

# Gelatin 加重層法に依る沈降反応輪保存の研究

## (抗原抗体稀釈法の研究 第3報)

岡山大学医学部衛生学教室 (主任 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

沈降反応に於ける重層法の反応輪は、普通の方法では、反応輪形成後、数時間で拡散消失する。

私は反応を適当な時期に、停止固定させ、反応輪を長時間反応停止の状態に保持する為次の様な方法で、大体目的を達した

即ち抗原及び抗体 medium に、2%の割に Gelatin を加えて重層法を行い、37°C にて反応を進行させ、一定時間後之を冷却して、medium をゲル状となす事により、反応を停止固定させた。

尚、古来特殊な重層法としては、Oudin<sup>1)</sup> が Solid immune serumagar mixture に、抗原を重層する方法を創始し、寒天層中に発現する band を、抗原の単一系及び複合系に付異同を指摘し、J. Munoz<sup>2)</sup> も之を追試して band の発現原理、性状を論じ、Kabat<sup>3)</sup> 等も同法によつて人の Albumin と Globulin の抗原分析を行っているが、Oudin の寒天層中の沈降反応は、通常重層法とは、反応条件、反応発現状態等、根本的に異つたものである。

### 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

使用抗血清は、抗酵母、抗人、抗牛、抗結晶卵白 Albumin 家兎血清である。

抗酵母血清は、フライシュマン乾燥酵母 (Sa. cerevisiae) の 0.5g を、生理的食塩水 5cc に懸濁し、100°C 5分間加熱後、1分間

軽く遠心した上清 3cc を、3日間隔で10回。

抗人血清及び抗牛血清は、人血清及び牛血清を夫々 0.5cc 3日間隔で10回、

抗結晶卵白 Albumin 血清は、1%卵白 Albumin 溶液を2日間隔で15回、

夫々成熟家兎耳静脈に注射し、最終注射日より10日後全採血、血清を分離した。

#### 第2項 抗原

1) 酵母多糖類は、フライシュマン乾燥酵母より、橋谷氏抽出法<sup>4)</sup> で Biuret 反応陰性、Molisch 反応強陽性の白色、水溶性粉末を得之を 0.85% 食塩水に溶解したものをを使用した

2) 人血清は、56°C 30分加熱非働化したものを、原液とし実験に供した。

3) 牛血清も、人血清と同様にして使用

4) 結晶卵白 Albumin は、鶏卵々白より脱水芒硝で3回結晶したものをを使用した。

#### 第3項 Gelatin加 抗原及び抗体稀釈液の調製。

予め必要濃度より2倍濃厚に、抗原或は抗体の2倍連続稀釈系列を作つて置く。

次に、食塩水 100cc に 4gr の Gelatin を、加熱に依り溶解濾過したものを、前記の抗原或は抗体稀釈系列に、等量混合し、所定濃度の稀釈列を作製した。

#### 第2節 実験方法

使用器具及び注入方法は、一般の重層法と全く同一であるが、反応液をゾル状態に保持する為、重層注入、反応等を、37°C 水槽中で行つた

沈降反応は、各反応系の抗原稀釈 (Uhlenhuth 氏法) 及び、結合帯<sup>5)</sup> に於ける抗体稀

釈に付実験し、何れも2倍連続稀釈法を用いた。

実験内容は次記の如く行つた。

- 1) 普通法と Gelatin 加法の比較  
(反応速度, 反応価, 反応状態)
- 2) Gelatin 加重層法の反応停止時期の決定。
- 3) Gelatin 加重層法に於いて, 防腐剤添加と, 不添加との比較。
- 4) Gelatin 加重層法の反応輪長期保存状態の観察。

### 第3章 実験成績

#### 第1節 Gelatin加重層法と普通法の比較

##### 第1項 反応速度及び反応価

各種抗血清を使用し, 37°C 水槽で, 抗原稀釈及び抗体稀釈法に依り, 比較した成績は第1表より第8表の如くであつた。

尚, 反応輪発現の時間別記録は, 教室の慣用法に依つた。

第1表 酵母多糖類系 抗原稀釈

抗体 (1:2)	抗原	1:20万	1:40万	1:80万	1:160万	1:320万	K
普通法		+++	+++	+++	++	-	-
Gelatin法		+++	+++	+++	++	-	-

第2表 酵母多糖類系 抗体稀釈

抗原 (1:50000)	抗体	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	K
普通法		+++	+++	+++	++	±	-	-
Gelatin法		+++	+++	+++	++	±	-	-

第3表 人血清系 抗原稀釈

抗体 (1:2)	抗原	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	K
普通法		+++	+++	++	+	-	-
Gelatin法		+++	+++	++	+	-	-

第4表 人血清系 抗体稀釈

抗原 (1:300)	抗体	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	K
普通法		+++	+++	+++	++	-	-
Gelatin法		+++	+++	+++	+	-	-

第5表 牛血清系 抗原稀釈

抗体 (1:2)	抗原	1:5000	1:10000	1:20000	1:40000	1:80000	K
普通法		+++	+++	+++	++	-	-
Gelatin法		+++	+++	+++	++	-	-

第6表 牛血清系 抗体稀釈

抗原 (1:2000)	抗体	1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	K
普通法		+++	+++	++	+	-	-
Gelatin法		+++	+++	++	+	-	-

