BSAウサギ血清をモルモットの皮内に注射し, 4時間後にブタ血清0.5mlを Evans blue 液0.5mlを混ぜて静注したが, 前二者はいずれも陰性であり, 抗BSA抗体のみ陽

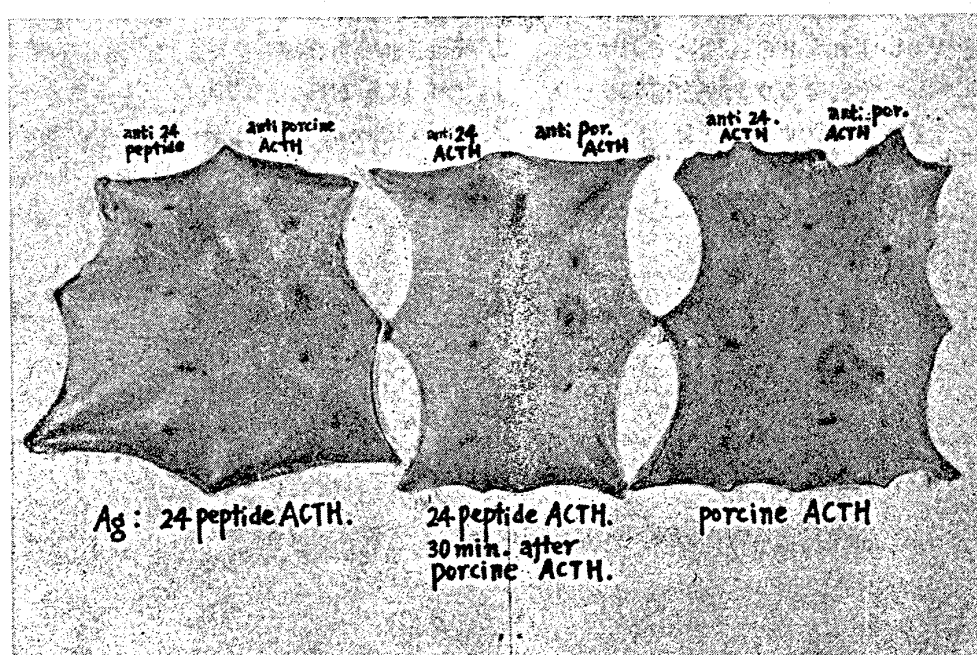


写真4.

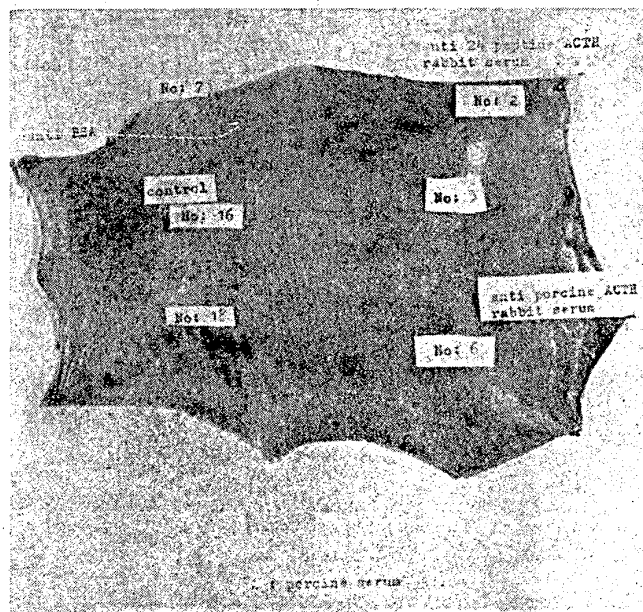


写真 5.

