

寒天層中における補体結合反応の研究 (I)

板 倉 益 夫

北海道大学結核研究所細菌部 (主任 大原達教授)

受付 昭和 35 年 10 月 28 日

緒 言

Oudin^{1)~7)} によつてその基礎を確立された寒天層内沈降反応は、その後血清学の分野において活発に利用されるとともに、術式に関してもいろいろな改良法ないし変法が考案、発表されている^{8)~9)}。この方法によれば単に反応の陰陽のみならず反応に関与する抗原抗体系の数までも同時に観察しうるので、あたかも化学における chromatographyのごとく、現在この方法は血清学的な諸研究において欠くことのできない手段となりつつある。

一方、血清学の分野においてこれまで非常に重要な役割を演じてきた反応に補体結合反応がある。この反応に関与する諸因子には量的に厳密な相互関係が保たなければならないが、したがつてその手技はかなり煩雑であるが、それにもかかわらず補体結合反応が好んで用いられるゆえんはその感度の鋭敏さにある。したがつて、このように従来重視されてきた補体結合反応と、最近新しく発展してきた寒天層内沈降反応とを結びつけて、前者の反応を Oudin の方法によつて寒天層中で観察することはなほだ興味ある問題といわなければならない。このさい、用いられる reagent の量的関係はある程度簡易化される可能性があり、かつまた種々な程度に起る部分溶血を溶血帯の長さという形において直接肉眼的にみうるという利点がある。しかも従来の方法と異なり部分溶血を読むために一定時間後に反応を打ち切つて photometer にかける必要がないため、溶血の時間的な進行、換言すれば反応の時間的推移を観察することができる。しかしその反面、鋭敏度という点になると寒天層内の補体結合反応にはある程度の疑問がある。通常の試験管内沈降反応と agar diffusion によるそれとを比較した Schiott²⁾, Grabar²¹⁾ らは鋭敏さにおいて両者の間に差はないと述べているが、補体結合反応の場合、完全溶血を指標とする在来の方法との比較はともかく、最近の 50% 溶血単位法に較べれば寒天層内の反応は鋭敏度において遠く及ばないものと考えられる。しかしながら元來 agar diffusion 法をわれわれが用いる目的は血清力価の測定にあるのではなく、反応系の数の解析ないしは 2 つ以上の抗原の homogeneity または heterogeneity の検索にあるのであるから、目的を異にするものについてそ

の優劣を論ずるのは愚かなことというべきであろう。

さて著者は、寒天層内において補体結合反応を実施せんとするに先立ち、反応の indicator となるべき溶血反応について基礎的な研究を行つてみた。実際に反応を行うに当つては、溶血素と血球を寒天層におき補体液を重層する場合と、逆に補体と血球を寒天層におき、溶血素を重層する場合とか考えられ、また上下両層とも寒天層として重ねる方法や、血球を下層だけでなく上層にも加える方法など、いろいろな術式が考えられる。さらに本試験の場合には抗原、抗体、補体、溶血素、血球の各 reagent を上下両層に分ける組合せは幾通りもある。これらの各 reagent が互いに結合する場合、血清学的な法則に従うのはもちろんであるが、同時にまた、反応の現われ方は拡散の基本公式にも従わなければならない。したがつて溶血反応においても、溶血素、血球、補体の 3 者間にみられる量的な相互関係が溶血帯の現われ方にどのように影響してくるか、またそれが時間的にどのように推移してゆくかを知らなければ正しい補体結合反応は行われぬ。本実験はこのような基礎知識を得るために行われたものである。

実験材料および実験方法

寒天：良質の寒天を溶解して 1.5% の濃度とし、これに 1% の割合に NaCl を加えたのち NaOH で pH を 7.0 付近に修正する。この寒天を冷めないうちに、4,000 回転 15 分間遠心沈澱し、夾雑物を含む不透明な沈澱部を棄てて透明な上清部のみを使用した。