第7表 卵白 Albumin 系 抗原稀釈

抗体 (1:2)	抗原	1:2000	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	K
	普通法		+++	+++	++	+	+	-
Gelatin法		+++	+++	++	+	+	±	-

第8表 卵白 Albumin 系 抗体稀釈

抗原 (1:200)	抗体	1:25	1:50	1:100	1:200	1:400	1:800	K
	普通法		+++	+++	++	+	+	-
Gelatin法		+++	+++	++	+	+	-	-

## 第2項 反応状態

第1～第3図の如く、普通法と Gelatin 法を、各反応系の抗原稀釈及び抗体稀釈につき、37°C 2時間反応後の状態を比較すると次の如くであつた。

即ち、反応輪形成後、拡散による輪環の不明確化は、普通法に著しく、Gelatin 法の反応輪は総て明確であつた。

以上の如く、Gelatin 法は普通法に比べ、反応出現速度は少々劣るが、反応価、反応状態に、毫も遜色を認めなかつた。

第2節 Gelatin加重層法に於ける  
反応停止時期の決定

Gelatin 加重層法の反応固定時期の決定を、次の様な方法で施行した。

各種反応系の抗原稀釈及び抗体稀釈につき、各時間別に固定し、反応価、反応状態に重点を置き比較し、夫々を氷室に一昼夜保存したものを観察した。

同時に 37°C で普通法も行い、比較した。

## 1) 酵母多糖類系、抗原稀釈

1時間、2時間及び6時間反応を進行させた後、固定した成績は第1図の如くである。

即ち1時間では輪環は明確であるが、反応不充分的嫌いあり、6時間では拡散著しく、2

時間が良好である。

## 2) 酵母多糖類系、抗体稀釈

2時間、4時間及び6時間後固定した成績は第2図の如く、2時間後固定したものが良好と思われ、一昼夜氷室に保存した抗原及び抗体稀釈列共、固定時の状態を完全に保持し反応価の上昇も認めなかつた。

3) 牛血清系抗体稀釈、第3図についても、酵母系と同様な事が認められ、其の他の抗血清による実験にも、2時間反応後、固定したものが最良であつた。

## 第3節 マーゾニン添加の Gelatin加重層法に及ぼす影響

反応輪を長期間保存するには、腐敗による変化を考慮に入れる必要があるので、Gelatin 加重層法に於いて、抗原、抗体メチウムに、1万倍の割にマーゾニンを添加した反応系列と、不添加反応系列とを、反応速度、反応価、反応状態及び、長期保存に於ける影響を、抗牛血清、抗酵母血清により検討した。

## 1) 反応速度、反応価

抗牛血清に依る成績は、第9表及び第10表の如く、マーゾニンの影響なく、之を抗酵母血清で、同様にして比較したが差異を認めなかつた。

第9表 牛血清系 抗原稀釈

抗体 (1:2)	抗原	1:4000	1:8000	1:16000	1:32000	1:64000	K
	マーゾニン添加		+++	+++	++	+	-
不添加		+++	+++	++	+	-	-

第10表 牛血清系 抗体稀釈

抗原 (1:2000) \ 抗体	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	K
マーズニン添加	卅	卅	+	-	-	-
不添加	卅	卅	+	-	-	-

2) 反応状態, 長期保存に於ける影響  
牛血清系, 酵母多糖類系に付, マーズニン添加及び不添加反応系列を比較したが, 総て反応状態に差なく, 固定後, 0°C 氷室に1ヶ月間保存したが, 両者に異同を認めず, マーズニン不添加系列に於いても, 濁濁, 其の他の変化も現れず, 反応輪は初期の状態に保持された。

長期保存に際し, 0°C に置けば, 防腐剤添加の必要はない様であるが, 以下の実験には凡て, 一万倍の割にマーズニンを加えた。

**第4節 Gelatin加重層法に依る反応輪固定後, 長期保存状態の観察**

各種抗血清の抗原稀釈及び結合帯に於ける抗体稀釈(2倍連続稀釈)につき, 37°C 水槽で2時間反応後, 冷却固定し, 0°C 氷室に保存して, その変化を観察した。

**第1項 酵母多糖類系**

抗酵母血清の, 普通法による Uhlenhuth 氏法及び緒方氏抗体稀釈法<sup>6)</sup>の成績は, 第11表の如くであつた。

第 11 表

抗体	抗原	成績		
		U 氏 価	緒 方 氏 法	
抗酵母血清	酵母多糖類		1:1280000	結合帯
		1:40000		1:32

1) 抗原稀釈

第4図の如く, 1ヶ月間氷室に保存観察したが, 反応輪は固定時の状態を保持し, 反応価の上昇或は減少も認めなかつた。

2) 抗体稀釈

第5図の如く, 抗原稀釈同様, 反応輪は無変化のまま, 1ヶ月間保存出来た。

**第2項 牛血清系**

使用抗牛血清の Uhlenhuth 氏法及び緒方

氏抗体稀釈法の成績は, 第12表の如くであつた。

第 12 表

抗体	抗原	成績		
		U 氏 価	緒 方 氏 法	
抗牛血清	牛血清		1:32000	結合帯
		1:2000		1:64

1) 抗原稀釈

第6図の如く, 固定後数日間著変なく, 1週後, No. 1, No. 2 試験管の反応輪上に, 巾0.5mm の極めてうすい青色の曇りを生じ, 之は1ヶ月後に新反応輪となり, 二重輪を形成した外, 初期の反応状態を1ヶ月後にも保持したが, 反応価は1本上昇した。

