

職業性アレルギー性皮膚障害に関する研究

第 1 編

ブローム (Bromine) の抗原性並びに感作原性に関する研究

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 大田原一祥教授)

助 手 岡 崎 雅 治

[昭和34年6月23日受稿]

目 次

第1章 緒 論

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験動物

第2節 抗 原

第1項 免疫用抗原並びに免疫方法

第2項 感作用抗原並びに感作方法

第3項 反应用抗原

1) 沈降反应用抗原

2) 再注射用抗原

第3節 採血方法

第4節 沈降反応

第5節 海狸尿中ブロームの定量

第1項 試 薬

第2項 検量曲線の作製

第3項 海狸尿中ブロームの定量方法

第6節 皮膚反応の判定

第3章 実験成績

第1節 血清学的反応

第1項 ブローム化人血清を反应用抗原とした抗ブローム化人血清家兎抗体の沈降反応

第2項 抗原原液を 1.0%無処置人血清とした抗ブローム化人血清家兎抗体の沈降反応

第3項 交叉反応

第4項 寒天層内沈降反応

第2節 抗原として静脈内に注射されたブローム及びブローム化人血清の海狸尿中ブロームの排泄

第3節 過敏性皮膚反応

第1項 ブローム水、ブローム化人血清の経静脈感作家兎に於ける過敏性皮膚反応

第2項 ブローム水、ブローム化人血清の経静脈感作海狸に於ける過敏性皮膚反応

第3項 経皮内感作海狸に於ける過敏性皮膚反応

1) ブローム水の経皮内感作海狸に於ける過敏性皮膚反応

2) ブローム化人血清の経皮内感作海狸に於ける過敏性皮膚反応

第4項 ブローム水、ブローム化人血清の経胸骨皮下感作海狸に於ける過敏性皮膚反応

第4章 総括並びに考按

第5章 結 論

文 献

英文抄録

第1章 緒 論

化学的処置によつて、血清の種属特異性が減少し、化学的特異性が加えられる事は、Obermeyer, Pick¹⁾等によつて見出されたところである。彼等は蛋白質分子によるヨード、NO₂又はN=Nを導入する

事により、化学的特異性を招来し得る事を、ヨード化された牛血清をもつて免疫して得た家兎血清との沈降反応においてヨード化された血清はその種属の如何を問わず、牛、馬、家兎のいずれとも又卵白とも反応するが、Diazo化された蛋白質の何れとも反応しない事実によつて示した。其の後同様の実験は尠からず行わ

れ、Landsteiner 及び Scheer^{2), 8), 4)} はレゾルチン或はチロシンに2個のハプテン基を結合した簡単な化合物が抗原性を有する事を発見した。

我が国に於ても大川⁵⁾ は燐蛋白を以て、内山⁶⁾ は Methyl 化蛋白及び Atoxyl 化蛋白を以つて、化学的特異性の発現を沈降反応、補体結合反応あるいは海狸の過敏性反応によつて確認し、横地⁷⁾ も Nitro 化した諸種の血清による過敏性反応を、海狸の腸管反応及び家兎の血圧下降について観察しその化学的特異性の発現する事を明らかにした。

ブローム化する蛋白の血清学的特異性及び 3,5-Dibromtyrosin の抑制現象に関しては既に1929年 Wormall⁸⁾ は詳細な研究を発表しているがその実験に於てブローム化された馬、牛、家鶏、家兎血清は抗ブローム化馬血清家兎免疫血清と反応するのみでなく更にヨード化された馬、牛、家鶏及び家兎血清とも反応する事実を認めている。

江頭⁹⁾ はブロームの家兎に対する抗原性について、田代¹⁰⁾ はブローム化合物による実験的過敏性反応を海狸について実験し、更にブロームの抗原性とその化学的性状との関係については青木、雨谷、富田等¹¹⁾ が游離せるブロームは解離せるブロームよりも強度の感作原性及び抗原性を有する事を明らかにし、古藤、中島、佐竹等¹²⁾ はブロームの感作処置を受けた海狸が過敏性の成立に先んじてそれぞれの感作原に対する耐性の増強を示すこと、その耐性は皮膚反応の如き過敏性を示現する諸反応において示される事等をブローム、ブロームカリ、ブローム酸カリの混合液に塩素を加えたもの及びブローム酸カリを感作原とする実験に於て観察している。

ブローム化合物による医学的研究は数多く行われているがその内、大村¹³⁾ は家兎にカルモチンを投与してその薬理作用、並びに食塩附加が覚醒を早める事を、吉富¹⁴⁾ はブロムラールを経口投与した場合の各臓器における無機ブローム、並びに有機ブロームの分布について研究し、勝¹⁵⁾、伊藤¹⁶⁾、寺本¹⁷⁾ はハロゲン化合物の生理学的研究特にハロゲンイオンと養素との結合関係について、千田¹⁸⁾、小坂¹⁹⁾、滝本²⁰⁾ はハロゲン化合物投与の動物体に及ぼす影響について発表している。

ブロームが人体に特異なる皮膚発疹を発現せしむる事実は往時より数多くの臨床家によつて報告された所であり、^{21), 22)} 谷村²³⁾ は結節性ブローム疹患者の血清を正常海狸の皮下に注射し、その海狸にブロームに対する過敏性ショックを起さしめ得た事を報告してい

