

Forssman shock (FS) についての免疫薬理学的研究

永井博式，市川昌和，江田昭英

（岐阜薬科大学薬理学教室）

Immunopharmacological Study on Forssman Shock

HIROICHI NAGAI, MASAKAZU ICHIKAWA and AKIHIDE KODA

Department of Pharmacology, Gifu College of Pharmacy

(Received September 5, 1977)

The pharmacological study on Forssman shock was conducted in guinea pigs. After an intravenous injection of Forssman antibody, fetal systemic shock was associated with marked drops in CH_{50} , leucocyte count and platelet count and with an incoagulability of the blood. With intraperitoneal administration of chlorpheniramine, homochlorcyclizine, theophylline, isoproterenol or prednisolone, guinea pigs were not protected from lethal shock caused by Forssman antibody. Experimental glomerulonephritis could not be induced by three injections of sublethal dose Forssman antibody into guinea pigs. These results confirm that Forssman shock belongs to typical Type II, cytotoxic reaction and demonstrate that this reaction is an efficacious method to investigate the allergic reaction associated with remarkable changes of blood components.

アレルギー疾患の研究が進むにつれて，その実験モデルはアレルギー疾患の原因の解析や抗アレルギー剤の前臨床的評価のために重要なことである。アレルギー疾患は Coombs and Gell¹⁾ によつて4型に分類されているので，抗アレルギー剤の研究はこの4型に従つて適当な実験モデルを用いて行うことが必要である。この観点に立って著者らは N-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl) anthranilic acid の抗アレルギー作用について多角的な検討を行つてきた。4型のアレルギー反応のうちで，Type II の反応は逆アナフィラキシーによる細胞溶解型の反応であり，細胞あるいは組織それ自体，またはこれらに附着した小分子の物質が抗原となり，対応する抗体と補体などの血清成分の関与で細胞溶解を起こす。臨床的には自己免疫性溶血性貧血や Goodpasture 症候群における腎炎など重篤な症状を示すものが多い。実験モデルとしてはウサギの抗ラット血清をラットの皮内に注射して生ずる浮腫を指標とする reversed cutaneous anaphylaxis やウサギの抗ラット腎血清をラットに静注して惹起する馬杉腎炎などが挙げられ，また，1911年，Forssman によつて発見された Forssman 抗原とその抗体による反応も Type II の反応の一つと考えられる。すなわち，その全身反応としてはヒツジ赤血球でウサギを免疫して得られる hemolysin をモルモットに注射するとアナフィラキシーショック類似の症状を呈する反応であり，ヒツジ赤血球膜の Forssman 抗原に対する抗体がモルモットの腎，肝，睪丸あるいは脳の組織にある共通抗原と逆アナフィラキシー型の反応を惹起し，全身性ショック症状 (FS) を示し，多くの場合，その症状は致死的である。Forssman 抗原および抗体については多くの研究者により詳細な免疫学的検討が行われており，それらの性質は明確になってきた。FS は補体依存性の反応であることが Glovsky et al,³⁾ Jenson⁴⁾ および著者らによつて報告され，また，血小板の意義についても抗血小板抗体による反応の抑制が報告されている。⁶⁾しかし，ショックの性質についての詳細な検討はみあたらない。そこで本研究では FS の免疫薬理学的検討を企図し，抗アレルギー剤の研究法としての意義について検討したので報告する。

実験材料および方法

実験動物：体重250~300g の Hartley 系モルモットを雌雄の別なく用いた。

抗血清：ウサギの抗ヒツジ赤血球血清 (Forssman 抗体) は西岡および岡田の方法に従って作製した。すなわち体重約 2.5kg のウサギに 10⁹/ml ヒツジ赤血球浮遊液 1 ml を隔日に10回静脈内に注射して免疫し、最終注射から10日目に採血して得た血清を用いた。この血清の溶血素価は 1 : 5,000であった。抗血清は56°C, 30分加熱処理して非働化し、-20°Cで凍結保存した。ウサギの抗 egg albumin 血清はすでに報告した方法に準拠して作製した。抗原は complete Freund's adjuvant とともに初回は10mg, 以後は10日毎に20mg を3回腎筋あるいは背部筋肉内の数カ所に分けて注射した。最終注射から10日目に採血し、抗ヒツジ赤血球血清の場合と同様に非働化して凍結保存した。

