

補体結合反応に於ける補体結合の感作条件に関する研究

(抗原抗体稀釈法の研究 第2報)

岡山大学医学部衛生学教室 (指導 緒方益雄教授)

副 手 井 上 邦 彌

[昭和29年4月5日受稿]

第1章 緒 言

補体結合反応は1901年 Bordet u, Gengou¹⁾により創案確立されて以来抗原及抗体の証明には必要不可欠なものとなり、実用的にも Wasserman 反応を始め、各種疾患の診断に博く応用されている。

本反応に於いて、補体結合に対する温度の影響を松本²⁾が補体増量法により、0°C と 37°C の比較を行つている。

亦、時間に関しては Kolmer³⁾ 及び大田原教授⁴⁾が、37°C に1時間、更に低温 19~24時間の長時間結合法を発表された。

私は、緒方氏抗原抗体稀釈法で各種反応系により結合時の温度を、0°C, 20°C, 37°C となし比較し、亦時間別比較を低温に1時間、6時間及び24時間の結合時間による反応を観察した。

第2章 実験材料及実験方法

使用反応系は、人血清、牛血清、Hefegummi、馬血清 Albumin、牛血清 Globulin の家兎抗体による反応系で、Wasserman 反応は日新化学製の cardiolipin 加抗原と梅毒患者血清との補体結合反応である。

家兎抗体の補体結合法は本教室の慣用法⁵⁾を用い、Wasserman 反応は厚生省編纂の衛生検査指針⁶⁾に従い、施行し記録した。

補体結合反応に於ける補体結合は、第2部の実験では 0°C 20°C 37°C の各恒温槽で、夫々1時間行い、5分室温に放置した後溶血系を加えた。

第1部の実験では操作を氷水槽中に行い、0°C 氷室にて補体の結合を行わせ、1, 6, 24時間後夫々溶血系を加え、何れも 37°C にて2時間反応後、一夜氷室に保存し判定を行つた。

第3章 実験成績

第1節、補体結合の時間による影響

第1項 人血清系

本反応系の沈降反応の成績は(抗体価)(結合部抗原価)=250:500であつた。

補体結合法の成績は、第1表の如く、結合時間6時間の抗体価は1時間より一稀釈上昇して沈降反応の抗体価に一致し、24時間結合では更に一稀釈上昇した。

第1表 人血清系*

感作時間	抗原稀釈	抗 体 稀 釈					
		50	100	250	500	1000	K
1 時 間	250	+++	++	-	-	-	-
	500	+++	++	-	-	-	-
	1000	+++	+	-	-	-	-
	2500	+++	+	-	-	-	-
	5000	+++	±	-	-	-	-
	10000	+++	±	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-
6 時 間	250	+++	++	-	-	-	-
	500	+++	++	+	-	-	-
	1000	+++	++	+	-	-	-
	2500	+++	+	±	-	-	-
	5000	+++	+	±	-	-	-
	10000	+++	±	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-

24 時 間	250	卅	卅	卅	-	-	-
	500	卅	卅	卅	±	-	-
	1000	卅	卅	卅	+	-	-
	2500	卅	卅	卅	+	-	-
	5000	卅	卅	卅	±	-	-
	10000	卅	卅	+	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-

結合帯は1時間、6時間及び24時間と結合時間が増し、抗体価が上昇するにつれて、略一稀釈づつ抗原稀薄側へ現れた。

亦、他の人血清系に於いても同様な結果を得た。

第2項 牛血清系

本反応系の沈降反応成績は500:5000であった。補体結合法の成績は、第2表の如く、1時間結合では(抗体価):(結合帯抗原価)=250:10000, 6時間では500:25000, 24時間では1000:25000~5000となり、6時間では、抗体価が沈降反応と一致したが結合帯は稍抗