る。

著者は職業性アレルギー性皮膚障害の研究の一環としてブロームの抗原性並びに感作原性について実験を行い、興味ある成績を得たのでここに報告する。

第2章 実験材料並びに実験方法

第1節 実験動物

体重約3,000 g 前後の白色正常成熟家兎及び約300 g 前後の白色又は腹部のみ白色の正常海狸を使用し、飼料は何れもオカラと雑草を用いた。

第2節 抗 原

ブロームの蛋白結合はチロシン基の OH group の Ortho の位置で、天然には Märner^{24), 25)} によりサングの1種 *Primona iepadifera* の骨格より単離され R. Zeyneck²⁶⁾ はこれをチロシンより合成した。

著者は R. Zeyneck の 3,5-Dibromtyrosin 合成法及び Wormall の用いた Hopkins and Pinks の方法⁸⁾ を参考にしてブローム化蛋白を合成した。即ちブロームの酸化作用による蛋白の変性を防止する目的で蛋白液と等量の Veronal 緩衝液 (pH 8.5) を加え外部より氷で冷却し乍ら 7.0%蛋白液 1 量に対し、石津製純ブローム水 1 量の割合に振盪し乍ら徐々に滴下した後、セロハン紙に1昼夜流水中に透折し、遠心沈澱した上清に塩化ナトリウムを加えて0.85%食塩水溶液とし、予め生理的食塩水にて0線に調節した日立製作所製の屈折計を使用して蛋白量を計測した。

第1項 免疫用抗原並びに免疫方法

1%ブローム化人血清 2乃至5 ccを4日乃至1週間の間隔を以て漸増的に反覆家兎耳静脈より注射し、時々採血して免疫価の上昇を測定して血清学的交叉反応の出現を認めたものを実験に供した。

第2項 感作用抗原並びに感作方法

海狸は感作方法によつてこれを6群に分ち各4匹を1群となし、第1群は純ブローム水の0.5%生理的食塩水溶液 0.1cc宛を予め脱毛せる背部皮内へ1日1回連続10日間注射し、第2群は1.0%ブローム化人血清 0.1cc宛を背部皮内へ隔日5回注射した。第3群は1.0%ブローム化人血清 1.0ccを胸骨皮下に1回注射し、第4群は生理的食塩水で稀釈した30.0%ブローム水 1.0ccを胸骨皮下に1回注射、第5群は1.0%ブローム化人血清 1.0ccを静脈内に1回注射、第6群は生理的食塩水で稀釈した30.0%ブローム水を1.0cc静脈内に注射した。

第3項 反应用抗原

1) 沈降反应用抗原

人血清及び感作用抗原に使用したブローム化人血

清, Keckwick の方法²⁷⁾により調製した卵白アルブミンに既述の方法によりブローンを結合せしめたブローン化卵白アルブミンを使用した。

2) 再注射用抗原

城²⁸⁾は皮膚に於ける局所過敏性反応に就て実験を行い、抗原の静脈内注射を以て感作した家兎に於ては、感作後7乃至14日より21乃至28日に抗原の皮内再注射を行つた場合の方が皮膚反応の出現率もよく又程度も強い事を認め、Köhler u. Heilmann²⁹⁾は静脈内感作と皮内感作を比較して後者に於て強い過敏性反応を見ている。

著者は静脈内に感作せる家兎は潜伏期を4週間とし、海猿の潜伏期はすべて2週間とし、再注射量は予備実験によりこれを定めた。即ち生理的食塩水にて各濃度に稀釈せるブローンを剃毛せる腹部へ、家兎に於ては0.2cc、海猿に於ては0.1ccを皮内注射し、24時間後に注射部位の炎症性皮膚反応の有無を検し、全く反応を認めない最高濃度を再注射の限界量とし、それ以下の濃度を皮内再注射量とした。

第1表(a) 家兎に於けるブローンの皮内注射による皮膚反応

皮膚反応 ブローン水 稀釈度	家 兎 番 号 (注射量 0.2 cc)		
	1	2	3
1 : 500	+	+	++
1 : 1,000	+	±	+
1 : 2,000	+	—	±
1 : 4,000	—	—	—
1 : 8,000	—	—	—

第1表(b) 海猿に於けるブローンの皮内注射による皮膚反応

皮膚反応 ブローン水 稀釈度	海 猿 番 号 (注射量 0.1 cc)		
	1	2	3
1 : 1	+	+	+
1 : 10	+	+	+
1 : 100	±	—	—
1 : 1,000	—	—	—
1 : 10,000	—	—	—

- (++) 中等度に発赤腫脹を呈するもの
 (+) 腫脹は認められないが明らかに発赤を示すもの
 (±) 軽微なる発赤を示すもの
 (—) 全く反応の認められないもの