薬物：chlorpheniramine maleate (興和新薬), homochlorcyclizine hydrochloride (エーザイ), isoprotrenol hydrochloride (半井化学), theophylline (半井化学) および prednisolone phosphate (武田薬工) を用いた。これらのうちで塩を形成するものは、以後、単に塩基名のみを以て示した。

FS：予備実験の結果からショックを惹起しうる最少抗血清量は0.2ml/animal であったので、以下の実験ではこの量を用いたすなわち、予めモルモットから採血して血清補体価、血液凝固時間、赤血球数、白血球数、血小板数、ヘマトクリット値および A/G 比を測定した後、前腕静脈的に抗血清を注射して症状を観察した。症状の観察は既報に従って A) licking nose, rubbing nose B) ruffling fur C) weakness, diminished tone D) labored breathing E) sneezing, coughing F) retching G) rales H) evacuation of feces I) micturition J) convulsion K) prostration L) death の12症状について行った。モルモットが死亡した場合には直ちに採血し、前述の血液所見を測定した。

Passive systemic anaphylaxis (PSA)：既報に従った。すなわち、ウサギの抗 egg albumin 血清の 1 ml/animal をモルモットの心臓内に注射して受身感作し、24時間後、前腕静脈内に 1 mg/ml の 1 ml/animal を注射してショックを惹起した。症状の観察および血液所見の測定は FS の場合と同様に行った。

血液所見の測定：血清補体価は Milgrom and Miller⁹⁾の方法に従い、寒天内溶血反応を用いて測定した。すなわち、ペロナール緩衝液 (pH 7.5) に浮遊させた 2%ヒツジ赤血球浮遊液と50単位の溶血素の同容量を混合し、37°Cで1時間 incubation して 1%感作赤血球浮遊液を作製した。この浮遊液に47°Cでペロナール緩衝液に溶解した 2%アガロース溶液の同量と混合し、その 15ml を直径 9.5cm のシャーレ内に注いだ。アガロースが凝固した後、直径 3 mm の well を 1.5cm 間隔で15個あけ、そのうちの 5 個には CH₅₀ unit 既知のモルモット補体の 10 μ l を標準液として注入し、他の well には被血清の同量を入れ、4°Cで24時間反応させ、ついで1時間 incubation して生ずる溶血輪の直径を測定した。標準液の力価と、溶血輪の直径から標準曲線を作製し、被検血清中の補体価を測定した。血液凝固時間の測定は Sahli-Fonio¹⁰⁾法により、A/G 比はセバラックス法によりそれぞれ測定した。血球数およびヘマトクリット値は常法によって測定した。

実験的腎炎：ウサギの抗ヒツジ赤血球血清のモルモットに対する致死量は 0.2ml/animal であったので、その 1/4 または 1/2 量をモルモットの腹腔内に 3 日間注射し、前述の血液所見に加えて尿蛋白質量および腎の組織学的所見を観察した。

成 績

FS および PSA の比較

FS および PSA による症状, 致死時間ならびに血液所見の変動は Table 1 および 2 に示すごとくである (Fig. 1 参照)。

Table 1 Comparison of symptoms and lethal time caused by Forssman systemic shock and passive systemic anaphylaxis.

Reaction	Symptoms ^{a)}												Degree of general symptoms ^{b)}	Lethal time (sec.)
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L		
FS	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	III	240
	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	III	240
	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	+	III	300
	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	III	180
PSA	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	III	300
	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	III	220
	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	III	180
	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	III	246
	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	III	242
	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	III	243

- a) Symptoms are expressed as follows, A; licking nose, rubbing nose, B; ruffling fur, C; weakness and diminished tone, D; labored breathing, E; sneezing coughing, F; retching, G; rales, H; evacuation of feces, I; micturition, J; convulsion, K; prostration, L; death. When symptoms is recognized, + is signed.
 b) Evaluation of degree on general symptoms caused by shock is as follows, 0; asymptoms, I; + (1~3), II; + (4~7), III; + (more than 8) or death.

Table 2 Changes of complement activity, coagulation time, white blood cell count, red blood cell count, platelet count and hematocrit value after Forssman shock and passive systemic anaphylaxis in guinea pigs.

