HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	アスペルギルス症の免疫病理学的研究：3. アスペルギルス症の血中抗体について
Author(s)	河内, 薫
Citation	結核の研究, 23-24, 31-36
Issue Date	1966-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26764
Type	departmental bulletin paper
File Information	23_24_P31-36.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

アスペルギルス症の免疫病理学的研究

3．アスペルギルス症の血中抗体について

河　内　　薫
（北海道大学結核研究所病理部　主任　森川和雄教授）

（昭和40年12月1日受付）

深在性真菌症の臨床的診断はしばしば困難なことが多い。というのは被検材料から真菌を分離しても，これが人体や自然界に非病原性真菌として存在している場合はこれを直ちに病原菌と決定することは出来ず，ここに免疫学的診断の必要性が生じ，近年この方面の研究がなされてきた。

アスペルギルスがアレルゲン的性格を持っていることは気管支喘息の抗原因子になる事実からも指摘されているが，アスペルギルス感染症における宿主の抗原抗体反応の意義については殆んど明らかにされていない。しかし根本的には細菌感染の場合と異なるものではないと思われるが，抗原として更に複雑な因子が加わるだろうことが想像出来る。

人のアスペルギルス（以下アスペと省略）感染症の血中抗体については，沈降反応[1),2),3),4)]，凝集反応[2),3),5)]，補体結合反応[2),3)]に関して報告があるが，いずれの場合も抗体価の低いのが特徴である。前報[6)]のアスペ感染実験では皮内反応と病変程度との間にはいく分相関関係がみられたが，沈降体価とは何ら関連性が認められなかった。これらの反応が各々異った抗体にもとづくのか，または1つ以上の作用を持った抗体系があるためとも考えられる。

そこで，アスペ感染時の血中抗体の特異性を解明するために，まずアスペ感染家兎での血清蛋白分屑の変動を濾紙電気泳動で分析した。ついで抗アスペ家兎血清及びアスペルギローム患者血清を DEAE-cellulose による column chromatography で分画し，抗体活性の分布を検討した。

実験 1　実験的アスペ感染家兎の血清蛋白分屑の変動

材料及び方法

使用動物：　健康成熟家兎5匹

感染方法：　A. fumigatus をサブロー寒天培地で2週間培養後，胞子をかき集め，5.8×10^6/mℓ 生食浮遊液にした。このさい 0.01％の濃度になるよう Tween 80を加えた。家兎の臀部筋肉内に各1mℓ宛注射した。

血清蛋白分屑の測定法：　感染直前及び感染後1日目，1，2，3，4，5週目に採血して血清を分離した。Veronal Buffer pH 8.6　$\mu=0.75$　で濾紙電気泳動を行ない，蛋白量を refractometer で測定した。

成　　績

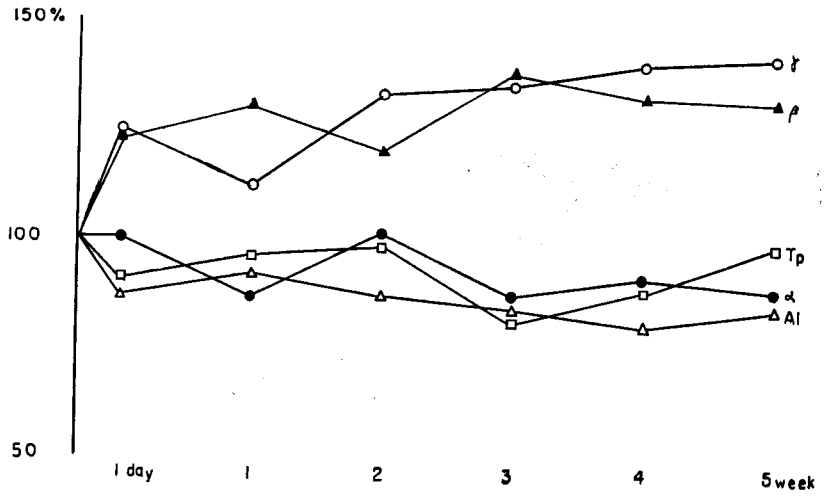
血清総蛋白量と各血清分屑の経時的変動を表1に示した。図1は感染前血清の総蛋白量及び各分屑量を100として感染後各時期の数値の5匹の平均値を百分率で示した。β-globulin と γ-globulin が感染後1日目からすでに増加しはじめ，5週目まで続き，それぞれ35％及び40％の増量を示している。α-globulin と Albumin は反対に1日目から減少しはじめ，3週目には最も強く，それぞれ13％及び15％の減少をみせている。しかしその後は回復していく傾向を示している。総蛋白量もむしろ減量の傾向を示し，実験期間中10％前後の減量が続いた。