予備実験の成績は家兎に於ては第1表(a)に示す如くいずれも注射量0.2ccとして1 : 1,000稀釈液注射部位は3例とも全部発赤を認め、1 : 2,000 稀釈液注射部位は1例のみ発赤を示し、1例は僅かに発赤し、1例は全く反応を認めなかつた。1 : 4,000 稀釈液注射部位は3例共すべて陰性であつた。海猿に於ては第1表(b)に示す如くいずれも注射量 0.1ccとして1 : 10 稀釈液注射部位は3例共発赤腫脹を認めたが1 : 100, 1 : 1,000, 1 : 10,000稀釈液注射部位は1例の疑陽性をのぞき他はすべて陰性であつた。故に家兎に於ては1 : 4,000稀釈液 0.2ccを限界とし、1 : 4,000, 1 : 16,000, 1 : 64,000稀釈液各 0.2ccを、海猿に於ては1 : 100, 1 : 1,000稀釈液 0.1ccを夫々皮内に再注射して反応を検した。

第3節 採血方法

家兎に於ける採血は最終感作より4週間目の皮膚反応誘発注射直前に耳静脈より行い、約15ccを採血して検査に供した。

第4節 沈降反応

従来行われているUhlenhuth法、緒方法³¹⁾を行い、寒天層内沈降反応としては Oudin法³⁰⁾及び Oakley 変法³²⁾を行つた。即ち、Oudin 法は抗血清に等量の 0.6% 寒天溶液を45°Cに保ちつつ混合し、直ちに乾熱滅菌した内径3mm 長さ8cmの清浄な小試験管の底部に約2cmの高さに分注する。それを冷蔵庫に保つて寒天層を凝固させ、次に45°Cに保つた0.3%寒天溶液を一旦試験管口に至る迄分注し直ちに吸い出して前述の寒天層を残存させ再び冷蔵庫に保つて凝固させる。かくて試験管壁に寒天の薄膜を残し次に加える抗原液が管壁と寒天層の間を伝つて侵入するのを防ぎ次に抗原液として1.0%ブローン化人血清及び1.0%無処置人血清を注加し、3乃至5°Cの氷室内に保つて9日間反応を観察した。

Oakley 変法は上記原法で抗血清と寒天を凝固させた後更にその上層に0.3%寒天溶液を2cmの高さに分注し、それが凝固した後、前法と同じ操作で抗原液を注加した。

沈降反応に用いた抗原はすべて 1.0%蛋白液を基準として稀釈法を行つた。

第5節 海猿尿中ブローンの定量

投与抗原の運命を追求する一助として海猿1匹について、抗原として生理的食塩水を用いて1 : 3に稀釈せるブローン水 1.0ccと純ブローン水 1量、Veronal 緩衝液(pH 8.5) 1量、人血清(蛋白量7%) 1量の割合に冷却し乍ら徐々に加えたもの 1.0ccを静注し

24時間毎に採尿して排泄されるブローム量を定量した。海狸は2匹宛を使用し、定量法は Fister⁸³⁾ の方法に従った。

第1項 試 薬

1) トリクロール醋酸一食塩溶液

100.0g のトリクロール醋酸を蒸留水にとかして100.0cc としたものを保存し、その10.0cc をとり 0.6% 食塩水を以て希釈して全量100.0cc とする。

2) 塩化金溶液

1.0g の塩化金 ($\text{AuCl}_3 \cdot \text{HCl} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) を 200.0cc の蒸留水にとかす。

3) 0.1g/dl ヨードカリ溶液

4) ブローム規準液

1.00g のブロームナトリウムを100.0cc のメスコルベンに入れ約5cc の蒸留水にとかし 0.1g/dl ヨードカリ溶液 0.15cc を加え、蒸留水を加えて割線迄満たす。

第2項 検量曲線の作製

ブローム規準液3.0cc を蒸留水で希釈して 100.0cc とする。その0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0cc を6本の試験管にとり夫々水を加えて 5.0cc とする。これは各々0, 30.0, 60.0, 90.0, 120.0, 150.0mg/dl のブロームナトリウムに相当する。ブローム規準液を増加させる事により30mg間隔で180mg/dl より540mg/dl のブロームナトリウムに相当する溶液を作り、其の各々に4.0cc のトリクロール醋酸一食塩溶液と1.0cc の塩化金溶液とを加え、0濃度をブランクとし、波長440m μ に於ける吸光度を島津光電分光光度計QB50型を使用して測定した。

第3項 海狸尿中ブロームの定量方法

8.0cc のトリクロール醋酸一食塩溶液に尿2.0cc を滴下して激しく振盪し30分後に遠心沈澱を行い除蛋白

し、その上清5.0cc に塩化金溶液1.0cc を混じ蒸留水4.0cc を加えて測定した。但しブロームの排泄量が多い時には尿を1:2乃至1:5に蒸留水を以て希釈したものについて測定した。盲検は除蛋白剤4.0cc と蒸留水5.0cc と塩化金溶液1.0cc とを混合したものについて行い、それを100%透過率目盛に合せ10分以内に波長440m μ に於ける海狸尿の吸光度を測定した。

第8節 皮膚反応の判定

海狸に於ける過敏性皮膚反応の判定はすべて体長軸に平行なる径を縦径、体長軸に直角の方向の径を横径とし、計測して得た長さをmmをもつて現わした。又家兎に於ける皮膚反応はその反応の広さをセロハン紙に複写した後プランニメーターを用いて面積を計測してmm² で示した。尚お(卅)は反応部位に壊死を認めざるも発赤腫張の強度なるもの、(卅)は中等度に発赤腫張を呈するもの、(十)は腫張は認めないが明かに発赤を示すもの、(±)は軽微なる発赤の認められるものを示す。

