

海狸遊離腸管の被働性過敏症に関する研究

第 1 篇

鶏卵白 Albumin 系による最小感作抗体量及び 最小反応抗原量について

岡山大学医学部衛生学教室 (主任: 大平昌彦教授)
指導: 緒方益雄名誉教授)

那 須 昭 三

〔昭和 34 年 6 月 5 日受稿〕

第 1 章 緒 論

1907年 Nicolle¹⁾, Otto²⁾ により被働性過敏症なる現象が発見されて以来多くの学者が本現象の検索を試み、反応に関与する感作免疫血清量、再注射抗原量、潜伏期、感作持続期間等の問題について多数の業績が発表されたが、流血中の沈降素と過敏性抗体との異同については種々の論議があつてなかなか結論が得られなかつた。しかし1927年当教室の緒方益雄教授³⁾⁴⁾が沈降反応における抗原抗体稀釈法を提唱され、この方法によつて一定の抗原濃度に於て最も強く反応が起る事からこの抗原の好適濃度を結合帯と称し、この結合帯に於て抗体の沈降素価を緊密に示し得る事を証明されて以来、景山⁵⁾, 白玖⁶⁾, 杉本⁷⁾, 伊東⁸⁾, 桑名⁹⁾, 石原¹⁰⁾等は被働性過敏症における抗原と過敏性抗体の量的関係を詳細に研究し、被働性過敏症における症状の程度は沈降素量の大小に比例する事を証明してこの異同論に明快な解決を与えたのである。以来この緒方氏法沈降反応に基いて湊¹¹⁾, 大田原¹²⁾, 末永¹³⁾, 桑原¹⁴⁾, 広田¹⁵⁾, 大川¹⁶⁾等によつて詳細な被働性過敏症の研究が行われ、更に最近では単一抗原として結晶卵白 Albumin を用いた緒方¹⁷⁾, 原田¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾の報告がある。

遊離臓器においても生体と同様に過敏症実験を行える事は、1910年 Schultz²¹⁾が感作海狸の腸管が生体と同様に過敏症を起す事を報告し次いで1913年 Dale²²⁾が感作海狸の子宮について同様の報告を行つてより Schultz-Dale 氏現象として過敏症研究の一有力な観察方法として種々の研究に用いられて来た。当教室の桑名²³⁾は遊離海狸腸管を用いて被働性過敏症における感作抗体量と反応惹起抗原量との

関係について詳細な実験を行い、これと緒方氏法沈降反応における結合帯との関係を明らかにした。しかしこの実験は複合抗原たる牛血清を抗原として用いたものであつて、単一抗原を用いて遊離臓器の被働性過敏症を行い感作抗体量及び反応惹起抗原量と結合帯との関係を明らかにしたものは井上²⁴⁾の酵母多糖類を用いた実験の他は見当たらない。

筆者は単一抗原として結晶卵白 Albumin を用いて遊離海狸腸管の被働性過敏症実験を行い、最小感作抗体量、最小反応惹起抗原量を求め、緒方氏法沈降反応によつて求めた感作血清の結合帯との関係について検討した。

