

# 犬の Peptone ショック及びアナフィラキシー・ショック における二次的活性物質の検索

岡山大学医学部薬理学教室 (主任 : 山崎英正教授)

山崎英正 秦泉寺 圭 近藤和 二

[昭和34年3月27日受稿]

## 緒 言

Peptone ショック又はアナフィラキシー・ショックの場合犬の血液又はリンパ中に多量の Histamine (Hist.) 及び Heparin が遊離され、特に前者はその症状発現に直接重要な意義をなしていることは周知のことであるが、これらのショックに際してそのほかに滑平筋に特異な緩徐収縮をおこす Bradykinin の如きいわゆる Slow-reacting substance の出現をみることも知られている<sup>1)2)</sup>。しかし、それら以外にもショック症状に関与する活性物質が出現するか否かの点については犬では未だ確実なことが判っていない。Green ら<sup>3)</sup> は創傷ショックにおける ATP 遊離の可能性を唱え、Albaum ら<sup>4)</sup> もこれを支持する知見を報告している。真崎ら<sup>5)</sup> は Congo red ショック時、猫と犬の血液中に赤血球からこの物質の遊離されることを報告した。高岡<sup>6)</sup> によると ATP は犬の動脈血圧を下降し、門脈圧を上昇し、胸管リンパ流を催進する点においてその作用 Hist. と頗る類似し、しかも、リンパ凝固性を停止せしめるので、恰も Peptone 又はアナフィラキシー・ショックの症状を思わせる類似作用がある。高岡<sup>6)</sup>、山崎ら<sup>7)</sup> はシジミエキス、上村ら<sup>8)</sup> はエビエキスの静注によつて、ATP 及び他の Adenine nucleotides が多量に血液中に遊離されることを報告した。また最近モルモット・アナフィラキシー及びラットのアナフィラクトイド反応に除して Serotonine (5-HT) の遊離が関与することが知られている<sup>9)</sup>。

著者らは今回犬の Peptone ショック及びアナフィラキシー・ショック時に Adenine nucleotides 又は 5-HT の遊離がおきないかどうかを検らるために実験を行つた。

## 実験方法

実験には 7~10 kg の成熟犬を用いた。犬のアナフィラキシー・ショックは西山<sup>10)</sup>と同様の方法によつた。即ち牛血清を 5 cc 宛皮下及び静脈内に注射して感作し、約3週間後に採血して緒方氏法により結合帯を求め、再注射抗原量を次式により算出し股静脈に注射した。再注射抗原量 (cc) = [体重 (g) × 1/13] × 1/結合帯。Peptone は Witte 製品を用い、300 mg/kg を同じく股静脈内に注射した。

ショック誘発に際しては Morphine (10 mg/kg) 及び Urethane (1 g/kg) の皮下注射により犬を麻酔し、ショック強度を確認するため股動脈圧を煤紙上に描記させた。

Adenine nucleotides の検索 上村ら<sup>8)</sup>、山崎ら<sup>7)</sup>と同様に股静脈及び肝静脈血漿について行つた。即ち、ショック誘発注射前と直後及び30分後に Heparin-Na の少量を加えた注射器で股静脈血及び肝静脈血を採取した。肝静脈血の採取は頸静脈を経て臨床用心臓カテーテルを肝静脈に達せしめておこなつた。採取した血液は直ちに遠心して血漿 3 cc を分離し、氷冷下で 2% 過塩素酸を 4 倍量加えて除蛋白を行い、次いで 15% KOH で中和し KClO<sub>4</sub> の沈澱を除いた濾紙を蒸留水で 15 cc に調整した。そのうち 10 cc を濾液クロマトグラフィー用に凍結乾燥し、残りの 5 cc は更に蒸留水で倍量に稀釈 (もとの血漿の 10 倍稀釈) したのち分光分析に供した。分光分析はショック誘発注射後のものについて注射前のそれを対照として Beckman 自記分光光度計 (d=1 cm) によつて波長 240~290 m $\mu$  の範囲で行つた。

Adenine nucleotides の濾紙クロマトグラフィーには、上記除蛋白血漿の凍結乾燥末を蒸留水 0.2 cc に溶解し、その 0.1 cc (もとの血漿の 1 cc に相当)

