脈管透過促進因子の測定について

佐藤 一英・田中 徳満・三橋 進

群馬大学医学部微生物学教室 (主任 三橋 進教授)

[受付: 9月5日・1960年]

炎症に際して脈管透過亢進がみられるが, 炎症の浸出液中に Permeability factor が存在するか否かは古く Menkin^{1,4)}, Loos⁵⁾, Bier⁶⁾等によつて論ぜられてきた。しかしこれらの研究の最も大きな難点はその測定法の不備にあった。

Feldberg 等⁷⁾は蛇毒, ブドウ球菌毒素, ペプトン等を肺血管に灌流することによつて, 毛細管の透過性を測定する試みを発表した。

1936年 Menkin⁸⁾は家兎皮内に測定すべき物質を注射し, 直ちに Trypan blue を静注し, 血管を透過して皮下に現れた色素斑を測定する方法を発表し, 炎症浸出液中より Leukotaxine⁹⁾を単離した。この方法は従来の方法に比し極めて優れ, この方面の研究には賞用されてきた。

吾々は偶々蛇毒に著るしい脈管透過促進作用のあることを知った¹⁰⁾。しかし Menkin の方法に従つて測定すると, 蛇毒には種々の酵素が含まれ拡散因子¹¹⁾の強い分割を使用すると, 浸出した色素の面積は極めて広いが色調が薄く, 脈管透過促進作用の強い部分の精製が進むと色素の拡散は少いが色調の濃いことに気づいた。従つて透過した面積を測定する代りに脈管から透過した色素自体の濃度を定量する必要に迫られ本実験を開始した。

実験方法並びに材料

実験動物: 群馬中央実験動物室生産のものおよび市販のラットを使用した。体重 150 g 前後のものを揃え, 水および固型飼料で飼育した。

色素液: 生理食塩水に 1% の割に溶かした Trypan blue, 生理食塩水に 0.5% の割に溶解した Evans blue を用いた。

皮膚より色素を抽出するために蛋白分解酵素として Pronase¹²⁻¹⁶⁾を用いた。

実験結果

Menkin⁸⁾は試料を家兎腹部皮内に注射し, 15分後 1%

Trypan blue を耳静脈より 10ml 注射し 4 時間後に皮内に浸出した色素の面積を測定する方法をとつた。吾々はこの方法によつて皮内に浸出した色素を抽出し比色定量することを試みた。

すなわち青く染つた皮膚を切りとり缺で細分した後, pH 7.8, $1/15$ M 磷酸緩衝液に 0.5% の割に溶解した Pronase, 1 ml を添加し 60°C, 60 分作用せしめた。消化を受け軟化し粘稠性を帯びた液に蒸留水 2 ml を加えガラスホモジナイザーで磨砕する。更に蒸留水を加え全量 10 ml とし 3,000 r.p.m., 20 分間遠心を行う。この液の最上部に脂肪層が, 中間に透明の Trypan blue 液層, 最下層に組織の粗大粒子の沈澱がみられた。この中間層を毛細管ピペットで吸引し, 10,000 r.p.m., 15分間遠心を行つた。しかし依然として混濁が認められ, Trypan blue 色調丈けを光電比色計で定量する際濁りが測定妨げとなつた。

この濁りを除く為に更に高速で遠心するか, 濾紙で濾過すると, 色素の一部は濾紙上又は遠心沈澱された部分に吸着して青色を呈しておる。苛性ソーダ, 塩酸等によつて組織を分解し, Trypan blue のみを抽出する試みも失敗に終つた。

次に皮膚蛋白に結合した Trypan blue を Pronase で消化後, 等量のエチールアルコール, エチールエーテル, アセトン, 酢酸エチール等の溶媒を加え室温 2 時間放置して色素の抽出を試みたが Trypan blue は抽出されなかつた。

以上の結果から Trypan blue と蛋白の結合は強固で色素のみを光電比色定量可能な状態に抽出するには Trypan blue が不適當であることを知つた。

SATO Ichiei, TANAKA Tokumichi and MITSUHASHI Susumu: Measurement of the Extent of Increased Capillary Permeability. Department of Microbiology, School of Medicine, Gunma University. (Director: Prof. S. Mitsuhashi)—Jap. J. of Bact., 16 (3), 195-198. 1961.