表 1　A. fumigutus 生菌接種時の血清蛋白分屑の変動

採血時	A1b.	α	β	γ	総蛋白量
感染前	62.4%	9.6%	14.4%	13.6%	5.6g/dl
1　日	54.4	9.6	17.6	17.8	5.1
1　週	57.6	8.4	18.8	15.2	5.3
2　週	54.8	9.8	17.4	18.0	5.6
3　週	54.0	8.2	19.6	18.2	4.8
4　週	53.0	8.8	19.2	18.8	5.1
5　週	53.4	8.4	19.0	19.2	5·5

A1b：アルブミン　　β：β-グロブリン
α：α-グロブリン　　γ：γ-グロブリン

図 1　A. fumigatus 生菌接種時の血清蛋白分屑の変動



実験 2　DEAE-cellulose column chromatography による各種抗体活性の分布

材料及び方法

抗血清：a) 抗アスペ家兎血清：アスペ加熱死菌 30 mg/mℓ に等量の Adjuvant を加えたものを4日間隔で6回，家兎に筋肉内注射をした。最終注射後7日目に全採血して血清を分離した。

b) アスペルギローム患者血清：平賀洋明博士（札幌鉄道病院）より提供を受けた。

DEAE-cellulose column chromatography による血清分画：市販の DEAE-cellulose (0.8 mq/g) を用いた。1.7×40 cm の column をあらかじめ 0.005M pH 7.5 の燐酸緩衝液で平衡状態にしておいた。被検血清 4 mℓを 0.005 M pH 7.5 の燐酸緩衝液で12時間透折後，生じた沈澱を遠心で除いた。分画溶出は stepwise elution の方法を用い，次の緩衝液を使用した。

1	0.01M	NaPB*,	pH 7.5
2	0.02M	NaPB ,	pH 6.2
3	0.05M	NaPB ,	pH 4.5
4	0.3 M	NaPB ,	pH 4.5+2M NaCl

* PB：燐酸緩衝液

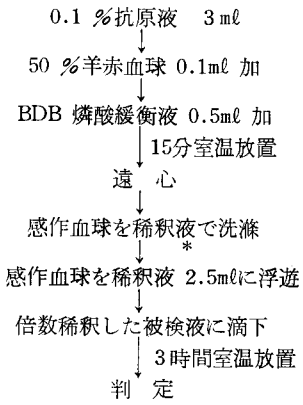
溶出時間は 30 分で 20mℓになるようにし，各試験管に 20mℓ宛集めた。溶出された各分画液について 280 mμ の optical density を測定した。まず生じた peak の抗体活性を測定し，ついで各分画液を2試験管ずつ混じて濃縮または稀釈して蛋白濃度を一定にした後，以下の抗体活性を測定した。このさい被検分画液は生食水で1夜透折した。なお各分画液の peak 部分の濾紙電気泳動を行ない，その移動度をみた。

抗体活性：

a) 沈降抗体価：抗原として 0.01% Apt-f 溶液[4]（アスペ・培養濾液蛋白画分）を用い，重層法により抗体価を測定した。以下の実験はすべて抗原としてこの Apt-f を用いた。

b) Passive cutaneous anaphylaxis (PCA) 価：Ovary の法[7]に従い，モルモットの腹部皮内に被検分画液または血清 0.1 mℓを注射後6時間目に 0.5% Evans blue 加抗原液 4 mg/mℓ を 1 mℓ宛静注した。15分後エーテルにより屠殺して皮膚裏面より着色斑を計測した。

図 2　BDB 法



* 稀釈液：1%正常家兎血清加燐酸緩衝液

c) Bis-diazotized-benzidine (BDB) 凝集価： Arbesman[8], Gordon[9] らの方法を参照し，図2のような順序で行なった。

感作血球： 脱線維した羊血球に等量の Alsever 液を加えて保存した。使用時にこの血球を0.15M燐酸緩衝生食水 (pH 7.3) で3回洗滌して用いた。0.1%抗原液3mℓを軽く振りながら50%血球浮遊液0.1mℓと15倍に稀釈した BDB 溶液0.5mℓを滴下し，15分間，室温に放置した。その間時々軽く振盪した。この感作血球を稀釈液（0.15M燐酸緩衝生食水に1%の割に56℃30分間非働化した正常家兎血清を加えたもの）で1回洗滌後，2.5mℓの稀釈液に浮遊させた。