性であつた。ウシ血清アルブミン (BSA) に対し、ブタ血清アルブミンは32%の交叉性があるといわれているので¹⁸⁾、このPCA反応は交叉反応によるものと思われる。以上の結果、NH-ACTH-plain (ブタ) によるPCA陽性抗体は、NH-ACTH-plain中に混入せるブタ血清成分のためではないことが判明した。

6) Tetracosactide を結合せるBSAによるPCA
tetracosactide を Morpho CDI でBSAに結合せる蛋白の2.5mgを抗原としてPCAを行なつてみたが、NH-ACTH-plain に対する抗血清、tetracosactide-plain で免疫せるウサギ血清のいずれもPCA陰性であつた。

7) Tetracosactide-Z で免疫せるウサギ血清のPCA
tetracosactide-Z で免疫せるウサギ血清を3匹のモル

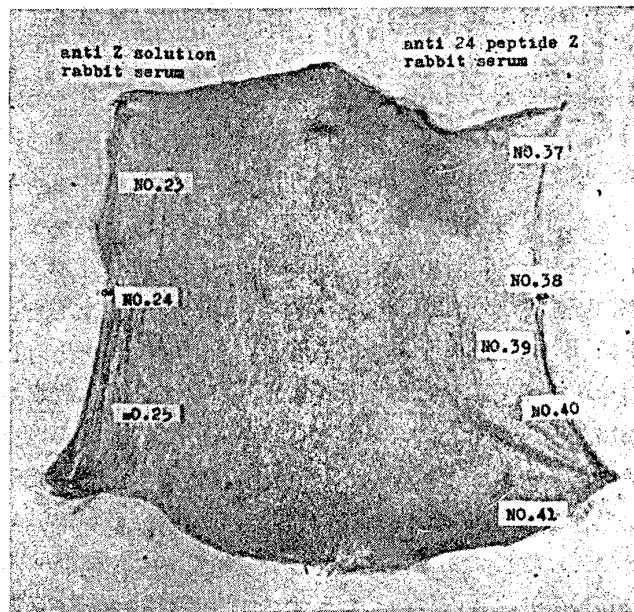


写真 6. Ag: tetracosactide-Z (24-peptide-ACTH-Z)

モット皮内に注射し、tetracosactide-Z 0.5ml (tetracosactide 0.5mg), 0.25ml (tetracosactide 0.25mg), 0.125ml (tetracosactide 0.125mg) を静注しPCAを行なつたが、いずれも陰性であり、同様の実験を3回行なつたが陰性であつた (写真6)。

また、tetracosactide-plain を静注してPCA反応を行なつたが陰性であつた。

3) Radioimmuno-electrophoresis

NH-ACTH-plain, tetracosactide-plain, tetracosactide-Z で免疫せるウサギ全部の血清につき、radioimmuno-electrophoresis をおこなつた。すべての血清につき、¹³¹I 結合 NH-ACTH-plain と反応させた。また、¹³¹I 結合 tetracosactide-plain を用いて同様の実験を行なつた。

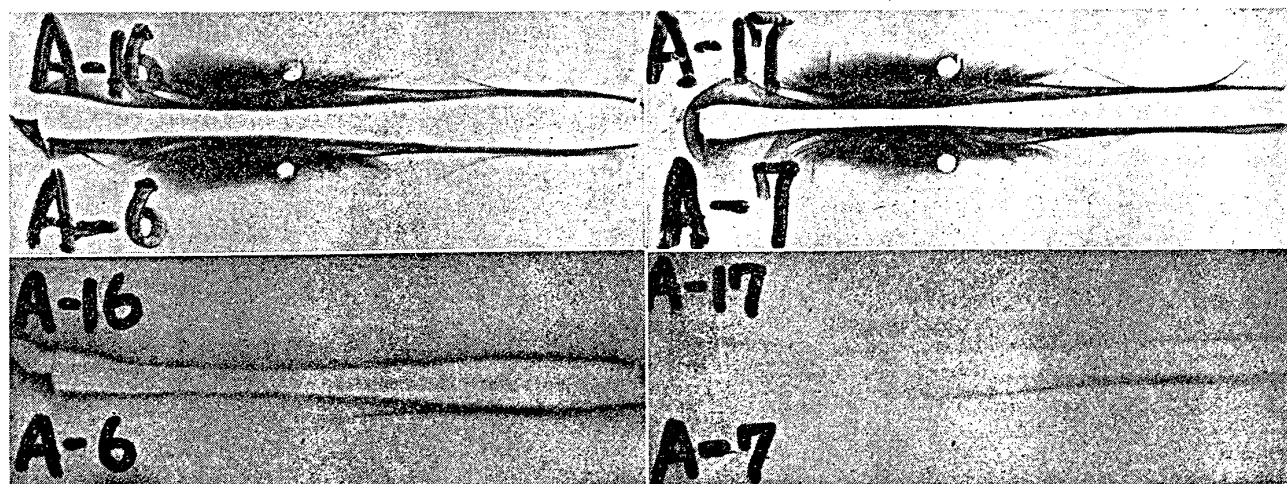


写真 7.

