

梅毒血清反応における反応温度の影響

第 3 報

緒方法における反応温度の影響

岡山大学医学部皮膚科泌尿器科教室（主任大村順一教授）

助手 丸 尾 栄 一

〔昭和34年7月2日受稿〕

緒 言

梅毒血清反応の中で最も信頼し得られるものとして1906年に補体結合反応¹⁾が創始されて以来、今日に至るまで多くの研究が実施され多数の術式が考案発表されてきた。わが国においては緒方法を始めとして Browning 法、Kolmer 法、北研法等が主として採用実施されており、これらの術式の優秀性は梅毒血清診断法に関する比較実験成績の示す通りである。

この中、緒方法は特にすぐれ凝集法と共に厚生省衛生検査指針の標準法として採用されていることは既に知られている通りである。

補体結合反応は凝集法或いはガラス板法における抗原-抗体反応に溶血系を利用し、反応をより鋭敏且つ特異的に、更に可視的にしたものであつて、従つて反応に関与する因子も抗原、抗体以外に多くのものが介在し、ためにその手技も複雑化し且つ正確な熟練を要することは申すまでもない。しかも、多くの補体結合反応の利用している理論的根拠は抗体減量或いは補体増量による抗体の捕捉であるのに反して緒方法のみ抗原減量法を採用し、最適比を確実に得る方法がとられている。これらの理論的研究は既に徳永²⁾によつて発表され同時に実験的成績も報告されている。

著者は Cardiolipin 抗原使用による梅毒血清反応の研究として既に凝集法³⁾、ガラス板法⁴⁾における反応温度の影響を調査して報告したが、今回は緒方法における反応温度の影響を研究してみるべき結果を得たので発表する。

実験材料並びに実験方法

A. 抗原について

1. 抗原は住友化学工業株式会社製の有効期間内

のものを使用した。

2. 抗原稀釈液の作り方は緒方富雄著⁵⁾「梅毒の新しい血清学的検査法」(以下緒方富雄著と省略する)に記載されている方法に準じた。

3. 稀釈抗原液の温度は 5°C, 10°C, 20°C, 30°C, 37°C の5種類で 5°C の場合は氷室, 10°C は氷室或いは室温, 20°C, 30°C, 37°C の場合はそれぞれの温度の恒温槽中に放置して温度を保つようにした。

B. 血清について

1. 血清はすべて陽性血清で、被検血清の作り方は先報³⁾⁴⁾において述べた通りである。

2. 血清の温度変化は抗原の項で述べた場合と同様で、再非働化後それぞれの場所に放置して所要温度を保つようにした。

C. 溶血系について

1. 溶血系の作り方は緒方富雄著の方法に準じ、使用赤血球は予め実験前に抵抗試験を行つて正常範囲内のものを選んだ。

2. 溶血度の判定は第1表に示したように標準溶血度系列を作つて溶血度%を定め、反応終了後遠心沈澱を行いその上清を標準溶血度系列と比較して判定の正確を期した。

3. 溶血素は純グリセリンと等量に、血球は Alsever 溶液と等量に混じたものを原液として氷室に保存し、実施に際して稀釈後所定の場所において温度を保つようにした。

D. 補体について

1. 数頭のモルモットより心臓穿刺によつて採血後血清を分離し、出来るだけ新鮮なものを実験に使用し保存液は利用しなかつた。

2. 補体の稀釈法は緒方富雄著の方法に準じて実施し、稀釈後所定の場所において所要温度を保つようにした。

第 1 表 標準溶血度系列

| 試験管番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| A 液 | 3.0 | 2.7 | 2.4 | 2.1 | 1.8 | 1.5 | 1.2 | 0.9 | 0.6 | 0.3 | 0 |
| B 液 | 0 | 0.3 | 0.6 | 0.9 | 1.2 | 1.5 | 1.8 | 2.1 | 2.4 | 2.7 | 3.0 |
| 溶血度 % | 0 | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 | 80 | 90 | 100 |
| 判定 A | 0 | ? | 1' | 1 | 1 | 1 | 2' | 2 | 2 | 2 | 3 |
| 判定 B | 0 | ? | 1 | | | | 2 | | | | 3 |

A 液：生理的食塩水15ml+2%血球液3ml

B 液：蒸溜水14.25ml+2%血球液3ml+20倍濃厚食塩水0.75ml

判定 A：8段階分割判定

判定 B：5段階分割判定

E. 食塩水について

1. 本実験においては Mg 含有生理的食塩水を使用し、普通 100 倍濃厚原液より希釈したものを用的。

2. 食塩水の保存は氷室において行い、実験に際しては所要量を所定の場所において温度を保つようにした。

F. 硝子器具類については先報³⁾⁴⁾において述べた通りである。

G. 検査結果の判定は緒方富雄著の方法に準じて行つたが、反応終了後は前述の標準溶血度%と比較して検査結果の正確を期した。

H. 補体結合反応に関与する因子は血清、抗原、補体、溶血素、赤血球及び食塩水が挙げられ、これら各々相互間の温度変化による影響を観察するために、これらの中の 1 種類を一定温度にし他を前記 5 種類の温度にして反応せしめ、Incubation Periods は滴定反応においては 37°C 30 分間、標準法では氷室 4 時間法及び 37°C 1 時間法の 2 種類を採用した。従つて反応に関与する各因子相互の変化による実験の組合せ数は多数にのぼり、本報告では関与因子 1 種に対して残りの因子が総て同一温度で反応した場合を掲げる。