被検分画液及び血清： 被検物を稀釈液で0.5mℓずつ倍数稀釈した。これに前記の感作血球浮遊液を0.05mℓ宛滴下し，振盪後室温に3時間静置後，血球の凝集状態を判定した。なお，i) 感作血球＋稀釈液， ii) 感作血球＋正常人血清，iii) 感作血球＋正常家兎血清を対照とした。至適抗原濃度及び BDB 濃度は別にそれぞれのいろんな濃度で行なってみて決定した。

d) Prausnitz-Küstner 反応： 正常家兎の背部皮内に被検物を0.2mℓ宛注射し，48時間後，反応の消退したことを確かめてから同部位に0.001% Apt-f を0.1mℓ宛再注射した。再注射後1時間目に発赤を判定した。

成　績

抗アスペ家兎血清については図3下のように主に5つの peak を示す分画曲線をえた。それで各分画 peak の濾紙電気泳動を行なった（図4）。同時に泳動した全血清と比較すると peak I はおそい泳動の γ-globulin に相当し，peak II，III. は早い泳動の γ-globulin に peak IV は albumin と β-globulin に peak V は α-globulin に相当した移動度を示した。表2に各 peak の抗体活性を示した。沈降反応活性はIに PCA 活性はI，IIに，また BDB 活性はI，IIに認めた。P-K 活性はII，IIIに軽度に認められた。各分画内の蛋白あたりの抗体

図 3　DEAE-cullulose によるアスペルギス感作家兎血清の分画と抗体活性の分布

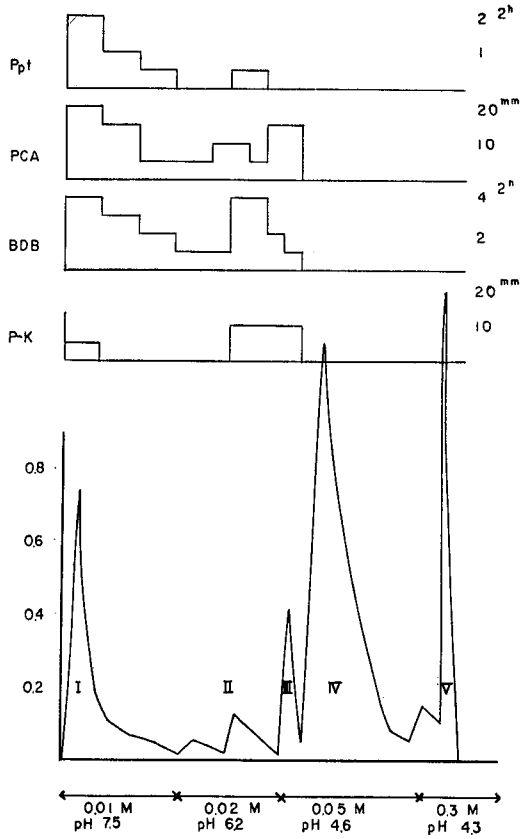


図 4　抗アスペ家兎血清の chromatographic fraction の電気泳動図

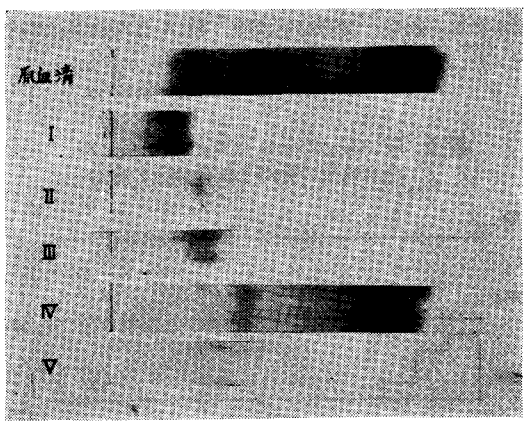


表 2　アスペ死菌感作家兎血清分画各 peak の抗体活性

peak	Tube No.	沈降抗体価	PCA mm	BDB	P-K	O.D.
I	4	4×	22×18	16×	±	0,77 (0.74)**
II	18	−	10×8	2×	±	0.12 (0.18)
III	26	−	−	−	+	0.41 (0.195)
IV	29	−	−	−	−	1.15 (1.05)
V	41	−	−	−	−	1.25 (0.94)
原血清		64×	23×23*	512×	8×	8.25

*　原血清を50倍に稀釈した時の値
**　( ) 内は生食水で1夜透析後の O.D.

