ヒマ種子中に含まれる Ricin の生理活性に関する研究 (第4報¹⁾)

Concanavalin A および Ricin の発熱活性と赤血球膜

アセチルコリン エステラーゼにおよぼす影響について

古謝紀和, 持田研秀, 吉田 稔

国立衛生試験所大阪支所²⁾

Studies on the Physiological Activity of Ricin from Castor Bean. IV.¹⁾

Pyrogenic Activity and Effects on Rabbit Erythrocytes

Acetylcholinesterase of Concanavalin A and Ricin

NORIKAZU KOJA, KENSHU MOCHIDA, and MINORU YOSHIDA

National Institute of Hygienic Sciences, Osaka Branch²⁾

(Received September 3, 1976)

The pyrogenic activity of concanavalin-A (Con.-A) and its effect on rabbit erythrocytes were studied in comparison with those of ricin. The minimum pyrogenic dose of Con.-A to the rabbit was 0.5 mg/kg, while administration of 1 mg/kg caused $2^{\circ} \pm 0.3^{\circ}$ increase in the average body temperature. By repeated injection of Con.-A the rabbit produced an antibody to bring about pyrogenic tolerance. The cross tolerance reaction, however, was not observed among these tolerant rabbits which were repeatedly injected with Con.-A, ricin, or bacterial pyrogen. Physiological activity of Con.-A closely resembled that of ricin in point of having a lag time, duration of fever, and nonproducibility of endogenous pyrogen in febrile rabbit serum. *In vitro*, Con.-A and ricin (500 μ g/ml each) manifested 35 and 48% inhibition, individually, to the rabbit erythrocytes acetylcholinesterase, whereas no such effect was seen in the rabbit serum acetylcholinesterase.

From the results of preincubation test and blocking by sugar, these inhibitory effects were distinctly attributed to blood agglutination.

Keywords—concanavalin A; ricin; ricinus hemagglutinin; acetylcholinesterase; pyrogenicity; pyrogenic tolerance; blood agglutination

前報において, ricin が発熱活性^{3a, b)} および末梢血管透過性亢進作用など¹⁾ の炎症反応を示すことを明らかにし, その作用機序について菌体成分であるグラム陰性菌の夾膜を構成するリポ多糖 (LPS) との類似点を報告し

た。

一方, ricin と同様に Jack bean より抽出される concanavalin A (Con. A) は subunit 構造を有する単純蛋白質であり,⁴⁾ 強い発熱活性⁵⁾ と細胞凝集活性をもつことが知られ,⁶⁾ 細胞膜の透過性調節機能をもつアセチル

1) 第3報: 古謝紀和, 持田研秀, 吉田 稔, 衛生化学, **21**, 337 (1975).

2) Location: 6, Hoensaka-cho, Higashi-ku, Osaka (大阪市東区法円坂町6).

3) a) 古謝紀和, 持田研秀, 衛生化学, **20**, 204 (1974); b) 古謝紀和, 持田研秀, 吉田 稔, 衛生化学, **20**, 209 (1974).

4) B.B.L. Agrawal, I.J. Goldstein, *Biochim. Biophys. Acta.*, **133**, 376 (1967).

5) E. Atkins, L. Francis, *J. Infec. Dis.*, **128**, suppl., 277 (1973).

6) I. Kaneko, H. Satoh, T. Ukita, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **50**, 1087 (1973).

コリンエステラーゼ (Achase) に強い affinity を示すといわれている。⁷⁾

そこで、著者らは家兔の赤血球膜 Achase におよぼす Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin の阻害効果を比較するとともに、発熱反応の機序についても検討を行なった。

実験の部

1) 実験材料 精製 ricin (ricin), 血球凝集成分 (ricinus hemagglutinin) およびリポ多糖 (LPS) は前報の方法^{3b)}にしたがい調製したものを持ちいた。Con. A は Miles-Yeda 社製, eserine は Merk 社製の硫酸フィズチグミンを持ちいた。

塩化アセチルコリンは Sigma 社製を持ちいた。塩化アセチルコリンは Sigma 社製を持ちい 10 mmole/ml の溶液を基質とした。

2) 実験動物と発熱性試験 実験動物は体重 2.5—3.0 kg の雄性家兔を使用した。発熱性試験および発熱量の測定は前報^{3a)}のごとく行なった。

3) 家兔の免疫と抗体価の測定 家兔の ricin による免疫は前報^{3b)}のごとく行なった。Con. A は 1 mg/ml/kg を生理食塩水にとかし、一週間毎に家兔の耳静脈に注射し免疫を行ない、重層法による抗体価の測定および寒天ゲル内沈降反応は常法にしたがった。⁸⁾