実験成績

〔I〕溶血素滴定反応

溶血素滴定においては溶血素、補体、赤血球の 3 種類が反応に関与する主要因子で、これら相互の関係を実験した結果を第 2 表に示す。表中横欄の温度は従欄の因子以外の諸因子の温度を示す。

A. 溶血素について

5°C の場合 他の因子温度の上昇につれて溶血素

第 2 表 溶血素滴定実験成績

| | | Incubation 37°C 30分間 | | | | |
|-----------|------|----------------------|------|------|------|------|
| 温 度 | | 5°C | 10°C | 20°C | 30°C | 37°C |
| 補 体 | 5°C | 83.3 | 71.4 | 62.5 | 62.5 | — |
| | 10°C | 71.4 | 71.4 | 55.6 | 50.0 | — |
| | 20°C | 55.6 | 55.6 | 55.6 | 41.7 | — |
| 食 塩 水 | 30°C | — | — | — | — | — |
| | 37°C | — | — | — | — | — |
| 感 作 血 球 液 | 5°C | 83.3 | 83.3 | 71.4 | — | — |
| | 10°C | 83.3 | 71.4 | 55.6 | — | — |
| | 20°C | 62.5 | 62.5 | 55.6 | — | — |
| | 30°C | 41.7 | 41.7 | 41.7 | — | — |
| | 37°C | 27.8 | 27.8 | 27.8 | — | — |
| 感 作 血 球 液 | 5°C | 83.3 | 71.4 | 62.5 | — | — |
| | 10°C | 71.4 | 71.4 | 55.6 | — | — |
| | 20°C | 62.5 | 62.5 | 55.6 | — | — |
| | 30°C | 35.7 | 31.3 | 27.8 | — | — |
| | 37°C | 27.8 | — | — | — | — |

価は 8,000, 7,000, 3,000 と減少し、30°C では溶血素価 0 となり、20°C 以上は激減する。

10°C の場合 5°C の場合と全く同様の経過を示した。

20°C の場合 溶血素価は 6,000, 3,000, 3,000 と減少し、10°C 以上は半減する結果を示した。

30°C の場合溶血素価は 1,000 又は 1,000 以下を示した。

以上のように溶血素と他の因子との関係は使用溶血素の温度よりも他の因子の温度に左右され易く、溶血素は 5~10°C で使用する場合が最適で温度の

上昇につれて溶血素の結合能力が減退する傾向を認めた。

B. 補体について

5°C の場合他の因子温度の上昇につれて溶血素価は8,000, 8,000, 5,000, 5,000と減少し37°C では溶血素価0を示し, 10°C 以上は約半分近くまで減少することが分つた。

10°C の場合溶血素価は 8,000, 7,000, 4,000, 2,000を示し, 前と同様 20°C 以上は半減以上の減退を認めた。

20°C の場合 溶血素価は4,000, 3,000, 3,000を示し, 5°C の場合の半減以上の結果を示し補体温度30°C 以上では補体分解の為か溶血素価は0であった。

このように補体の変化は溶血素の場合より更に鋭敏で, 補体温度5~10°C 他の因子温度も同様5~10°C の場合に最良の結果を示したことから, 補体温度5°C であれば他の因子温度が30°C であつて相当高い溶血素価を示したことから, 補体の最適使用温度は5°C であり補体の保存は10°C 以下が望ましい結果を得る一条件と考えられる。

C. 血球液について

5°C の場合他の因子温度の上昇につれて溶血素価は 8,000, 7,000, 3,000 を示し, 30°C 以上は溶血素価0を示し10°C 以上では半減以上の減少を示し溶血素と同様な結果を示した。

10°C, 20°C の場合 いずれも5°C の場合と全く同様の傾向を示した。

30°C の場合 溶血素価は5,000, 3,000, 2,000, と減少し5°C の半減或いはそれ以上の減少であつた。

37°C の場合 溶血素価は2,000或いはそれ以下であつたことは溶血素或いは補体の場合と異なり, 比較的高温度においても反応に関与することを示した。即ち, 血球液は比較的溶血素に類似の傾向を示すと共に室温で保存しても他の因子, 特に補体が低温度であれば滴定反応に大なる影響を及ぼさぬものと推定され興味ある点である。

以上の成績より溶血素及び補体は10°C 以下, 血球液は20°C 以下で反応させればほぼ満足すべき結果を得られることを表中の曲線で示した。この中補体は5°C 以下で保存使用すれば最も良成績が期待し得られ, 更に溶血素滴定においては溶血素, 補体, 血球液共に水中において操作反応せしめれば補体の結合を最も完全ならしめるものと考えられる。

