



Title	ナガズカ卵巣の毒性物質：第5報 Lipostichaerinと毒性磷脂質の抗原性について
Author(s)	羽田野, 六男; HATANO, Mutsuo; 新井, 良治 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 21(4), 325-330
Issue Date	1971-02
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/23441
Type	departmental bulletin paper
File Information	21(4)_P325-330.pdf



ナガズカ卵巣の毒性物質

第5報 Lipostichaerin と毒性磷脂質の抗原性について*

羽田野 六 男・新 井 良 治**

Toxic Substance of the Roe of Northern Blenny

V. Antigenicities of Lipostichaerin and its toxic phospholipid molecule.

Mutsuo HATANO and Ryōji ARAI

Abstract

This paper describes the antigenicities of the Lipostichaerin and of the toxic phospholipid as a toxic component.

The Lipostichaerin was injected as an inoculated antigen into the palm of the limbs of a male rabbit. The antiserum was obtained from the blood collected from the rabbit's heart 31 days after inoculation.

The precipitation reaction between the antiserum and Lipostichaerin and between the former and apoprotein, the latter two being used as tested antigens showed positive, respectively. The optimal proportion in Lipostichaerin - antiserum precipitation gave a ratio 0.04 mgN of Lipostichaerin to 1 ml. of antiserum. All the mice injected intraperitoneally with the Lipostichaerin-antiserum mixture died, and also in the case of inoculation of the toxic phospholipid - antiserum mixture.

The precipitation reaction between apoprotein absorbed antiserum and Lipostichaerin was perceived not to be a complex haptent.

Judging from these results Lipostichaerin and apoprotein belong to a common antigen. Moreover this antiserum lacked the ability of neutralization. On the other hand, lipid moiety of Lipostichaerin had no antigenicities as a complete antigen and as a complex haptent. But it was not clear whether the moiety was a simple haptent or not.

緒 言

著者らは前報¹⁾においてナガズカ卵巣の毒性はリボ蛋白質, Lipostichaerin に存在し, かつその蛋白部分(アポ蛋白質)には毒性は認められないが, 脂質部分中に存在するある種の磷脂質に毒性のあることを認めた。

すでに浅野ら²⁾は本魚卵巣の毒性物質をリボ蛋白質と考え, このものは免疫学的にトキシイドとなし得ることより完全抗原としての抗原性を認めている。これに対して坂井ら³⁾は浅野らの接種材料がトキシイドとしての性格を持っていないものと判定し, さらにその本態を非水溶性, 脂質性の磷脂質と関係の深いものとしていることから不完全抗原(Haptent), 特に単純ハプテンではなからうかと推定している。

著者らは上記のごとくナガズカ卵巣の毒性物質はリボ蛋白質として存在し, またその中に含まれるある種の磷脂質にも毒性を認めたのでこれら両者について免疫学的な関係をみるために本実験を行ない, 2, 3の知見を得たので報告する。

* 昭和44年4月 日本水産学会年会(東京)にて講演発表

** 北海道大学水産学部食品化学第一講座

(Laboratory of Food Chemistry, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

実験および結果

実験材料

(1) 免疫抗原および沈降反応用抗原

まずナガズカ卵巣を 10% 食塩水で抽出しこの抽出液について硫酸アンモニウム分画を行ない、得られた 50% 飽和沈澱を水に透析後凍結乾燥を行なった。この得られた毒性リポ蛋白質, Lipostichaerin を免疫抗原および沈降反応用抗原として使用したが、その性状は N, 11.15%; P, 0.62%; Lipostichaerin 含量 85.0%; LD₅₀, 200mg/kg (*i. p.*) である⁷⁾。

また沈降反応用抗原としてアポ蛋白質も供試したが、このアポ蛋白質は免疫抗原である Lipostichaerin の一部を Scanu ら⁸⁾の方法によって -20°C でエタノール・エーテル (3:1), 次いでエーテルで脂質部分を抽出除去した蛋白部分である。このものの性状は N, 12.69%; P, 0.17% で毒性は認められないものである。