4) 家兔の赤血球および血清 雄性家兔の心臓穿刺により採血し、少量のヘパリンを混合し 2500 rpm, 10 min 遠心分離を行なって血清を分離し、下層の赤血球を生理食塩水で数回洗滌したのち、生理食塩水でもとの採血量まで希釈してもちいた。

5) アセチルコリンエステラーゼ活性の測定 Hestrin の方法⁹⁾を準用した。基質溶液 0.3 ml, 0.05 M リン酸緩衝液 0.1 ml および試料溶液 0.5 ml の混液をあらかじめ 37° で preincubate し、これに酵素液 0.3 ml を加え 37°, 30 min 反応したのち、2 M ヒドロキシルアミンと 3.5 N 水酸化ナトリウムの等量混液 1 ml を加える。15 min 後、12 % 塩酸 1 ml および 0.37 M 塩化第二鉄溶液 1 ml を加えてろ過する。そのろ液につき、540 nm で吸光度を測定し、3 回の平均値を示した。

実験結果

1) Con. A の発熱作用について

正常家兔の耳静脈に Con. A を静注すると、Fig. 1 に示す 30—60 min の潜伏期のあと 5 時間で約 41° の最高体温を示し、その持続時間は約 12 時間であった。

Fig. 1. Typical Fever Curves in Rabbit

(A) —○—: concanavalin A 1 mg/kg i.v.
(B) —●—: purified ricin 0.2 μg/kg i.v.
—×—: bacterial pyrogen (LPS) 0.02 μg/kg i.v.

TABLE I. Pyrogenicity of Concanavalin A and Purified Ricin

	Dose (mg/kg)	FI-10
Concanavalin A	0.1	10.5
	0.5	20.0
	1.0	39.7
	1.5	45.0
Purified ricin	0.0002	39.0

Con. A の家兔に対する最少発熱量は 0.5 mg/ml/kg であり、他の発熱性物質に比べ活性が弱いにもかかわらず、安定した発熱反応を観察することができる。しかし、1 mg/ml/kg の投与では Atkin らの報告⁵⁾と異なり、二峰性の発熱曲線は得られず、潜伏期と持続的な特徴をもつ発熱曲線を示した。

つぎに家兔耳静脈より Con. A を静注した場合、その投与量と発熱量の関係を Table I に示した。1.5 mg/ml/kg 以上の投与により頭打ちの状態となる。Con. A 1 mg/ml/kg の発熱量は ricin 0.2 μg/ml/kg とほぼ等しい値を示した。

2) Con. A の反復投与による発熱耐性獲得について

Ricin あるいは他の発熱性物質 (LPS, リゼルギン酸など) は反復投与することにより発熱反応に対する顕著な耐性獲得がおこる。

そこで Con. A 1 mg/ml/kg を一週間の間隔をおいて家兔の耳静脈に連続投与すると、発熱量の低下と持続時間の短縮がおこり発熱反応の耐性獲得が認められた。さらに耐性獲得にともなって血清中の抗体価も上昇し、Fig. 2 に示すように抗体の産生も極めて速やかであ

7) T. Wiedmer, R. Gentinetta, V. Brodbeck, *FEBS Letters*, **47**, 260 (1974).

8) 医科学研究所学友会編, “細菌学実習提要,” 丸善株式会社, 東京, 1968, p. 227.

9) S. Hestrin, *J. Biol. Chem.*, **18**, 249 (1941).