第2表 抗 原 価

抗体：抗ブローム化人血清家兎抗体
抗原：ブローム化人血清

抗原稀釈度	1,000	2,500	5,000	1万	2.5万	5万	10万	25万
原血清	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-

第3表 抗体価

抗体：抗ブローム化人血清家兎抗体
抗原：ブローム化人血清

抗体稀釈度	25	50	100	250	500	1,000
抗原稀釈度						
50	卅	卅	卅	+	-	-
100	卅	卅	卅	卅	-	-
250	卅	卅	卅	卅	+	-
500	卅	卅	卅	卅	-	-
1,000	卅	卅	+	-	-	-
2,500	卅	+	-	-	-	-

(卅) 重層15分後に反応陽性のもの
(卅) // 30分
(卅) // 1時間
(+) // 2時間
(±) 重層2時間後反応不明瞭なもの
(-) 全く反応の認められないもの

第3章 実 験 成 績

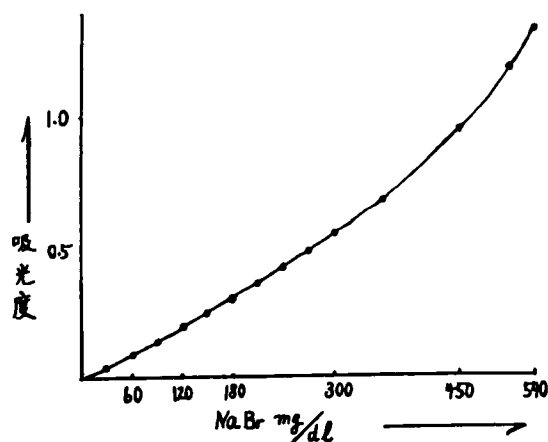
第1節 血清学的反応

第1項 ブローム化人血清を反応用抗原とした抗

ブローム化人血清家兎抗体の沈降反応

ブローム化せる人血清蛋白にて免疫して得た家兎抗

第1図 ブロームナトリウムの検量曲線



体に免疫用抗原即ちブローム化せる 1.0%人血清を抗原原液とした抗原価及び抗体価は第2表及び第3表に示す如き成績を得た。

即ち抗ブローム化人血清家兎抗体に 1.0%ブローム化人血清を反応用抗原とした場合には抗原価 1 : 25,000, 抗体価 1 : 500, 結合帯 1 : 250を示した。

第2項 抗原原液を 1.0%無処置人血清とした抗ブローム化人血清家兎抗体の沈降反応

抗ブローム化人血清家兎抗体にブローム化する前の蛋白即ち 1.0%無処置人血清を抗原原液とした沈降反応の抗原価及び抗体価は第4, 第5表に示す如くである。

第4表 抗原価 抗体：抗ブローム化人血清家兎抗体
抗原：無処置人血清

抗原稀釈度	1,000	2,500	5,000	1万	2.5万	5万	10万	25万	50万	100万
原血清	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊	+	-

第5表 抗体価 抗体：抗ブローム化人血清家兎抗体
抗原：無処置人血清

抗体稀釈度	25	50	100	250	500	1,000
抗原稀釈度 \						
50	冊	冊	+	-	-	-
100	冊	冊	冊	+	-	-
250	冊	冊	冊	冊	-	-
500	冊	冊	冊	冊	+	-
1,000	冊	冊	冊	冊	-	-
2,500	冊	冊	冊	冊	-	-

抗ブローム化人血清家兎抗体に反応用抗原原液として1.0%人血清を用いた場合には抗原価 1 : 500,000, 抗体価 1 : 500, 結合帯 1 : 500 であつた。これを第3章第1節, 第1項のブローム化人血清を反応用抗原とした場合と比較すると抗体価は両者殆ど差を認めないが抗原価は無処置人血清を抗原とした方が高い価を示し, 結合帯も高稀釈度に移行した状態を示した。此の結果より実験に用いたブローム化人血清には未だブローム化されない人血清蛋白成分が相当量含有されているものと考えられる。

第3項 交叉反応

免疫用抗原に使用した人血清と血清学的に全く異なる卵白アルブミンをブローム化して反応用抗原とした場合の抗ブローム化人血清家兎抗体との沈

降反応の成績は第6表に示す如く僅か乍ら陽性を示し抗原価は 1 : 8 であつた。尚ブローム化しない卵白アルブミンとの反応は陰性であつた。即ち抗ブローム化人血清家兎抗体中に微弱乍らブローム化蛋白の血清学的特異性を証明し得た。

第6表 抗ブローム化人血清家兎抗体の交叉反応

抗体：抗ブローム化人血清家兎抗体
抗原：ブローム化卵白アルブミン

抗原稀釈度	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
原血清	+	+	+	+	±	-	-

抗体：抗ブローム化人血清家兎抗体
抗原：無処置卵白アルブミン

抗原稀釈度	1 : 1	1 : 2	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
原血清	-	-	-	-	-	-	-