〔II〕 補体滴定反応

補体滴定は溶血素滴定終了後実施するものであるが緒方法では溶血素と血球液よりなる感作血球液を使用して実施する。この場合の反応因子は補体, 食塩水, 感作血球液の3種類でその実験成績は第3表に示す。

第3表 補体滴定実験成績

| Incubation | | 37°C 30分間 | | | | |
|-------------|------|-----------|------|-------|------|------|
| 温 度 | | 5°C | 10°C | 20°C | 30°C | 37°C |
| 溶 血 素 | 5°C | 8000 | 7000 | 3000 | — | — |
| | 10°C | 8000 | 7000 | 3000 | — | — |
| | 20°C | 6000 | 3000 | 3000 | — | — |
| | 30°C | 1000 | 1000 | >1000 | — | — |
| | 37°C | — | — | — | — | — |
| 補 体 | 5°C | 8000 | 8000 | 5000 | 5000 | — |
| | 10°C | 8000 | 7000 | 4000 | 2000 | — |
| | 20°C | 4000 | 3000 | 3000 | — | — |
| | 30°C | — | — | — | — | — |
| | 37°C | — | — | — | — | — |
| 血 球 液 | 5°C | 8000 | 7000 | 3000 | — | — |
| | 10°C | 8000 | 7000 | 3000 | — | — |
| | 20°C | 8000 | 7000 | 3000 | — | — |
| | 30°C | 5000 | 3000 | 2000 | — | — |
| | 37°C | 2000 | 1000 | >1000 | — | — |

A. 補体について

5°C の場合 溶血素滴定と同様に他の因子温度の上昇につれて補体価の減少が認められそれぞれ83.3, 71.4, 62.5, 62.5を示し, 37°C 以上は補体価0を示した。

10°C の場合 補体価は 71.4, 71.4, 55.6, 50.0を示し5°C に比して漸減傾向を示した。

20°C の場合 補体価は20°C 迄55.6と同様であつたが30°C では41.7と半減した。

このように補体は低温度で使用するほうがより高い補体価が得られ, 補体温度30°C 以上では補体価0を示すことより, 溶血素滴定における補体の推移と同様な傾向を認めるも更に鋭敏で最高補体価は反応に関与する因子温度が5°C の場合にのみ発現するという結果を得た。

B. 食塩水について

5°C の場合 因子温度の上昇につれて10°C まで

は83.3, 続いて71.4を示し 30°C 以上は補体価0であつた。

10°C の場合 補体価は 83.3, 71.4, 55.6 と漸減した。

20°C の場合 補体価は 62.5~55.6 で 5°C の場合に比して軽減した。

30°C の場合 補体価は 5~20°C で 71.4 を示し 5°C の場合に比して半減した。

37°C の場合 補体価はいずれも 27.8 と極めて低値を示し溶血素滴定における血球液の推移とはほぼ同様な結果を得た。

以上のように食塩水は補体滴定反応においては反応温度に直接的な影響を及ぼすことが少なく、更に他の因子温度が 30°C 以上では全例が不溶の結果を示した点より他の反応に関与する因子によつて左右され易いことを示したものと云い得られる。

C. 感作血球液について

5°C の場合 補体価は因子温度の上昇につれて 83.3, 71.4, 62.5 と漸減し 30°C 以上は補体価0を示した。

10°C の場合 5°C 並びに 10°C では共に 71.4 を示し 20°C に至つて 55.6 で 5°C より軽度の減少傾向を認めた。

20°C の場合 5~10°C で共に 62.5, 20°C で 55.6 と更に減少傾向を認めた。

30°C の場合 5°C においても 35.7 と激減し明らかに温度による変化の限界を認めた。

このように実験成績は比較的補体に類似せる結果を示したが、温度による変化は食塩水よりやや鋭敏で、先の溶血素滴定における溶血素と血球液の混合液である点より補体滴定においても水中で操作することが望ましいものとする。

以上の補体滴定の実験結果は表中の曲線で示したように補体及び感作血球液は 5°C, 食塩水は 10°C で反応せしめれば最良の結果が期待し得られ、溶血素滴定の場合と共に補体が最重要因子たることは明白で、これら反応因子は共に水中で操作反応せしめれば満足すべき補体価が得られることが明らかになつた。

〔Ⅲ〕 標準法による実験成績

補体結合反応における主要点は、(1) 溶血素滴定を完全に実施して最良の溶血素価を決定すること、(2) 補体滴定によつて前記同様最良の補体価を決定すること、(3) 最良の溶血素並びに補体を使用して抗原-抗体反応を捕捉すること。以上の3点に

要約し得る。著者は既に(1)及び(2)の条件について温度変化による影響を観察し、両滴定反応は水中にて操作して補体の捕捉を完全にすることが必要条件であることを知つた。次の(3)に関して緒方法は氷室4時間法と 37°C 1時間法の2方法を掲げている。Incubation を ice bath incubation か heat incubation かいずれの方法を採用するかについては古くより多くの論文⁶⁾⁷⁾⁸⁾が発表されているが現在では ice box incubation が補体の結合を完全にするので最良の方法とされている。著者はこれらの点について実験を試みたので前記同様考察を加えてみる。

