

# 抗原抗体反応の研究

## 第 2 編

### 沈降反応に及ぼす各種条件の影響に関する研究

岡山大学医学部衛生学教室 (指導・緒方益雄教授)

中 居 幸 三

[昭和 32 年 6 月 10 日受稿]

#### 第 1 章 緒 論

血清蛋白に物理的, 化学的操作を加うれば血清中の抗体も共にその影響を受ける事については幾多の業績が残されている。

即ち酸, アルカリ, 沃度, フォルマリン, ペプシン, 尿素, X線, 乾燥, 日光, 赤外線, 紫外線, エーテル, ベンゾール, クロロホルム, 諸種毒物の抗体に及ぼす影響について幾多の先人により実証されているところであり, 又温熱に対する抵抗性については抗体価の測定法が異なるため諸学者により各々その成績が異なっていた。

然るに 1927 年緒方教授が緒方氏抗原, 抗体稀釈法<sup>1)</sup>を完成され, これにより沈降素は 75°C 30 分の加温により, その反応能力を失う事を発表され, 又須之内<sup>2)</sup>, 佐藤<sup>3)</sup>, 国房<sup>4)</sup>等の緒方氏抗原, 抗体稀釈法を用いて温度の抗体に対する影響に関する研究発表が残されている。

塩類に対する影響については 1927 年林<sup>5)</sup>は各種中性塩類の沈降反応に及ぼす影響につき報告があり, 1936 年 Heidelberg u. Kendall<sup>6)</sup>が肺炎双球菌 III 型系並びに卵白アルブミン系を使用し種々塩類濃度による沈降反応の定量的研究を発表し, 1951 年 Aladjem u. Lieberman<sup>7)</sup>は卵白アルブミン系を用いて沈降反応に於ける食塩濃度の影響を定量的に, 教室に於ては緒方(正)<sup>8)</sup>の抗原抗体反応沈降物の生理的食塩水に対する溶解度に関する研究が残されている。

糖類に関しては 1932 年 Silber<sup>9)</sup>一派が葡萄糖の血清蛋白熱凝固阻止作用につき発表し, 1947 年緒方, 大川<sup>10)</sup>は糖類添加により補体は 56°C 以上加熱にも耐える事を証明し, 永田<sup>11)</sup>は葡萄糖の抗体, 補体の保護作用につき, 波多野<sup>12)</sup>は各種糖類の加熱による血清蛋白の変性並に補体非働化阻止作用につき発表があり, 更に緒方(正), 望月<sup>13)</sup>は比濁計を用いて各種糖類の補体非働化阻止作用に関する証明が行われている。

著者は沈降反応の重層法に於ける食塩濃度, 反応時の温度, 糖類の影響について検討したのでその結果を報告する。

#### 第 2 章 実験材料及び実験方法

##### 第 1 節 実験材料

###### 第 1 項 免疫血清

人血清, 牛血清, 卵白アルブミン家兎抗体を使用した。

###### 第 2 項 免疫方法

人血清, 牛血清はいづれも 1:10 に生理的食塩水で稀釈したものを 5.0 cc を 1 回量とし, 卵白アルブミン注射量は 1 回量 1.0 cc (1.5 mg) を 3~4 日の間隔に体重 2500~3000 g の家兎の耳静脈に 10~15 回注射し最終注射日より 10 日後全採血して血清を氷室に 24 時間放置し, その後遠沈分離し, 56°C 30 分加温非働化し氷室に保存して使用した。

###### 第 3 項 反応用抗原

人血清, 牛血清は 56°C 30 分加温非働化したものを原液とし, 卵白アルブミンは

Keckwick<sup>14)</sup> の脱水芒硝法により 3 回結晶して精製したものを使用した。

第 2 節 実験方法

反応時の温度、塩濃度、糖類の影響のいづれに於ても沈降反応の重層法により緒方氏抗原、抗体稀釈法、Uhlenhuth 氏法<sup>15)</sup> を用い、成績判定は反応後 15 分以内に反応輪の生じたものを冊、30 分以内冊、1 時間以内冊、2 時間以内+と記録した。