を東洋濾紙 No. 50 (2 cm×40 cm) の一端より 5 cm の原点に風乾しながら少量宛附着せしめる。展開溶媒には (1) 5%  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -Isoamylalcohol<sup>11)</sup> または (2) Isoamylalcohol (5 cc)-Isopropanol (15cc)-5% Trichlor 醋酸 (10 cc)-乳酸 (0.5 cc)-濃  $\text{NH}_4\text{OH}$  (3 滴)<sup>12)</sup> のいずれかを使用し、前者では 13~18°C、後者では 0~5°C で展開した。試料と同時に ATP-Na 塩 (Zellstoffabrik Waldhof 製) の展開を平行させた。これらの濾紙は科研遠紫外線フィルター 2537 を通した低圧水銀燈 (マツダ殺菌燈 GL-15) で、ATP, ADP 及び AMP のスポットを検らべたのち、濾紙の原点と前端の間を 16 等分した。その各区分を細切して 0.01 N-HCl 5 cc で 24 時間溶出し、波長 260 m $\mu$  における吸光度を求めた。

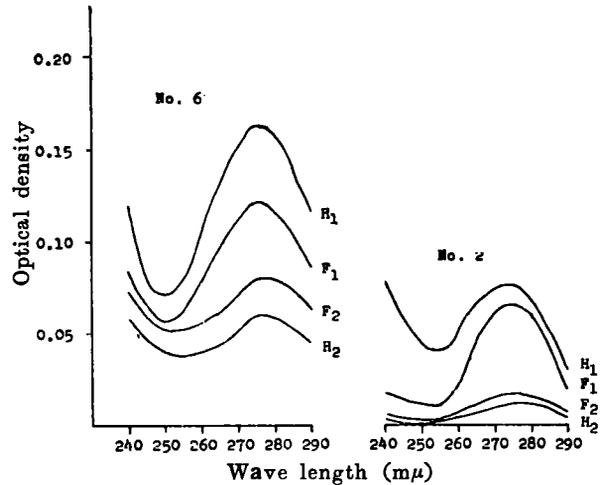
濾紙クロマトグラフィーによる 5-HT の検索：凍結乾燥した肝静脈及び股静脈血除蛋白血漿を Bhattacharya ら<sup>13)</sup> に従って、Acetone 10 cc で 24 時間抽出したのち、風を送つて Acetone を蒸発させ、残渣に 0.2 cc の蒸留水を加えて溶解しその 0.1 cc (もとの血漿の 1 cc に相当) を東洋濾紙 No. 50 に付け、Butanol-醋酸-水 (5:1:4) の溶媒系を用い室温で約 12 時間展開した。同定は Jepson and Stevens<sup>14)</sup> の方法で行つた。即ち、展開後濾紙を風乾し Acetone に溶かした Ninhydrin 試薬を吹きつけ 90°~100°C に 2~3 分間熱したのち紫外線で螢光を検らべた。但しこの方法では Creatinine 硫酸塩として、0.1  $\mu\text{g}$  以下の 5-HT の検出は不確実であつた。

## 実験成績

### 1. Peptone ショック

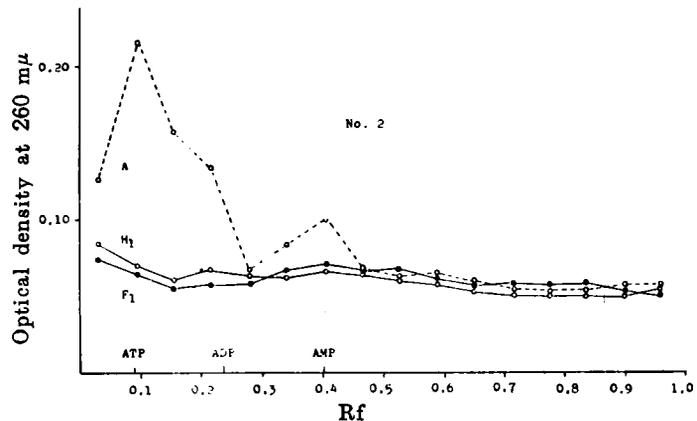
Peptone 股静脈内注射直後及び 30 分後の、肝静脈及び股静脈血漿除蛋白液について、注射前のそれを対照として得た吸光度曲線を 2 例の犬について示すと第 1 図の如くであつた。即ち注射直後の肝静脈血及び股静脈血にいずれも  $\lambda_{\text{max}}$  275 m $\mu$  を認めた。そして肝静脈血の極大吸収は股静脈血のそれより幾分大であつた。注射後 30 分の血漿でも僅かながらやはり 275 m $\mu$  附近に極大吸収が認められた。