第 2 章 実 験 材 料

1. 抗原

Kekwick, Cannan²⁴⁾の方法によつて作つた結晶鶏卵白 Albumin を用いた。第 1 図にその濾紙電気泳動図を示す。

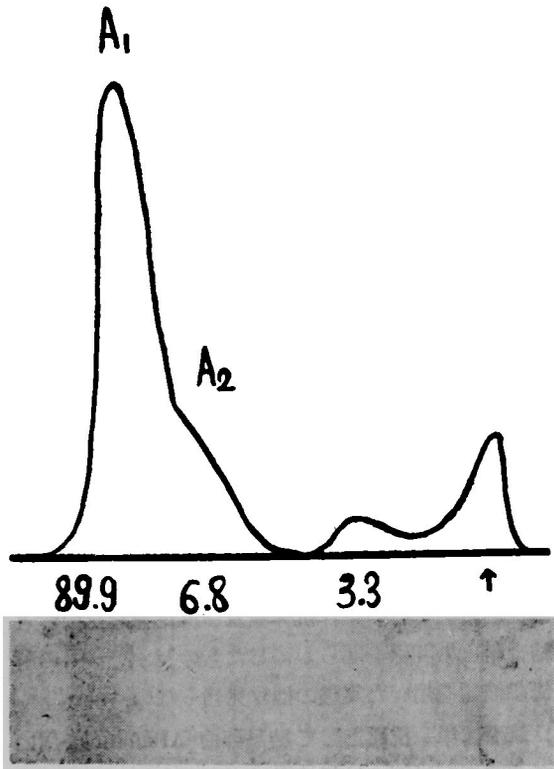
2. 抗体 (抗血清) の作製

Kabat²⁵⁾の方法に従つて、結晶鶏卵白 Albumin 滅菌生理的食塩水溶液に 1%の滅菌明礬水溶液を加え、N/10 NaOH で中和して濁度が最大になつたものを 1.5 mg/ml の蛋白濃度になるように調製し、その 3 ml づつを 3 kgm 前後の家兎の耳静脈より隔日に 14 回注射して感作を行つた。最終注射より 7 日目に頸動脈より放血して全採血し、得た血清は 56°C, 30 分間加熱して非働化し、冷却を待つて 1 : 10,000 のマーズニンを加え、抗体価および結合帯を測定した後氷室に保存して実験に供した。

3. 抗体価および結合帯

抗血清の抗体価は緒方氏抗原抗体稀釈沈降反応

第1図 抗原に用いた結晶卵白 Albumin の濾紙電気泳動図



第1表 使用免疫血清の沈降反応

免疫血清	A				B				C											
血清 稀釈	抗原 稀釈				血清 稀釈				抗原 稀釈				血清 稀釈				抗原 稀釈			
1:250	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:100	1:250	1:500	1:1,000	1:100	1:250	1:500	1:1,000				
	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---				

(第1表)によつて求め、同時にその結合帯を求めた。測定結果を混合沈降反応、補体結合反応の結果と共に第2表に示す。すなわち、抗血清Aは抗体価1:1,000、結合帯1:1,000、抗血清Bは抗体価1:500、結合帯1:1,000、抗血清Cは抗体価1:1,000、結合帯1:1,000である。

なお、抗血清の感作24時間後に結合帯相当抗原量を静脈内に注射して被働性過敏症死を来す最小致死感作抗体量は3血清ともに4単位である(第3表)。

第2表 使用免疫血清の抗体価及び結合帯

免疫血清	重 層 法		混 合 法		補 体 結 合 反 応	
	抗 体 価	結 合 帯	抗 体 価	結 合 帯	抗 体 価	結 合 帯
A	1:1,000	1:1,000	1:250	1:2,500	1:5,000	1:50,000
B	1:500	1:1,000	1:250	1:2,500	1:1,000	1:10,000
C	1:1,000	1:1,000	1:500	1:2,500	1:1,000	1:10,000

第3表 使用免疫血清による被働性過敏症

免疫血清	海猿番号	体 重 gm	感 作		再 注 射		転 帰
			血清量 ml	単 位	抗原量 ml	結合帯 との比	
A	1	350	0.11	4	0.027	1	3分 死生
	2	360	0.06	2	0.028	1	
B	3	270	0.16	4	0.021	1	2分30秒 死生
	4	330	0.10	2	0.025	1	
C	5	260	0.08	4	0.02	1	1分50秒 死生
	6	350	0.05	2	0.027	1	

第3章 実験方法

1. 感作

体重 200~300 gm (平均約 260 gm) の海猿の頸

静脈より抗血清を注射して被働性に感作し、24時間後に実験を行つた。

感作抗血清量は被感作海猿の血液 1 ml 中の抗体量を基準として決定した。すなわち注射した抗血清が被感作海猿の血液の中に稀釈されて血液 1 ml 当りの抗体価が 1:1 となるように注射した場合、これを1単位感作とする。