Fig. 2. Antibody Formation and Pyrogenicity in Rabbit Injected with Concanavalin A

1 mg of concanavalin A/kg was injected *i.v.* at 7-days intervals

Fig. 3. (A) Tolerance of the Fever Response by the Repeated Injections of Bacterial Pyrogen (LPS)

0.2 μ g of bacterial pyrogen/kg was injected *i.v.*

(B) Fever Response Curves of Concanavalin A on Bacterial Pyrogen Tolerant Rabbit

1 mg of concanavalin A/kg was injected *i.v.*

(A) —○—: 1st day —●—: 10th day

(B) —○—: control rabbit

—●—: bacterial pyrogen tolerant rabbit

った。

Atkin ら⁹⁾は Con. A の 1 mg/ml/kg を家兎の耳静脈に投与するとき、LPS と同様な二峰性の発熱反応を示すと報告しているが、Bruson ら¹⁰⁾は使用された Con. A の標品が細菌汚染をうけたものとして疑問を示した。そこで LPS 耐性家兎に対する Con. A の発熱反応について検討した。Fig. 3 に示すように、LPS 0.2 μ g/kg を家兎の耳静脈へ10日間連続投与し、LPS 耐性家兎を得た。

この LPS 耐性家兎に Con. A 1 mg/kg を耳静脈より投与したが、Fig. 3 (B) に示すように、その発熱量は

Fig. 4. Antigen-Antibody Precipitation of Concanavalin A

非耐性家兎に同量の Con. A を投与した場合とほぼ等しい。また、Con. A 耐性家兎に LPS を投与した場合は LPS 特有の発熱反応を示し、発熱耐性に交叉現象は認めなかった。

さらに Con. A 耐性家兎に ricin を投与した場合にも発熱性を示し、これらの発熱性物質相互に発熱反応の交叉耐性は成立しなかった。

以上の事実から Con. A の発熱性は Con. A 本来の性質に由来することが明らかになった。

3) Con. A および Ricin の免疫化学的性質

正常家兎の耳静脈に Con. A および ricin を静注するとき、それぞれの抗体が産生され、発熱反応に耐性を示すことが明らかになった。そこで、おのおのの耐性家兎の抗血清を分離し、寒天ゲル内沈降反応を行なった。ricin が単一の抗原抗体反応像を示すのに対し、Fig. 4 に示すように Con. A は抗原抗体反応による 1 本の沈降線のほかに対象血清にもみられる 2 本の沈降線を認めた。

一方、発熱反応における交叉耐性を認めなかった ricin は Con. A 血清に反応を示さず、Con. A は糖蛋白質である ricin と明瞭な沈降線を形成した。

4) Con. A, Ricin および Ricinus Hemagglutinin の赤血球膜および血清 Ach ase におよぼす影響について

Fig. 5. Effect of Concanavalin A, Purified Ricin, Ricinus Hemagglutinin, Lipopolysaccharide and Eserine on Rabbit Erythrocytes Acetylcholinesterase Activity

—○—: concanavalin A —●—: purified ricin
 —●—: ricinus hemagglutinin
 —□—: lipopolysaccharide —△—: eserine

Fig. 6. Effect of Concanavalin A, Purified Ricin, Ricinus Hemagglutinin and Eserine on Rabbit Serum Acetylcholinesterase Activity

—○—: concanavalin A —●—: purified ricin
 —●—: ricinus hemagglutinin —△—: eserine

赤血球膜 Ach ase に対し終濃度 500 μg/ml の Con. A は約 35%, ricin は約 48% および ricinus hemagglutinin は約 45% の阻害を示し, LPS は全く影響を認めなかった. また, Ach ase 阻害剤の eserine は 10^{-5} M/ml で完全に阻害効果をあらわすのに ricin は 50% 阻害にとどまった.

一方, 血清中の Ach ase は基質にアセチルコリンをもちいて, 赤血球膜 Ach ase と同様の操作を行なった. Fig. 6 に示すように eserine が完全阻害を示すのに対し Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin は全く影

Fig. 7. Inhibitory Effect of Preincubation with Concanavalin A (A), Purified Ricin (B) and Ricinus Hemagglutinin (C) on Rabbit Erythrocytes Acetylcholinesterase

□: preincubation ▨: no preincubation

響をおよぼさなかった.

さらに, 赤血球膜 Ach ase の反応系に 2%, 0.5% の牛血漿アルブミンを加えて阻害効果を検討したが, Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin との阻害効果に影響をおよぼさないことが認められた.

5) Con. A, Ricin および Ricinus Hemagglutinin による赤血球膜 Ach ase の阻害様式

一般に eserine の Ach ase 阻害は静電気的な相互作用によるとされ, 荷電状態に関係するといわれている.¹¹⁾ しかしながら, Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin による Ach ase 阻害は eserine のような直接的な作用でなく, 赤血球が凝集されてのち間接的に阻害効果をあらわすと考えられる. すなわち, Ach ase の膜面存在形態は活性面を膜表面に向けており, Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin がこの部位と結合し, 血球の凝集に伴ない Ach ase 阻害が惹起するものと推定される.