第2表 牛血清系

感作時間	抗原稀釈	抗 体 稀 釈					
		100	250	500	1000	2500	K
1 時 間	2500	卅	-	-	-	-	-
	5000	卅	卅	-	-	-	-
	10000	卅	卅	-	-	-	-
	25000	卅	+	-	-	-	-
	50000	卅	-	-	-	-	-
	100000	卅	-	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-
6 時 間	2500	卅	卅	-	-	-	-
	5000	卅	卅	-	-	-	-
	10000	卅	卅	+	-	-	-
	25000	卅	卅	卅	-	-	-
	50000	卅	卅	+	-	-	-
	100000	卅	卅	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-
24 時 間	2500	卅	卅	卅	-	-	-
	5000	卅	卅	卅	-	-	-
	10000	卅	卅	卅	+	-	-
	25000	卅	卅	卅	卅	-	-
	50000	卅	卅	卅	卅	-	-
	100000	卅	卅	卅	卅	-	-
	K	-	-	-	-	-	-

原稀薄側に偏した。

亦他の牛血清反応系では、6時間結合は1時間より2稀釈抗体価が高く、24時間の抗体価は6時間と同一であつたが、反応度は24時間が強かつた。

第3項 牛血清 Globulin 系

本反応系の沈降反応抗体価は、500倍であつた。補体結合法では、第3表の如く、抗体価は1時間、6時間、24時間の順に夫々一稀釈づつ上昇し、之に伴い結合帯も抗原稀薄側へ、移動した

第3表 牛血清 Globulin 系

感作時間	抗原稀釈	抗 体 稀 釈					
		50	100	250	500	1000	2500
1 時 間	500	卅	+	-	-	-	-
	1000	卅	卅	-	-	-	-
	2500	卅	卅	±	-	-	-
	5000	卅	+	-	-	-	-
	10000	卅	+	-	-	-	-
	25000	±	-	-	-	-	-
	50000	-	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	
6 時 間	500	卅	卅	-	-	-	-
	1000	卅	卅	+	-	-	-
	2500	卅	卅	卅	±	-	-
	5000	卅	卅	+	±	-	-
	10000	卅	卅	±	-	-	-
	25000	+	±	-	-	-	-
	50000	±	-	-	-	-	-
K	-	-	-	-	-	-	
24 時 間	500	卅	卅	±	-	-	-
	1000	卅	卅	卅	-	-	-
	2500	卅	卅	卅	+	-	-
	5000	卅	卅	卅	卅	±	-
	10000	卅	卅	卅	+	±	-
	25000	卅	卅	+	+	-	-
	50000	卅	卅	±	±	-	-
100000	卅	±	-	-	-	-	
K	-	-	-	-	-	-	

註. 蛋白濃度7%を原液とした。

第4項 馬血清 Albumin 系

本反応系の沈降反応の抗体価は1000倍で、補体結合法では、第4表の如く抗体価は1時

320 : 640, 6時間では 1280 : (1280~2560), 24時間では 2560 : 2560 となり, 時間の増す毎に抗体価は順次上昇した

第7項 Wasserman 反応抗体稀釈

数人の患者血清を用いて結合帯部に於ける抗体価を比較した成績は, 第7表の如くであった。

即ち, 6時間では1時間に比し, 1~2稀釈強く現れ, 24時間では, 6時間と抗体価が同一であるが反応度が強い, 或は1稀釈高く現れた。

第7表 Wasserman 反応抗体稀釈 (抗原 1 : 80)

第 例	感作	抗体				
		160	320	640	1280	K
第 1 例	1 時間	+++	+	-	-	-
	6 "	+++	+++	+	-	-
	24 "	+++	+++	++	-	-
第 2 例		160	320	640	1280	K
	1 時間	++	±	-	-	-
	6 "	+++	+++	++	-	-
第 3 例		160	320	640	1280	K
	1 時間	++	-	-	-	-
	6 "	+++	+++	-	-	-
第 4 例		40	80	160	320	640
	1 時間	+++	++	+	-	-
	6 "	+++	+++	++	+	-
第 5 例		80	160	320	640	1280
	1 時間	+++	+++	±	±	-
	6 "	+++	+++	+++	+	±
第 5 例		80	160	320	640	1280
	1 時間	+++	+++	+++	++	+
	24 "	+++	+++	+++	+++	+