第4項 寒天層内沈降反応

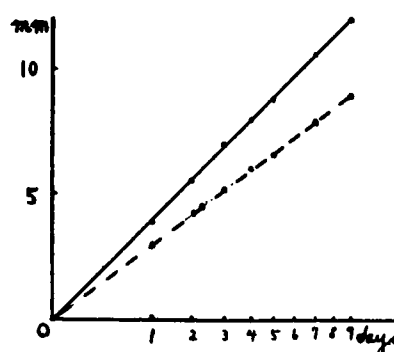
Oudin 法を実施する時, 反応輪の進行速度が進行に要する時間の平方根に比例するものがある事を Munoz & Becker³⁴⁾ は認めている。

寒天にて凝固せしめた抗ブローム化人血清家兎抗体に1.0%無処置人血清及び1.0%ブローム化人血清を重ねて比較すると第2図(a)の如く, 反応輪の移動速度は後者に於て遅い傾向を示したが, 両者にアルブミン, グロブリンの反応輪を認めた。これは Liefmann の CO₂ 導入法³⁵⁻³⁶⁾ により, アルブミン, グロブリンを分離してたしかめた。

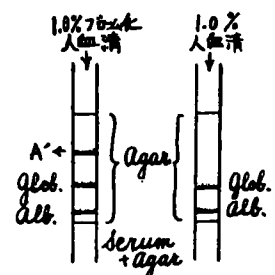
Oakley 変法に於てはアルブミン, グロブリンの反応輪の他に, 抗原重層後第4日目にブローム化人血清を重ねた方に新に反応輪の出現を認めた(第2図

第2図 寒天層内沈降反応

(a) Oudin 法



(b) Oakley 法



第7表 海猿静脈内に注射したブロームの尿中排泄状態 (mg)

注 射 後 数 日	第 1 群	第 2 群	注 射 後 数 日	第 1 群	第 2 群	注 射 後 数 日	第 1 群	第 2 群
1	0	0	23	815	1,287	45	730	630
3	0	0	25	840	980	50	1,247	450
5	164	910	27	1,055	450	55	830	955
7	500	750	29	720	470	60	560	875
9	840	360	31	1,582	572	65	420	370
11	684	432	33	320	555	70	330	240
13	2,180	1,108	35	880	925	75	602	165
15	1,590	1,265	37	620	750	80	720	320
17	1,590	1,416	39	440	330	85	340	432
19	817	1,250	41	550	1,250	90	0	0
21	1,212	306	43	306	970	95	0	0

(第1群 1:3稀釈ブローム水, 第2群はブローム化人血清)

(b)のA'。これはブローム化人血清が無処置人血清と抗原性に於て多少とも異っている為と思われる。

第2節 抗原として静脈内に注射されたブローム水及びブローム化人血清の海猿尿中ブロームの排泄

体内に注入された抗原としてのブローム排泄状態を推知する目的で海猿2匹を1群として第1群には純ブローム水を生理的食塩水を用いて1:3に稀釈したものの1.0cc宛を, 第2群には人血清, Veronal 緩衝液(pH 8.5), 純ブローム水を1:1:1の割合に加えたものの1.0cc宛を静注し, 24時間毎に尿を採取して排泄されるブローム量を Fister 法²⁸⁾で定量してブロームの平均排泄量を第7表に示した。

人及び動物体内に注入されたブローム排泄の緩慢なる事は往時より多数の学者の認める所で^{20) 22) 87)}, 著者の実験に於ても海猿に於て, 注射後4日目よりブローム, ブローム化人血清投与例共に尿中ブロームを証明し, 以後日毎の排泄量の変動激しきも注射後85日目に尙両者共に尿中ブロームを証明し90日以後は排泄を認めなかった。又第1群, 第2群の排泄量に大差を認

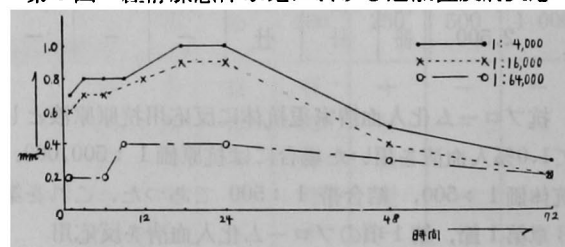
めなかつた。

第3節 過敏性皮膚反応

第1項 ブローム水, ブローム化人血清の経静脈感作家兎に於ける過敏性皮膚反応

ブローム化人血清にて免疫し, 第3章第1節に詳述せる如き血清学的反応を認めた同家兎に最終注射より4週間後耳静脈より採血して検査に供した直後, 純ブローム水の1:4,000, 1:16,000, 1:64,000 溶液0.2ccを腹部皮内に注射し, 1, 3, 9, 12, 18, 24, 48, 72時間後の皮膚反応を観察し, 発赤及び浮腫の縦横径を第8表に, 又その面積をプランメーターにて計測して第3図に示した。

