毒素アナフィラキシーに関する研究

(第1報) 毒素アナフィラキシーの生体内及び試験管内表現について

石坂 公成

國立予防衛生研究所血清学部 (主任 中村敏三部長)

〔受付: 9月1日, 1951年〕

緒言

元来アナフィラキシーなる現象は抗毒素免疫に関する研究の途上に於て発見されたものであるが、それにもかかわらず眞の毒素によるアナフィラキシーの研究は極めて少く、僅に Fleming¹⁾等がデフテリア毒素によるモルモットのアナフィラキシーを観察しているに過ぎない。しかもこの当時の毒素は未だに精製が不充分であつた所から、之が眞の毒素アナフィラキシーであるか否かに就いては疑問が残されている。所が一方、免疫とアレルギーとの関係を迫る爲には先づ抗毒素免疫と毒素アナフィラキシーとの関係を明らかにする事が先決問題と考えられ、この点で毒素アナフィラキシーなる現象が重要な意味を有するわけである。そこで私は眞の毒素によつてアナフィラキシーが発現するか否かを検討した結果、眞のデフテリア毒素によるアナフィラキシーを生体内及び試験管内に於て発現せしめる事に成功したので之を報告する次第である。

実験材料及び実験方法

実験動物としてはモルモットを用い、多くの場合アナトキシン 5 cc, 1 カ月後毒素 10 M.L.D. で充分に免疫したものを実験に供した。なお之等のモルモットの免疫の程度を見る爲には、家兎の皮内反應により血中抗体価を測定して参考とした²⁾。アナフィラキシーを誘発せしめる爲に用いた抗原は、いずれも予研の黒川、村田両博士より分與されたもので、1) マルタンブイオンに P-W No. 8 株を培養して得られた粗毒素 (Lf=25), 2) 精製アナトキシン (Lf=800, 精製度 95%), 及び 3) アナトキシンの硫酸の 25% 飽和で沈澱させて得た分割 (Lf=125) である。なおこのアナトキシン分割は Kf が極めて長く、生体内抗原性も極めて弱い³⁾。又之等の外に、Miller & Müller の培地に鉄を多く加えて、デフテリア菌 (P-W No. 8 株) を培養して得た培養濾液を抗原として使用した。この培養濾液中には毒素は殆んど存在しないが、菌体成分を粗毒素と同程度に含んでいると思われるので、粗毒素に依るアナフィラキシーがその中に含まれる菌体成分に依るものか否かを明らかにする爲に、対照の意味

で用いたものである。

又試験管内アナフィラキシーの表現には Schultz-Dale 法を利用し、上記の如く能動的に免疫したモルモットの腸管を用いて実験を行つた。

実験成績

I. 生体内毒素アナフィラキシー: 先づモルモットを市販のアナトキシン 5 cc で免疫後 1 カ月でその血中抗体価を測定した所、その血中抗体価は 0.5 乃至 1.25 単位/cc であつたので、その 6 頭に粗毒素 0.3 乃至 1 cc を後肢靜脈内に注射した所、0.5 cc 以上注射したものでは、定型的アナフィラキシーショックを起し、内 3 頭はショック死を遂げた。即ち能動免疫モルモットは、毒素注射によりアナフィラキシーショックを起す事は確實である。そこで次には、被動性に抗毒素血清で感作したモルモットが、毒素注射によつてアナフィラキシーを発現するか否かを検討した。所が感作にフロキュラシオン用の抗毒素馬血清を用いた場合には、感作後 24 時間で誘発注射を行つても、明らかなアナフィラキシーショックは全然認められなかつた。そこで始にアナトキシン、次いで毒素でモルモットを強力に感作し、このモルモットより抗毒素血清を採取し、之によつて健康モルモットを被動性に感作した。この血清は家兎の皮内反應から 12.5 単位/cc であつたので、之を健康モルモットの腹腔内に 1.6 乃至 2 cc 注射して血中抗体価が 1 単位/cc となる様にし、感作後 18 時間で粗毒素 0.3~0.6 cc を感作動物の後肢靜脈内に注射した所、能動免疫の場合に比すれば程度は弱い、明らかにアナフィラキシーショックを発現せしめ得る事が出来た (表 1)。

以上の結果から、免疫モルモットの靜脈内に毒素を注射する時にはアナフィラキシーショックが発現する事が明らかとなつたが、果してこのアナフィラキシーが眞の毒素抗毒素間の抗原抗体反應に依るものであるか、或い

ISHIZAKA, Kimishige: Studies on the Toxin-anaphylaxis. I. Observations of the toxin-anaphylaxis in vivo and in vitro. The National Institute of Health of Japan. Jap. J. Bact. 7(2): 127-130, 1952.