Group	No.	Complement (CH ₅₀ .U)	Coagulation (time, sec)	White blood cell (10 ² /mm ³)	Red blood cell (10 ⁶ /mm ³)	Platelet (10 ³ /mm ³)	Hematocrit (%)
Normal	8	205.6 ± 7.35	446.9 ± 85.40	53.3 ± 2.80	581.6 ± 33.22	416.2 ± 30.45	43.4 ± 0.76
FS	7	157.9 ± 18.22 *	3572.0 ± 496.71 *	12.1 ± 1.26 *	600.4 ± 30.72	162.4 ± 18.5 *	43.9 ± 1.30
PSA	7	214.9 ± 11.52	413.3 ± 40.14	46.0 ± 5.69	606.1 ± 5.60	406.3 ± 21.55	42.9 ± 1.10

Each values in normal is measured on the blood taken from animals before shock.
 * means statistically significant at p < 0.05 from normal.

すなわち, FS により全例がショック症状を呈して死亡したが, その症状は PSA の場合とは異なり, A) licking nose, rubbing nose E) sneezing, coughing G) rales および J) convulsion の 4 症状はみられず, 剖検所見では著明な肺水腫がみられた。また, FS により血清補体価, 白血球数および血小板の減少が認められ, 血液凝固時間は著明に延長した。一方, PSA によつてはこのような血液所見は認められなかった。

薬物の影響

アレルギー疾患, 特に Type I の疾患の治療剤として用いられている chlorpheniramine, homochlorcyclizine, theophylline, isoproterenol または prednisolone の 10mg/kg を反応惹起 30 分前に腹腔内投与した場合の FS に対する影響は Table 3 に示すごとくである。

すなわち, いずれの薬物によつても FS の抑制はみられず, 致死時間の延長もみられず, むしろ短縮の傾向がみられた。また, 補体価の減少, 血液凝固時間の延長, 白血球数および血小板数の減少はいずれの薬物によつても抑制されなかった。

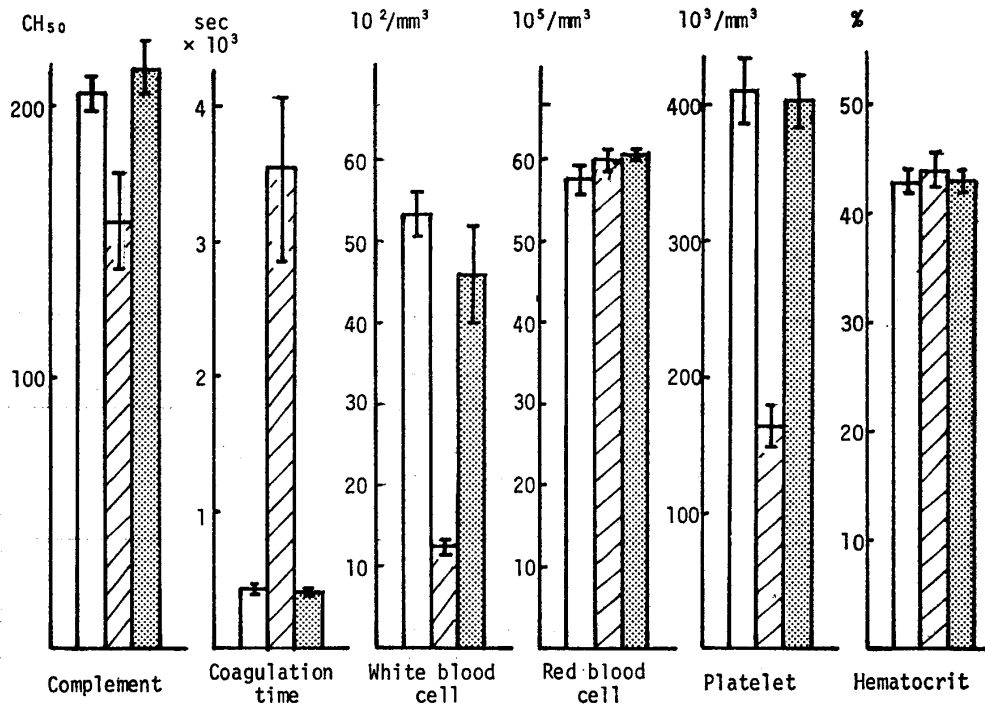


Fig. 1 Changes of complement activity, coagulation time white blood cell count, red blood cell count, platelet count and hematocrit volume by Forssman shock and passive systemic anaphylaxis.