第 1 項 沈降反応に対する反応時の温度の影響

抗体稀釈には 1%アラビヤゴム食塩水を用い 0°~45°C の各恒温槽中にて反応せしめ 2 時間の成績結果を判定した。

第 2 項 沈降反応に対する食塩濃度の影響

抗原稀釈には蒸留水、各種濃度の食塩水を用い、抗体稀釈には 1%アラビヤゴム食塩水、1%アラビヤゴム蒸留水、9% Saccharose に 1%の割合になる様にアラビヤゴムを加えたもの及び 56°C 30 分非働化した異種抗原による 10%免疫家兎血清、同じく非働化した 10% 正常家兎血清を使用した。

第 3 項 沈降反応に対する糖類の影響

抗原稀釈には等張となる様に調製した 6% Galactose, 10% Saccharose, 6% Glucose, 6% Sorbit, 6% Mannit 水溶液及び生理的食塩水を用い、抗体稀釈には抗原稀釈に用いた各糖類溶液に 1%になる様にアラビヤゴムを加えたもの及び 1%アラビヤゴム食塩水を使用し各々を組合せて重層法を行つた。

第 3 章 実験成績

第 1 節 反応時の温度の影響

各反応系を Uhlenhuth 氏法により室温と 37°C にて反応せしめた結果第 1 表の示す如く 37°C で反応せしめた場合が大体 2 倍の抗原価を示した。

次に抗体を 1:10, 1:50 稀釈にして同様に反応せしめた結果は第 2 表の示す如く 37°C で反応せしめた場合が強い反応成績が得られた。

第 3 表は牛血清系を用い Uhlenhuth 氏法に

第 1 表 反応時の温度 (抗原稀釈 1:n×10<sup>4</sup>)

反応系	抗原 n		温度						
	0.1	1	2.5	5	10	25	50	100	
人系血清	室温	9.2°C	冊	冊	冊	冊	+	-	-
		37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
人系血清	室温	11°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
		37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
牛系血清大	室温	11°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
		37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
牛系血清小	室温	10°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
		37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
卵白ミアル系	室温	9.6°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
		37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

第 2 表 反応時の温度 (抗原稀釈 1:n×10<sup>4</sup>)

反応系	抗体	抗原 n		温度						
		1	2.5	5	10	25	50			
牛血清系大	1:10	室温	10°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
			37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	1:50	室温	10°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
			37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
牛血清系小	1:10	室温	10°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
			37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
	1:50	室温	10°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊
			37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊	冊

第 3 表 反応時の温度 (抗原稀釈 1:n×10<sup>4</sup>)

温度	抗原 n		温度					
	1	2.5	5	10	25	50		
4°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊		
室温	冊	冊	冊	冊	冊	冊		
25°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊		
37°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊		
45°C	冊	冊	冊	冊	冊	冊		

より 4°~45°C の温度による反応を比較した

もので、この結果によると37°Cに於て強い成績が得られた。

第4表及び第5表は結合帯を中心として0°~45°Cの各温度において反応せしめた結果で、37°Cにおいて反応させた場合の成績が良く、人血清系に於ては45°Cにおける反応は比較的良いが卵白アルブミン系では45°Cの反応は著しく弱く、0°Cで反応した場合と殆んど抗体価を同じくする成績を示した。

第4表 反応時の温度 (人血清系)

抗原	抗体		温度					
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2500		
1:500 (結合帯)	0°C	+++	++	+	-	-	-	
	室温 9°C	+++	++	++	+	-	-	
	20°C	+++	++	++	+	±	-	
	37°C	+++	++	++	++	+	-	
	45°C	+++	++	++	+	-	-	

第5表 反応時の温度 (卵白アルブミン系)

抗原	抗体		温度				
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000		
1:250 (結合帯)	0°C	++	+	-	-	-	
	室温 9°C	++	+	±	-	-	
	20°C	++	++	+	-	-	
	37°C	++	++	+	±	-	
	45°C	++	+	-	-	-	