表1 粗毒素による受動アナフィラキシー

No.	體重	感作 血清量*	再注射前 の血中抗 體價	毒 素 注射量	アナフィ ラキシー
1	370g	2. cc	1 單位/cc	0.3cc	—
2	300	1.62	1	0.4	±
3	310	1.64	1	0.5	+
4	320	1.73	1	0.6	+
5	370	2.	1	0.6	++

* 感作には抗毒素モルモット血清 (1.25u/cc) を用いた。

は粗毒素液に含まれる毒素以外の抗原によるものであるかは明らかでないので次には精製アナトキシンを誘発注射の際に用い、この場合にも果してアナフィラキシーが発現するか否かを検討した。即ち強力に免疫したモルモットの後肢静脈内に、最終免疫後 14 乃至 18 日目に精製アナトキシン (Lf 800 のものを生理的食塩水で 20 倍に稀釈して Lf 40 とし直ちに使用した) を 0.1~0.5cc (4~20 Lf) 注射した所、表 2 に示す如く、明らかにアナフィラキシーショックが起つた。前にも述べた様に、この精製アナトキシンは 95% までが純粹のアナトキシンである所からして、こゝに発現したアナフィラキシーショックは眞のデフテリア毒素—抗毒素間の抗原抗体反應にもとづくものと考えてよいであろう。

表2 精製アナトキシンによるアナフィラキシー

No.	體重	誘 發 注射日	血 中 抗體價	誘 發 注射量*	アナフィ ラキシー
1	360g	18日	0.5u/cc	0.5cc	++
2	405	18	0.5	0.3	++
3	310	18	1	0.1	++
4	410	18	0.5	0.1	++
5	380	14	5	0.3	+
6	360	14	10	0.3	±
7	400	14	2	0.5	++
8	350	14	5	0.5	++

* 注射アナトキシンは 40Lf/cc
免疫はアナトキシン 5cc, 1 カ月後毒素 10
MLD にて行い誘発注射日は最終免疫後の日
数を示す。

II, 毒素アナフィラキシーの試験管内表現: 以上の様に生体内に於ては精製アナトキシンによつてもアナフィラキシーを発現せしめる事が出来たが、更に之が毒素以外の抗原物質によるものではないという事を確立する爲に、Schultz-Dale 法を利用して試験管内に於て毒素アナフィラキシーを表現せしめ、之が眞の毒素によるもので

ある事を検討せんとした。即ち上述の場合と同様に、能動性に免疫したモルモットの血中抗体価を、最終免疫後 3 週間で測定した所、8~10 單位/cc であつたので、全採血の後、腸管を切出し、之が毒素及び精製アナトキシンにより特異的に収縮するか否かを Schultz-Dale 法によつてしらべた。

1) 抗原として粗毒素を用いた場合: 先ず栄養槽内の濃度としてアセチルコリンを 10^{-8} g/cc になる様に加えた場合の腸管の収縮を対照とし、之と同程度の収縮を起すに要する粗毒素の量をしらべてみると、その量は 0.3 cc (Lf 7.5) 即ち 5.0cc の栄養槽内の濃度としては 0.15 Lf/cc であつた。そこでよくこの腸管をタイロード液で洗つた後、更に 0.3cc の毒素を栄養槽内に加えてみると、腸管は僅かしか之に反應せず、明らかに脱感作が成立していた (図 1)。即ちこの事から、毒素による腸管の収縮

圖 1: A アセチルコリン, T 粗毒素 (Lf 25)