陽性結果を得たのは、 ^{131}I 結合 NH-ACTH と、No. 6, No. 7 のウサギ血清の反応のみであつた。IgGと思われる沈降線に一致して ^{131}I 結合 NH-ACTH の反応がみられた (写真7)。

考 案

以上報告したごとく、tetracosactide をウサギに注射したが、抗体を作る事ができなかつた。また、抗 porcine ACTH 抗体と tetracosactide とが *in vitro* で結合することも示されなかつた。

Tetracosactide はウサギに抗体を作るのは非常に困難であり、作り得るとしても極めて稀であるという従来の報告¹⁹⁾²⁰⁾²¹⁾と我々の実験結果は一致している。我々の作製した抗 NH-ACTH はブタの血清成分に対する抗体を含んでいないのでおそらく ACTH (ブタ) そのものに対する抗体と思われる。tetracosactide (β^{1-24} ACTH) は抗原性が証明されなかつたので、ブタ ACTH の抗原性はウサギに対しては、ACTH の N 末端より数えて 25 番目のアミノ酸と 39 番目のアミノ酸の間にあると考えられる。

NH-ACTH-plain で免疫せるウサギのうち 1 匹が第 4 回目の注射後 anaphylactic shock 様症状で死亡したが注射直前に採血した血清は PCA 反応陰性であつた。ウサギの場合、早期に出現する抗体と物理化学的性状を異にし、モルモットに passive transfer が不能であるとされている。また、これがウサギ同志にのみ passive transfer 可能なことがわかつてきた²²⁾²³⁾²⁴⁾。従つてこのウサギ血清がモルモットを使つた PCA 反応陰性ではあつたけれども、おそらく anaphylactic shock であつたと考えても差しつかえないであろう。

Tetracosactide で免疫せるウサギのうち、1 匹が第 1 回目の注射後数時間で死亡しているが、初回であるので anaphylactic shock であつたとは考えがたい。ウサギの健康状態によるものであろうが、ここでは原因をつかめなかつた。Fleischer ら²⁵⁾は tetracosactide で免疫せるウサギ血清はブタの ACTH を中和するとしているが、我々の実験ではこれを確かめることができなかった。

我々は tetracosactide を Morpho-CDI で BSA に結合させて PCA の抗原としたが、抗 NH-ACTH 抗体、あるいは tetracosactide で免疫せるウサギ血清と反応しなかつた。しかし最近、Gelzer²⁶⁾ が報告するところに

よると、この tetracosactide をウサギの血清アルブミンに Morpho-CDI で結合せしめ、ウサギを免疫すると補体結合性の抗体ができると言っている。この場合 1 分子のウサギ血清アルブミンにつき 3.5~5 分子の tetracosactide が結合している。すなわち tetracosactide のみの免疫では抗体を作り得なくても他の蛋白に数個結合させると抗原性がでてくるのであり、あたかも hapten のような態度を示している。我々が調べた所では、tetracosactide は、NH-ACTH と抗 NH-ACTH との間の PCA 反応を抑制することはできなかつた。tetracosactide は大量ではモルモットの全身の血管透過性を強めるので、PCA 抑制には NH-ACTH の 10 倍の単位量しか使わなかつたので、あるいは量が少なかつたのかもしれない。

臨床では Buytendijk²⁷⁾ らが、high purified ACTH に皮膚反応陽性の患者 7 例につき、この tetracosactide を皮内に注射しても何らの反応も示さなかつたと報告している。

この結果は我々のウサギの実験結果と一致するものである。

しかし、tetracosactide がすでにできあがつた 39 個アミノ酸 ACTH 抗体と反応しないということと、tetracosactide を長期免疫して抗体を作り得るか否かということとはまた、別問題であるし、モルモットに対しては抗体を作り得るという報告もあるので、臨床長期使用する場合には、一応考慮する必要がある。