活性をみるために図3上に各分画の蛋白濃度を一定にした時の抗体活性分布を示した。沈降反応活性は第1分画の早く流出する領域に最も高くみられた。PCA 活性も第1分画に最も強く認められるが，第1分画から第3分画の初期 peak まで比較的広く分布し，しかも第3分画の初期 peak でかなり強いことがわかる。BDB 活性は第1分画から第3分画まで広く分布しているが，第1分画と第2分画に同じ程度に活性があることがわかった。

アスペルギローム患者血清の分画でも抗アスペ家兎血清と同じように主に5つの peak を持つ分画曲線を得た(図5下)。各 peak の濾紙電気泳動による移動は図6に示した。BDB 活性はⅠ，Ⅴに認められた。P-K 活性はⅡ，Ⅲにかなり強くみられたが，沈降反応活性及び PCA 活性は全く陰性だった(表3)。各分画の蛋白濃度を一定にした場合の抗体活性をみると，図5上のように BDB 活性は第1分画の早い領域に比較的限局して存在し，しかも最も高く，第4分画にも軽度に認められた。P-K 活性は第3分画の初期 peak に最も強く，第1分画にもわずかにみられた。沈降反応活性，PCA 活性は共に陰性だった。

図 5 DEAE-cellulose アスペルギロース患者血清の分画と抗体活性の分布

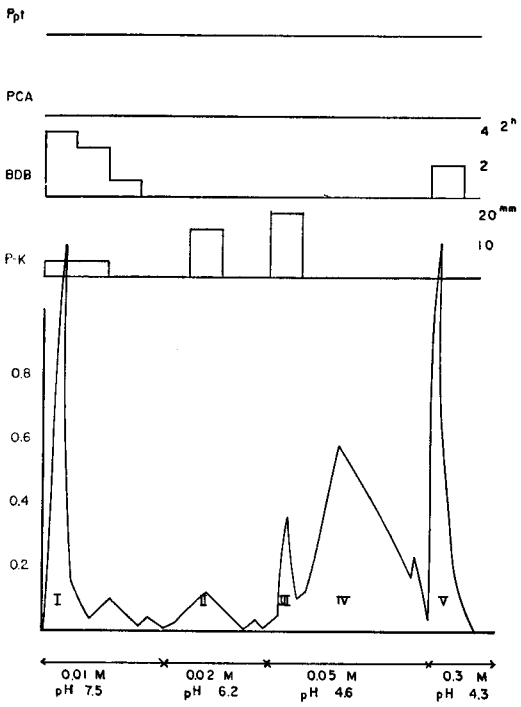


図 6 アスペルギローム患者血清の chromatographic fraction の電気泳動図

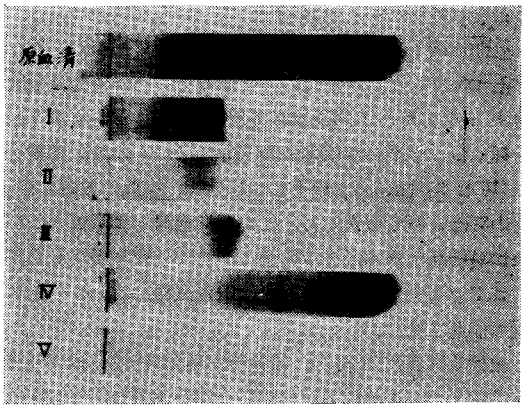


表 3 アスペルギローム患者血清分画各 peak の抗体活性

peak	Tube No.	沈降抗体価	PCA	BDB	P-K	O.D.
Ⅰ	4	−	−	32×	±	2.7 (2.9) ***
Ⅱ	25	−	−	−	++	0.11 (0.13)
Ⅲ	34	−	−	−	+++	0.33 (0.36)
Ⅳ	40	−	−	−	−	0.55 (0.6)
Ⅴ	53	−	−	2×	−	1.15 (0.96)
原血清		8×*	−**	1028×	16×	

* 抗原 1 mg/mℓを使用した時の値
** 血清4倍稀釈以上で陰性
*** ( ) 内は生食水で1夜透析後の O.D.