次に Peptone 注射直後に肝静脈及び股静脈より得た除蛋白血漿の凍結濃縮液を (1) 又は (2) の溶媒系で展開した濾紙を検らべてみたが、いずれも市



第 1 図. Peptone ショックの犬の除蛋白血漿の分光分析。Witte Peptone 300 mg/kg 股静脈内注射。H<sub>1</sub>: 注射直後の肝静脈血漿, H<sub>2</sub>: 注射 30 分後の同, F<sub>1</sub>: 注射直後の股静脈血漿, F<sub>2</sub>: 注射 30 分後の同。〔左〕犬 No. 6, 7.0 kg ♂, 最大血圧下降 70%, 〔右〕犬 No. 2, 9.7 kg ♀, 最大血圧下降 82%。

販 ATP 製品では明瞭に認められる ATP, ADP 及び AMP スポットの該当 Rf には全く紫外線吸収暗点を認めなかつた。そこで、濾紙の原点と前端の間を 16 等分して 0.01 N-HCl で溶出したものについて波長 260 m $\mu$  でその吸光度を測定したところ、第 2 図に示す如く吸光度曲線は平坦で ATP, ADP



第 2 図. Peptone ショックの犬の除蛋白血漿の濾紙クロマトグラム (Isoamylalcohol-Isopropanol-Trichlor 醋酸-乳酸-濃  $\text{NH}_4\text{OH}$  溶媒系) からの Adenine nucleotidas の検索。Rf と 260 m $\mu$  における吸光度の関係。吸光度は原点と前端間を 16 等分した各区分溶出液についての測定値。ATP, ADP 及び AMP の位置はそれぞれの Rf。符号 H<sub>1</sub> 及び F<sub>1</sub> は第 1 図と同じ, A: 市販 ATP 製品。犬 No. 2。

及び AMP の各 Rf に相当する濾紙区分にピークを認めることができなかつた。

Peptone ショック直後の犬の肝静脈血及び股

股静脈血除蛋白血漿について濾紙クロマトグラフィーにより 5-HT の検出を行つたが、該当 Rf 附近に紫外線による蛍光を全く認めえなかつた。これらの犬は Peptone 注射後30分以内の最大血圧下降率 70~82%を示したものである。

**2. アナフィラキシー・ショック**

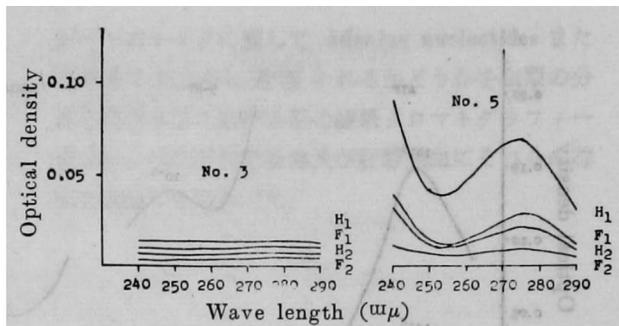
78~91%の最大血圧下降率を示した3頭の犬の誘発注射直後及び30分後の除蛋白血漿の紫外部吸収曲線は第3図の如くで、1例に 275 mμ 附近にショック直後の肝静脈血漿の吸収ピークがみられたが、他の2例には波長 240~290 mμ 間にピークを全く認めなかつた。

それらの犬のショック直後の血漿の濾紙クロマトグラフィーにおいても、2種の溶媒系のいずれを用いた場合にも Adenine nucleotides の Rf 附近にスポットを認めず、又16等分濾紙区分の溶出液にも 260 mμ 波長では Adenine nucleotides Rf 該当部分の特別な吸光度の変化を認めえなかつた(第4, 5図)。