(モルモットに対する抗原性については第 2 報に述べるつもりである)。

結 論

1) ブタの脳下垂体より抽出した ACTH 製剤である NH-ACTH と 24 個のアミノ酸よりなる合成 ACTH (tetracosactide) の抗体産生能力をウサギで調べた。

2) NH-ACTH で免疫した 5 匹のウサギのうち 2 匹の血清は NH-ACTH に対し CPA 反応陽性であり、又 radioimmuno-electrophoresis で ^{131}I 結合 NH-ACTH との反応がみられた。他の 1 匹は anaphylactic shock 様症状で死亡した。

3) tetracosactide で免疫せるウサギの血清は PCA, radioimmuno-electrophoresis のいずれにおいても tetracosactide に対する抗体を検出することができなかった。

4) tetracosactide は抗 NH-ACTH 抗体に対し、PCA, radioimmuno-electrophoresis のいずれにおいても反応

しなかつた。

5) 従つて tetracosactide (β 1-24 ACTH)はウサギに
対し、免疫原性がないと思われる。

(なお、本論文の一部は第17回日本アレルギー学会に
おいて発表したものである。)

文 献

- 1) 西沢秀郎, 七星正久, 浅沼克次, 植村泰三, 熊谷朗, 山村雄一, 武田和之: 所謂ACTHアレルギーに関する研究, 日内分泌会誌, 40, 61, 1964.
- 2) Zucker, A. & Bendo, D.: Anaphylactic reaction to ACTH, New York J. Med., 61, 623, 1961.
- 3) Rajka, G.: On the prophylactic possibilities in ACTH allergy, Acta Allergol., 16, 195, 1961.
- 4) Arnoldsson, H.: Allergische Reaktionen auf ACTH, Acta Allergol., 8, 369, 1955.
- 5) Forssman, O., Korsgren, M., Nordh, B. & Paulsen, F.: Allergy to ACTH of animal and human origin, Acta Allergol., 18, 462, 1963.
- 6) White, W.F.: Studies on adrenocorticotropin. V. The isolation of corticotropin-A. J. Am. Chem. Soc., 75, 503, 1953.
- 7) Li, C.H., Simpson, M.E. & Evans, H.M.: Isolation of adrenocorticotrophic hormone from sheep pituitaries, Science, 96, 450, 1942.
- 8) Li, C.H., Evans, H.M. & Simpson, M.E., Adrenocorticotrophic hormone, J. Biol. Chem., 149, 413, 1943.
- 9) Bell, P.H.: Purification and structure of β -corticotropin, J. Am. Chem. Soc., 76, 5565, 1954.
- 10) McGarry, E.E., Ballantyne, A. & Beck, J.C.: Studies with antisera to corticotropin (ACTH). Ciba Fdn. colloq. Endocr., 14, 273, 1962.
- 11) Felber, J.P.: ACTH antibodies and their use for a radioimmunoassay for ACTH. Experientia, 19, 277, 1963.
- 12) Imura, H., Sparks, L.L., Grodsky, G.M. & Forsham, P.H.: Immunologic studies of adrenocorticotrophic hormone (ACTH): Dissociation of biologic and immunologic activities. J. Clin. Endocr., Metab. 25, 1361, 1965.
- 13) Yalow, R.S., Glick, S., Roth, J. & Berson, S.A.: Radioimmunoassay of human plasma ACTH, J. Clin. Endocr. Metab., 24, 1219, 1964.
- 14) Kappeler, H. & Schwyzer, R.: Die Synthese eines Tetracosapeptides mit der Aminosäuresequenz eines hochaktiven Abbauproduktes des β -Corticotropins (ACTH) aus Schweinehypophysen, Helv. Chim. Acta., 44, 1136, 1961.
- 15) Ovary, Z.: Immediate Reactions in the Skin of Experimental Animals provoked by Antigen-Antibody Interaction, Prog. in Allergy, V., 459, 1958.
- 16) Goodfriend, T.L., Levine, L. & Fasman, G.D.: Antibodies to bradykinin and angiotensin, A use of carbodiimides in immunology, Science, 144, 1344, 1964.
- 17) Yagi, Y., Maier, P., Pressman, D., Arbesman, C. & Reisman, R.E.: The presence of the ragweed-binding antibodies in the β_2A^- , β_2M^- and γ -globulins of the sensitive individuals, J. Immunol., 91, 83, 1963.
- 18) 中村弘: 現代の生物学5. 免疫生物学, 45, 岩波書店, 1966 より引用.
- 19) Fischer K., Hachmeister U. & Kracht J.: Immunohistologische Befunde mit Anti- β 1-24-Corticotropin am Hypophysenvorderlappen der Ratte, Naturwissenschaften 52, 432, 1965.
- 20) Felber, J.P. & Ashcroft, S.J.H.: The relationship between structure and antigenicity and properties of ACTH, Eur. Biochem. Soc. Vienna, 225, 1965.
- 21) Hachmeister, U. & Kracht, J.: Antigene Eigenschaften von β 1-24 Corticotropin, Virchows Arch. path. Anat. Physiol. 339, 254, 1965.
- 22) Zvaifler, N.J. & Becker, E.L.: Rabbit passive cutaneous anaphylaxis, Fed. Proc., 24, 250, 1956.
- 23) Zvaifler, N.J. & Becker, E.L.: Rabbit anaphylactic antibody, J. exp. Med., 123, 935, 1966.
- 24) Hogarth-Scott, R.S.: Rabbit ragin like antibodies, Int. Arch. Allergy, 32, 201, 1967.
- 25) Fleischer, N., Givens, J.R., Abe, K., Nicholson, W.E. & Liddle, G.W.: Studies of ACTH antibodies and their reactions with inactive analogues of ACTH, Endocrinology, 78, 1067, 1966.
- 26) Gelzer, J.: Immunochemical study of β -corticotropin-(1-24)-tetracosapeptide, Immunochimistry, 5, 23, 1968.
- 27) Buytendijk, H.J. & Maesen, Fr.: Comparative skin tests with animal and synthetic corticotropin in patients hypersensitive to animal corticotropin, Acta Endocrinol. 47, 613, 1964.