例えば 1:1,000 の抗体価を有する抗血清を用いて 260 gm の海猿を1単位に感作する場合、体重の 1/13 を以て全血液量とすると、それは $260 \div 13 = 20$ (ml) となる。

この全血液量をもつて抗血清の抗体価を除すると、抗血清 1 ml で感作した場合の海猿血液 1 ml 中の抗体価が求められる。

$$1,000 \div 20 = 50 \text{ (EH)}$$

この価をもつて希望感作単位（この場合は1単位）を除すると、感作するのに必要な抗血清量が求められる。

$$1 \div 50 = 0.02 \text{ (ml)}$$

すなわち、0.02 ml の抗血清を注射するとこの海猿は1単位に感作されたとする。

2. 遊離腸管被働性過敏症の実施

感作後24時間を経た海猿の頸動脈より放血して失血死させ、直ちに開腹して回盲部に近い部分の廻腸片を暴力を加えないように注意して採取し、腸間膜、血管等の附着物を除去し、38°C に保つた Tyrode 氏液中にて各片をそれぞれ約 2 cm の長さに切断する。こうして得た腸管片の内腔は Tyrode 氏液で洗滌して清浄にし、Tyrode 氏液に浸したまま氷室中に保存、4～5時間以内に使用した。

実験はこの腸管片を 38°C に保ち、かつ微細な泡として空気を通じた 50 ml の Tyrode 氏液槽中に牽吊し、下端を固定し上端を横杆に連結してその運動が Kymographion に装着した煤紙上に描記されるようにし、ほぼ一定の律動で運動が行われる迄待った後、栄養液槽内に抗原を注加した。約1時間待っても一定の運動を起さぬ腸管片は放棄した。

3. 注加抗原量

1%結晶鶏卵白 Albumin 溶液を基準とし、栄養液槽中に加えて 50 ml の Tyrode 氏液で稀釈された終濃度が、使用した抗血清の結合帯濃度と等しくなる量が結合帯相当抗原量で、これを中心として注加抗原量を定めた。即ち、結合帯 1:1,000 の場合には1%結晶鶏卵白 Albumin 溶液を10倍に稀釈したもの 0.5 ml を 50 ml の Tyrode 氏液に加えると結合帯相当抗原量となる。