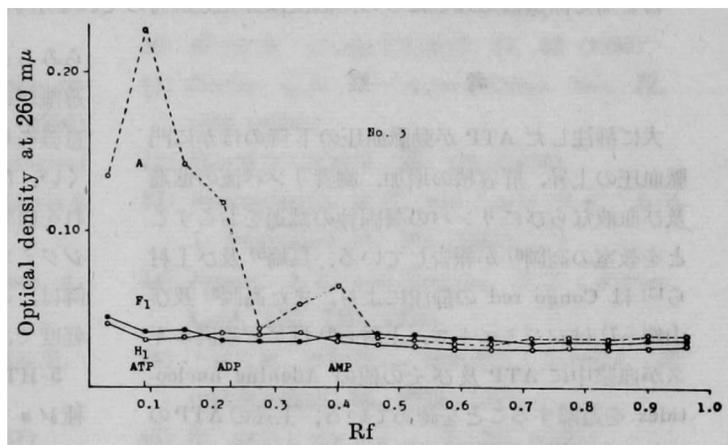
5-HT の濾紙クロマトグラフィーによる検出も陰性におわつた。

**3. ATP, 5-HT, Adrenaline, Histamin 及び Peptone の分光分析**

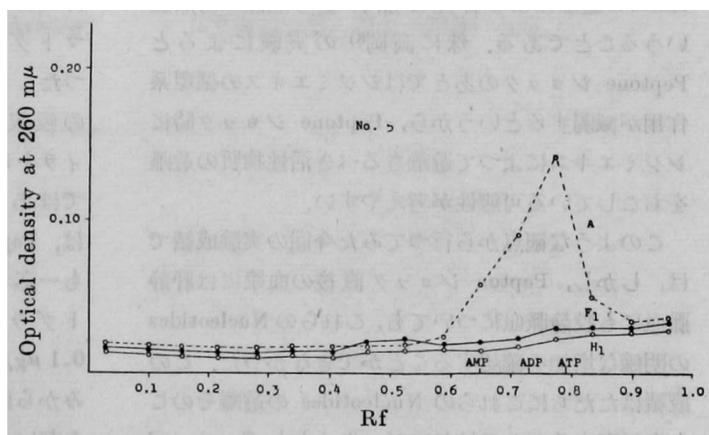
無処置犬の股静脈血漿 2 cc に ATP-Na 塩, 5-HT・creatinine 硫酸塩, 塩化 Adrenaline, 塩酸 Histamine, または Peptone を夫々加え上に述べたと同様の除蛋白処理を行い最終液量を蒸留水で 20 cc に調整し、血漿だけを除蛋白処理したものを対照として上記の波長範囲で分光分析を行つた(第6図)。分光分析時の各薬物の濃度  $10^{-5}$  では ATP 260 mμ, 5-HT 275 mμ, Adrenaline 280 mμの波長においていずれも明らかな吸収ピークを認めたが Hist. では全くピークを認めず、濃度  $10^{-6}$  では ATP にのみピークが認められた。従つてこの分光分析法の検出可能なものの感度はいずれも血漿中の濃度が 10 μg/cc 以上であることが必要と考えられる。血漿に Peptone を加え除蛋白処理したものの吸光曲線は、Peptone によるショック誘発直後の血漿で得たそれと全く類似して



第3図. アナフィラキシー・ショックの犬の除蛋白血漿の分光分析。牛血清股静脈内注射。H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub> は第1図と同じ。[左] 犬 No. 3, 7.0kg ♀, 最大血圧下降78%, [右] 犬 No. 5, 8.4 kg ♀, 最大血圧下降91%。