1) 氷室4時間法

A. 血清について

5°C の場合 第4表に示したように因子温度 20°C までは+を示し 30°C 以上は陰性であつた。

第4表 緒方法標準法実験成績

| | | Incudation 冷蔵庫 4時間 | | | | |
|-----------|------|--------------------|------|------|------|------|
| 温 度 | | 5°C | 10°C | 20°C | 30°C | 37°C |
| 血 清 | 5°C | + | + | + | - | - |
| | 10°C | ++ | +++ | +++ | + | - |
| | 20°C | +++ | +++ | +++ | + | - |
| | 30°C | +++ | +++ | +++ | 0+ | - |
| | 37°C | ++ | ++ | ++ | - | - |
| 抗 原 | 5°C | + | +++ | +++ | - | - |
| | 10°C | ++ | +++ | +++ | ++ | - |
| | 20°C | ++ | +++ | +++ | + | - |
| | 30°C | ++ | ++ | ++ | + | - |
| | 37°C | + | 0+ | - | - | - |
| 補 体 | 5°C | + | +++ | +++ | + | - |
| | 10°C | + | +++ | +++ | ++ | - |
| | 20°C | + | +++ | +++ | + | - |
| | 30°C | 0+ | + | + | 0+ | - |
| | 37°C | - | - | - | - | - |
| 感 作 血 球 液 | 5°C | + | +++ | +++ | 0+ | - |
| | 10°C | ++ | +++ | +++ | + | - |
| | 20°C | ++ | +++ | +++ | 0+ | - |
| | 30°C | ++ | +++ | +++ | 0+ | - |
| | 37°C | + | ++ | ++ | - | - |

10°C の場合 5°C の場合は++であつたが 10~20°C では+++を示し 30°C では+に減少した。

20°C の場合 5~10°C で+++と最高の結果を示し 続いて++~+と減少を示した。

30°C の場合 5~20°C でいずれも卍を示し30°C 至つて0+と減少した。

37°C の場合 5~20°C で卍を示し 30°C 以上は陰性であつた。

このように血清については先報で述べたと同様10~30°C において最良の反応を示し、特に 20°C で卍を示したことから血清にも最適温度があるものと考えられる。

B. 抗原について

5°C の場合因子温度 5°C の場合はわずかに+であつたが 10~20°C では卍を示し、30°C 以上は陰性であつた。

10°C の場合 温因子度 5°C では卍と上昇し10°C では卍、20°C では卍を、30°C では卍で 5°C の場合に比して反応の発現が完全になつてくることを認めた。

20°C の場合 10°C とほぼ同様な経過であるが 30°C においては卍より+に低下する傾向を認めた。

30°C の場合 5~20°C では卍で陽性度の減少を認めた。

37°C の場合 更に減少しわずかに5~10°C で+~0+の反応を示すのみであつた。

このように抗原温度については 10~20°C が最良の結果を得ることを認めたが他の因子温度が5°C の場合は 10°C の場合に比して陽性度の発現が低下するのは主として血清温度の低下のために由来するものと考えられ、血清温度 10~20°C の場合で補体及び感作血球液の温度が低い場合はいずれも最良の結果を得た実験成績からも抗原-抗体反応には最適の温度限界があるものと考ええる。

C. 補体について

5°C の場合 因子温度 10°C において卍を示し 20°C に至つて卍と減少し 30°C では+と激減した。

10°C の場合 5°C の場合と同様に 10°C において卍を示し、30°C でも卍を示した。

20°C の場合 因子温度 10~20°C で卍と 10°C の場合に比して減少傾向を示した。

30°C の場合 20°C の場合に比して0+~+の間に変化して 20°C における卍の反応は認められず、補体温度の限界を認めた。

滴定反応における補体温度は 30°C では殆んど反応せず補体の分解が認められたのと共に、標準法においても 20°C 迄で操作反応せしめることが必要であろう。特に因子温度 10°C で補体温度 5~10°C で卍を認めたことは補体の鋭敏性を現わすもので後

述する 37°C 1時間法に比して遙かに秀れた結果を得たことはこれを裏付けるものと思う。

D. 感作血球液について

5°C の場合 因子温度 10°C で卍を示し、20°C 以上は卍~0+の結果を得た。

10°C の場合 5°C の場合に比して上昇し 20°C 以上は卍~+を示した。

20°C の場合 10°C の場合とほぼ同様な結果を示し、因子温度 10°C では感作血球液温度 5~20°C でいずれも卍の結果を示したことは興味ある点である。

30°C の場合 20°C の場合に比して軽度の減少を認め 10°C で卍を示した。

37°C の場合 5~20°C で+~卍と激減し温度の上昇と共に反応力の減少する傾向が著明であつた。

以上の氷室4時間法の成績より、血清は 20°C (10~30°C)、抗原は 20°C (10~20°C)、補体は 5°C (5~10°C)、感作血球液は 10°C (5~20°C) が最適温度となり、これらの組合せより血清を除き諸因子はいずれも 20°C 以内で反応せしめるのが最も望ましい結果が期待し得られ、夏季における緒方法の実施に際してはこれら諸因子物質の保存並びに