抗原稀釈 (抗体 1 : 40)

第 例	感作	抗原				
		80	160	320	640	1280
第 5 例	1 時間	+++	+++	±	±	-
	6 "	+++	+++	+++	+	±
	24 "	+++	+++	+++	+++	+

第2節 補体結合の温度に依る影響

第1項 人血清系

補体結合反応に於ける補体結合期を, 0°C, 20°C, 37°C, の温度別に比較した成績は, 第

8表の如く, 各温度に依る影響は余り認められなかつた

亦他の人血清反応系に於いては, 37°C が幾分他より結合が良かった。

第8表 人血清系

温 度	抗原稀釈	抗 体 稀 釈					
		50	100	150	200	300	K
0°C	250	++	+	+	±	-	-
	500	++	+	+	±	-	-
	1000	++	+	±	-	-	-
	2500	++	±	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-
20°C	250	+++	+++	+	±	-	-
	500	+++	+++	+	±	-	-
	1000	+++	+	±	-	-	-
	2500	+++	+	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-
37°C	250	+++	++	++	±	-	-
	500	+++	++	+	+	-	-
	1000	+++	+	+	±	-	-
	2500	++	±	±	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-

第2項 牛血清系

第9表の如く, 本実験に於いては, 0°C,

第9表 牛血清系

温 度	抗原稀釈	抗 体 稀 釈				
		100	200	300	400	K
0°C	5000	+++	+++	++	+	-
	10000	+++	+++	+++	++	-
	20000	+++	+++	+++	-	-
	40000	+++	+++	+	-	-
	K	-	-	-	-	-
20°C	5000	+++	+++	±	-	-
	10000	+++	+++	++	-	-
	20000	+++	+++	+	-	-
	40000	+++	+++	-	-	-
	K	-	-	-	-	-
37°C	5000	+++	+	-	-	-
	10000	+++	++	+	-	-
	20000	+++	+	-	-	-
	40000	+	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-

20°C, 37°C, の順に結合が良好であつた

此の事は同時に行つた補体増量法による成績に於いても認められた

亦他の牛血清系につき実験した成績では、逆に 37°C, 20°C, 0°C の順に結合が強かつた。

第3項 Hefegummi 系

第10表の如く、本反応系では、0°C にて結合を行つた場合が、最も強く、37°C が最も弱かつた。

此の事は、補体増量法に依る場合も、稀釈法と同様 0°C, 20°C, 37°C の順に、結合度が低下した。

亦他の数種の本反応系による比較に於いても、同様な結果を得た。

第10表 Hefegummi 反応系

温度	抗原稀釈	抗体稀釈					
		100	200	300	400	800	K
0°C	25	+++	++	±	-	-	-
	50	+++	+++	++	±	-	-
	100	+++	+++	++	+	-	-
	250	+++	+++	++	±	-	-
	K	-	-	-	-	-	-
20°C	25	+++	++	-	-	-	-
	50	+++	+++	++	-	-	-
	100	+++	+++	++	+	-	-
	250	+++	+++	++	±	-	-
	K	-	-	-	-	-	-
37°C	25	+++	-	-	-	-	-
	50	+++	+	-	-	-	-
	100	+++	±	-	-	-	-
	250	+	-	-	-	-	-
	K	-	-	-	-	-	-

第4項 Wasserman 反応 (抗体稀釈)

第11表に示す如く、数名の患者血清の抗体価を比較した成績では、各例共、0°C に於ける補体結合は弱く、37°C が最強であつた。

第4章 総括並びに考按

各種反応系の補体結合反応に於ける補体結合期に対する時間及温度の影響を比較実験した。

第11表 Wasserman 反応 (抗原×80)

第	温度	抗体			
		40	80	160	320
1 例	0°C	+	-	-	-
	20°C	+++	+	-	-
	37°C	+++	+++	±	-
2 例	0°C	+	-	-	-
	20°C	+++	+++	+++	±
	37°C	+++	+++	+++	+
3 例	0°C	+++	+	-	-
	20°C	+++	+++	++	-
	37°C	+++	+++	++	-
4 例	0°C	+++	+	-	-
	20°C	+++	+++	++	-
	37°C	+++	+++	+++	-
5 例	0°C	+	-	-	-
	20°C	++	+	±	-
	37°C	+++	+++	+	-