第4章 実験成績

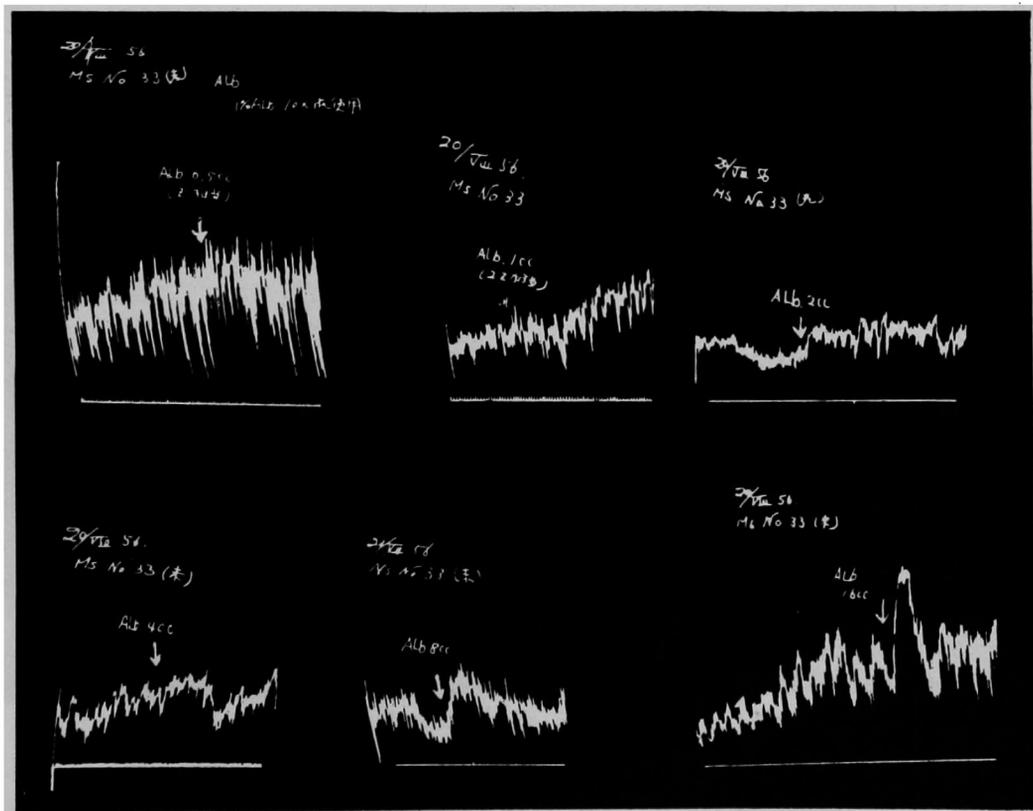
1. 未感作海猿の腸管片に及ぼす抗原の影響

本実験の対照実験として抗血清にて感作していない海猿の腸管片に対する抗原の作用をしらべた。結果は第2図に示す通りである。すなわち 1:10 の抗原 4 ml 迄は腸管運動に何等の影響をおよぼさず、8 ml でわずかに収縮の傾向を示す。この量は使用した抗血清の結合帯相当抗原量の16倍となつて、本実験の使用抗原量の範囲では腸管片の非特異的収縮が起らない事が明らかとなつた。

2. 被感作海猿血清の沈降反応

被感作海猿が計算量の単位に確実に感作されてい

第 2 図 未感作海猿の腸管に対する抗原の影響



るのを確かめるために、放血して得た血清を1%のアラビアゴム生理的食塩水溶液で稀釈し、これに使用抗血清の結合帯相当濃度の抗原溶液を重層して沈降反応を行つた。その結果を第4表に示す。

第4表 被働性に感作された海猿血清の沈降反応

血清	感作位	血清稀釈						対照
		1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	
A	4	+++	+++	++	-			-
	2	+++	++	-	-			-
	1	+++	+++	-	-			-
	0.5	+++	-	-	-			-
	0.25	-	-	-	-			-
C	8	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
	4	+++	+++	+++	-	-	-	-
	2	+++	++	-	-	-	-	-
	1	+++	-	-	-	-	-	-
	0.5	++	-	-	-	-	-	-
	0.25	++?	-	-	-	-	-	-
D	8	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
	4	+++	+++	+++	++	-	-	-
	2	+++	+++	++	-	-	-	-
	1	+++	+++	+	-	-	-	-
	0.5	+++	-	-	-	-	-	-
	0.25	-	-	-	-	-	-	-

この表に示すように感作は確実に行われている。

3. 被感作海猿の遊離腸管過敏症

種々の量の抗血清で海猿を被働性に感作し、そのおのおのの遊離腸管に対する過敏症反応惹起の限界抗原量を追求した結果を第5表に一括して示し、各感作単位の1例づつを第3, 4, 5, 6, 7, 8 図に示す。

第3図の例では、8単位感作では結合帯相当量の抗原注加で著明な収縮を示し、抗原量を遞減して行くと1/32結合帯相当量で軽微な収縮を示し、1/64結合帯相当量では収縮を見ない。従つて最小反応惹起限界抗原量は1/32結合帯相当抗原量である。