第5表 緒方法標準法実験成績

| | | Incubation 37°C 1時間 | | | | |
|---|------|---------------------|------|------|------|------|
| 温 | 度 | 5°C | 10°C | 20°C | 30°C | 37°C |
| 血 | 5°C | + | + | + | - | - |
| | 10°C | + | 卍 | 卍 | - | - |
| | 20°C | 卍 | 卍 | 卍 | - | - |
| | 30°C | 卍 | 卍 | 卍 | - | - |
| | 37°C | + | + | 0+ | - | - |
| 抗 | 5°C | 0+ | 卍 | 卍 | - | - |
| | 10°C | + | 卍 | 卍 | + | - |
| | 20°C | 卍 | 卍 | 卍 | 0+ | - |
| | 30°C | + | + | + | - | - |
| | 37°C | - | - | - | - | - |
| 補 | 5°C | + | 卍 | 卍 | 0+ | - |
| | 10°C | + | 卍 | 卍 | + | - |
| | 20°C | + | 卍 | 卍 | 0+ | - |
| | 30°C | 0+ | 0+ | 0+ | 0+ | - |
| | 37°C | - | - | - | - | - |
| 感 | 5°C | 0+ | 卍 | 卍 | - | - |
| | 10°C | 卍 | 卍 | 卍 | + | - |
| | 20°C | 卍 | 卍 | 卍 | 0+ | - |
| | 30°C | + | 卍 | 卍 | - | - |
| | 37°C | 0+ | + | + | - | - |

取扱いに充分の注意が必要である。

2) 37°C 1 時間法

37°C 1 時間法が氷室 4 時間法に比較して陽性度の低下を認めることは緒方富雄著にも述べられていることであるが、著者は氷室 4 時間法の成績について比較的詳細に報告したので本実験の結果は氷室 4 時間法と比較してその相異点のみについて述べる。実験結果は第 5 表に示す。

A. 血清について

血清温度 20°C において因子温度 5°C の場合のみ卍の発現を認め、血清温度 10°C においては卍を示さずわずかに血清温度 30°C、因子温度 10°C で卍を認めた。更に因子温度 30°C 以上は全例陰性化し明らかに氷室法に比較して鋭敏性の消失が認められた。

B. 抗原について

抗原温度 20°C、因子温度 10°C において卍を認め、抗原温度 20°C では氷室法とほぼ同様の結果を示したに過ぎず、特に抗原温度 37°C では陰性化した。

C. 補体について

補体温度 5°C、因子温度 10°C で卍を示したのみであるが、補体温度 5~10°C では氷室法とほぼ同様の推移を示したとはいえその鋭敏性の減少を認めざるを得ない結果を得た。

D. 感作血球液について

氷室法では感作血球温度 5~20°C、因子温度 10°C で卍を示したにも拘らず、37°C 1 時間法ではわずかに血球温度 5°C、因子温度 10°C の場合のみ卍を示し、感作血球液温度 10°C のみ比較的類似的陽性を認めた。

以上の成績より 37°C 1 時間法では氷室 4 時間法と比較して、ある範囲内ではほぼ同様な成績を認めることが出来たが陽性の発現能の低下が著明であり、特に反応因子温度の上昇につれてこの傾向は顕著になることが明らかとなった。Incubation Periods から考えれば 37°C 1 時間法は短時間内に操作判定が出来るので日常の Routine Test としては便利であるが、これを実施する際には反応に関与する因子物質の温度に注意することが大切で、氷室 4 時間法の 20°C 限界に対して 37°C 1 時間法は 10°C が限界になり、これらの諸点を充分考慮するならば定性的には氷室法とほぼ同様な結果が期待し得られるものと信ずる。

〔IV〕 緒方法比較実験成績

先に述べた標準法の実験成績を基にして梅毒患者

21名について氷室 4 時間法、37°C 1 時間法、室温 (15~25°C) 2 時間法の 3 種類の Incubation Periods で比較実験を実施したので、その成績について述べる。

実験に使用せる患者血清は早期潜伏梅毒患者 8 名、晩期潜伏梅毒患者 13 名合計 21 名より採血分離せるもので、標準法実施に当つて使用せる各因子物質の温度は、血清 10~20°C、補体 5°C、抗原 20°C、感作血球液 5~10°C で滴定反応の結果溶血素 8,000、補体価 83.3 の溶血素並びに補体を使用した。

A. 氷室 4 時間法

氷室として電気冷蔵庫を使用し、実験成績は一括して第 6 表に示した。

定性反応において卍を示すもの 3 例、卍を示すもの 11 例、卍を示すもの 4 例、+ を示すもの 2 例、0 + を示すもの 1 例で、定量反応との関係は、卍は全例 1,280 倍、卍 1,280~160 倍、卍 160~40 倍、+ 40~20 倍で 0 + は定量値 0 であつた。疾患との関係は早期潜伏梅毒患者では卍 1 名、卍 320 倍 4 名、160 倍 1 名、卍 160 倍 1 名、0 + 1 名で平均定量値は 360 倍を示した。