第6表 食塩濃度 (人血清系抗原稀釈 1:n×10<sup>4</sup>)

食塩濃度	抗原n							
	1	2.5	5	10	25	50	100	200
蒸溜水	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-
0.1%	+++	+++	+++	++	++	+	-	-
0.85%	+++	+++	++	++	±	-	-	-
1.8%	+++	+++	++	±	-	-	-	-
3.0%	++	++	+	-	-	-	-	-

第2節 食塩濃度の影響

第6表及び第7表は抗原を蒸溜水及び0.1%, 0.4%, 0.85%, 1.8%, 3.0%の食塩水にて各々稀釈し Uhlenhuth 氏法を行つた成績であつて人血清系, 牛血清系のいずれに於ても抗原を蒸溜水にて稀釈したものが最も反応が強く、食塩濃度の高くなるに従つて反応は弱くなつた。

第8表及び第9表は結合帯を中心とし、抗

第7表 食塩濃度 (卵白アルブミン系抗原稀釈 1:n×10<sup>4</sup>)

食塩濃度	抗原n								
	1	2.5	5	10	25	50	100	250	500
蒸溜水	+++	+++	+++	+++	++	+	±	-	-
0.1%	+++	+++	+++	+++	++	++	±	-	-
0.4%	+++	+++	+++	++	±	-	-	-	-
0.85%	+++	+++	+++	++	±	-	-	-	-
3.0%	+++	++	++	±	-	-	-	-	-

第8表 食塩濃度 (人血清系)

抗原	抗体		食塩濃度					対照
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000			
1:500 (結合帯)	蒸溜水	+++	++	+	-	-		
	0.1%	+++	++	++	±	-	-	
	0.4%	++	++	+	-	-	-	
	0.85%	++	++	+	-	-	-	
	1.5%	++	+	-	-	-	-	
2.0%	++	±	-	-	-	-		

第9表 食塩濃度 (卵白アルブミン系)

抗原	抗体		食塩濃度					対照
	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000			
1:250 (結合帯)	蒸溜水	+++	++	+	+	±	-	
	0.1%	+++	++	+	+	-	-	
	0.4%	++	++	+	±	-	-	
	0.85%	++	++	+	±	-	-	
	1.0%	++	+	-	-	-	-	
2.0%	++	±	-	-	-	-		

体稀釈は1%アラビヤゴム食塩水、抗原稀釈は蒸溜水及び表に示す各濃度の食塩水を用いて沈降反応を行つた成績であつて、抗原を蒸溜水にて稀釈した場合の抗体価は高く食塩濃度の増すにつれて抗体価は減少する傾向を示したが、Uhlenhuth 氏法に於ける食塩濃度の影響による抗原価の差程著しい差はない。

第10表は抗原稀釈に生理的食塩水を用い、抗体稀釈には表に示す様な種類の溶媒を使用し沈降反応を行つた所正常家兎血清、免疫家兎血清にて抗体を稀釈した場合が生理的食塩水で抗体を稀釈した場合より比較的反應が強いが1%アラビヤゴム水溶液で抗体を稀釈した場合は著明に反應が弱かつた。

第10表 各種溶液による抗体稀釈 (人血清系 抗原稀釈1:n×10<sup>4</sup>)

抗体	抗体稀釈溶液	抗原n							
		1	2.5	5	10	25	50	100	対照
1:10	1%アラビヤゴム食塩水	卅	卅	卅	±	-	-	-	-
	1%アラビヤゴム蒸溜水	卅	+	-	-	-	-	-	-
	10%正常家兎血清	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
	10%免疫家兎血清	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
	1%アラビヤゴム加9% Saccharose	卅	卅	±	-	-	-	-	-

第3節 糖類の影響

本節においては各種の糖類、高級アルコールの沈降反応に及ぼす影響について検討した。即ち、抗原及び抗体を稀釈する溶媒として二単糖として Saccharose, 単糖類として Glucose, Galactose, 高級アルコールとして Mannit, Sorbit の各等張溶液を用い、生理的食塩水を用い抗原、抗体を稀釈した場合の反