第3図 経静脈感作家兎に於ける過敏性皮膚反応



第8表 経静脈感作家兎に於ける過敏性皮膚反応

誘発注射 (0.2cc)	経過時間 1	2	6	12	18	24	48	72
1:4,000	8.0×7.5 (-)	10.5×8.5 (-)	10.5×8.5 (-)	12.0×8.5 (5.5×4.0)	12.0×8.5 (5.5×4.5)	11.0×10.0 (5.5×4.5)	10.0×8.5 (5.5×4.0)	6.0×5.5 (-)
1:16,000	7.5×8.0 (-)	8.5×9.5 (-)	9.0×9.5 (-)	10.0×11.5 (3.5×3.0)	10.0×12.0 (4.0×3.0)	10.0×12.0 (4.0×3.0)	8.5×8.0 (3.0×3.0)	4.0×3.5 (-)
1:64,000	4.5×3.0 (-)	4.5×4.0 (-)	6.0×4.5 (-)	7.0×4.5 (-)	8.0×4.5 (-)	8.0×5.0 (-)	6.5×5.0 (-)	5.0×4.5 (-)

(単位mm. 括弧内は壊死部)

即ち血清学的交叉反応は1:8の微弱なる反応を示したが、過敏性皮膚反応は1:64,000稀釈液の誘発注射によつても尚明らかに陽性反応を認めた。

第2項 ブローム水、ブローム化人血清の経静脈感作海猿に於ける過敏性皮膚反応

ブローム水及びブローム化人血清の感作能を比較する為に両者のブローム含量を等量にして感作した。即ち生理的食塩水にて1:3に稀釈せるブローム水1.0ccと、純ブローム水、Veronal緩衝液(pH 8.5)及び人血清を1:1:1の割合に加えたもの1.0ccを以つて頸静脈より1回感作し、2週間後1.0%及び0.1%ブローム水0.1ccを腹部皮内に注射し、24時間後の皮膚反応を検した。

第9表 経静脈感作海猿に於ける過敏性皮膚反応

感作原	誘発注射1.0%ブローム水 (注射量0.1cc)			誘発注射0.1%ブローム水 (注射量0.1cc)		
	海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm	海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm
ブローム水	1	+	3.0×5.0	1	—	—
	2	+	5.0×4.5	2	±	1.0×1.0
	3	+	3.5×4.0	3	—	—
	4	+	3.5×4.0	4	—	—
ブローム化人血清	5	+	3.0×2.5	5	—	—
	6	+	4.0×2.0	6	—	—
	7	+	3.0×4.0	7	—	—
	8	±	3.0×2.0	8	—	—

第9表に示す如くブローム水にて感作したものは1.0%ブローム水を以つて誘発した部位に於て4例共陽性の反応を認めたが、0.1%ブローム水をもつて誘発注射した部位は4例中1例のみ疑陽性を呈したのみで他の3例は陰性であつた。

ブローム化人血清にて感作した海猿は1.0%ブローム水を以つて誘発した部位に於て4例中3例陽性、1例は疑陽性であり、0.1%ブローム水にて誘発注射した部位は全部陰性であつた。即ち両者に殆ど差を認め得ない結果を得た。

第3項 経皮内感作海猿に於ける過敏性皮膚反応

1) ブローム水の経皮内感作海猿に於ける過敏性皮膚反応

生理的食塩水を用いて稀釈せる0.5%ブローム水0.1ccを背部皮内へ1日1回、連続10日間注射し、最終注

射より2週間後1.0%及び0.1%ブローム水0.1ccを腹部皮内へ注射し、24時間後の皮膚反応を観察した。即ち1.0%ブローム水にて誘発した部位に於ては全部陽性の反応を示し内2例は中等度の発赤、腫脹を認めた。0.1%ブローム水にて誘発した部位に於ては1例のみ陽性、2例は疑陽性の反応を示し他の1例は陰性であつた。

第10表 0.5% ブローム水を感作原とする海猿の過敏性皮膚反応

誘発注射1.0%ブローム水 (注射量0.1cc)			誘発注射0.1%ブローム水 (注射量0.1cc)		
海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm	海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm
1	++	7.0×6.0	1	+	3.0×2.0
2	++	6.0×5.0	2	±	2.0×2.0
3	+	4.0×4.0	3	—	—
4	+	5.0×5.0	4	±	1.0×1.0

2) ブローム化人血清の経皮内感作海猿に於ける過敏性皮膚反応

1.0%ブローム化人血清0.1ccを海猿背部皮内へ隔日5回注射し、最終注射より2週間後1.0%及び0.1%ブローム水0.1ccを腹部皮内へ注射し、24時間後の皮膚反応を観察した成績は第11表の如くであつた。

第11表 1.0% ブローム化人血清を感作原とする海猿の過敏性皮膚反応

誘発注射1.0%ブローム水 (注射量0.1cc)			誘発注射0.1%ブローム水 (注射量0.1cc)		
海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm	海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm
1	+	5.0×6.0	1	±	1.0×1.0
2	±	2.0×2.0	2	—	—
3	—	—	3	—	—
4	±	2.0×3.0	4	—	—

ブローム化人血清にて感作せる海猿に於ては1.0%ブローム水にて誘発した部位に於て1例陽性、2例は疑陽性の成績を示し、1例は陰性であり、0.1%ブローム水を誘発注射した部位に於ては1例のみ疑陽性であり他の3例は陰性であつた。