晩期潜伏梅毒では卍 2 名、卍 1,280 倍 1 名、640 倍 3 名、320 倍 2 名、卍 160 倍 1 名、80 倍 1 名、40 倍 1 名、+ 40 倍 1 名、20 倍 1 名で平均定量値は 518.5 倍を示し早期潜伏梅毒より高値であつた。

B. 37°C 1 時間法

定性反応において卍を示すもの 2 例、卍を示すもの 10 例、卍を示すもの 2 例、+ を示すもの 3 例、0 + を示すもの 3 例、- を示すもの 1 例で氷室法に比較して定性的にはほぼ同様の結果を得たが、卍 1 例、卍 1 例、卍 2 例が減少し、+ 1 例、0 + 2 例、- 1 例が増加し、定量反応では氷室法に比較して定量値の増加せるものを認めず、減少せるもの 13 例、不変 8 例を数えた。疾患との関係は早期潜伏梅毒では卍 640 倍 1 名、320 倍 1 名、160 倍 2 名、卍 160 倍 1 名、80 倍 1 名、+ 40 倍 1 名、- 1 名で平均定量値は 195 倍を示し、氷室法に比較し半減してた。早期潜伏梅毒 8 例中 2 例のみが氷室法と同結果で、残り 6 例は定性定量共に減少を示した。晩期潜伏梅毒では卍 1,280 倍 2 例、卍 640 倍 2 例、320 倍 4 例、+ 40 倍 1 例、10 倍 1 例、0 + 10 倍 2 例、0 倍 1 例で平均定量値は 399.2 倍を示し氷室法に比して約 $\frac{2}{3}$ 倍減少した。

晩期潜伏梅毒 13 例中定性定量共に不変のもの 5 例を数え、定量値のみ減少せるもの 3 例で残り 5 例は

第6表 緒方法比較実験成績

| 番号 | 姓 名 | 病 名 | 冷蔵庫 4時間 | | 室温(15~ 25°C) 2時間 | | 37°C 1時間 | |
|----|----------|-----|------------|------|------------------------|-----|-------------|------|
| | | | 定性 | 定量 | 定性 | 定量 | 定性 | 定量 |
| 1 | T. K. 42 | 晩期 | 卅 | 1280 | 卅 | 320 | 卅 | 1280 |
| 2 | S. N. 25 | 早期 | 卅 | 1280 | 卅 | 320 | 卅 | 640 |
| 3 | E. H. 48 | 晩期 | 卅 | 1280 | 卅 | 640 | 卅 | 1280 |
| 4 | K. U. 54 | " | 卅 | 640 | 卅 | 80 | 卅 | 320 |
| 5 | T. K. 39 | " | 卅 | 640 | 卅 | 160 | 卅 | 640 |
| 6 | Y. T. 42 | " | + | 20 | - | 0 | 0+ | 0 |
| 7 | M. N. 34 | 早期 | 卅 | 320 | 卅 | 80 | 卅 | 160 |
| 8 | R. M. 36 | 晩期 | 卅 | 640 | 卅 | 160 | 卅 | 320 |
| 9 | S. T. 42 | " | 卅 | 320 | 卅 | 80 | 卅 | 320 |
| 10 | R. S. 46 | 早期 | 0+ | 0 | - | 0 | - | 0 |
| 11 | F. Y. 33 | 晩期 | 卅 | 160 | 0+ | 0 | + | 40 |
| 12 | M. H. 27 | 早期 | 卅 | 160 | - | 0 | + | 40 |
| 13 | M. T. 32 | " | 卅 | 320 | 0+ | 10 | 卅 | 160 |
| 14 | S. T. 42 | 晩期 | 卅 | 320 | + | 20 | 卅 | 320 |
| 15 | M. M. 20 | 早期 | 卅 | 160 | + | 20 | 卅 | 160 |
| 16 | R. T. 53 | 晩期 | 卅 | 40 | - | 0 | + | 10 |
| 17 | T. H. 47 | " | 卅 | 1280 | 卅 | 320 | 卅 | 640 |
| 18 | F. Y. 28 | 早期 | 卅 | 320 | + | 20 | 卅 | 80 |
| 19 | I. I. 39 | 晩期 | 卅 | 80 | - | 0 | 0+ | 10 |
| 20 | R. H. 63 | " | + | 40 | - | 0 | 0+ | 10 |
| 21 | K. N. 31 | 早期 | 卅 | 320 | + | 40 | 卅 | 320 |

定性定量共に減少した。

C. 室温2時間法

定性反応において卅を示すもの1例, 卅を示すもの8例, +を示すもの4例, 0+を示すもの2例, -を示すもの6例を数えた。平均定量値は108.1倍で氷室法の約1/4に減少し顕著な差を認めた。更に37°C1時間法と比較しても約1/3に減少し, 明らかなる変化が認められた。

以上の成績が示すように氷室4時間法は他の2方法に比較して秀れていることが明らかになった。即ち, 氷室4時間法を標準法として37°C1時間法は簡易法と呼称すべく, 定性的には37°C1時間法は21例中11例52.4%が一致し, 定量的には7例33.3%が一致した。これを詳細に観察すれば卅以上の陽性で卅に低下せるもの2例に対し卅より+に低下せるもの3例, 0+に低下せるもの1例計4例を示し, 更に+より0+に低下せるもの2例, 0+より-に低下するもの1例であつた。即ち, 卅より以上の陽性を示す場合の低下率は少なく, 卅以下の陽性を示す場合が大半を占めることは注意を要する点で, 強陽性血清は定性定量共に著変を認めないが弱陽性血清