The Role of Allergic Reactions of Immediate and Delayed Type on the Bronchospasm of Guinea Pigs

Junzaburo Kabe and Terumasa Miyamoto

Department Physical Therapy and Medicine, Faculty of Medicine, University of Tokyo

The experiments were designed to analyse the reactions of the respiratory tract of guinea pigs sensitized with egg albumin (EA) or tubercle bacilli following the exposure to the antigens. Oscillation method was used to record the changes of respiratory frequency and respiratory resistance of the animals.

In the experiments of the reactions of immediate type, 39 guinea pigs inhaled aerosolized EA after passive sensitization with γ_1 or γ_2 globulin fraction of anti-EA guinea pig serum. To separate γ_1 and γ_2 globulin fraction the serum was applied to a column of DEAE cellulose, equilibrated with sodium phosphate buffer 0.005 M or 0.15 M at pH 8.0. The purity of both fractions was examined by PCA and passive lysis. Guinea pigs sensitized with anti-EA antibodies reacted with immediate increase of respiratory resistance following the exposure to the antigens. The magnitude of the reactions was of the following order; 1) pigs which were challenged 24 hrs. after sensitization with γ_1 . 2) pigs challenged within 1 hr. of sensitization with γ_2 . 3) pigs challenged within 1 hr. of sensitization with γ_1 . 4) pigs challenged 24 hrs. after sensitization with γ_2 . The resistance returned to normal in one hour except in the second group in which the increase of the resistance lasted for 2–4 hrs. There was no definite change in respiratory frequency in any of the above groups.

Of the guinea pigs sensitized with tubercle bacilli, immediate increase of respiratory resistance was noted in some of the pigs which were exposed to old tuberculin spray but in none exposed to PPD. At 24 hrs. after exposure, all these animals exhibited 1.5–2 times higher respiratory frequency than those of pre-treatment. This tachypnea was not accompanied by the change in respiratory resistance and was not noted after old tuberculin inhalation in the control group.

It was concluded that the biological active substance which produces bronchospasm upon exposure to the antigen was contained both in γ_1 and in γ_2 globulin fraction of guinea pigs. It seemed that the substance in γ_1 fraction required the latent period for the fixation to tissue but the substance in γ_2 fraction did not.