(2) 中和試験用毒素

前記 Lipostichaerin のほか毒性磷脂質も毒素-抗毒素中和試験に用いたが、この毒性磷脂質はナガズカ卵巣をアセトンで抽出、抽出液をエーテルに転溶し濃縮後アセトン処理を行なった。得られたアセトン不溶部 (磷脂質区分) をエタノールで処理してエタノール不溶部 (ケファリン区分) を集め、このものをクロロホルム・メタノール (2:1) を加えて溶解させ、再び多量のエタノールを加えて生じた沈澱区分である。このものの性状は N, 8.38%; P, 3.61%; 沃素価, 73.8; LD₅₀, 60mg/kg (*i. p.*) である⁹⁾。

(3) 抗血清の調製

市販固型飼料で 1 カ月間予備飼育した健康なウサギ (雄, 体重 3.8kg) を使用し、免疫抗原 (濃度 126.0mg/ml 生理的食塩水) 0.5ml と Adjuvant (Difco 製, Incomplete) 0.5ml, を混合・乳化させ四肢の掌に接種した。接種後それぞれ 15日, 30日目に耳静脈より予備採血し得られた抗血清について、Lipostichaerin を抗原とする沈降反応により抗体価の上昇を認めたので (15日目では 1:1,500; 30日目では 1:3,000), 翌31日目に心臓より採血し抗血清を調製した。

実験方法

(1) 重層法による抗体価の測定⁷⁾

常法どおり 56°C, 30 分間の非働化を行なった抗血清をアラビアゴム溶液で稀釈し、重層法による沈降素価すなわち抗血清の稀釈倍数より抗体価を求めた。なお反応は 37°C, 2 時間で行なった。

(2) 混合法による最適比の測定⁷⁾

まず予備試験として抗血清をそれぞれ生理的食塩水で倍数稀釈し、37°C で混合法による沈澱の生成を経時的に観察し肉眼的に混濁の強く現われる管を求めた。次いでこの結果より得られたものをその最適比の値の前後について、さらに抗血清濃度一定にし抗原をこまかく段階稀釈して正確な価を求めた。

(3) 動物接種試験

生理的食塩水あるいは 1% Tween 60 水溶液に試料を懸濁させたのち、体重 15-25g のマウス (NIH) に腹腔内接種 (*i. p.*) した。

実験結果

抗原-抗体の最適比:

絶対量としての抗原-抗体量を知るために混合法によって最適比を求めたが、これらの結果は Table 1 と 2 に示すとおりである。

すなわち Table 2 における第 5 管は濁りが最初に生じる管で、抗原 (12.16mgN/ml) の稀釈倍数は 500 倍 (実量 0.2ml/0.5ml), また抗血清は 4 倍であるので、抗原量: 抗血清量 = 1/1250:1/4 = 1:312.5, すなわち原抗血清 1 に対し抗原液の 312.5 倍稀釈が当量となり、抗血清 1ml に対し抗原

Table 1 Box titration between Lipostichaerin and rabbit antiserum

	Dilution of Lipostichaerin* (1:)									0.9% NaCl aq.
	250	500	1,000	2,000	4,000	8,000	16,000	23,000	64,000	
Dilution of antiserum (1:)	2	##	##	##	##	##	+	-	-	-
	4	##	##	##	+	+	+	+	-	-
	8	+	+	+	##	+	+	+	±	-
	16	-	-	-	+	+	+	+	±	-
	32	-	-	-	±	±	±	±	-	-
	64	-	-	-	-	±	+	±	-	-
0.9% NaCl aq.		-	-	-	-	-	-	-	-	-

Criteria of the reaction:

—: negative; ±: doubtful; +: weakly positive; #: positive;

##: completely positive

##, #, +: Precipitate appears sooner

* Initial Lipostichaerin concentration: 12.16 mgN/ml

Table 2 Optimal proportion in Lipostichaerin - antiserum precipitation

Tube no.	1	2	3	4	5	6	7
500-fold dilution of Lipostichaerin*, ml	0.5	0.4	0.3	0.25	0.2	0.15	0.1
0.9% NaCl aq., ml	0	0.1	0.2	0.25	0.3	0.35	0.4
4-fold dilution of antiserum, ml	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
Visual inspection, min.	27	27	26	24	15	17	18

* Initial Lipostichaerin concentration: 12.16 mgN/ml.