應を対照として、その抗体価を比較検討した。その成績は第11表に示される如くである。この結果よりみれば糖類溶液にて抗原、抗体を共に稀釈した場合は、何れの種類の糖類溶液を使用した場合の抗体価も対照として生理的食塩水を用いた場合の抗体価より弱く、又各種糖類溶液では Mannit, Sorbit, Glucose, Saccharose, Galactose の順に反應が減弱する

第11表 糖類の影響 (卵白アルブミン系)

抗原	抗体稀釈溶液	抗体 抗原稀釈溶液	抗体						
			1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2500	対照
1:500 (結合帯)	1%アラビヤゴム 加 6% Galactose	6% Galactose	卅	卅	+	±	-	-	-
		生理的食塩水	卅	卅	卅	+	-	-	-
	1%アラビヤゴム 加 10% Saccharose	10% Saccharose	卅	卅	卅	±	-	-	-
		生理的食塩水	卅	卅	卅	+	-	-	-
	1%アラビヤゴム 加 6% Glucose	6% Glucose	卅	卅	+	-	-	-	-
		生理的食塩水	卅	卅	卅	卅	-	-	-
	1%アラビヤゴム 加 6% Sorbit	6% Sorbit	卅	卅	卅	±	-	-	-
		生理的食塩水	卅	卅	卅	卅	-	-	-
	1%アラビヤゴム 加 6% Mannit	6% Mannit	卅	卅	卅	卅	±	-	-
		生理的食塩水	卅	卅	卅	卅	+	-	-
	1%アラビヤゴム 生理的食塩水	生理的食塩水	卅	卅	卅	卅	+	-	-

傾向を示した。

抗原稀釈のみに生理的食塩水を使用した場合は抗原、抗体の両者を糖類溶液で稀釈した場合より反応は強く現われた。

又この場合の各種糖類溶液による沈降反応の強さは Mannit は殆んど反応阻止作用がなく、対照と大体等しい反応の強さを示し、他の糖類は Sorbit, Glucose, Saccharose, Galactose の順に反応を阻止する傾向を示した。

#### 第4章 総括並びに考案

以上の実験結果を総括してみると、免疫血清蛋白と密接なる関係のある抗体の加温による変性作用並びに低温における阻止作用については諸学者により明らかにされている所である。緒方教授は沈降素は 75°C 30分の加温により反応能力を失うと述べられている。

37°C における反応が最も強い事は、温度が高くなると共に沈降物の溶解度の増加及び抗原、抗体蛋白質の部分変性がおこるために抗原、抗体反応が阻止され、又低温になるに従つて抗原、抗体結合の反応速度がおそくなるために 37°C より高温或は低温における反応が減弱するものと考えられる。

抗原を稀釈する場合に食塩濃度の低い程、沈降物の形成が強く現われる事は、主として重層界面部に形成された沈降物の溶解度に帰するためと推察される。即ち、低食塩濃度においてはグロブリンは溶解度を減じ析出しやすい状態にあり、従つて抗原、抗体反応形成物は主としてグロブリンであるため反応が強く現われるものと考えられる。

更に各種糖類により抗原、抗体稀釈を行い沈降反応を行つた結果を考えるに、糖類の抗体、補体の加熱による変性阻止作用については永田、波多野の報告があり、又緒方(正)、望月は比濁計により補体の熱凝固防止作用及び補体の保護作用が Galactose>Saccharose>Glucose>Sorbit>Mannit の順に強い事を発表しており、糖類が保護膠質として作用する事は明らかである。

実験結果においては以上の糖類の熱凝固防止作用に平行して抗体価の弱い事実は糖類が保護膠質として抗原、抗体反応に於ける分子活動を阻害するためと考えられ、抗原を生理的食塩水にて稀釈した場合は抗原、抗体両者を同一糖類にて稀釈した場合より比較的抗体価の高い結果を得た事は食塩水によつて糖類溶液の濃度が界面において稀釈されるため保護膠質作用が減弱して沈降反応が強く現われるものと思われる。