Clausen¹⁷⁾等は血液又は組織中に浸出した色素を測定するために Evans blue を使用した。吾々はこの方法に次のような改良を加え皮膚組織から色素を収率よく抽出し、比色定量することに成功した。

Clausen 等の使用した臓器は心筋、小腸、脳、肝、腎等であるが、吾々は以上の臓器に比し固く、磨砕の困難な皮膚を使用する為 Pronase による酵素消化が必要であった。

150 g 前後のラットの背部皮内に測定すべき試料を注射し、5分後 0.5% Evans blue 液 0.5ml を尾静脈より注射した。数分後に試料を注射された部位の皮膚は青染する。30分後エーテル麻酔を施したラットの皮膚を剥離し、鋏で細分する。これに pH 7.8, $\frac{1}{15}$ M 磷酸緩衝液に 0.5% の割に溶解した Pronase, 1 ml を加え 60°C, 60分作用せしめる。軟化し粘稠となつた組織液に飽和尿素液を加え全量 5 ml にする。ガラスホモジナイザーを用いて磨砕後充分冷却したアセトン 5 ml を加えて直ちに振盪しよく混和後 10 分間放置する。ついて、10% ZnSO₄, 0.5ml および 2% NaOH, 0.5ml を加えて混和、15分放置し、東洋濾紙 No. 11 で濾紙し、濾液を光電比色計 (610 m μ) で比色定量した。Evans blue 濃度は予め作製した標準曲線より算定した。

注射部位による透過色素量の変動

動物皮膚への色素の透過は血管の分布、皮膚の固さの差異等によつて変動することが考えられる。そこで図 1 に示す如くラット背部を正中線および四肢附着部を目標に 12 区劃に分け、ハブ毒 7.5 μ g をそれぞれの部位の皮内に注射し Evans blue 色素の透過を比較した。

実験の一部は表 1 に示した。背部の 4, 5, 8, 9, の 4 個所に透過する Evans blue 色素量は極めてよく一致した。

3, 7, 6, 10 の如く腹部に近い側では色素透過量が大きい。頭部、尾部に近い部位の色素透過量はこれに反した。

以上の結果から正中部 4 区劃を利用し、5 区のラットにつき変動を観察したが上記と全く同様の傾向を示し、正中部 4 個所の色素透過量は $(3.0 \pm 0.2) \times 10^{-8}$ M と極めてよく一致した。よつて以下の実験には全てこの部位に試料を注射した。

組織重量別による色素回収量の変動

上記背部に前と同様ハブ毒 7.5 μ g を皮内に注射し、切りとる皮膚片を種々に変え透過色素を抽出定量した。この結果は表 2 に示した。

すなはち重量 300mg の皮膚内の色素も、1,000 mg の皮膚片より抽出される色素量も同様に抽出された。このことは青斑の面積は異つていても、その中に含まれる Evans blue 色素は正しく抽出され、また青斑部を中心として切りとる皮膚片の重量を必ずしも厳重に揃える必要のないことを示しておる。

皮内注射色素の回収率

図 1 注射部位による色素透過量の変動

各部位の皮内にハブ毒 7.5 μ g を注射し、本文に記載の方法で透過してきた Evans blue 色素量を比較した

表 1 背部皮膚各部位による Evans blue 色素透過の差異

注 射 部 位	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
抽出色素量 (10^{-8} M)	3.45	3.40	3.60	3.0	3.0	3.85	5.20	3.0	3.0	4.25	3.45	3.45

各部位の皮内にハブ毒 7.5 μ g を注射し、本文記載の方法で透過した Evans blue 色素を比色定量した。

表 2 切りとつた皮膚の重量差による抽出色素量との関係

切りとつた皮膚重量 (mg)	300	600	800	1000
抽出色素量 (10^{-8} M)	3.24	3.27	3.24	3.24

ハブ毒 7.5 μ g 皮内に注射し、切りとる皮膚の重量を種々にかえ、この部位に透過する Evans blue 色素を本文記載の方法で抽出定量し、切り取った皮膚重量との関係を調べた。

Evans blue, $0.25 \times 10^{-8} \sim 10 \times 10^{-8}$ M の種々の量をラッテ皮内に注射し、10分後、皮膚を剥離して前述の方法で色素を抽出し比色定量した。この結果は表 3 および図 2 に示した。

表 3 皮内に注射された Evans blue 色素の抽出率

注射された色素量 (10^{-8} M)	皮内から抽出された色素	
	抽出量 (10^{-8} M)	回収率 (%)
0.25	0.23	91.0
0.5	0.46	92.2
1.0	0.92	92.0
2.0	1.88	94.0
3.0	2.77	92.3
4.0	3.68	92.0
5.0	4.61	92.2
6.0	5.60	93.3
7.0	6.56	93.7
8.0	7.60	95.0
9.0	8.67	96.4
10.0	9.52	95.2