考　　按

外因性真菌症の1つであるアスペ感染症では血中抗体価が非常に低いことが知られているが，感染に伴って産生される抗体が宿主及び感染原にどのような作用を及ぼしているかは全くわかっていない。

今回はアスペ感染症の血中抗体を調べるにあたって，まず実験的アスペ感染時の血清蛋白の変動を経時的に観察した。感染後1日目からすでに γ-, β-globulin の増加が始まり，実験期間中両者は40%前後の増加を認めた。β-globulin の増加するのが特異的で，前回の生菌チヤレンジ実験[6]で感染後5日目からすでに皮内反応が陽転していることと関連しているのではないかと思われる。このように β-globulin の増加は，Apt-f による皮内反応で，注射後2～3時間目に現われる強い wheal 反応が皮膚感作抗体にもとずくのではないかという考えを裏付け

ていると思われる。というのは現在，皮膚感作抗体の性格を最も強く持つと思われる β_2A-globulin[10),11),26)] は電気泳動で早い移動度を持つ γ-globulin から β-globulin にかけて移動することが知られているからである。なお γ-globulin も1日目から増加しはじめているが，前回の実験[6)]では血清沈降抗体は感作後21日目から出現している。これは沈降抗体量が重層法で測定するにはまだ少なすぎるためと考える。2～3週後，略30％の増加ではじめて，測定しうる量にまで抗体が上昇したのだろう。

次に抗アスペ家兎血清とアスペロギローム患者血清をDEAE-cellulose で分画後，沈降抗体，BDB 抗体，PCA 抗体，P-K 抗体の分布を比較検討した。両者で得られた elution pattern の間には著しい差は認められないが，抗体活性の分布はかなりの相違を認めた。またこの実験で抗アスペ血清の BDB 反応が特異的な抗原抗体反応であることが確認された。抗アスペ血清の BDB 価は凝集反応としては必ずしも高い値ではないが，正常血清との間に有意義な差が認められた。BDB 反応は Bis diazotized benzidine を利用して赤血球に蛋白抗原をアゾ結合させたものだが[8),12)]，同じように蛋白抗原をタンニン酸処理赤血球に吸着させる Boyden 血球凝集反応では陰性だった。（未報）

アスペルギローム患者血清では BDB 価はアスペ感作家兎血清よりむしろ高いにもかかわらず，沈降反応，PCA 反応が全く陰性であることは，BDB 抗体がこれらの抗体と物理化学的にも異るものであることを意味すると思われる。アスペルギローム患者血清では第4分画にも BDB 活性がみられた。Turcotte ら[13)]によると結核症患者で BDB 反応を行なったところ，病変の活動型では7S グロブリンの方が 19S グロブリンと比べ，BDB 凝集価が著しく高く，これに反して非活動型では19S グロブリンの凝集価が高く，7S グロブリンの BDB 活性は殆んどないことを報告している。この事実がどのような機序にもとずいているのかは明らかでないが，今回の実験では，アスペ死菌感作家兎，アスペルギローム患者血清共に第1分画即ち7Sグロブリンを含む分画に BDB 価は最も高くみられた。ところが第4分画即ち19Sグロブリンを含む分画はアスペルギローム患者血清のみ陽性を示している。第4分画の BDB 活性が生菌の侵襲と関係があるか否かは現段階では言及出来ない。

両者共，P-K 活性は γ-globulin の早い移動を示す部分即ち，Ⅱ，Ⅲに認められた。しかもアスペルギローム患者血清で特に強いことはアスペ感染症においてもアスペがアレルゲンの因子を持っていることを示唆するものではないかと思われる。カビや ragweed pollen に対して過敏症の患者血清について凝集反応抗体と皮膚感作抗体または沈降抗体を分離し，抗体の位置付けをしようとする試みが澱粉電気泳動[14),15),16)]，超遠心法[17)]，DEAE column chromatography[18)～22)] 等の方法で行なわれている。Perelmutter ら[23)]は ragweed 過敏症患者血清を DEAE-cellulose で分画し，初期分画に凝集反応抗体の殆んどが存在しており，後分画に皮膚感作性抗体の最高値があると報告している。更に凝集反応活性因子が阻止活性及び沈降反応活性も持っていることが示されている[21)]。