第4図の4単位の感作では1/2結合帯相当量で中等度に収縮し、1/4結合帯相当量となると僅かに収縮の傾向がみとめられるのみである。

第5図の2単位の感作では1/4結合帯相当量で明らかに収縮するが、1/8結合帯相当量となると全く収縮を起さない。

第6図の1単位感作では結合帯相当量で明らかな収縮を示すが、1/2結合帯相当量で既に収縮を見ない。

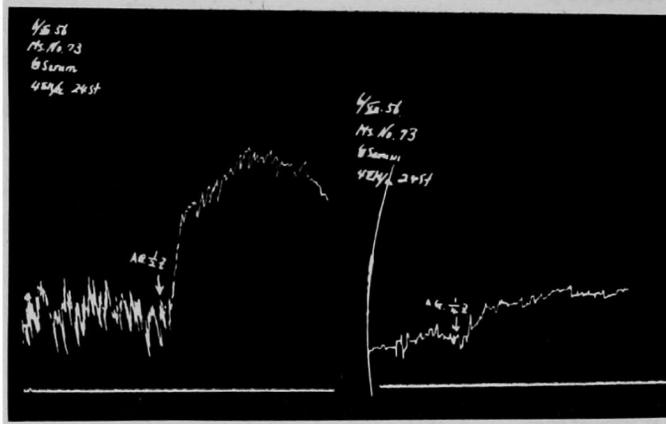
第7図の0.5単位感作は1単位感作の場合と同様である。

第8図の0.25単位感作では結合帯相当量の8倍にまで増しても過敏性収縮は認められない。

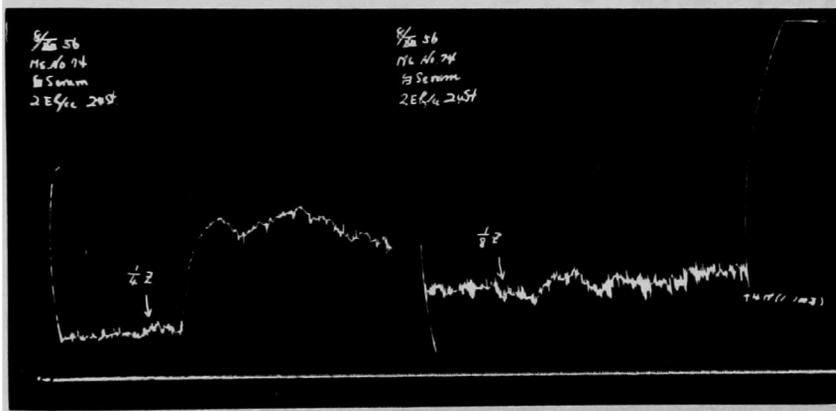
第5表

免疫血清	海猿番号	体重 gm	感作単位	感血清量 ml	注加抗原量 (1=結合帯相当量)													
					8	4	2	1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256	1/512	
A	1	280	4	0.086							+	+	-					
	8	230	4	0.071										+		+	±	-
	2	265	2	0.04							+	±	-					
	7	210	2	0.032										+	+	-		
	3	300	1	0.023														+
	6	220	1	0.017														±
	4	330	0.5	0.013								±	+	-				
	16	280	0.5	0.011								±	±	-	-			
	10	250	0.35	0.007										+	-			
	13	290	0.35	0.008										-	-			
	11	300	0.3	0.007										+	-			
	14	250	0.3	0.006										-	-			
	15	250	0.3	0.006										-	-			
	17	280	0.3	0.0064								±	±	-				
	5	260	0.25	0.005								-	-	-				
	9	230	0.25	0.0044								-	-	-				

