

抗原抗体反応の研究

第 3 編

高並びに低分子抗原の補体結合反応（温度，時間条件）

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

補体結合反応は Bordet u. Gengou¹⁾により 1901年始めて抗体の証明に応用され、その後 Neisser u. Sachs²⁾により抗原の証明に成功し、以来実用的にも広く応用されて来た。然るに補体結合性抗体と沈降性抗体とが同一のものであるか否かは諸学者により論議されていたが教室の多数の業績により沈降素と補体結合性抗体とは同一なる事を立証した。即ち両反応に於ける結合帯、抗体価の相違は反応実施の術式に原因するものと大田原教授³⁾は考えられ、補体結合時間を 37°C 1 時間後低温 24 時間法を考案され、従来補体結合性抗体の証明が不可能なるものを本法により証明され、かつ沈降素と補体結合性抗体とは一元なる事を報告された。かくの如く補体結合反応に於ては時間、温度の影響が大であつて、この事に関しては松本⁴⁾、Kolmer⁵⁾、井上⁶⁾の発表がある。

著者は沈降反応に於ける結合帯を中心にして人血清系、卵白アルブミン系を使用し、補体結合反応の感作時間並びに感作温度の影響につき検討した結果を報告する。

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、卵白アルブミンを抗原とし、人血清は 1:10 の割合に生理的食塩水で稀釈したものを 1 回量 5.0 cc づつ、又卵白アルブミン

は 1 回量 1.0 cc (1.5 mg) を 3~4 日間隔に 2500~3000 g の健康家兎の耳静脈に 10~15 回注射し、最終注射日より 7 日後全採血し、血清を氷室に 24 時間放置し、その後分離し、56°C 30 分加温非働化し氷室に保存したものを使用した。

第 2 項 反応用抗原

人血清は 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 Keckwick⁷⁾ の脱水芒硝法により 3 回結晶し精製したものを使用した。

第 3 項 溶血系及び補体

溶血系としては 2.5 多山羊血球浮游液並に非働化した抗山羊溶血素を用い、補体としては空腹時数匹の海狸より採取した新鮮な血清を使用した。実験には溶血素は溶血価の 2 単位を用い、補体は毎常溶血系に対する補体価を測定し、その 1.5 単位を使用した。

第 2 節 実験方法

第 1 項 補体結合反応の教室慣用法

教室慣用法としては抗原、抗体、補体の三者を各々 0.5 cc 宛よく混和しつつ 37°C 1 時間孵卵器中にて加温後氷室に 24 時間放置し補体結合を行い、次いで溶血系を加え、37°C 2 時間反応後、1 夜氷室に保存し判定を行い、実験は毎常厳密な対照併置の下に行つた。

成績判定は完全溶血阻止卅、不完全溶血阻止はその程度により卅、卅、+、完全溶血は - を以て表示した。補体結合反応に於ける成績判定の記録は以下同様に表示する。

第 2 項 補体結合の時間による影響

抗原, 抗体, 補体の3者を各々0.5cc宛よく混和しつつ37°C 1時間孵卵器中にて加温後, 直ちに溶血系を加えたもの及びその後0°C氷室に2, 6, 12, 15, 24時間補体を結合させ夫々に溶血系を加えたものを37°C 2時間反応後, 1夜氷室に保存し, 判定を行つて各々を比較した。

第3項 補体結合時の温度による影響

抗原, 抗体, 補体の3者を各々0.5cc宛混和し初め0°C, 10°C, 20°C, 37°C 2時間結合させ, その後37°C 1時間結合後各々に溶血系を加え, 37°C 2時間加温後1夜氷室に保存し, 成績を判定した。又補体結合を初め37°C 1時間させ, 次いで10°C 2時間結合したものと, 初め10°C 2時間, 次いで37°C 1時間結合したものと, 10°C 3時間結合したものの3者に溶血系を加え, 37°C 2時間加温し1夜氷室に保存し成績判定し教室の慣用法と比較した。

第3章 実験成績

第1節 結合時間による影響

本節に於ては抗原, 抗体, 補体の結合時間について検討した。その結果は第1表, 第2表に示す如く卵白アルブミン系, 人血清系のいずれの場合も低温12時間結合に於て殆んど低温24時間結合の抗体価に近く, 低温15時間結合に於ては低温24時間結合の抗体価と殆んど一致した成績を得た。又卵白アルブミン系の結合時間の影響は人血清系のそれに比し著明であつた。