□: Normal, ▨: Forssman shock, ▩: Passive systemic anaphylaxis

Table 3 Effect of drugs on FS and FS-induced changes in blood components.

Drugs a)	General symptoms b)	Lethal times (sec)	Complement (CH ₅₀ , U)	Coagulation (time, sec)	White blood cell (10 ² /mm ³)	Platelet (10 ³ /mm ³)
Normal	0	—	205.6 ± 7.35	446.9 ± 85.40	53.3 ± 2.80	416.2 ± 30.45
Control	III	522.9 ± 218.98	157.9 ± 18.22	3572.0 ± 496.7	12.1 ± 1.26	162.4 ± 18.51
Chlorpheniramine	III	368.2 ± 76.12	175.0 ± 8.50	3738.0 ± 1119.10	11.2 ± 1.50	184.4 ± 20.62
Homochloramine	III	227.2 ± 5.70	188.8 ± 7.30	4000.0 ± 854.32	14.5 ± 2.00	199.9 ± 31.61
Theophylline	III	292.0 ± 109.29	174.4 ± 20.00	3560.8 ± 803.44	13.0 ± 3.50	172.3 ± 26.52
Isoproterenol	III	336.0 ± 129.97	171.4 ± 11.6	3968.0 ± 983.34	13.1 ± 2.83	138.4 ± 58.33
Prednisolone	III	186.2 ± 17.07	152.6 ± 19.4	4497.8 ± 1006.58	15.2 ± 2.50	169.2 ± 24.64

a) Drugs were administered 10 mg/Kg i.p. 30 min prior to challenge. b) Degree on general symptom caused by shock was evaluated as described in table 1.

実験的腎炎:

致死量の $\frac{1}{4}$ または $\frac{1}{2}$ 量の抗血清を3日間注射した場合の尿蛋白質量および血液所見は Fig. 2に示す如くである。

すなわち、抗体の初回注射後、1, 5, 10, 15および20日目のいずれにおいても尿蛋白質は認められず、血清補体価の変動は抗血清注射前値の域を離れなかった。赤血球数、白血球数およびA/Gは5および10日目に軽度減少の傾向を示したが、15日または20日目には回復した。ヘマトクリット値にはほとんど変化が認められなかった。また、20日後の腎の組織学的検討では $\frac{1}{4}$ または $\frac{1}{2}$ 投与群のいずれも糸球体および尿細管に変化は認められず、糸球体基底膜肥厚、細胞浸潤、尿腔内蛋白質の漏出などの特徴的な腎炎の所見は認められなかった。Fig. 3の $\frac{1}{2}$ 投与群の20日目の腎の所見を示した。