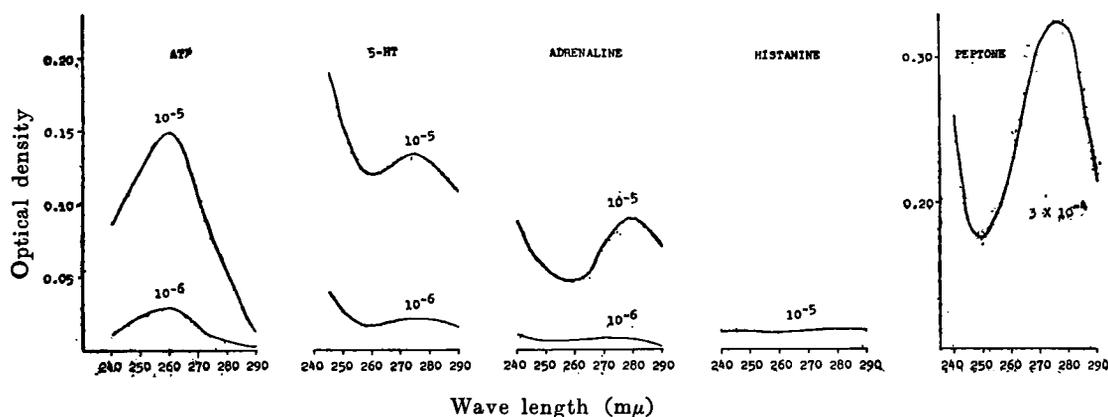


第4図. アナフィラキシー・ショックの犬の除蛋白血漿の濾紙クロマトグラム (Isoamylalcohol-Isopropanol-Trichloroacetate-乳酸-濃 NH<sub>4</sub>OH 溶媒系) からの Adenine nucleotides の検索。その他第2図と同じ。犬 No. 3。



第5図. アナフィラキシー・ショックの犬の除蛋白血漿の濾紙クロマトグラム (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Isoamylalcohol 溶媒系) からの Adenine nucleotides の検索。その他第2図と同じ。犬 No. 5。

おり波長 275 mμ 附近に極大吸収を認めた。



第6図. ATP, 5-HT, Adrenaline, Histamine 及び Witte Peptone の分光分析. 犬の血漿に上記薬物を加え除蛋白処理したもの. 濃度は分光分析時のそれを示す.

### 考 察

犬に静注した ATP が動脈血圧の下降のほかに門脈血圧の上昇, 肝容積の増加, 胸管リンパ流の促進及び血液ならびにリンパの凝固性の減退をおこすことを教室の高岡<sup>6)</sup>が報告している. 真崎<sup>5)</sup>及び上村ら<sup>15)</sup>は Congo red の静注により, また高岡<sup>6)</sup>及び山崎ら<sup>7)</sup>はシジミエキス, 上村ら<sup>8)</sup>はエビ筋肉エキスが血漿中に ATP 及びその他の Adenine nucleotides を遊離することを認めている. 上述の ATP の犬における循環系作用は Peptone 注射またはアナフィラキシーにみられる変化と頗る類似しているところからみて, これらのショックの場合にも, Hist. 及び Heparin の総合効果のほかに Adenine nucleotides の遊離による作用の加わる可能性は当然疑いである. 殊に高岡<sup>6)</sup>の実験によると Peptone ショックのあとではシジミエキスの循環系作用が減弱するというから, Peptone ショック時にシジミエキスによつて遊離さるべき活性物質の遊離をおこしている可能性が考えやすい.

このような観点から行つてみた今回の実験成績では, しかし, Pepton ショック直後の血漿には肝静脈血にも股静脈血についても, これらの Nucleotides の明確な増加を確認することができなかった. この成績はただちにこれらの Nucleotides の遊離そのことを否定するものではないが, 少なくとも Congo red, シジミエキス及びエビ筋肉エキス投与時に認められる程度にはその遊離が著明でないことを知ることができる. 血清アナフィラキシーにおいても結果は同様であつた. 最近, 岸<sup>16)</sup>は犬のアナフィラキシー・ショックにおける血清 ATP の増加を  $\Delta 10$  P の濃度から推定しているが, われわれの実験結果か

らみると, これらの場合に Adenine nucleotides の遊離があつたとしてもショック反応にさほど重大な意義をもつほどにこれがおきるということは考えにくい. なぜなら, われわれの方法によつて著明にそれを血漿中に検出するほどの量において遊離するシジミエキスの投与量によつておきる動脈血圧の下降は, これらのショックの場合にくらべてはるかに軽度である<sup>6)7)</sup>からである.

5-HT についても現在の実験で用いた方法では兩種ショック後の血漿に充分にその遊離を確認しえなかつた. Peptone ショック後の肝静脈及び股静脈血除蛋白血漿に 5-HT と同じ 275 mμ の  $\lambda_{max}$  を認めしたが, これはまた使用した Witte Peptone のそれにも相当した. 5-HT 含有血漿除蛋白液の分光分析 ( $10^{-6}$ 以上) よりも感度のよい濃縮濾紙クロマトグラフィーによる蛍光検出成績が陰性であつたことからみて, おそらく血行中の Peptone の吸収曲線ではないかと思う. しかしアナフィラキシー・ショック直後の血漿にも 3 例中 1 例ではあるが同様の極大吸収の認められたことは, Peptone とはちがつた物質の吸収曲線についても一応考慮する必要がある. 今回の濾紙クロマトグラフィーによる分析の限界は血漿中の 5-HT 0.1 μg/cc 濃度以上であるから, 現在の実験結果のみから直ちに 5-HT の遊離を否定するわけにはゆかない. 岸<sup>16)</sup>は 5-HT の遊離を犬のアナフィラキシー発症の原因として重くみているが, 5-HT の犬の動脈血圧に対する作用はアナフィラキシー・ショックの場合とはかなり異り (Page<sup>17)</sup>, Schneider and Yonkman<sup>18)</sup>, 西嶋<sup>19)</sup>), また西嶋<sup>19)</sup>の実験によると犬のアナフィラキシーの特徴である肝腫大, 門脈血圧上昇作用は 5-HT では著明でなく, 門脈血圧は