第4項 ブローム水、ブローム化人血清の経胸骨皮下感作海猿に於ける過敏性皮膚反応

第3章, 第3節, 第2項に於て使用したのと同じ抗原即ち生理的食塩水にて1:3に稀釈せるブローム水1.0ccと, 純ブローム水, Veronal 緩衝液 (pH 8.5) 人血清を1:1:1の割合に加えたもの1.0ccにより胸骨皮下に1回感作し, 2週間後1.0及び0.1%ブローム水各々0.1ccをもつて誘発注射を行い, 皮膚反応を観察した結果は第12表の如くであつた。

第12表 経胸骨皮下感作海猿に於ける過敏性皮膚反応

感作原	誘発注射 1.0%ブローム水 (注射量0.1cc)			誘発注射 0.1%ブローム水 (注射量0.1cc)		
	海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm	海猿番号	反応の強さ	反応の大きさ mm
ブローム水	1	+	3.5×4.0	1	—	—
	2	++	7.5×4.5	2	±	1.0×2.0
	3	+	5.0×6.5	3	±	1.0×1.0
	4	+	5.0×5.0	4	—	—
ブローム化人血清	5	+	4.0×9.0	5	—	—
	6	++	6.0×8.0	6	±	10.×1.0
	7	+	2.0×5.0	7	—	—
	8	+	5.0×3.0	8	—	—

胸骨皮下感作に於ても, ブローム水, ブローム化人血清共に 1.0%ブローム水を誘発注射した部位は4例共陽性の反応を示しその内各々1例は中等度の発赤, 腫脹を示した。

0.1%ブローム水を誘発注射した部位はブローム水を用いて感作せる群に2例, ブローム化人血清にて感作せる群に1例に於て疑陽性の反応を認めたが他はすべて陰性であつた。

第4章 総括並びに考按

過敏性反応が血清の如き自然蛋白質の特異性を頗る鋭敏に示現する事は, 過敏性現象に関する研究の進展とともに明かにされた所であるが, かかる特異性が何に起因するかという問題は未だ完全に解明されるに至っていない, 然し感作原の特異性がその化学構造と密接な関係を有する事実は近時の研究の指示するところであり此の方面に関する実験と理論的考察は近来大いなる進歩を遂げている^{38) 39) 40)}。

Obermeyer, Pick⁴¹⁾ に始まるヨードの血清学的特異性に関する研究は, 更に Wormall⁴²⁾ により

ヨード化蛋白とヨード化蛋白抗体間の反応を3,5-Diiodotyrosin が抑制する事を発見し, ブローム化蛋白についても同様に3,5-Dibromotyrosin が其の反応を抑制する事を証明している。

著者の行つた蛋白のブローム化の方法に於ても蛋白の一部分は容易にブローム化され, そのブローム化蛋白を用いて免疫した家兎血清中にブローム化蛋白の化学的特異性を有する抗体を産生せしめ得ると共に, 同家兎にブロームに対する過敏性皮膚反応を認めた。このことは動物体内に入つた化学的物質がその動物体内の蛋白質と結合して感作原性を獲得するという想定を裏づけるものと考えられる。

然し必ずしも常に免疫家兎に於て血中抗体の化学的特異性と過敏性皮膚反応とが同時に証明されず, 実験的に過敏性皮膚反応のみを認め血中抗体にブロームの化学的特異性の証明され得なかつた例もあり, 又同時に証明された例に於ても血清の交叉反応は微弱なるに拘わらず過敏性皮膚反応は比較的鋭敏であつた事より, 血中抗体の化学的特異性は過敏性皮膚反応より検出が困難なるものであらうと推定される。

Consden & Gordon 等⁴³⁾ によればブローム水を蛋白に作用せしめると蛋白のS-S結合が切断される事を証明している事から蛋白のブローム化には多少の蛋白変性は避け得られないとしてもpHを中性附近に保つ事により変性はその大部分が防止されるものと考えられる。

第5章 結 論

ブロームを用いてアレルギー性皮膚障害について実験を行い次の如き結果を得た。

(1) ブロームは蛋白質と結合して容易にブローム化蛋白となる事を認めた。

(2) ブローム化蛋白にて免疫した家兎抗体中にブロームに対する化学的特異性を血清学的に証明した。

(3) 同家兎に於ける過敏性皮膚反応は, 純ブローム水の1:64,000稀釈液0.2ccの誘発注射で尙陽性の反応を示した。

(4) 寒天層内沈降反応によりブローム化人血清と無処置人血清との間にその抗原性の異なることを認めた。

(5) 静脈内に注射されたブローム水及びブローム化人血清の尿中ブロームの排泄は緩慢で注射後85日にして尙尿中ブロームを証明した。

(6) 海猿に於けるブローム水及びブローム化人血清の感作原性は経静脈, 経皮内, 経胸骨皮下の各感作方法の何れに於ても過敏性皮膚反応は陽性であり, プロ

ーム水、及びブローム化人血清両者の感作原性は殆ど差を認めなかつた。

稿を終るに当り御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜わつた恩師大田原一祥教授に深謝の意を捧げると共に

終始御親切なる御指導を賜つた緒方助教授に謝意を呈す。

(本論文の要旨は昭和33年4月8日第28回日本衛生学会に於て発表した)