今回の実験で，アスペルギローム患者原血清ではP-K反応は16倍稀釈までわずかに陽性であったのに分画により，Ⅱ，Ⅲに明白に P-K 反応が見られた。このⅡ，Ⅲは濾紙電気泳動で早い移動を示す γ-globulin に相当し，現在皮膚感作抗体と考えられている γ_1A globulin の部分に一致している。皮膚感作抗体に血球凝集反応能力[24)]があるか否かはいまだ解明されていないが今回の抗アスペ家兎血清でもⅡ，Ⅲは両反応が陽性だった。Pepys[25)]はアスペ感染症では少くも2つの型の抗体が関与していると報告している。即ち，沈降抗体はあるがアレルギー性のない人，もう1つの型はアスペ菌体抽出物で処理すると沈降素は消失するがなおアレルギー性の残っている人。筆者の実験結果からも抗アスペ血清が multiple type の抗体を持っていることが分った。また，皮膚感作抗体は PCA 反応を起こし得ない[26)]ことが証明されているので，Ⅱ，Ⅲは2種以上の抗体が混在していると思われる。

以上，抗アスペルギルス血清について，その抗体活性を目標として実験を試みたが，各種の抗体活性がグロブリンのかなり広い範囲に分布していることがわかった。血清抗体価が低いために，その測定にかなりの困難を伴ない，より鋭敏な免疫反応が望まれ，今回始めて試みた BDB 血球凝集反応は，比較的優れた血清反応と考える。

結　　論

1. 実験的アスペルギルス感染家兎血清の蛋白分屑の変動を濾紙電気泳動法で観察した。感染後直ちに β-globulin と γ-globulin が40％前後増加し，実験期間中続いた。

2. アスペルギルス死菌感作家兎血清を DEAE cellulose column chromatography で分画し，抗体活性の分布をみた。BDB 抗体，PCA 抗体，沈降抗体は第1，第2分画に存在し，第3分画の始めの peak に P-K 活性が軽度に認められた。

3. アスペルギローマ患者血清も同様に分画し，BDB 活性は第1，第4分画に，P–K 活性は第2分画及び第3分画の初期の peak にかなり強くみられた。

文　　献

1) 秋葉朝一郎：真菌と真菌症，**1**，3 (1960)
2) Matsumoto, T. : Frans. Brit. Mycol. Soc. **14**, 69 (1929)
3) Salvin, S. B. : Prog. in Allergy, VII, p 220 (1963)
4) 河内　薫：結核の研究，**20**，33 (1964)
5) 瀬尾昌克：岡山医会誌，**72**，2049，2069 2091 (1960)
6) 河内　薫：結核の研究，**23.24**,23 (1965～1966)
7) Ovary, Z.: Progress in Allergy, V, p 459 (1958)
8) Arbesman, C. E., Rose, W. R., Kantor, S. Z. & Beede, R. B. : J. Allergy, **31**, 317 (1960)
9) Gordon, J., Rose, B. & Sehon, A. H.: J. Exp. Med. **108**, 37 (1958)
10) Heremans, J. F. & Vaerman, J. P. : Nature **193**, 1091 (1962)
11) Terr, A. I. & Bentz, J. D.: J. Allergy, **35**, 206 (1964)
12) Staivtzky, A. B. & Ariquilla, E. R. : J. Immunol. **74**, 306 (1959)
13) Turcotte, R., Freedman, S. O. & Sehon, A. H. : Am. Rev. Resp. Dis. **88**, 725 (1965)
14) Loveless, M. H. & Cann, J. R. : J. Immunol. **74**, 329 (1955)
15) Cann, J. R. & Loveless, M. H. : J. Allergy, **28**, 379 (1957)
16) Kuhns, W. M. J.: J. Exp. Med. **99**, 577, (1954)
17) Gyenes, L., Sehon, A. H. : Int. Arch. Allergy **18**, 330 (1961)
18) Mathewo, K. P. & Spear, H. J. J. : J. Immunol. **87**, 274, (1961)
19) Gyenes, L. & Sehon, A. H.: Canad. J. Bioch. Physical. **38**, 1249 (1960)
20) Frick, D. E., Gyenes, L. & Sehon, A. H. : J. Allergy, **31**, 216, (1960)
21) Perelmutter, L., Lea, D. J., Freedman, S. O. & Sehon, A. H.: Int. Arch. Allergy, **20**, 355 (1962)
22) Augustin, R., Hayward, B. J.: Immunology, **3**, 45 (1960)
23) Perelmutter, L., Sehon, A. H. & Freedman, S. O. : Int. Arch. Allergy, **19**, 129 (1961)
24) Gyenes, L., Sehon, A. H. et al. : Int. Arch. Allergy, **24**, 106 (1964)
25) Pepys. J. et.al. : Am. Rev. Resp. Dis. **80**, 167 (1959)
26) Ishizaka, K. & Ishizaka, T. : J. Allergy, **34**, 395 (1963)