Table 3 Precipitation reaction between apoprotein and rabbit Lipostichaerin antiserum

	Dilution of apoprotein* (1:)					0.9% NaCl aq.	
	250	500	1,000	2,000	3,000		
Dilution of antiserum (1:)	2	##*	##	##	+	±	-
	4	##	##	+	±	±	-
	8	+	+	+	±	±	-
0.9% NaCl aq.		-	-	-	-	-	-

* Initial apoprotein concentration: 0.10 mgN/ml

** Visual inspection

0.04 mgN が最適比と算出された。

アポ蛋白質を反応抗原とする沈降反応:

アポ蛋白質を反応抗原とする沈降反応は抗原と抗血清をそれぞれ稀釈し重層法による観察を行なった。この結果は Table 3 に示すとおりで抗血清にアポ蛋白質に対する特異抗体の存在が認められた。

Table 4 Neutralization reaction between Lipostichaerin and rabbit antiserum

Lipostichaerin*: Antiserum (v:v)	Average mouse body wt. (g)	Dose of Lipostichaerin**			Death no.	Average death time (hrs.)
		(ml)	(mg)	(mg/g. body wt.)		
1:0	26.0	0.50	25.0	0.96	3/3	14
	25.5	0.30	15.0	0.58	3/3	26
1:0.1	24.5	0.55	25.0	1.02	3/3	14
1:0.5	26.0	0.75	25.0	0.96	3/3	14
1:1	26.0	1.00	25.0	0.96	3/3	14
1:2	27.0	0.90	15.0	0.55	3/3	21
1:3	28.0	1.20	15.0	0.53	2/3	18

* Initial Lipostichaerin concentration: 50.0 mg/ml

** All mice injected intraperitoneally

Table 5 Neutralization reaction between toxic phospholipid and rabbit antiserum

Toxic phospholipid*: Antiserum (v:v)	Average mouse body wt. (g)	Dose of toxic phospholipid**			Death no.	Average death time (hrs.)
		(ml)	(mg)	(mg/g. body wt.)		
1:0	24.5	0.50	5.0	0.20	3/3	36
	18.5	0.40	4.6	0.21	2/2	36
1:0.1	21.5	0.55	5.0	0.23	3/3	39
1:0.5	21.0	0.75	5.0	0.23	3/3	39
1:1	21.5	1.00	5.0	0.23	3/3	39
1:2	18.5	1.05	3.6	0.19	3/3	39

* Initial toxic phospholipid concentration: 10.0 mg/ml

** All mice injected intraperitoneally

毒素—抗毒素中和試験:

ナガズカ卵巣より抽出した毒性リポ蛋白質, Lipostichaerin は完全抗原として抗体 (沈降素) 産生能を有することがみられたが, この抗血清が抗毒素 (Antitoxin) を含有するか否かを検討するために次のごとく毒素—抗毒素中和試験を行なった。すなわち抗原 (Lipostichaerin) 一定量 (50.0 mg/ml; 5.58 mgN/ml) に抗血清を種々の割合に加えて, 混合し 37°C, 2 時間反応させたのちマウスに腹腔内接種を行なった。この結果は Table 4 に示すとおりである。

また上記 Lipostichaerin の場合と同様に毒性磷脂質 (10.0 mg/ml; 0.84 mgN/ml) についても実験を行ない Table 5 に示す結果を得た。

すなわちこれらの結果から, この抗血清は Lipostichaerin および毒性磷脂質に対する抗毒素 (毒素中和抗体) を含有しないことが明らかにされたが, なお坂井ら⁹⁾ もすでに脂質性毒素に対するマウス抗血清に中和能のないことを報告している。

毒性磷脂質のハプテンとしての性格について:

前述のごとくナガズカ卵巣より抽出した Lipostichaerin は完全抗原としての性格を有するとともに, その蛋白部分 (アポ蛋白質) も同様に完全抗原の性格を有することが判明した。本実験においては Lipostichaerin の脂質部分である毒性磷脂質についてハプテンであるか否かを免疫血清学的に検討を行なった。

まず抗血清 2 ml に生理的食塩水に溶解したアポ蛋白質 (0.04 mg/ml) 2 ml を加え, 37°C, 3 時間反応させたのち, 一夜氷室に放置後遠心分離を行ない 2 倍稀釈のアポ蛋白質吸収血清を調製した。こ

Table 6 Precipitation reaction between Lipostichaerin and apoprotein absorbed serum