はアナフィラキシー性のものである事がわかる。そこで対照として同一動物の腸管の他の一片に粗毒素を 60°C 30分加熱したもの 0.3cc を作用させてみたが、腸管は全く反應しなかつた。随つて粗毒素による腸管の収縮は、その中に含まれる易熱性抗原によるものである事が明らかである (図 2)。そこで次に Miller & Müller の培地に鉄

圖 2

を多く加えた際の培養濾液 0.3cc を他の腸管に切片に作用させてみた。所が腸管は之に対して僅かに反應するが、之によつては毒素に対する脱感作は全然起らなかつた (図 3)。前述の様にこの培養濾液中には毒素は殆んど存在しないが、菌に基く毒素以外の物質は粗毒素と同程度に含まれていると考えられる。随つて以上の結果から粗毒素による感作動物の腸管の収縮は、眞の毒素によるアナフィラキシー性の収縮と考えられる。然しながらこゝに用いた抗原は粗毒素であるから、更に精製アナトキ

シンを抗原として用い、上の結果を確認せんとした。

圖3 P-fraction: 菌體蛋白で Miller & Müller 培地に鐵量を多くして培養した培養濾液

2) 抗原として精製アナトキシンを用いた場合: 精製アナトキシンは生体内に於ける実験と同様、食塩水で稀釈して Lf 40 として実験に供した。即ち上述の場合と同様に強力に免疫したモルモットの腸管の切片に、精製アナトキシン 0.3cc (Lf 12) を作用させた所、標準のアセチルコリン 10^{-8} による収縮と同程度の収縮が起り、しかも脱感作も成立していた (図4)。又同一動物の腸管の他

圖4: An 精製アナトキシン (Lf 40)

圖 5

圖6 P. An: 精製アナトキシン (Lf 25)

の切片は、60°C 30分加熱アナトキシン 0.3cc には僅かに反応するが (図5)。70°C 1時間加熱アナトキシン

0.3cc に対しては全く反応しなかつた (図6)。

以上の結果から、粗毒素及び精製アナトキシンによる腸管の収縮は、ジフテリア毒素に特異的なアナフィラキシー性の収縮である事がわかるのである。

III, 毒素アナフィラキシーに於ける抗原の Lf, Kf の意義: 上述の如く、私はジフテリア毒素に対する毒素アナフィラキシーを生体内及び試験管内に於て発現せしめる事に成功したので、次に抗原の Lf 及び Kf が毒素アナフィラキシーに於て如何なる意義を有するかを検討してみた。

動物及びその感作方法は先に述べた所と同様である。なお抗原としては上述の粗毒素、精製アナトキシン及びアナトキシンを硫酸の25%飽和で沈澱させた分割を用いた。

先づ予備実験として、之等の抗原を生理的食塩水で稀釈し、すべて Lf 25 とし、各々の Kf を測定した所、粗毒素は Kf 30分、精製アナトキシンは Kf 2時間であり、アナトキシンの25%分割は直接法では一晝夜でもフロキュレーションは起らなかつた。

こゝに於て、感作モルモットの後肢静脈内に最終注射後8日目に精製アナトキシン及び Kf の長いアナトキシン分割を注射してアナフィラキシーを起させ、注射抗原の種類によつて、アナフィラキシーの発現が如何に変化するかをしらべた。その結果は表3に示す如く、誘発注射に用うる抗原の Lf 量が同一であれば、それらの Kf には無関係に、アナフィラキシーは同程度に起るものである事が推定される。併しこの様な生体内の実験では、動物の個体差が問題となるので、同一感作動物の腸管を用い、腸管に同程度の特異的収縮を起さしめるに要する抗原量を Sc-