2) 抗体稀釈

第7図の如く, 反応停止後, 1ヶ月間殆ど変化なく反応輪を保持した。

**第3項 人血清系**

使用抗人血清の, Uhlenhuth 氏法及び緒方氏抗体稀釈法の成績は, 第13表の如くであつた。

第 13 表

抗体	抗原	成績		
		U 氏 価	緒 方 氏 法	
抗人血清	人血清		1:32000	結合帯
		1:300		1:40

1) 抗原稀釈

反応停止時と, 1ヶ月後との間に, 著変は見られないが, 保存3週頃より, No. 1及びNo. 2の二重輪は, 明確となつて来た。(第8図参照)

2) 抗体稀釈

第9図の如く, No. 1に1ヶ月後, 二重輪

形成の傾向を認め、1本反応価の上昇が見られた。

#### 第4項 卵白アルブミン系

使用抗体のU氏価、及び緒方氏抗体稀釈法の成績は、第14表の如くであつた。

第14表

抗体	抗原	成績	
		U氏価	緒方氏法
抗ブ 卵ミ 白ン アル 血清	卵白 ミン アル ブ	1:35600	結合帯
			抗体価
			1:200
			1:320

#### 1) 抗原稀釈

固定反応輪には、第10図及び写真1の如く、1ヶ月後にも著変を見なかつたが、No. 2, No. 3の反応輪の上部に、青色の極めてうすい濁濁帯が、1ヶ月後出現した。

#### 2) 抗体稀釈

第11図及び写真2の如く、固定反応輪には、1ヶ月後にも著変を見ないが、No. 2の固定反応輪を狭んで、1週目頃より、青色の、極めてうすい濁濁帯が生じた。

### 第4章 総括並に考按

以上の実験より明かな様に、抗原及び抗体 medium に、2%に Gelatin を加えて沈降反応の重層法を 37°C の水槽で行えば、普通の重層法と変わりなく反応を起こさせる事が出来、之を冷却して medium を凝固させる事に依り反応輪を固定し、反応の進行を一応阻止する事が出来た。

固定した反応輪は、0°C 氷室に置けば、長期間反応停止時の状態に、保存する事が可能であつた。

又、37°C で施行した普通法に比べ、Gelatin 加重層法の反応速度が少々遅いのは、抗原及び抗体 medium の膠質状態の差により、分散相の拡散速度が遅い為と考えられる。

亦、Gelatin は抗原性を持たない蛋白質として知られ<sup>8)</sup>、各種反応系に、顧慮なく使用する事が出来ると推察する。

### 第5章 結 論

1) 抗原及び抗体 medium に、2%に Gelatin を含有させ施行した重層法は、37°C にて反応させた後、冷却する事に依り、反応を一応停止固定する事が出来る。

2) 本法は、37°C で行えば、普通の重層法と同様な反応輪を形成し、同温度で施行せる普通重層法に比し、反応速度は少々劣るが、反応価に差を見ない。

3) 本法の反応停止固定時期は、37°C 2時間後で、反応進行が充分且つ最良と思われる。

4) 本法で、1万倍にマーゾニンを加えたものと、不添加法の間、反応速度、反応価、反応状態に差を認めず、不添加法でも、0°C に1ヶ月保存後、腐敗度の諸変化を見ず。

5) 本法に依る固定反応輪は、0°C 氷室に保存すれば、抗原の特に濃厚部を除き、殆ど不変化のまま、長期間保存する事が可能である。

終りに臨み、終始御鞭撻、御指導並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。

尚併せて、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29年第64回岡山医学会総会に於いて発表した。

### 文 献

- 1) Oudin, J. · C. r. Acad. Sci., Par. 222, 115 (1946)
- 2) Munoz, J. a L. Becker J. Immunol. (A. m.) 65, No. 1 (1950)
- 3) Kabat, E. A. · Amer. J. med. 4, 653 (1948)
- 4) 橋谷 · 酵母学. 103, 昭 24.

- 5) 広田: 岡山医学会雑誌. 50年, 1号.
- 6) 緒方益雄: 日本衛生学, 微生物学, 寄生虫病学聯合学会, 第1回総会講演. 昭和2.
- 7) 飛岡: 岡山医学会第59回総会講演 (岡, 医, 誌 61年, 5号, 152, 昭 24)

Department of Hygiene, Okayama University Medical School.

(Director : Prof. Dr. M. Ogata)

## Studies on the Method for Preservation of Reaction's Ring in Precipitin Ring Test.

By

Kuniya Inoue.