そこで Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin と赤血球を 37°, 10 min, preincubate し, 赤血球を凝集させたのち, 基質液を反応液に加えて阻害率を測定し, その結果を Fig. 7 に示した.

おのおの 500 μg/ml もちい, preincubate したものはしない場合の約 2 倍の阻害を示した.

さらに Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin との赤血球凝集作用は D-マンノース および D-ガラクトースによって阻害されることが明らかにされている.⁶⁾ そこで赤血球膜 Ach ase 阻害作用がこれらの単糖類によって妨げられることが予想されるので, Chart 1 の方

11) J. H. Koch, *Australian J. Biol. Sci.*, **9**, 371 (1975).

	Test (μ l)	Blank (μ l)
Con. A, ricin or ricinus hemagglutinin	500	500
Man. or gal. soln.	100	-
Rabbit erythrocyte soln.	300	300
Incubation at 37° for 10 min Centrifugal separation		
Substrate sol.	300	300

Add buffer to 1.2 ml and measurement

Chart 1. Assay Procedure

法にしたがってその効果をしらべた。

糖質を含む反応系と含まぬ反応系について、37°, 10 min. preincubate したのち、遊離の糖と Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin を遠心分離して除き、基質を添加し、赤血球膜 Ach ase の活性を測定した。

Fig. 8. Effect of Concanavalin A (A), Purified Ricin (B) and Ricinus Hemagglutinin (C) on Rabbit Erythrocytes Acetylcholinesterase in the Presence of Sugar

□ : with sugar ▨ : without sugar

Fig. 8 に示すように、マンノース、ガラクトースの 1 M/ml 溶液で赤血球の凝集は完全に抑制された。したがって、この赤血球の凝集抑制が Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin による赤血球膜 Ach ase 阻害を

妨げていることがわかった。

考 察

Ricin は発熱活性および血管透過性亢進など細菌の夾膜を構成する LPS と同様の活性を示したが、その物性の異なるため活性を比較するにあたり困難を伴った。そこで著者らは、単純蛋白質である赤血球凝集因子 Con. A が細胞凝集活性が ricin と類似であること⁶⁾、赤血球膜上の receptor が Band III ポリペプチドで ricin と共通すること^{12,13)}に着目し、その生理活性に類似が認められるのではないかと想定した。

Con. A の最少発熱量は 0.5 mg/ml/kg で ricin のそれと比較すると、極めて大量である。しかし、LPS, 2,4-ジニトロフェノールおよびリゼルギン酸ジエチルアミド (LDS) など¹⁴⁾の示す一過性の発熱と異なり、潜伏期と持続性をもつことは ricin と良く類似する。また LPS, ricin の発熱反応における交叉耐性を認めない事実から、Con. A そのものに由来する発熱活性である。

さらに LPS 発熱家兎に顕著にみられる内因性発熱物質 (endogenous pyrogen, Ep) の存在を Con. A 発熱家兎の血清中を検索したが、ricin と同様認められなかった。

つぎに、赤血球膜 Ach ase に対し Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin の影響を調べた。Ach ase 阻害剤である eserine は 10^{-5} M/ml で Ach ase 阻害をあらわすのに比較し、Con. A および ricin の場合は 500 μ g/ml をもちいてもそれぞれ 35%, 50%にとどまり、血清中の Ach ase には全く阻害をあらわさなかった。しかしながら、あらかじめ赤血球と上記物質を preincubate させ凝集がおきるときは阻害が強くあらわれ、D-マンノース、D-ガラクトースの添加により、その阻害が妨げられるという事実から、Con. A, ricin および ricinus hemagglutinin の赤血球膜 Ach ase 阻害は血球凝集に基づく二次的に発現したものと考察される。

謝辞

本研究に終始御指導鞭達いただいた国立衛生試験所大阪支所薬理微生物部長 加納晴三郎博士に深謝いたします。

12) W.L. Adair, S. Kornfeld, *J. Biol. Chem.*, **249**, 4696 (1974).

13) J.B.C. Findlay, *J. Biol. Chem.*, **249**, 4398 (1974).

14) 田中 悟, 桑村 司, 大森義仁, 中尾 健, 医薬品研究, **3**, 419 (1972).