では著明な低下を示す傾向があり, 治療経過を観察する場合には37°C1時間法よりも氷室4時間法によつて厳密な抗体価の追求が望まれる。

総括並びに考按

Cardiolipin 抗原の特異性並びに鋭敏性が極めて優秀であることは Kent⁹⁾, Maltaner¹⁰⁾, Kolmer¹¹⁾, Harris¹²⁾ その他多数¹³⁾¹⁴⁾¹⁵⁾ の報告するところであり, これらの文献は緒方富雄著に記載されているので詳細は避けるが最近 Osler¹⁶⁾ 等は人心筋よりの抗原を使用して人血清の梅毒補体結合反応を実施し, この場合においても4°C, 56°C, 65°Cの3種の温度について補体の結合能が低温度においてすぐれていると発表している。

1906年に補体結合反応が創始されて以来, 1930年迄に Incubation の方法に関しては多くの研究があり, ice box incubation を最良とする報告¹⁷⁾¹⁸⁾ と普通の heat incubation を最良とする報告¹⁹⁾ とが相まじりあつていたが次第に前者の方法が優秀であることが判明し, 現今では専ら ice box incubation の方法が採用されるに至つた。Boyd²⁰⁾ は抗原-抗体反応に関して各種の因子に及ぼす温度の影響が非常に大きいことを述べ, (1) 抗原-抗体の第一段階における結合状態に変化を及ぼす, (2) Agglutination の速度に変化を及ぼす, (3) Precipitation の量的並びに質的变化を来たさしめる, (4) 反応速度に影響を及ぼす等の結果を掲げている。Noguchi²¹⁾ は抗原, 溶血素, 補体の3者間において濃度, 時間, 温度の3因子が普通一般の化学反応と同様に反応速度に影響を及ぼすと述べ, Smith²²⁾ は Incubation について抗原-抗体と低温度の関係を詳細に実験し, Kolmer²³⁾ も0~2°Cより8°Cにおけるほうが, 更に8~10°Cは38°Cよりも反応の遅延することを報告している。このように反応速度は温度の上昇と共に上昇するが, 温度の上昇による補体その他の諸因子の結合状態については Gilbert²⁴⁾, Levine²⁵⁾, Kline²⁶⁾, Kolmer²⁷⁾ 等の報告にみられるように3~6°Cにおける補体の結合が37°Cにおけるよりも遙かに大きく, 補体の分解, 或いは抗補体性の出現, 更には Cold fixation と warm fixation の相違による反対の結果が発現すること等が認められている。特に Rhamy¹⁸⁾, Levine²⁵⁾ 等は強陽性血清と弱陽性血清では Incubation の相違による判定が屢々反対になることを報告している。著者の実施した実験成績においても溶血素並びに補体の滴定反応におい

て 10°C 以内の低温度で操作すると極めて優秀なる力価を得ることが出来、20°C 以内ではほぼ満足すべき結果となり、30°C 以上では不適當な力価の激減を認めた。これは多くの報告と同一の成績で抗原-抗体の第一段階の Incubation が低温度である場合の結合力増加を意味するものである。

次に本実験において陽性血清を使用して氷室 4 時間法と 37°C 1 時間法の比較を試み、第一段階の Incubation が氷室においては増加せしめられ 37°C 1 時間法よりも定性的にも定量的にもすぐれていることを知った。この結果は梅毒患者血清を使用した比較実験成績においても認められ、補体結合を完全に行なわせるためには或る温度限界の存在を無視することが出来ないことを知った。即ち、補体結合反応において手技上の正確さを要することは申すまでもないが反応に関与する諸因子たる血清、抗原、補体、溶血素、赤血球液の保存並びに取扱いは、血清を除き 10°C 以内が最適で、20°C 迄はやや満足すべき結果を得るとはいえ梅毒の診断並びに治療にこれらの結果を反映せしむる場合、特に中等度乃至は弱陽性血清は陰性化する傾向が窺えたことは最も注意すべき点であろう。

著者は先に補体結合反応の主要点として 3 点を挙げたが、低温度における諸因子-補体、溶血素、血球液-を使用して最良の滴定反応を実施し、低温度の Incubation によつて抗原-抗体の補体結合を完全に行えば適確なる梅毒抗体を捕捉し得られるものと信ずる結果を得た。

結 論

緒方法における主要反応因子温度の反応結果に及ぼす影響を観察して次の成績を得た。

1. 緒方法において使用する補体、溶血素、血球液は 10°C 以下で保存すれば滴定反応において最高の力価を示す溶血素並びに補体が得られる。特に補体は 5°C において反応力最も強く、次いで溶血素、血球の順となり、血球は比較的高温度においても安定した結果を示した。

