Neuraminidase の動物輸注実験

—neuraminidase と炎症の関連—

目黒 嵩・山田兼雄*, 稲垣 稔**

Infusion study of neuraminidase in rabbit—role of neuraminidase on inflammation

Takashi Meguro・Kaneo Yamada*, Minoru Inagaki**

生体において外因性、内因性いずれかの原因で neuraminidase 活性が上昇すれば生体の糖蛋白、糖ペプチド、脂質が脱シアル化して、これらの種々の生物活性に重大な影響を与えることが考えられる。感染、炎症により neuraminidase の関与は過去より考えられ、Fischer¹⁾ は肺炎において neuraminidase 活性上昇による thomeen cryptantigen の出現を示した。また、その他の 2~3 の報告²⁾ もあるが、近年筆者ら³⁾ は川崎病で初期に血中 neuraminidase 活性が著明に上昇していることを示した。

今回、筆者らは炎症における neuraminidase の上昇、またこの結果における脱シアル化の変動について検討を行う手がかりとして、neuraminidase の動物への投与実験を行い、種々の炎症反応に現れる諸種の因子の変化を検討したので報告する。

方 法

(1) 輸注方法

2.5~3.5kg の家兎に *Cl. perfergens* の neuraminidase (シグマ社, type V, VI) を Solita T 3 (シミズ薬品) に 5~7u/120 ml に溶解して、無菌的に注入した。

①one shot 注入法: 0.01~1.0u/ml/kg の範囲の neuraminidase を耳静脈より one shot で注入した。

②持続注入法: 2 u/kg/24hr の neuraminidase を infusion sump を用いて 5 ml/hr の流速で耳静脈より、カテラン針 (23G) で持続注入した。

(2) 採血方法

neuraminidase の注入部位と反対側の耳静脈より、21 G の翼付針を用いて血清、クエン酸加血漿、EDTA 血を neuraminidase 輸注前、および輸注後 2 週間まで採血 (1 回 5 ml) した。

①血清: 抗凝固剤なしで全血 1.5 ml 採血し、約 30 分

放置後 3,000 rpm, 10 分間遠心分離して血清を得た。この血清は総蛋白、蛋白分画測定に用いられた。

②クエン酸加血漿: 3.8% クエン酸ナトリウム 1/10 容加血液 2.5 ml 採血し、3,000 rpm, 4°C, 10 分間遠心分離して血漿を得た。この血漿は凝固時間、フィブリノーゲン、遊離シアル酸、オルソモコイドの測定に用いられた。

③EDTA 血: EDTA 2Na 加血液 (1mg/ml) 1.0ml 採血した。これは血小板数、白血球数、赤血球数、Ht、血小板中シアル酸の測定に用いられた。

(3) 測定方法

④血中 neuraminidase の測定⁴⁾: 蛍光合成基質法を用いた。クエン酸加血漿 20 μ l と 60 μ M N-acetylneuraminic 4-methylumbelliferyl ketoside 0.01M PBS (pH 5.9) 200 μ l を 37°C で 4 時間 incubation し、10% Na₂CO₃ 3,000 μ l 添加し、反応停止後 Ex 327nm, Em 448nm で蛍光強度を測定し、標準物質より neuraminidase 活性を求めた。

⑤血中遊離シアル酸の測定⁵⁾: 蛍光法を用いた。クエン酸加血漿 50 μ l と 0.1 N H₂SO₄ 1,000 μ l, 0.025 M periodic acid 250 μ l を加え、37°C, 30 分 incubation し、2% sodium arsenite 200 μ l, 1.62% thiobarbituric acid 2,000 μ l 添加し、7.5 分間水浴中で boiling し、冷水で冷却後、5% HCl-butanol 3,000 μ l で反応生成物を混和し、遠心 (3,000 rpm, 10 分) を行い butanol 層に抽出する。この抽出液を Ex 550nm, Em 570nm で蛍光強度を測定し、標準物質より濃度を求めた。