Allergic reactions of Arthus type and of delayed type were not likely to produce bronchospasm although the latter caused dyspnea with distinct tachypnea of the guinea pigs. Histological studies support this view.

The Antigenicity of Tetracosactide (β^{1-24} ACTH)

I. On the Antigenicity of Tetracosactide in Rabbits

Tiuzi Sindo and Koji Ito

Department of Allergology, the Institute of Medical Science, the University of Tokyo

Akiko Ohshiro

Department of Dermatology, School of Medicine, Keio University

Satoshi Shiraishi

Department of Dermatology, School of Medicine, Tokushima University

1) The immunogenicity of NH-ACTH extracted from the pituitary glands of pigs and synthetic ACTH (tetracosactide) consisted of 24 amino acids was investigated in rabbits.

2) Two of five sera of the rabbits immunized with NH-ACTH gave positive PCA reaction to NH-ACTH, and reacted with I^{131} -labelled NH-ACTH in the radioimmuno-electrophoresis. One rabbit died

in a state of anaphylactic shock.

3) No antibody against tetracosactide was detected by the PCA and radioimmuno-electrophoresis in the sera of the rabbits immunized with tetracosactide.

4) The tetracosactide was non-reactive with the antiNH-ACTH antibody in the PCA and radioimmuno-electrophoresis.

5) It seems, therefore, that tetracosactide (β^{1-24} ACTH) is not immunogenic in rabbits.

The Antigenicity of Tetracosactide (β^{1-24} ACTH)

II. On the Antigenicity of Tetracosactide in Guinea Pigs

Tiuzi Sindo and Koji Ito

Department of Allergology, the Institute of Medical Science, the University of Tokyo

Akiko Ohishiro

Department of Dermatology, School of Medicine, Tokushima University

Satoshi Shiraishi

Department of Dermatology, School of Medicine, Keio University

1) The Antigenicity of tetracosactide (β^{1-24} ACTH) was investigated in guinea pigs.

2) Three of five guinea pigs immunized with tetracosactide showed signs of anaphylactic shock, though the sera were not reacted with tetracosactide in the PCA and radioimmuno-electrophoresis.

The Degradation of Rabbit IgG by Trypsin

Shinichiro Watanabe

The Institute for Cancer Research Osaka University Medical School, Osaka

(Director: Prof. Masayasu Kitagawa)

Rabbit IgG antibodies against bacterial α -amylase were treated with trypsin in a medium free of any added reducing agent. The 5S fragments were isolated from the tryptic digest by fractionation with ammonium sulfate followed by gel filtration through Sephadex G-100. The tryptic 5S fragments could (1) form specific precipitate with corresponding antigen, (2) neutralize amylase activity, (3) react with anti-Fab but not with anti-Fc sera, (4) fail to induce passive cutaneous anaphylaxis in guinea pigs. With these respects the tryptic 5S fragments were identified as divalent antibody fragments and were designated as $F(ab'')_2$. The $F(ab'')_2$ fragments were split into the 3.5S univalent fragments. The 3.5S fragments were also obtained by tryptic digestion in the presence of cysteine. The 3.5S univalent fragments closely resembled the papain 3.5S Fab fragments according to the antigenic analysis using goat anti-rabbit globulin, Fab and Fc sera, and were designated as Fab''

Homoreactants against Fab'' or $F(ab'')_2$ fragments from rabbit IgG could be demonstrated in the normal rabbit IgG by passive hemagglutination method. These homoreactants could be distinguished from homoreactants against Fab and Fab' reported by Mandy, W.J. The homoreactants against Fab'' and Fab were partially purified with immuno-adsorbents which were made by conjugating with Fab, Fab', Fab'' insoluble poly-RSA by means of bis-diazotized benzidine method. These purified homoreactants showed specific binding activities with homologous immuno-adsorbents. These activities were inhibited by homologous fragments but not or little by heterologous fragments. From these results, it is clear that antigenic differences among Fab, Fab', Fab'' and $F(ab'')_2$ can be demonstrated by the homoreactants present in normal rabbit serum.