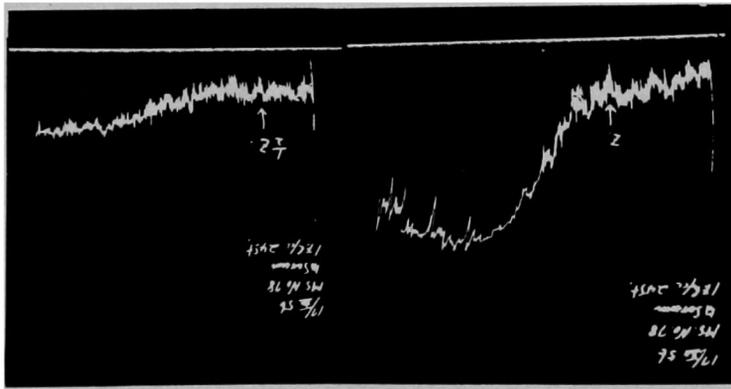
第4図 4単位感作例の限界抗原量



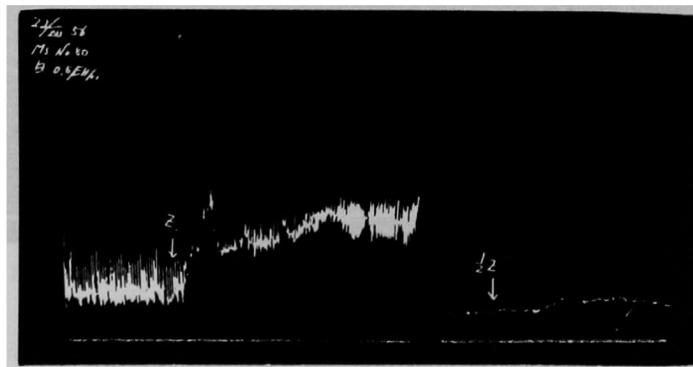
第5図 2単位感作例の限界抗原量



第6図 1単位感作例の限界抗原量



第7図 0.5単位感作例の限界抗原量



第5章 考 案

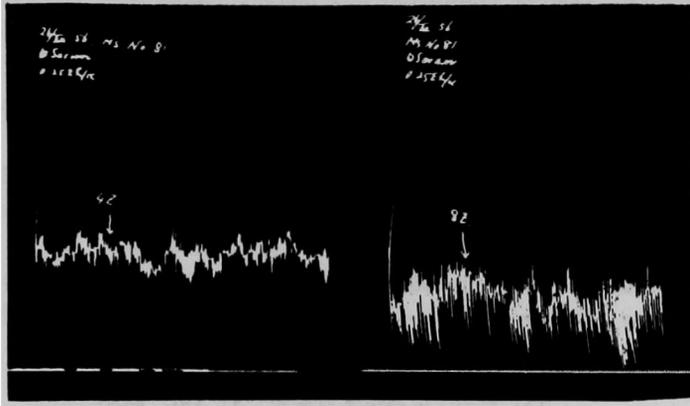
桑名²²⁾の抗牛血清を用いた複合抗原による遊離海猿腸管被働性過敏症実験の要旨を述べると、260 gmの体重を有する海猿において結合帯相当抗原量の注加によつて遊離腸管過敏症を起させる最小感作抗体量は200単位(1海猿当り)であり、この最小感作単位の際に遊離腸管過敏症を起す最小抗原量は、結合帯相当量又はその2倍量である。感作抗体量を増加すると反応惹起抗原量は少量ですむが、その最小抗原量は動物個々によつて一定せずという。

以上の要旨と筆者の実験結果を総括して、海猿の遊離腸管被働性過敏症における最小感作抗体量、最小反応惹起抗原量および複合抗原と単一抗原との差異を検討すると以下の如くである。

1. 最小感作抗体量

第5表に明らかな様に、1単位感作を基準として倍数関係に感作抗体量を増減した場合、0.5単位感作では結合帯相当量の抗原注加によつて確実に収縮反応を起し、A及びB抗血清の場合には更に1/4量でも収縮を起している。感作量を半減して0.25単位にするともはや抗原量をいかに増加しても収縮は起らない。0.5単位と0.25単位との中間で感作限界量を細かく求めようとしたが、これは結果が一定せず、2倍間隔以内での

第8図 0.25 単位感作例



決定は本実験法では無理であると思われる。

従つて、単一抗原たる結晶鶏卵白 Albumin を用いた遊離海猿腸管被働性過敏症における最小感作抗体量は 0.5 単位である。

牛血清を用いた桑名の最小感作抗体量は 1 海猿当り 200 単位であるが、これを本実験に用いた血液 1 ml 当りの感作単位に換算すると 10 単位相当量となり、本実験の最小感作量の実に 20 倍の大量となる。換言すれば、結晶鶏卵白 Albumin を抗原とした場合には牛血清を抗原とした場合の 1/20 量の抗体感作によつて、海猿の遊離腸管被働性過敏症を起す事ができるのである。これは緒方¹⁷⁾、Pratt²⁷⁾、宮田・後藤田²⁸⁾、原田¹⁸⁾等の単一抗原による被働性過敏症は、複合抗原による被働性過敏症に比べて感作抗体量が少量で足りるという所見を裏書きするものである。