表3 アナフィラキシーの発現と抗原の Lf, Kf との関係

注射抗原	No.	體重	注射抗原量	アナフィラキシー
精製 An	1	380	0.5cc	20Lf
Lf=40	2	355	0.6	24
Kf=30分	3	375	0.8	32
An 分割	4	400	0.45	18
Lf=40	5	420	0.6	24
Kf>18時間	6	360	0.8	32

hultz-Dale 法によつてしらべ、之によつて毒素アナフィラキシーに於ける抗原の Lf, Kf の意義を更に詳細に検討した。

その結果は(図7, 8)に示す通りで、対照としてとつたアセチルコリン $1.6 \times 10^{-8} \text{g/cc}$ による腸管の収縮と同程度の収縮を起すに要する抗原量は、3者とも 0.1cc 即ち Lf 量として Lf 25 に相当するものであつた。尤も Kf の長いアナトキシン分割の Lf 2.5 による収縮は他の抗原のそれらに比して多少小さい様であるが、作用させるアナトキシン分割の量を Lf 3 とすれば、他の抗原の Lf 2.5 による収縮より大きな収縮が得られる(図8)。しかもこの分割の Lf は間接法によつて測定したものであり、Lf の測定には 20% 程度の誤差が入る事は当然と考えられるから、この程度の収縮の差は殆んど誤差範囲と考えて差支えない。

図7 LAn: アナトキシンの硫酸 25% 分割で Kf の長いもの

図 8

随つて以上の結果から、毒素アナフィラキシーの発現は抗原の Kf には関係なく、Lf によつて決定されるものと思われる。

一方ここに使用したアナトキシン分割の 1 Lf あたりの蛋白窒素量は、精製アナトキシン 1 Lf 当りの蛋白窒素量の約 5 倍であり、粗毒素の 1 Lf 当りの蛋白窒素量は精製アナトキシンのその約 355 倍であつた。それにもかゝらずアナフィラキシーの発現が抗原の種類に関係せず、Lf 量によつて決定される事は、ここに現われたアナフィラキシーが眞の毒素アナフィラキシーである事の一つの論拠となると考えられる。

考 察

免疫とアレルギーとの関係を追究する上に於ては、先ず免疫に於ける抗体の関與が最も明らかである所の抗毒

素免疫と毒素アナフィラキシーとの間の関係を明らかにする事が先決問題と考えられる。しかるに現在迄毒素アナフィラキシーに関する研究は極めて少く、眞の細菌毒素によるアナフィラキシーの発現は、未だに明らかにされていない。そこで私はこの点に関して研究を行つた結果、眞の毒素によるアナフィラキシーショック及び Schultz-Dale 法による試験管内毒素アナフィラキシーを発現せしめ得る事に成功した。この事は粗毒素及び精製アナトキシンの加熱液、及びデフテリア菌体成分を粗毒素と略々同様に含む培養濾液による対照からも明らかであるが、更にこのアナフィラキシーが抗原の含有蛋白窒素量には無関係で、それらの Lf によつて決定されるという事実は、このアナフィラキシーが眞の毒素アナフィラキシーである事を明確にするものと思われる。

又抗原の Kf が全くアナフィラキシーの発現に無関係であるという事実は、抗原と組織抗体との結合が、抗原の Kf の長短にかゝらず、いずれも極めて迅速に起る事を示すものであると共に、アナフィラキシーが抗原抗体反応の極めて初期の結果として起るものである事を物語るものであろう。

結 論

- 1) デフテリア毒素による眞の毒素アナフィラキシーを生体内及び試験管内に於て発現する事に成功した。
- 2) この毒素アナフィラキシーの発現は、用いる抗原の Lf によつて決定されるもので、抗原の種類及び Kf には無関係である。
- 3) 以上の事実から、組織抗体と抗原との結合は、抗原の Kf には関係なく、Kf の長い抗原も、短い抗原も同様に、極めて速かに組織抗体と結合するものと思われる。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導並に御校閲を賜つた中村部長に深甚の謝意を表し併せて材料の分與と絶大な御支援を賜つた黒川、村田両博士を始め予研デフテリアトキソイド検定室の方々に厚く御礼を申し上げる次第である。

文 献

- 1) Neil, J. M., Fleming, W. L.: J. Immuno., 17, 419, 1929.
- 2) Claus Jensen.: Die Intrakutane Kaninchen methode, zur Auswertung von Diphtherie-Toxin und Antitoxin. 1933.
- 3) 黒川、村田、中野、山田、久保田: デフテリアトキソイドの抗原性に関與する因子に関する研究、未発表。