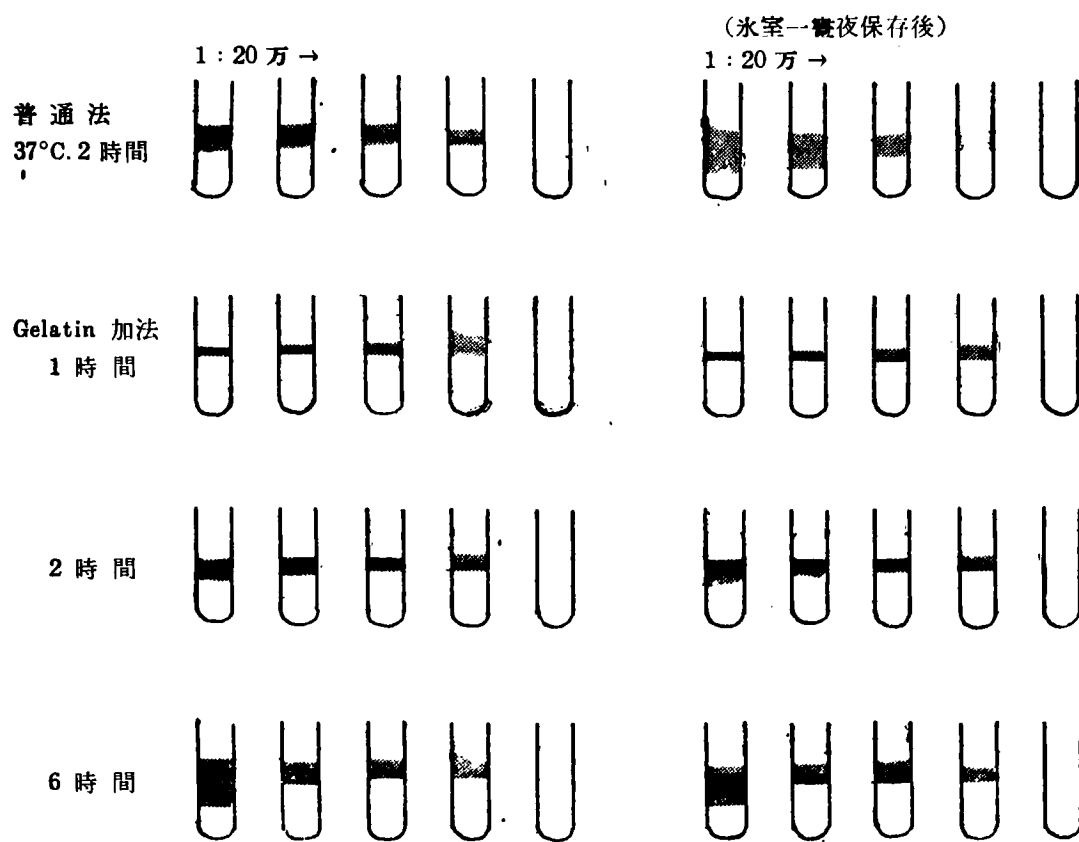
The author carried out precipitin ring test by adding 2% gelatin to its medium.

The results were as follows :

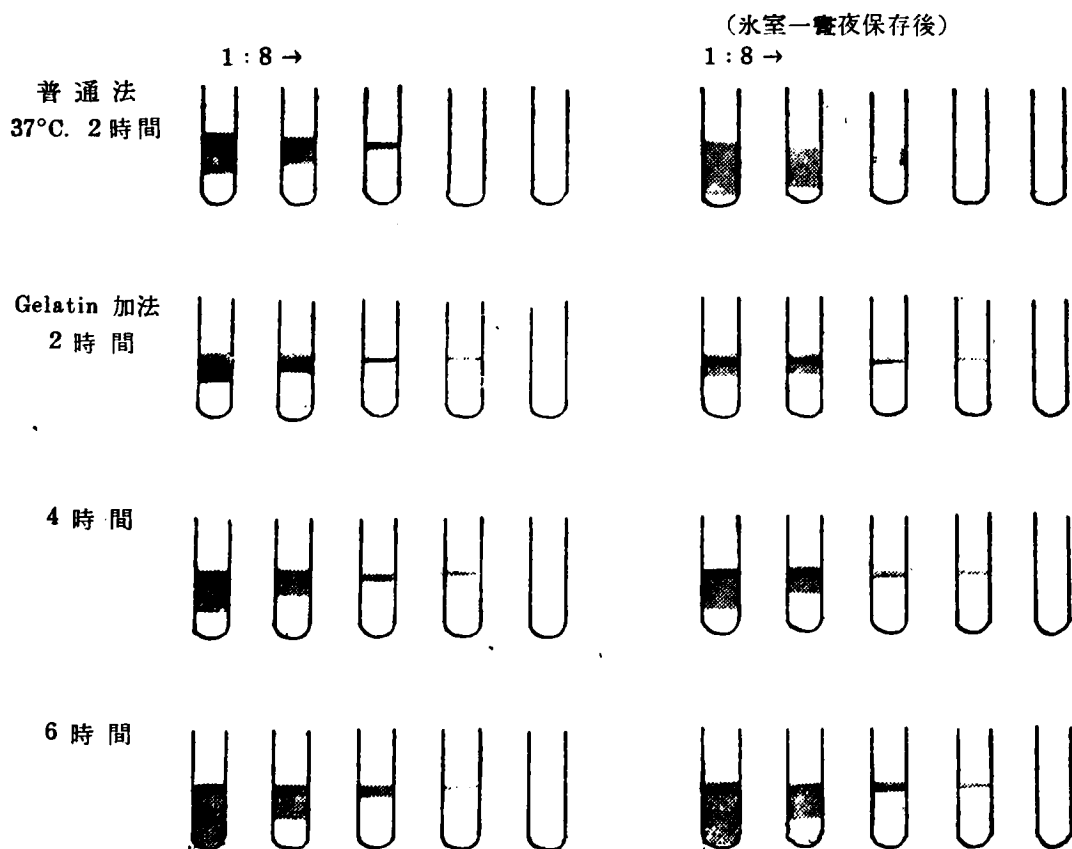
- 1) The ring test reacted in 2% gelatin solution at 37°C. was able to be stopped and kept as it is by cooling (0°C.)
  - 2) The reaction ring was able to be preserved by upper method for a month at 0°C, except extremely dense part.
  - 3) The velocity of reaction in this method shows slower than that of general method at 37°C, but reaction titer is equal to that of usual method.
-