	Dilution of absorbed serum (1:)						0.9% NaCl aq.
	8	16	32	64	128	256	
Dilution of Liposti- chaerin* (1:)	10 —**	20 —	40 —	80 —	160 —	—	—
0.9% NaCl aq.	—	—	—	—	—	—	—

* Initial Lipostichaerin concentration: 0.11 mgN/ml

** Visual inspection

の吸収血清を 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 に稀釈し, アポ蛋白質 (0.04mg/ml) との間に沈降試験を行なったところいずれも結果は陰性を示し十分にアポ蛋白質に対する抗体が吸収されていることを示した。

次にこのアポ蛋白質吸収血清と Lipostichaerin について, 前記同様に沈降反応を行なった結果は Table 6 に示すとおりで, いずれも陰性であった。すなわち Lipostichaerin と結合している毒性磷脂質は眼に見える抗原-抗体反応を示さないことから, 坂井ら³⁾ の見解のごとく複合ハプテンとは考えられない結果であった。

考察および総括

ナガズカ卵巣の毒性物質の抗原性と抗血清中の抗毒素の存在の究明のために次のごとき免疫血清学的方法によって検討を行なった。

すなわちナガズカ卵巣から抽出した毒性リポ蛋白質, Lipostichaerin を接種抗原としてウサギに非経口的に接種して得た抗血清は特異的抗体を有し, Lipostichaerin は完全抗原としての性格を有することが認められ, その抗原-抗体反応 (沈降反応) の最適比は抗血清 1ml 当り抗原 0.04 mgN であった。また Lipostichaerin を脱脂質した蛋白部分 (アポ蛋白質) についても同様に特異的抗原-抗体反応が認められ共通抗原であることが判明した。

一方 Lipostichaerin の脂質部分の毒性磷脂質についても同様にその抗原性の検討を行ない, その結果毒性磷脂質は複合ハプテンでないことが認められたが, 本実験において坂井ら³⁾ が推定している単純ハプテンとしての確認は明らかになし得なかった。

一般に脂質性抗原⁴⁾ はそれ単独では抗体産生能はなく, 抗体産生のためには蛋白担体を必要としいわゆるハプテンとされているが, ハプテンとしては Cardiolipin (Wasserman 抗原), Ceramidegalactose (糖脂質) などが知られており, また Lecithin と Cholesterol はそれ自体ハプテン活性ないがそれらの添加によって試験管内で脂質性抗原の抗原-抗体反応が促進されることも知られている。しかしこれら以外の脂質の抗原性についてはまだ不明な点も多く, このようなことから毒性磷脂質に関する免疫血清学的検討は今後に残された問題である。

また抗血清について抗毒素の存在をみるために得られたウサギ抗血清と Lipostichaerin および毒性磷脂質の間で毒素中和試験を行なったが, いずれの場合も抗血清に毒素中和能は認められなかった。これらのことについては坂井ら³⁾ も指摘のごとく抗原性は物質固有の性質でなく接種動物の種属によりハプテンともなり完全抗原ともなる点について今後検討すべきことと考えられる。

謝 辞

本研究において終始御指導を賜った本学部五十嵐久尚教授ならびに坂井稔教授に深く感謝の意を表するとともに座間宏一助教授、木村喬久助教授に御助言と御援助を頂いたことをここに記し厚く感謝の意を表する。

文 献

- 1) 羽田野六男 (1971). 北大水産彙報 21(4), 315-323.
- 2) Asano, M. & Itoh, M. (1962). *Tohoku J. Agr. Res.* 13(2), 151-167.
- 3) 坂井稔・木村喬久・信濃晴雄・絵面良男・坂正紀・林功(1964). 食衛誌 5(6), 433-440.
- 4) 羽田野六男 (1970). 北大水産彙報 20(4), 329-338.
- 5) Scanu, A., Lewis, L.A. & Bumpus, F.M. (1958). *Arch. Biochem. Biophys.* 74 390-397.
- 6) 羽田野六男. 未発表.
- 7) 赤堀四郎 (1961). 酵素研究法. IV 364p. 東京 ; 朝倉書店.
- 8) 今井陽・坂上利夫 (1966). 脂質の生化学. 56p. 東京 ; 朝倉書店.