2. 本試験においては氷室 4 時間法を採用すれば 37°C 1 時間法に比較して定性定量共に極めて優秀なる成績を得ることが出来る。

3. 氷室 4 時間法を採用する場合においても反応に関与する諸因子物質は補体 5°C、感作血球液 10°C、血清 20°C、抗原 20°C が最適の結果を示した。この場合低温度の血清の使用は反応を低下せしめ、抗原は 10~20°C、血球液は 5~20°C にわたつて安定した結果を得た。

4. 37°C 1 時間法は簡易法と呼称すべく、氷室 4 時間法と同様に操作すれば定性的にはほぼ同様の成績を得るも、弱陽性血清では特に陰性化が著明に認められるので反応結果を正確ならしめる点からも出来るだけその使用を避け、氷室 4 時間法を採用すべきである。

(本論文の要旨は第 8 回日本皮膚科泌尿器科学会西日本連合地方会総会において発表した)。

擧筆するに当り恩師大村教授の御指導並びに御校閲を深謝する。

文 献

- 1) Wassermann, A., Neisser, A., Bruck, C. : *Deutsch. med. Wchnschr.* 32, 745, 1906.
- 2) 徳永栄一：東京医学雑誌, 61, 224, 234, 昭28.
- 3) 丸尾栄一：性病, 42, 77, 1957.
- 4) 丸尾栄一：性病, 40, 179, 1955.
- 5) 緒方富雄：梅毒の新らしい血清学的検査法, 南山堂第 2 版.
- 6) Jacobsthal, E. : *Deutsch. med. Wchnschr.* 39, 1337, 1913.
- 7) Hinton, W. A. : *Amer. J. Syph.* 5, 81, 1921.
- 8) Gilbert, R., Langworthy, V., Moore, A. C. : *Amer. J. Syph.* 10, 162, 506, 1926.
- 9) Kent, J. F., Boyd, H. M., Sanders, R. W. : *Bull. U. S. Army. Med. Dept.* 8, 284, 1948.
- 10) Maltaner, E., Maltaner, F. : *J. Immunol.* 51, 195, 1945.
- 11) Kolmer, J. A. : *Amer. J. M. Technol.* 15, 293, 1949.
- 12) Harris, A., Portnoy, J. : *J. Ven. Dis. Inform.* 25, 353, 1944.
- 13) Mc Dearman, S. S., Cottrell, J. E. : *Amer. J. Clin. Path.* 19, 156, 1949.

- 14) Giordano, A. S., Frost, R. J., Hingginbotham, M. W. · Amer. J. Clin. Path. 19, 25, 1949.
- 15) Schmidt, H. : Brit. J. Ven. Dis. 28, 169, 1952, 29, 84, 1953.
- 16) Osler, A. G., Hardy, P. H., Sharp, J. T. : Amer. J. Syph. Gono. & Ven. Dis. 38, 554, 1954.
- 17) Kolmer, J. A. : Amer. J. Syph. 5, 63, 44, 30, 1921.
- 18) Rhamy, B. W. · Amer. J. Syph. 5, 300, 1921.
- 19) Altmann, K., Zimmern, F. · Arch. f. Derm. u. Syph. 3, 837, 1912.
- 20) Boyd, W. C. : Fundamentals of Immunology 1956. Interscience
- 21) Noguchi, I. : Laboratory Diagnosrs of Syphilis. 1923. Paul B. Hoeber.
- 22) Smith, J. W., Mac Neal, W. J. · J. Immunol. 2, 75, 1917. Jour. Inf. Dir. 21, 233, 1917.
- 23) Kolmer, J. A., Richter, C. E., Yagle, E. M. : Amer. Jour. Syph. 18, 204, 1934.
- 24) Gilbert, R., Langworthy, V. · Amer. Jour. Syph. 11, 475, 1927.
- 25) Levine, B. S. · Amer. Jour. Syph. 14, 378, 500, 1930. 15, 225, 1931. 18, 341, 1934.
- 26) Kline, B. S., Applebaum, H. S., Lundagen, M. A. · Amer. J. Syph. 9, 345, 1925.
- 27) Kolmer, J. A., Lynch, E. R. : J. Ven. Dis. Inform. 29, 166, 1948.

The Influence of the Temperature on the Serological Reaction

Report 3. on the Results of the Complement Flxation Test With Cardiolipin Antigen

By

Eiichi Maruo

From the Department of Dermatology & Urology, Okayama University Medical
School, Okayama. (Director: Prof. J. Omura, M. D.)

Since the studies of Jacobstahl in 1910, many efforts has been done to show that the complement fixation test for syphilis is more sensitive with cold fixation than with Wassermann's test at 37°C. Undoubtedly, the temperature and the duration of incubation is the important factors influencing the sensitiveness and specificity of the complement fixation reaction.

The author studied the above mentioned factors in Ogata's test with cardiolipin aneigen and the results were as followed,

1. The complement and hemolysin should be kept and used below 10°C to obtain maximum titer.
 2. The results of the heat incubation (1 hour at 37°C) showed mostly the same as in cold incubation qualitatively.
 3. Cold fixation at 5°C is reliable and with the syphilitic sera showed more sensitive than one hour fixation at 37°C dicidedly.
-