本実験に用いた抗血清のいずれも、結合帯相当量の抗原注入によつて過敏症死を起す最小致死感作抗体量は 4 単位である。そして、遊離腸管過敏症において結合帯相当抗原量の注加による反応惹起最小感作抗体量は 0.5 単位であつて、過敏症死を来す最小量の 1/8 の感作量となる。この差は、一方は生体の死を示標とし、一方は単に腸管の収縮運動を起すという事を示標としたものである事に起因していると考えられるのである。

2. 最小反応抗原量

第 5 表に明らかな如く最小反応抗原量は、抗体の同一単位感作の場合にも相当の幅が見られて、結合帯相当抗原量を中心とした倍数系列の稀釈では厳密な決定はできなかつた。そして一般的にいって、感作抗体量が増すに従つて最小反応抗原量は少量となるが、この両者の間にはつきりした逆比例関係は見られなかつた。なおこの点について石坂等²⁹⁾は、

チフテリア抗毒素による被働性腸管過敏症において組織抗体濃度と添加抗原濃度との関係は双曲線をなし、一般に作用抗原濃度が増せば反応は強くなると述べている。

最小感作抗体量である 0.5 単位感作の場合の最小反応抗原量は結合帯相当量ないしその 1/4 量であり、牛血清の場合の結合帯相当量ないしその 2 倍量に比べて少量の抗原で腸管の被働性過敏症を起す事が明らかとなつた。感作抗体量が 1 単位の場合には最小反応抗原量は 0.5 単位の場合に比べて大差はなく、2 単位、4 単位、8 単位と感作抗体量が増すと最小反応抗原量は非常に少量となつてくるが、各個体間の差が大きくてその間に 8~16 倍の隔りが出てくる。

以上の如く遊離腸管過敏症において最小反応抗原量を定める事はその値の動揺範囲が大きくて非常に困難である。これは本法が動物の個体差の影響のみでなく、遊離腸管がその採取、保存、実験操作中の諸条件の影響を受け易いためであると考えられるので、反応限界を知る方法としては余り適当ではなく、従つて定量的実験に用いる時は抗原の稀釈段階を大きくした方が良いと考えられる。但し、定性的に用いる事は本法の鋭敏性からして大いに推奨すべきものであつて、結合帯相当量の抗原を注加して反応の有無をしらべる事が、免疫の成立の有無を知る確実な方法である事が第 5 表の結果より明らかである。

何故ならば最小感作抗体量においても結合帯相当抗原量の注加によつて収縮を起し、一方結合帯相当抗原量の注加によつても収縮を起さぬ場合には抗原量を増しても収縮は起さないからである。

第 6 章 結 論

単一抗原として結晶鶏卵白 Albumin を用いて海猿の遊離腸管被働性過敏症実験を行い、次の結論を得た。

1) 24 時間の潜伏期後に遊離海猿腸管被働性過敏症を起し得る抗血清の最小感作量は、海猿の血液 1 ml 当り 0.5 単位である。

2) 感作抗体量を増すに従つて反応惹起抗原量は少量となるが両者の間に確然たる逆比例的関係は見られず、その限界抗原量は動物個々によつて一定ではない。

3) 最小感作抗体量にての最小反応抗原量は、緒

方氏法沈降反応によつて定めた使用抗血清の結合帯相当量及び $1/4$ 結合帯相当量であつた。

4) 複合抗原たる牛血清系を使用した場合に比べて、単一抗原たる結晶鶏卵白 Albumin を使用した場合の遊離腸管被働性過敏症における最小感作抗体量は非常に少量である。

終りに臨み終始御指導を賜りかつ御校閲を頂きました恩師緒方名誉教授、並びに種々の御援助、御校閲を頂きました大平教授、望月助教授に深甚なる謝意を表します。

(本論文要旨は昭和31年10月第11回日本公衆衛生学会総会に於いて発表した)