⑥血中ムコ蛋白の測定⁶⁾: ASPRO-GP 法 (大塚アッセイ研究所) を用いた。被検血漿 100 μ l を除蛋白液 (0.6M 過塩素酸) で除蛋白 (3,000 rpm, 20 分) し、除蛋白上清 200 μ l と呈色試薬を反応させ、15 分放置後、590 nm の吸光度を測定し、標準物質より濃度を求めた。

⑦フィブリノーゲン測定: トロンビン凝固時間法

⑧白血球・血小板数: 自動血球計数機 (Model CC 720, PL-100 東亜医用電子) を用いた。

成 績

(1) one shot 注入法

注入量は 0.5 u/kg が限度であり、一度に多量の注入の場合、血小板の急減あるいは血管内溶血を伴って出血死する例が多くみられた。一方 0.2 u/kg の少量では一

* Department of Pediatrics, St. Marianna University, School of Medicine 聖マリアンナ医科大学小児科学教室

** Department of Pediatrics, Keio University 慶応義塾大学医学部小児科学教室

図1 輸注前後の血中 neuraminidase 活性と血中遊離シアル酸量
(1) 血中 neuraminidase 活性, (2) 血中遊離シアル酸量

図2 輸注前後のムコ蛋白, フィブリノーゲン, 白血球, 血小板数の変動

時的に血小板, 白血球の減少がみられるが直ちに回復し, その後の変化は著明ではなかった。

一方, 0.01 u/kg の血中 neuraminidase 活性の経時的变化は二相性の減衰を示し, 初期半減期は12分であり, 真の半減期は125分であった。

(2) 持続注入法

輸注後, 血中 neuraminidase 活性は $10^{-4} \sim 4 \times 10^{-4}$ u/ml まで上昇し, 輸注中止後の半減期は約2.4時間であり, 約7~10日で前値に復した(図1-1)。このときの血中遊離シアル酸は注入直後に前値の約1.5倍と増加し, その後漸減しながら低下し, 2週後に前値に回復した(図1-2)。

また, 血中 mucoprotein は3~6日目に前値の4倍に増加し, 2週後でも前値の1.5倍と高い値を示し, フィブリノーゲンは2~3日目に前値の5~7倍に増加し, 白血球数は3~6日目に, 血小板数は6~8日目に増加した(図2)。

なお, その他の総蛋白, 蛋白分画, 赤血球などの変動も観察されたが, 現在さらに検討している。

考案

neuraminidase を注入した場合, それ自体による影響と, 反応性に発現した neuraminidase の影響とが存在することが考えられる。neuraminidase の投与法で one shot の場合, 半減期が125分で持続注入では24時間と大きな差異があることは, 後者では反応性の neuraminidase の影響が強いことを推測させるが, 今回の実験ではこれを明瞭に見きわめるまでに至っていない。

neuraminidase の注入による血中の種々の因子の変化が炎症反応自体の変化に類似し, また川崎病の変化にも類似していることは, きわめて興味ある。すなわち, 炎症による諸変化のなかで, neuraminidase との関連によって発現または増強している点, どの程度まで存在するかを見きわめることが, 今後の課題であると思う。

文献

- 1) Fischer, K., et al.: Hämolysse bei schwer Pneumonic infolge Neuraminidase-wirkung Immunofluorescenzdarstellung der Cryptantigene. Mschr. Kinderheilk 119: 2-8, 1971.
- 2) Rodriguez-Iturbe, B., et al.: Neuraminidase activity and free sialic acid levels in the serum of patients with acute poststreptococcal glomerulonephritis. New Eng. J. Med. 18: 1506-1510, 1981.
- 3) 山田兼雄・他: 炎症性疾患における血中 neuraminidase 活性と血小板。炎症, 投稿中
- 4) 目黒 嵩・他: 合成螢光基質を用いた血中の neuraminidase 活性の測定の試み。炎症 1(5): 701, 1981.
- 5) Hammond, K.S., et al.: Fluorometric assay of sialic acid in picomoles range: A Modification of the thiobarbituric acid assay. Anal. Biochem. 74: 292-297, 1976.
- 6) 中嶋克行・他: 酸可溶性糖蛋白の新しい測定法。第28回臨床病理学会, 1981.