文 献

- 1) Obermeyer und Pick : Wien. Klin. Wochenschr., 19, 327, 1906.
- 2) Landsteiner, K. : J. Exp. Med., 56, 399, 1932.
- 3) Landsteiner, K. : J. Exp. Med., 57, 633, 1933.
- 4) Landsteiner, K. : J. Exp. Med., 67, 79, 1938.
- 5) 大川緑郎 : 千葉医学会雑誌, 10, 1251, 1932.
- 6) 内山忠七郎 : 千葉医学会雑誌, 14, 1547, 1936.
- 7) 横地順一 : 成医会雑誌, 57, 482, 1934.
- 8) A. Wormall : J. Exp. Med., 51, 295, 1929.
- 9) 江頭巖 : 日本法医学雑誌, 6, 別冊, 66, 1952.
- 10) 田代康三 : アレルギー時報, 8, 64, 163, 1942.
- 11) 青木利彦・雨谷正俊・富田龍夫 : 日本法医学雑誌, 6, 別冊, 28, 1952.
- 12) 占藤龍弥, 中島博太郎・佐竹尚吾 : 東京慈恵会医科大学雑誌, 71, 別冊, 901, 1955.
- 13) 大村得三 : 脳, 3, 7, 22, 1929.
- 14) 吉富貞 : 日新医学, 6, 565, 1917.
- 15) Y. Kato : J. Biophys., 2, 123, 1926.
- 16) K. Itō : J. Biochem., 9, 17, 1928.
- 17) 寺本重樹 : 岡山医学会雑誌, 46, 3315, 1937.
- 18) 千田秀男 : 京府医大誌, 25, 465, 1939.
- 19) 小坂幹文 : 生化学, 25, 266, 1953.
- 20) 滝本恒雄 : 生化学, 27, 104, 1955.
- 21) 土肥慶蔵 : 皮膚科学中巻, 135, 1928.
- 22) 林春雄 : 薬理学, 269, 1947.
- 23) 谷村忠保 : 皮膚科泌尿器科雑誌, 20, 447, 1920.
- 24) C. T. Mörner : Z. physiol. Chem., 51, 33, 1907.
- 25) C. T. Mörner : Z. physiol. Chem., 88, 138, 1913.
- 26) R. Zeyneck : Z. physiol. Chem., 114, 275, 1920.
- 27) Kekwick, R. A., Cannan, R. K. : Biochem. J., 30, 227, 1936.
- 28) 城義彰 : 岡山医学会雑誌, 44, 8, 2235, 1932.
- 29) Köhler u. Heilmann : Ztb. Bact. Orig., 91, 112, 1924.
- 30) Oudin, J. : J. Immunol., 65, 47, 1950.
- 31) 緒方益雄 : 第1回衛生学, 微生物学, 寄生虫学連合学会講演, 1927.
- 32) 進藤宙二 : 血清反応とその実際, 36, 1956.
- 33) 吉川春寿 : 臨床医化学1実験編, 326, 1955.
- 34) J. Munoz, Elmer, L. B. : J. Immunol., 65, 47, 1950.
- 35) 進藤宙二 : 血清反応とその実際, 67, 1956.
- 36) 緒方富雄 : 血清学実験法, 111, 1947.
- 37) 額田晉, 額田煜 : 正しい治療のための薬理学, 269.
- 38) Haurowitz : Fortschritt d. Allergielehre v, P. Kallos, 1939.
- 39) 阿部正英・山岡静三郎 : 化学の領域, 1, 21, 1947.
- 40) 阿部正英, 山岡静三郎 : 化学の領域, 3, 68, 1948.
- 41) R. Consden, A. H. Gordon : Bioch. J., 46, 8, 1950.

Studies on The Professional Allergic Dermatitis

Part I.

The Antigenicity and The Sensitization of Animals with "Bromine".

By

Masaharu Okazaki

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director : Prof. K. Ohtahara, M. D.)

With bromine the author has experimented allergic dermatitis and the following results have been obtained.

(1) It was recognized that bromine easily combined with serum protein to become the brominated serum protein.

(2) The serological chemical properties of the brominated proteins were recognized by experiments showing the results of reaction between the brominated human serum antiserum of rabbits, and the brominated egg albumin.

(3) Positive effects to induce hypersensitiveness were observed to the skin of the same rabbit immunized by the brominated human serum with the injection 0.2cc of 1:64,000 dilution of bromine solution.

(4) Different antigenicity has been recognized between the brominated human serum and the human serum by "Oudin's serum agar technic".

(5) Discharge of the bromine in the urine of guinea-pigs intravenously injected as antigen 1cc of 1:3 dilution of pure bromine solution or 1cc of brominated human serum (pure bromine solution 1:human serum 1:phosphate buffer 1) was so slackness that the bromine was demonstrated 85 long days after the injection.

(6) Guinea-pigs were used as experimental animals and the sensitization were proved by the methods of intravenous, intracutaneous and subcutaneous injections of bromine solution or brominated human sera, and positive effects of inducing hypersensitiveness of the skin were obtained.

The brominated protein has not been recognized different from the bromine solution in their sensitization of guinea-pigs.