井上論文附図

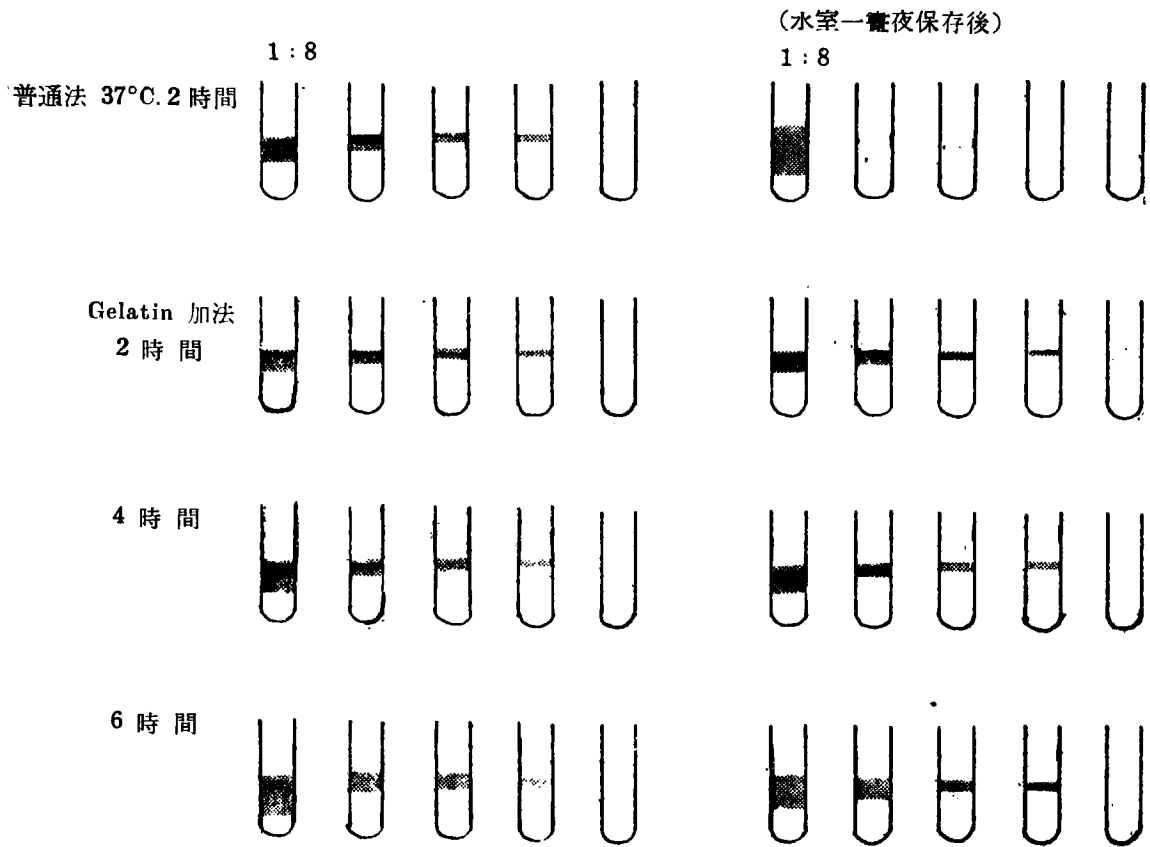
第1図 酵母多糖類系 抗原稀釈



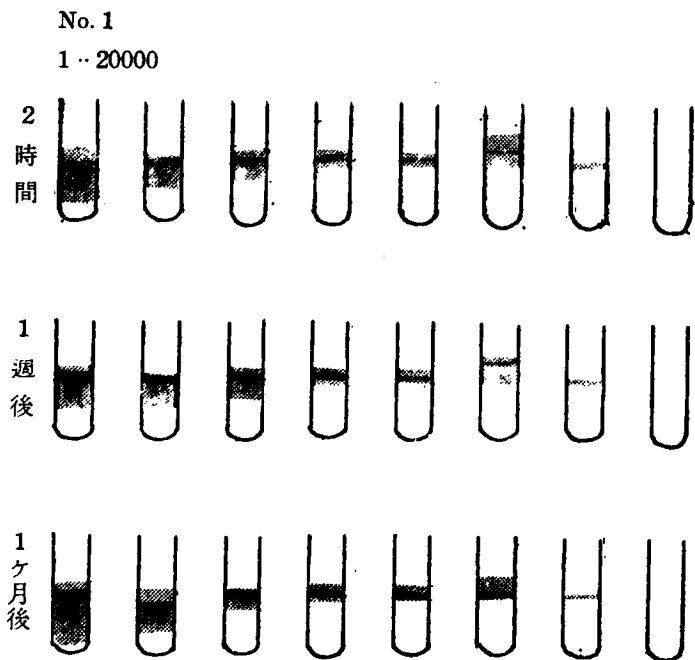
第2図 酵母多糖類系 抗体稀釈



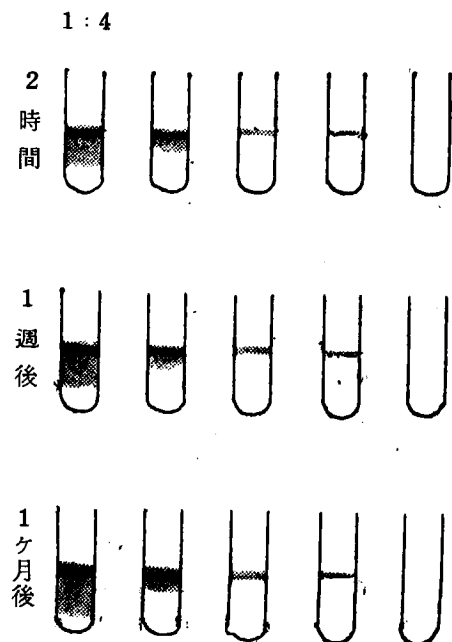
第3図 牛血清系 抗体稀釈



第4図 酵母多糖類系 抗原稀釈

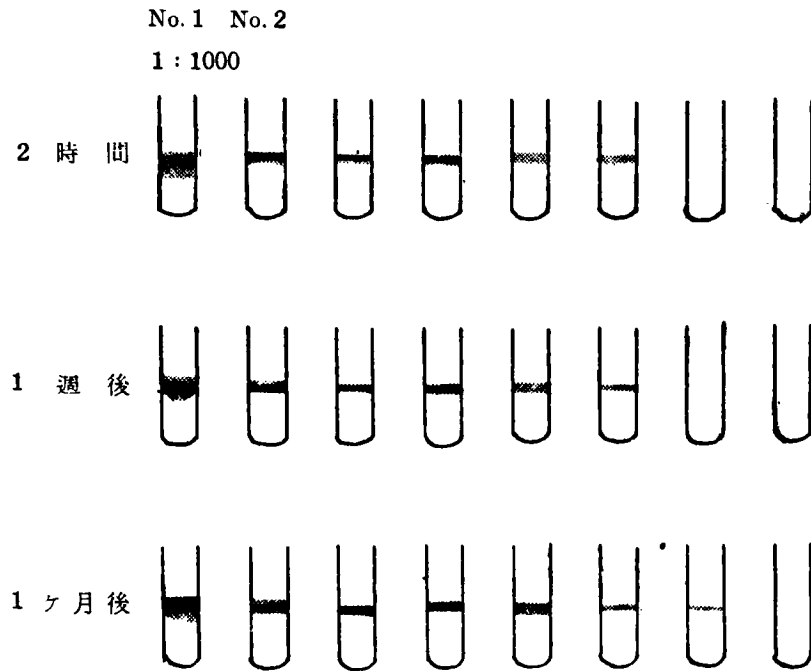