各表に於けるKは抗原, 抗体, 補体, 溶血素, 補体と溶血素の対照を示す。又Hは溶血系を示す。

第2節 結合温度による影響

次に抗原, 抗体, 補体の結合温度について検討した。その結果は第3表, 第4表に示される如く, 卵白アルブミン系に於ては10°C 2時間後37°C 1時間補体結合した場合が慣用法に殆んど近い抗体価を示し, 同一時間なれば比較的低温結合が良く結合する結果を得た。人血清系に於ては同一時間の場合は温度

第1表 補体結合の時間
卵白アルブミン系 (沈降反応結合帯: 抗体価 2500:1000)

抗原	抗体 結合時間	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2500	1:5000	K
		1:2500 (結合帯)	37°C 1時間 H	++	+	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 2時間 H	+++	++	±	-	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 6時間 H	+++	++	±	-	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 12時間 H	+++	++	+	-	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 15時間 H	+++	++	±	-	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 24時間 H	+++	++	±	-	-	-	-

第2表 補体結合の時間
人血清系 (沈降反応結合帯: 抗体価 250:500)

抗原	抗体 結合時間	1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000	K
		1:250 (結合帯)	37°C 1時間 H	++	+	-	-
	37°C 1時間 0°C 2時間 H	+++	++	±	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 6時間 H	+++	++	±	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 12時間 H	+++	++	+	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 15時間 H	+++	++	+	±	-	-
	37°C 1時間 0°C 24時間 H	+++	++	+	±	-	-

による影響は著しくなく, むしろ比較的高温結合が成績が良かった。

次に第5表, 第6表の実験成績の示す如く

第3表 補体結合の温度
卵白アルブミン系 (沈降反応結合帯 : 抗体価 500 : 1000)

抗原	抗体		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000	K
	結合温度							
1:500 (結合帯)	0°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	±	-	-	-
	10°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	+	±	-	-
	20°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	±	-	-	-
	37°C 3時間 ↓ H		卅	+	±	-	-	-
	37°C 1時間 0°C 24時間 ↓ H		卅	卅	+	+	-	-

第4表 補体結合の温度
人血清系 (沈降反応結合帯 : 抗体価 250 : 1000)

抗原	抗体		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2500	K
	結合温度								
1:250 (結合帯)	0°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	±	-	-
	10°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	±	-	-
	20°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	±	-	-
	37°C 3時間 ↓ H		卅	卅	卅	卅	+	-	-
	37°C 1時間 0°C 24時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	+	-	-

卵白アルブミン系, 人血清系のいずれに於ても 10°C 2時間後 37°C 1時間補体結合した場合が 37°C 1時間後 10°C 2時間補体結合させた場合よりよく結合し, その抗体価は慣用法の抗体価と殆んど一致する。換言すれば比較的低温より比較的高温に結合温度を変化せしめた場合が成績が良好であつた。

第5表 補体結合の温度
卵白アルブミン系 (沈降反応結合帯 : 抗体価 1000 : 1000)

抗原	抗体		1:100	1:250	1:500	1:1000	1:2500	K
	結合温度							
1:1000 (結合帯)	37°C 1時間 0°C 24時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	-	-
	37°C 1時間 10°C 2時間 ↓ H		卅	卅	±	-	-	-
	10°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	卅	±	-	-
	10°C 3時間 ↓ H		卅	±	-	-	-	-

第6表 補体結合の温度
人血清系 (沈降反応結合帯 : 抗体価 250 : 1000)

抗原	抗体		1:50	1:100	1:250	1:500	1:1000	K
	結合温度							
1:250 (結合帯)	37°C 1時間 0°C 24時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	±	-
	37°C 1時間 10°C 2時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	-	-
	10°C 2時間 37°C 1時間 ↓ H		卅	卅	卅	+	±	-
	10°C 3時間 ↓ H		卅	卅	+	-	-	-

第4章 総括並に考案

補体結合反応に於ける補体結合の時間及び温度の影響を卵白アルブミン系, 人血清系を使用し教室の慣用法と比較検討した。

反応時間に関しては12時間低温結合が殆んど慣用法に近い抗体価を示し, 15時間結合では卵白アルブミン系, 人血清系の何れに於ても抗体価が慣用法と殆んど一致した。

補体結合の温度に関しては卵白アルブミン系に於ては同一結合時間の場合には結合期を初め 10°C 2時間, 次いで 37°C 1時間結合

した場合が勝れかつ従来慣用法と殆んど抗体価が一致した。然るに人血清系では 37°C 3 時間結合がそれ以下の低温結合より良好で慣用法と殆んど一致した抗体価を得た。