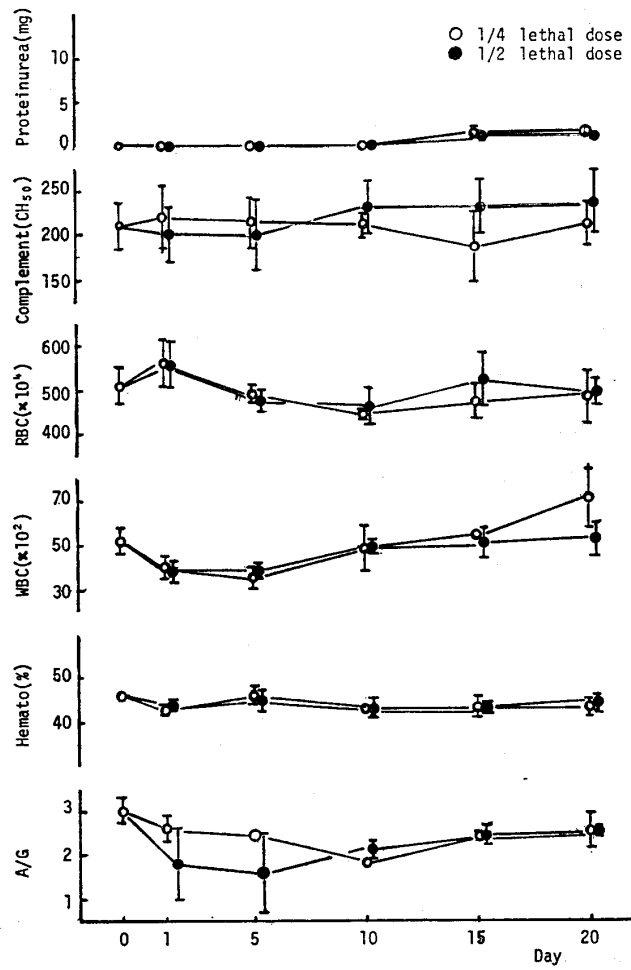


Fig. 2 Changes of proteinurea, complement activity, red blood cell, white blood cell, hematocrit and A/G in guinea pigs treated with Forssman antibody i.p. for 3 days.

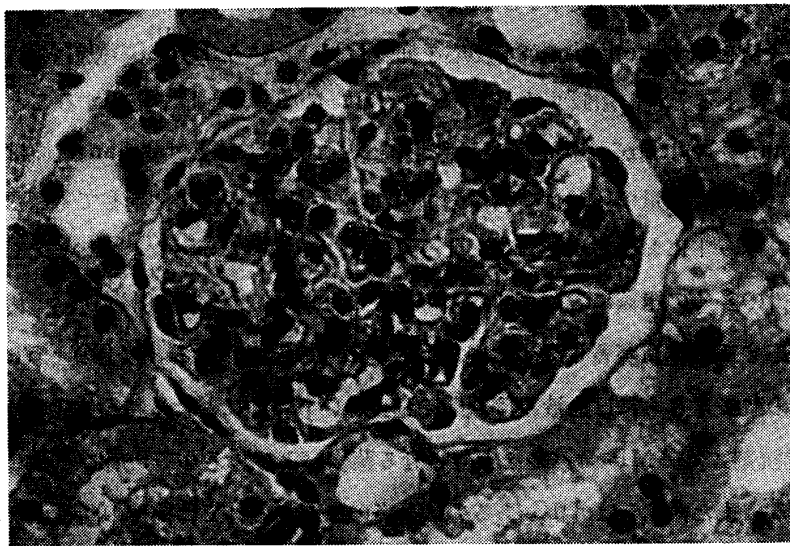


Fig. 3 Section of guinea pig kidney tissue following the injection of Forssman antibody.

考 案

Forssman 抗体による全身性ショックおよびこれに及ぼす薬物の影響,ならびに Forssman 抗体による腎炎惹起の可能性について検討した。ショック症状は PSA の場合とは異なり, licking nose, rubbing nose および sneezing のような上気道に対する histamine 症状と思われるものは認められず, また, FS は抗 histamine 剤の chlorpheniramine や anaphylactic mediator に拮抗する homochlorcyclizine によって全く抑制されなかった。したがって, FS には histamine の関与はないか, あるいは少ないように思われる。また, 細胞内 cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate (c-AMP) 量を増加させる theophylline や isoproterenol, さらには lysosome 膜の安定化作用をもち, 強力な消炎作用を示す prednisolone も FS に対しては無効であったので, FS による細胞溶解は c-AMP によって調整されたり, あるいは lysosome 膜の安定化によっては抑制することのできない機構によることを示唆する。FS による致死後の剖検所見では著明な肺水腫が認められ, これは theophylline や isoproterenol のような気管支拡張剤の投与によって抑制することができなかった。したがって, FS による肺水腫は気管支収縮の結果によるものではなく, 血管系の変化によるものと思われる。