第5図 酵母多糖類系 抗体稀釈

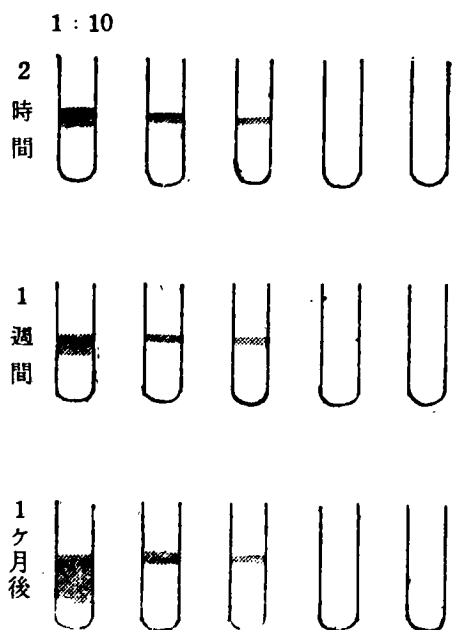




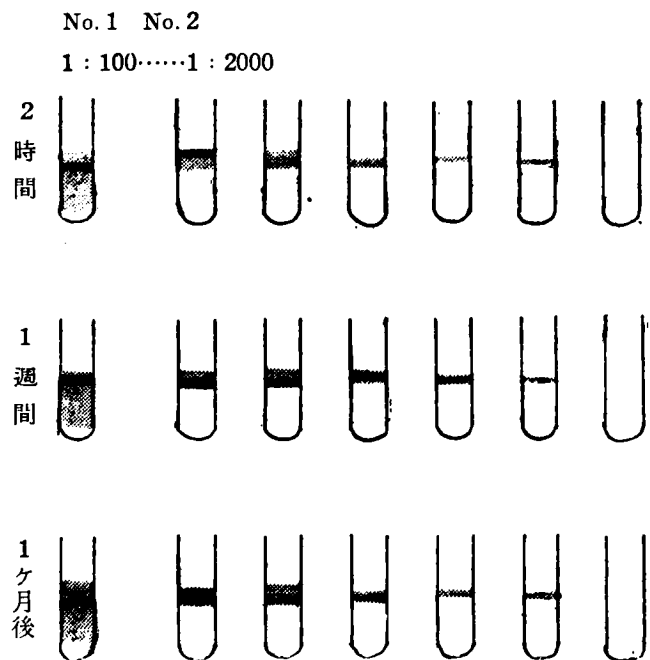
第6図 牛血清系 抗原稀釈



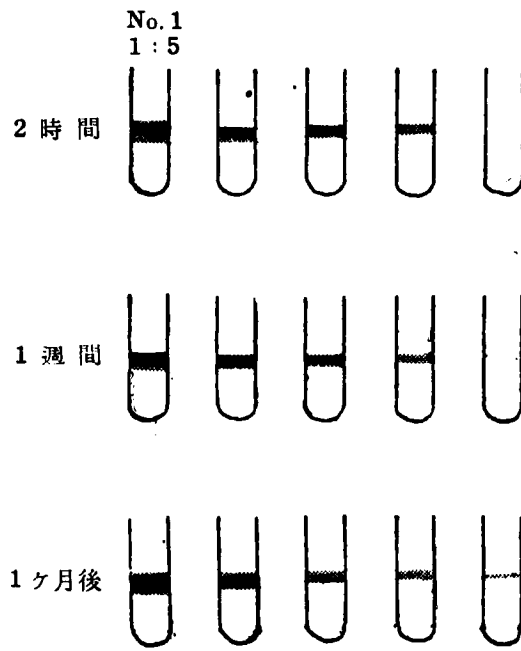
第7図 牛血清系 抗体稀釈



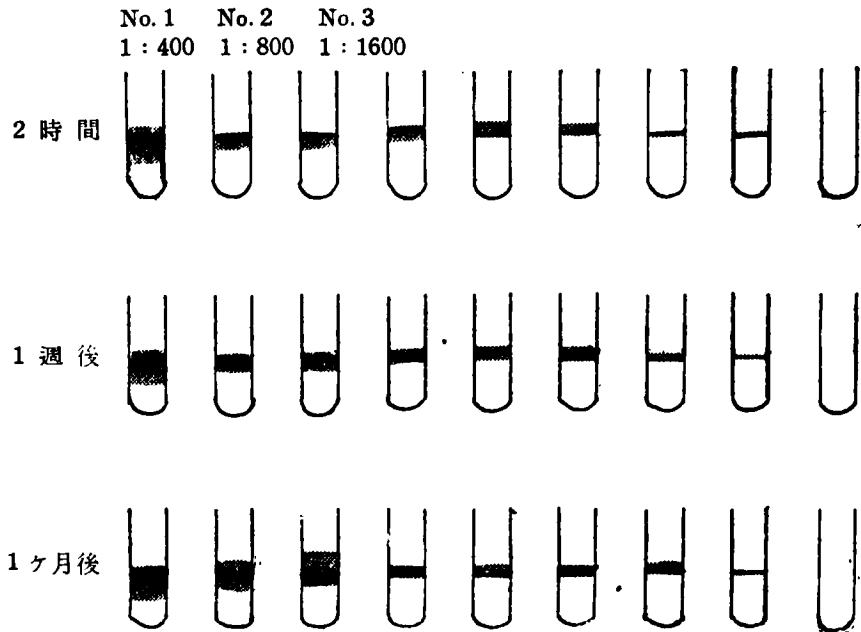