かかる事実は抗原の分子量に基因するのではないかと考えられ、当教室に於て大田原教授が低温長時間結合を創案され、従来補体結合を証明し得なかつたものを証明し得て以来、井上もこの方面の研究を残し、又緒方教授⁸⁾は証明困難とされた卵白アルブミン抗体の検索に補体結合時間を 37°C 2 時間後 2°C 24 時間延長され良い成績を得られている。日本脳炎その他の Virus 疾患の補体結合反応による診断も Casals 法⁹⁾の如く低温長時間結合法が行なわれ、現在我が国¹⁰⁾で行なわれている日本脳炎の補体結合も低温長時間結合法を使用している。又教室の森下¹¹⁾は Insulin 系の補体結合反応を低温長時間結合法により証明している。

かくの如く卵白アルブミン、ウイルス、インスリン等の特殊抗体の証明には低温長時間結合が必要条件とされていた。

然るに著者の行つた実験結果より卵白アルブミン系の補体結合は低温 15 時間結合で十分であり、又 10°C 2 時間後 37°C 1 時間結合により低温長時間結合に殆んど近い成績を得

られ、短時間で抗原、抗体の証明が可能となり Virus 疾患の如き場合には補体結合反応が短時間で判定出来るため、診断的応用価値が大なるものと思される。

第 5 章 結 論

1) 卵白アルブミン系、人血清系の何れに於ても低温補体結合 15 時間にて慣用法の抗体価と一致した。

2) 卵白アルブミン系では低温補体結合の時間の影響が著明である。

3) 卵白アルブミン系の補体結合は 10°C 2 時間後 37°C 1 時間結合により慣用法と抗体価が殆んど一致した。

4) 人血清に於ては比較的高温における補体結合が優れていた。

5) 卵白アルブミン系、人血清系の何れも補体結合を初め 10°C 2 時間、次いで 37°C 1 時間結合した場合が初め 37°C 1 時間、次いで 10°C 2 時間結合した場合より抗体価が高い傾向がある。

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 32 年第 66 回岡山医学会総会に於いて発表した)

文 献

- 1) Bordet u. Gengou: *Ann. d. L' Inst. Past.*, T. 15, P. 398, 1901.
- 2) Neisser u. Sachs: *Berl. Klin. Wochenschr.*, S. 1388, 1905, u. S. 67, 1906.
- 3) 大田原: *岡医雑*, 第 51 年, 第 5 号, 昭和 14 年.
- 4) 松本: *朝鮮医雑*, 25 卷, 6 号, 699.
- 5) Kolmer: *Inf. Imm. a. Biol. Therapy*. 3 Edition. 541, 1923.
- 6) 井上: *岡医雑*, 第 66 卷, 第 5 号, 昭和 29 年.
- 7) Keckwick, R. A., Cannan, R. K.: *Biochem. J.* 30, 232, 1936.
- 8) 緒方: *アレルギー*, 3, 293, 昭和 29 年.
- 9) Casals, J., Palacios, R.: *Science*, 93, 1941, *J. Exp. Med.*, 74, 409, 1941.
- 10) 厚生省: *衛生検査指針*, 11, 1950.
- 11) 森下: *岡医雑*, 第 68 卷, 6 号, 昭和 31 年.

III. Complement Fixation Tests of High and Low Molecular Antigen

By

kozo Nakai

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

- 1) All the ovoalbumin system and human serum system within 15 hours of low temperature complement fixation have given a similar titer as that of the conventional method (37°C a hour, cold 24 hours).
 - 2) Two hours after the complement fixation test of ovoalbumin at 10°C and one hour after the fixation at 37°C, antibody titer has nearly coincided with that by the conventional method.
 - 3) The complement fixation in the case of human serum system has been better at a relatively higher temperature.
 - 4) The antibody titer of complement fixation of both ovoalbumin system and human serum system, first at 10°C for 2 hours, then at 37°C for 1 hour has been found higher than that in the case where the complement fixation has been carried out first at 37°C for an hour and then at 10°C for two hours.
-