瞬時の上昇後むしろ下降し、また胸管リンパ流の催進は殆んど全くみとめられていない。従つて、5-HT は犬のアナフィラキシー・ショックの症状の特徴を再現しうる活性物質ではないといえる。

以上述べたように ATP または 5-HT がこれらのショックにおいて遊離されるとしてもその程度は発症の原因として著しいものがあるとは考え難い。

### 結 論

犬における Peptone ショック及びアナフィラキ

シー・ショックに際して Adenine nucleotides または 5-HT が血中に遊離されるかどうかを血漿の分光分析ならびに濃縮血漿の濾紙クロマトグラフィー法で検らべたが股静脈血及び肝静脈血にそれらの遊離を検出できなかつた。

### 文 献

- 1) Berafdo, W. T. Amer. J. Physiol. **171**, 371 (1953).
- 2) Brocklehurst, W. E. : Ciba Found. Symp. on Histamine, p. 175, Churchill, London (1956).
- 3) Green, H. N. and Stoner, H. B. : Biological Action of the Adenine Nucleotides, Lewis & Co., London (1950).
- 4) Albaum, H. G. and Milch, L. J. - Amer. J. Physiol. **178**, 293 (1954).
- 5) 真崎健夫 : 第14回日本医学会総会特別講演集, 475頁, 医書出版協会 (1955).
- 6) 高岡健男 : 岡山医学会雑誌, **69**, 1 (1957).
- 7) 山崎英正, 田坂賢二, 西嶋克巳 : 岡山医学会雑誌, **69**, 2111 (1957).
- 8) 上村之雄, 田坂賢二, 西嶋克巳, 久米政夫 : 岡山医学会雑誌, **69**, 2035 (1957).
- 9) Lewis, G. P. (ed.) - 5-Hydroxytryptamine, Pergamon Press, London (1958).
- 10) 西山良策 : 岡山医学会雑誌, **71**, 93 (1959).
- 11) Carter, C. E. - J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1466 (1950).
- 12) 関口豊三 - 生化学, **26**, 476 (1954).
- 13) Bhattacharya, B. K. and Lewis, G. P. : Brit. J. Pharmacol. **11**, 202 (1956).
- 14) Jepson, J. B. and Stevens, B. J. : Nature, Lond. **172**, 772 (1953).
- 15) 上村之雄, 田坂賢二, 西嶋克巳, 久米政夫 : 岡山医学会雑誌, **69**, 2023 (1957).
- 16) 岸 昭司 : アレルギー, **7**, 251 (1958).
- 17) Page, I. : Physiol. Rev. **34**, 563 (1954).
- 18) Schneider, J. A. and Yonkman, F. F. : J. Pharmacol. **111**, 84 (1954).
- 19) 西嶋克巳 : 原著未発表, 山崎英正, 西嶋克巳 : 日薬理誌, **55**, 77 § (1959) 参照.

## Investigation of Active Principles in Anaphylactic and Peptone Shock in Dogs

By

Hidemasa YAMASAKI, Kei JINZENJI and Kazuji KONDO

Department of Pharmacology, Okayama University Medical School, Okayama  
(Director: Prof. Hidemasa YAMASAKI)

In dogs immediately after the shock induced by *Witte* peptone 300 mg/kg or by bovine serum anaphylaxis, the presence of adenine nucleotides or 5-hydroxytryptamine in the blood plasma obtained from the femoral and hepatic veins were examined. But our present methods of spectrophotometry of the deproteinized plasma or paper chromatography of the deproteinized, freeze-dried plasma failed to reveal any increase in either substance of these.

---