第8図 人血清系 抗原稀釈



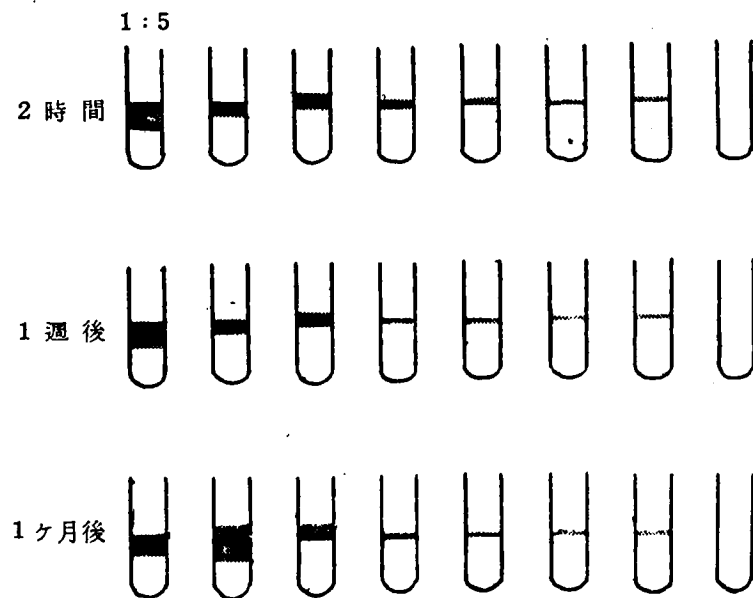
第9図  
人血清系  
抗体稀釈



第10図  
卵白 Albumin 系  
抗原稀釈



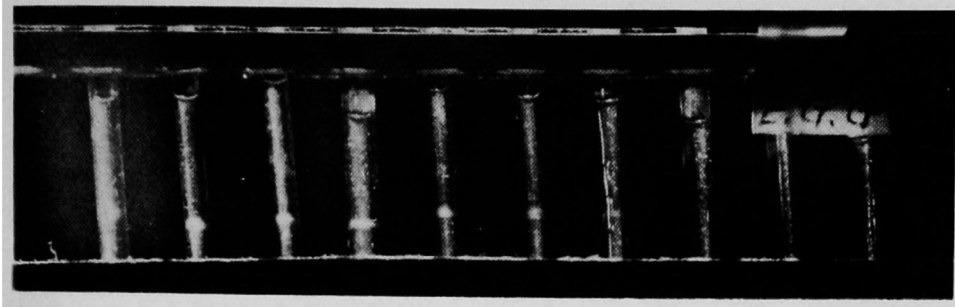
第11図  
卵白 Albumin 系  
抗体稀釈



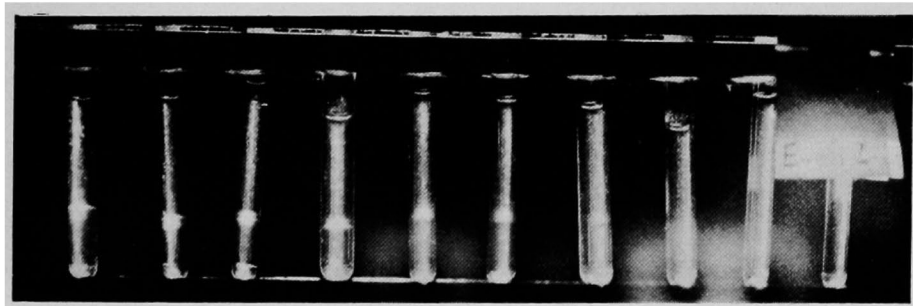