#### 第5章 結 論

1) 沈降反応の重層法に於ける反応時の温度の作用は各種反応系について 37°C において反応が最も強い。

2) 卵白アルブミン系に於ては反応時の温度の影響が他の反応系のそれより著しい。

3) 食塩濃度の影響は抗原稀釈に蒸溜水を使用した場合最も強く、食塩濃度の増加するに従い反応が弱くなる。

4) 食塩濃度の影響は Uhlenhuth 氏法は緒方氏稀釈法におけるより著明であつた。

5) 糖類の影響は各種糖類により抗原、抗体を稀釈し沈降反応を行つたものは何れも抗原、抗体を生理的食塩水で稀釈し、反応を行つたものより弱い。

6) 抗原を生理的食塩水で稀釈したものは抗原、抗体を同一糖類で稀釈し、反応したもののより強い。

7) 糖類の反応阻止作用は次の順で強かつた。Galactose>Saccharose>Glucose>Sorbit>Mannit。

終りに臨み、終始御鞭撻、御指導を賜りかつ御校閲を賜りました恩師緒方教授に深甚なる謝意を表します。

(本論文要旨は昭和 31 年 6 月岡山医学会臨時総会並に第 470 回岡山医学会通常例会に於いて発表した)

## 文 献

- 1) 緒方：第1回聯合衛生学，微生物学，寄生虫病学会講演。
- 2) 須之内：岡医雜，第41年，第7号，昭和4年。
- 3) 佐藤：社会医学雜誌，第517号，昭和5年。
- 4) 国房：社会医学雜誌，第521号，昭和5年。
- 5) 林：第1回聯合衛生学，微生物学，寄生虫病学会講演。
- 6) Heidelberger u. Kendall: J. Exp. Med. LXIII, 819, 1936.
- 7) Aladjem u. Lieberman: J. Immunol. 69, 117, 1952.
- 8) 緒方(正)：生物物理化学，2, 123, 1955.
- 9) Silber u. Schafran: Zeitschr. f. Immunität Forsh. Bd. 77, S. 514, 1932.
- 10) 緒方，大川，緒方(正)：岡医雜，59年，23号，昭和22年。
- 11) 永田 第54回岡山医学会總會発表，昭和18年。
- 12) 波多野：広島医学，第6卷，第11号，1953年。
- 13) 緒方(正)，望月 岡医雜，第10卷，第2号，82, 1956.
- 14) Keckwick, R. A., Cannan, R. K.: Biochem. J. 30, 232, 1936.
- 15) Uhlenhuth u. Weidanz: Technik u. Methodik d. biol. Eiweissdiff. Verfahrens., 1909.

## II. A Study on the Influences of Various Conditions upon Precipitin Reaction

By

Kozo Nakai

Department of Hygiene, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Dr. M. Ogata)

Influences of temperature, the concentration of saline solution as well as various sugars have been studied at the time when the reaction is taking place in the mixture test of precipitin reaction.

1) Temperature of 37°C has been found to be most suitable in enabling the reaction to take place to the highest degree; and the influence of temperature is most prominent on the reaction of ovoalbumin system.

2) As for the influence of the concentration of saline solution, it is most marked when antigen is diluted with distilled water; but the reaction falls behind as the concentration of saline solution more increases. Moreover, Uhlenhuth's method exerts more influence on the reaction than Ogata's antigen-antibody dilution method.

3) The precipitin reaction performed by diluting antigen antibody with the use of various sugars decline than the reaction performed by diluting antigen and antibody by physiological saline solution.

4) The reaction taking place when antigen alone is diluted by saline is stronger than the reactions observed in the case where antigen and antibody are diluted by the same kind of sugar solution.

5) The inhibitory action of sugars on the reaction has been found strong in the order of galactose > saccharose > glucose > sorbit > mannit.