FS による血液所見の変化は非常に特徴的であり, 血清補体価は約75%に, 白血球および血小板は約 $\frac{1}{4}$ ~ $\frac{1}{8}$ に減少し, 血液凝固時間は約10倍に延長した。したがって, 本反応は補体—白血球系および補体—血小板—血液凝固系の免疫学的組織障害における humoral amplification system が関与することを示唆する。両 system は共通の接点をもち, 一方が活性化されれば他方にも影響を及ぼすことが考えられるが, FS において, いずれの system が主要な反応であるかについては今回の実験からでは結論しがたい。著者らの知見では FS の特徴が種々の点でヒトの血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation syndrome, DIC) に酷似するように思われる。この際の血液凝固障害は DIC と同様に血栓形成にもとづく fibrinogen および血小板の消耗の結果, 消耗性凝固障害を起こす可能性も考えられたので, 反応前後における fibrinogen 量の変化と血栓の組織学的検討を行った。その結果, fibrinogen 量の反応前値は $54.1 \pm 6.84 \text{ mg/dl}$ (5例)であったが, 反応後値は $35.9 \pm 7.12 \text{ mg/dl}$ となり, 有意 ($P < 0.01$) に減少した。しかし, 組織学的には血栓は肝, 腎, 心および肺のいずれにも認められず, 腎糸球体での fibrin の折出も認められなかったので, FS による凝固障害は DIC のそれとは異なるものと考えられる。また, 薬理的には DIC に著効を示す heparin が本反応を抑制しないという Hyde¹¹⁾の報告および著者らの知見から, FS による症状は DIC によるそれに類似するが, FS を DIC のモデルとして応用することはできないように思われる。つぎに, Forssman 抗体による実験的腎炎の惹起について試みに。Forssman 抗原は腎にも存在するので, その可能性が考えられたが, 致死量の $\frac{1}{2}$ および $\frac{1}{4}$ 量の抗血清を3日間腹腔内に注射しても尿蛋白質の出現や腎の組織学的変化は認められず, ラットにおける馬杉腎炎のような所見はみられなかった。このことは Forssman 抗原が組織共通性であり, 腎以外の多くの組織にも存在するので, Forssman 抗体を注射しても, 馬杉腎炎における抗腎抗体とは異なり, 腎と反応する抗体量が著しく少ないことによるものと思われる。以上のように, FS は血清補体価, 白血球および血小板数の減少, さらには血液凝固時間の延長という多岐にわたる特徴的症状を呈し, anaphylactic mediator に対する拮抗剤, c-AMP レベルを上昇させる薬物およびステロイド剤によっては抑制されない反応であることが明らかである。また, FS は DIC あるいは腎炎のモデルとしては種々の問題点があるので, さらに多くの検討が必要である。しかし, 本反応には補体—白血球系, 補体—血小板—血液凝固系の反応が関与するので, アレルギー疾患のうちで, このような humoral amplification system が介在する疾患の治療剤の研究には必要なモデルであるように思われる。

文 献

- 1) Coombs, R.R.A., and Gell, P.G.H. : Clinical Aspects of Immunology, 2nd ed. Blackwell Scientific Publication, Oxford, P. 575, 1968.
- 2) Koda, A, Nagai, H, Watanabe, S. Yanagihara, Y and Sakamoto, K. : Inhibition of hypersensitivity reactions by a new drug, N-(3', 4'-dimethoxycinnamoyl, anthranilic acid (N-5'), J. Allergy & Clini. Immunol. 57, 396, 1976.
- 3) Glovsky, M. M., Ward P. A., Becker, E. L. and Halbrook N. J. : Role of fumaropimaric acid in guinea pig complement dependent and non-complement dependent biologic reactions, J. Immunol. 102, 1, 1969.
- 4) Jensen J. A. : A specific inactivator of mammalian C'4 isolated from nurse shark serum. J. Exp. Med., 130, 217, 1969.
- 5) 江田昭英，永井博弌：和漢薬シンポジウム， 8， 13， 1974.
- 6) Tsai, C, C, Taichman, N, S., Pulver, W. H. and Schönbaum, E : Heterophil antibodies and tissue injury, Am, J. Pathol, 72, 179, 1973.
- 7) 西岡久寿弥，岡田英親：蛋白質・核酸・酵素， 11， 1509， 1969.
- 8) 江田昭英，永井博弌，和田浩：Baicalin および baicalein の薬理作用（第2報），日薬理誌， 66， 237， 1970.
- 9) Milgrom F. and Miller, R. : Serological hemolysis and complement fixation test in agar gel, Vox, Sang, 8, 537, 1963.
- 10) 金井泉，金井正光：臨床検査法提要，金原出版，東京，P.VI-80，1968.
- 11) Hyde, R. R. : Complement deficient guinea pig. Study of inherited biochemical structure in relation to toxic immune body, Am. J. Hyg, 7, 619, 1927.