本教室の慣用法による補体結合法の抗体価は、沈降反応に比べ、略一稀釈弱く出た

然し、結合期を低温に6時間にする事により、補体結合力の強度でない抗体では、抗体価を沈降反応と略一致させる事が出来た。

同一反応系の沈降反応と補結法の結合帯は抗体価が同一の場合、一致すべきものと考えるが、補結法のそれは屢々抗原高稀釈側に現れた。

補体結合に対する温度の影響は、時間程著明ではないが、尚、多少の差を認めた。

補体結合反応に於いては反応初期程、急速に結合が起るが、今回の実験より反応長時間後にも結合が相当進行するものとする

結合期24時間の抗体価が高いのは、後期結合の増強と、補体の減弱とが考えられる。

6時間結合による抗体価は、24時間と大差はないが、補体減弱及び非特異的補体吸着が少く、且、沈降反応の抗体価に一致することが多いので、本法6時間法のみによつて沈降

反応の抗体価を推定することが出来る。

補体結合法に於ける補体吸着は沈降物の成生機転に左右されるので、温度の影響も相当あるものと思われる。

Hefegummi 系が低温度に於いて結合が強いのは、本反応系は高温に於いて大なる絮状物を形成し、低温で微細なる絮状物を形成し、補体吸着条件が良好となる為と考える。

第5章 結 論

1) 補体結合反応の結合期を、1, 6, 24 時間と比較した成績は、結合時間の長い程、反応価が高く、且強度である

2) 結合時間 6 時間による抗体価は、1 時間結合法より 1~2 稀釈高く、24 時間結合法では、6 時間法と同一で反応度がより強いのか、或は、1 稀釈高く出る。

3) 各反応系の補体結合反応に於ける補体の吸着は、初期程強度である

4) 本教室法に依る補体結合反応では、補体結合期を低温 6 時間となす事により、結合力の強力でない抗体では、抗体価が沈降反応と一致する。

5) 補体結合反応の補体結合期に対する温度の影響は、反応系により異なり、Hefegummi 系では 0°C の結合が良く、cardiolipin 加抗原に依る Wasserman 反応では、0°C では結合極めて悪く、37°C で良好であつた 他の反応系では大差を認めなかつた。

終りに臨み終始御鞭撻、御指導並びに御校閲を賜つた恩師緒方教授に対し満腔の謝意を表す。

尙、種々御援助を頂いた岡大衛生学教室緒方正名先生に深謝す。

(本論文要旨は昭和 28 年岡山医学会総会発表済)

文 献

- | | |
|--|--|
| 1) Bordet et Gengou Ann. d. L Inst. Past. T 15 398 (1901) | 4) 大田原 岡山医学会雑誌, 51 年, 5 号, 991 (昭 14) |
| 2) 松本: 朝鮮医学会雑誌, 25 卷, 6 号, 699. | 5) 内藤 岡山医学会雑誌, 48 年, 12 号, 2829 (昭 11) |
| 3) Kolmer Infection. Immunity. a. Biol. Therapy 3 Editiou 541 (1923) | 6) 厚生省: 衛生検査指針 I, (I) 384 (昭 28) |

Department of Hygiene, Okayama University Medical School.

(Director: Prof. Dr. M. Ogata)

Effects caused by Time and Temperature at Primary, Incubation of Complement-fixation Test.

By

Kuniya Inoue.

1) The antibody titer of complement-fixation test increased in proportion to the length of incubated time.

2) The antibody titer of complement-fixation test incubated at 0°C. for 6 hours was nearly equal to that of precipitin ring test.

3) The antibody titer of complement-fixation test incubated at 37°C. is higher than that at 0°C. in cardiolipin antigen system, but in yeastmannan system at 0°C. it proves higher than that at 37°C.