文 献

- 1) Nicolle : Ann. Inst. Pasteur. 21; 128, 1907.
- 2) Otto : Münch. med. Wschr. 54; 1665, 1907.
- 3) 緒方 : 第1回衛生学微生物学寄生虫学連合学会講演, 昭2.
- 4) 緒方 : 岡山医学会雑誌, 41; 694, 昭4.
- 5) 景山 : 岡山医学会雑誌, 41; 392, 昭4.
- 6) 白玖 : 岡山医学会雑誌, 42; 1372, 昭5.
- 7) 杉本 : 岡山医学会雑誌, 41; 2562, 昭5. 42; 2241, 昭5.
- 8) Itoh : Arb. med. Fak. Okayama. 3; 141, 1932.
- 9) Kuwana : Arb. med. Fak. Okayama. 2; 436, 1931.
- 10) Ishihara : Arb. med. Fak. Okayama. 4; 233, 1934.
- 11) 湊 : 岡山医学会雑誌, 48; 1689, 昭11.
- 12) 大田原 : 岡山医学会雑誌, 51; 1343, 昭14.
- 13) 末永 : 岡山医学会雑誌, 53; 1997, 昭16.
- 14) 桑原 : 岡山医学会雑誌, 47; 1891, 昭10.
- 15) 広田 : 岡山医学会雑誌, 50; 1, 昭13.
- 16) 大川 : 岡山医学会雑誌, 54; 1985, 昭17.
- 17) 緒方 : アレルギー, 3; 293, 昭29.
- 18) 原田 : 広島医学, 6; 附録原著号, 554, 昭28.
- 19) 原田 : 広島医学原著号, 3; 191, 昭30.
- 20) 原田 : 広島医学原著号, 2; 201, 昭29.
- 21) Schultz : J. Pharm. & exp. Therap. 1; 549, 1910.
- 22) Dale : J. Pharm. & exp. Therap. 4; 167, 1913.
- 23) 桑名 : 岡山医学会雑誌, 43; 402, 昭6.
- 24) 井上 : 岡山医学会雑誌, 70; 342, 昭33.
- 25) Kekwick & Cannan : Biochem. J. 30; 232, 1936.
- 26) Kabat : Experimental Immunochimistry, 1948.
- 27) Pratt : J. Allergy. 9; 18, 1937.
- 28) 宮田・後藤田 : 血清学免疫学雑誌, 3; 109, 昭17.
- 29) 石坂等 : アレルギー, 60, 昭32. 金原書店.
- 30) 石川 : アナフィラキシー概論, 昭24. 杏林書院.

Studies on Passive Anaphylaxis of Isolated Guinea Pig Intestine

Part I Studies on Minimal Sensitizing Antibody Dose and Minimal Antigen Dose

By

Shozo Nasu

Department of Hygiene, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Masahiko Ohira, M. D., M. P. H.)

Using crystalline hen's ovalbumin, an experiment on passive Schulz-Dale reaction in guinea pigs was done. The results are as follows:

1). After 24 hours of incubation period, the minimal sensitizing dose of antiserum which would cause passive Schulz-Dale reaction in guinea pigs is 0.5 unit per 1 ml guinea pig blood.

2). As the dose of sensitizing antibody increases, the dose of antigen lessons, but the critical dose depends upon the individual animal. Furthermore no definite propotional relation exists between the two.

3). The minimal antigen dose on minimal sensitizing antibody dose is the binding zone equivalent dose by Ogata's method or the 1/4 of it.

4). The most appropriate antigen dose to cause anaphylaxis to the isolated guinea pig intestine which is passively sensitized is the binding zone equivalent dose of the antibody used in this reaction.

5). Comparing bovine serum which is complex antigen and crystalline hen's ovalbumin which is simple antigen, the minimal antibody sensitizing dose is extermely small in quantity in the latter when in passive Shulz-Dale reaction.