井上論文附図

写真1. 卵白 Albumin 系 抗原稀釈

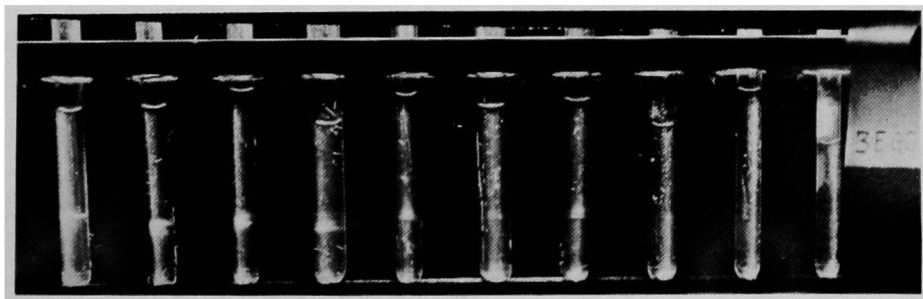
2時間後



1週後



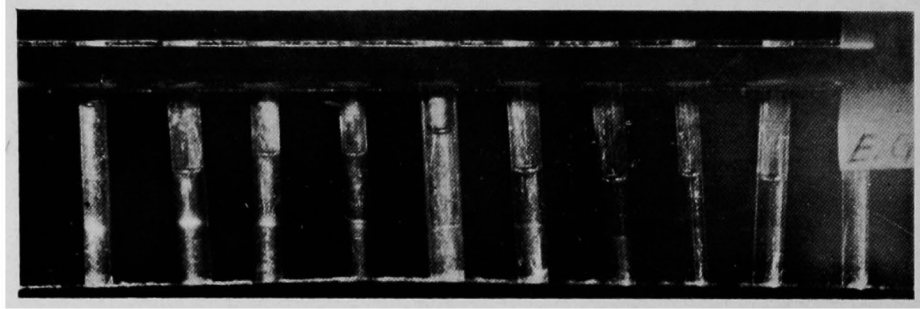
1ヶ月後



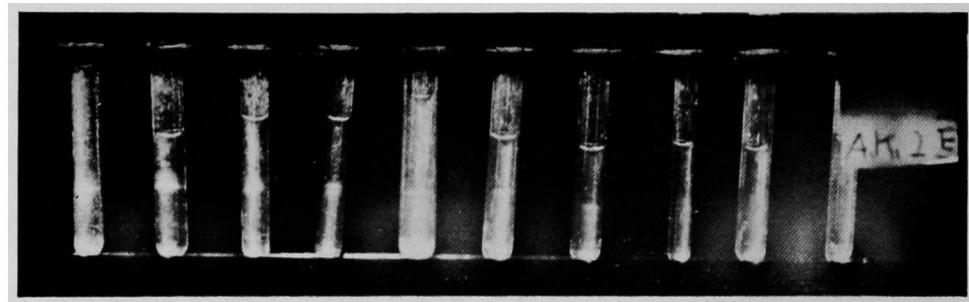
井上論文附図

写真2. 卵白 Albumin 系 抗体稀釈

2時間後



1週後



1ヶ月後