図 2 皮内注射色素量と抽出量との関係

種々の量の Evans blue を皮内に注射し、それぞれの部分から抽出した色素量と、注射した色素量との関係を示す

Evans blue 0.25×10^{-8} M より 10×10^{-8} M に至る各濃度においては、皮内に注射した色素量と抽出された色素量との間には直線関係がみられた。この直線部分に相当する色素量の回収率は 91.0 ~ 94.0% の間にあつた。3 回の実験、24 の全測定の色素回収率の平均値は 92.5% であつた。

従つて実際皮内局所に透過する Evans blue 色素濃度を C とし、抽出し実測された定量値を x とすると

$$C = Kx$$

但し K は抽出率、従つて

$$C = \frac{100}{92.5} \times x = 1.08x$$

となる。

総括並びに結論

炎症、アレルギー、或は毒素、薬物による毛細血管の障害等によつて脈管透過性が促進される事実は古くから注目され、Menkin によつて Trypan blue 法が考案せられた。

ハブ咬傷患者、ハブ毒注射実験動物において咬傷部位又は注射部位において著しい腫脹が特徴的である¹⁰⁾。

この腫脹因子の解明を目的として吾々は Trypan blue を用いたが、色素の拡散面積はハブ毒中に含まれておるヒアルロナーゼによつて著しく変動することを知つた。すなわち、面積は広いが色調の淡い場合と、面積は狭いが色調の濃い場合があつて、定量化するためには、皮内に実際透過した色素量を測定する必要に迫られた。

Menkin の方法に代つて Clausen 等の Evans blue 法を使用し、更に Pronase を用い皮膚を消化することによつて極めて収率よく色素が抽出された。

Pronase は基質特異性が広く、極めて強く動物蛋白を消化する点でこの目的になつておる。

上記の実験から得られた結果は次の如し。

1) 一旦蛋白に結合した Trypan blue は結合が極めて強く、蛋白消化法、尿素、アルカリ、酸による分解、溶媒等で比色定量できるように完全に抽出することは不可能であつた。

2) Evans blue は蛋白消化法を併用することによつて極めて収率よく抽出される。

ラッテの皮膚に注射された Evans blue は $0.25 \times 10^{-8} \sim 10 \times 10^{-8}$ M の濃度迄は注射された色素量と抽出される色素量との間には直線関係がみられ、ラッテ皮膚からの平均抽出率は 92.5% であつた。

3) ラッテ背部の各部位によつて色素の透過性は変動

し、腹部、頭部又は尾部に近い部位の透過性が大で、背部中央正中線に近い部位が最も変動が少く正確な測定に適當である。

文 献

- 1) Menkin, V.: J. Exp. Med., **50**, 171, 1929.
- 2) Menkin, V.: J. Exp. Med., **51**, 879, 1930.
- 3) Menkin, V.: J. Exp. Med., **52**, 201, 1930.
- 4) Menkin, V.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **27**, 1020, 1930.
- 5) Loos, H. O.: Arch. f. Dermat. und Syph., **164**, 199, 1931.
- 6) Bier, A.: Arch. f. Klin. Chir., **176**, 407, 1933.
- 7) Feldberg, W. and C. H. Kellaway: J. Physiol., **90**, 257, 1937.
- 8) Menkin, V.: J. Exp. Med., **64**, 485, 1936.
- 9) Menkin, V.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **40**, 103, 1939.
- 10) Mitsuhashi, S., Maeno, H., et al.: Jap. J. Microbiol., **3**, 95, 1959.
- 11) Maeno, H., Morimura, M., Mitsuhashi, S., et al.: Jap. J. Microbiol., 印刷予定.
- 12) 野本正雄・奈良橋快子: 理研報告, **34**, 381, 1958.
- 13) 野本正雄・奈良橋快子: 理研報告, **34**, 393, 1958.
- 14) 野本正雄・村上碩: 理研報告, **35**, 90, 1959.
- 15) 野本正雄・村上碩: 理研報告, **35**, 154, 1959.
- 16) 野本正雄・村上碩: 理研報告, **35**, 261, 1959.
- 17) Clausen, F. C. and N. Lifson, Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **91**, 11, 1956.