溶血系：羊赤血球とこれをもつて家兎を免疫した溶血素血清を使用する。羊血球は等量の Alsever 液を加えて氷室に保存すれば相当長時間保存できるが、古くなつた血球は溶血しやすくなるので 1 週間以上経つたものは使用しなかつた。血球浮游液は用に臨んで食塩水で何回も洗い、上清に色が着かなくなつてから最後に遠心沈澱した血球を 1.5% の浮游液にして用いた。溶血素血清は型のごとく 56°C、30 分間加温して非働性にしてから使用した。

補体：健康海獺数頭から採取した血清をよく混ぜ合わせ、羊血球で寒冷飽和したのち実験に供した。

試験管：口径約 3 mm、長さ約 6 cm のなるべく均一なものを選び、クローム硫酸につけたのち流水および

蒸留水で完全に洗滌し、乾燥後これに 1 % 寒天で薄い coating を施して用いた。coating を施さないと、場合によつては、寒天層と管壁との間に間隙ができ、上層した抗原が漏出することがあるのでこれを防ぐために行われたものである。

反応実施：寒天を加熱溶解してほぼ 50°C まで冷えたとき同温度に温めた 1.5 % の血球浮游液および溶血素（または補体）をそれぞれ等量混合し、小試験管に 5 ~ 10 % の高さまで capillary pipette で分注する。寒天が固まつてから補体（または溶血素）を重ねて 37°C の孵卵器に納め、一定時間ごとにとり出して溶血帯の長さ（溶血した部分の下縁から寒天と上層液の境界面までの距離）を mm の単位で測定した。著者は補体を寒天層内におく場合と溶血素を寒天層に入れる場合と両方行つてみたが、後者の場合は溶血素を血球浮游液に等量加えてから室温に 2 時間以上放置し、十分感作せしめてから寒天に混ぜた。以上の操作により寒天、溶血素、補体、血球の各因子は寒天に混合後いずれも 3 倍に稀釈されたことになるが、本論文に記載した濃度はすべて混合する前のものである。なお実験には同じ組合せのものを 3 本宛作り、測定にはその平均値をとつた。観察時間が長くなる場合には一般に防腐剤が使用されているが、防腐剤は血球の抵抗を弱めるのでこの実験においては使用せず、全操作を無菌的に行つた。

実験成績

1. 血球浮游液および溶血素の濃度と溶血帯の長さとの関係——とくに血球濃度の検討

本反応に用いる血球濃度および溶血素の至適濃度を検討するため、寒天層に 5 倍稀釈の補体と 10 %、5 %、2.5 % および 1.25 % の 4 段階に稀釈した血球浮游液をおき、その上に種々なる稀釈の溶血素を重ねて、生ずる溶血帯の長さを観察した。

表 1 の成績はその 1 例を示すものである。表のごとき組合せにおいて、溶血帯の長さは溶血素濃度が同一ならば赤血球の濃度に反比例し、同一濃度の血球に対しては溶血素濃度に比例する。血球濃度についてみれば、濃度のうすいものほど溶血帯が長く現われて測定に便利なように思われるが、あまり血球濃度がうすいと溶血帯がみにくし、下縁が乱れて測定が困難になつてくる。別に行つた実験（表省略）でも血球濃度が 1 % 以下になると溶血帯の下縁はぼやけてしまい成績が不揃であつた。

かくのごとく、一方において血球濃度はうすいほど溶血帯が長くなつて測定に好都合であるが、あまりうすすぎると測定誤差が大きくなる。したがつてその中間に適当な濃度を決めなければならない。われわれの経験によれば 1.5 % の血球浮游液までは鮮明な溶血帯が観察さ

表 1 血球浮游液および溶血素の濃度と溶血帯の長さとの関係

時間	溶血素稀釈		5n					
	血球	n = 1	2	3	4	5	6	
1 時間	10 %	0.4	0.1	0	0	0	0	
	5	0.8	0.3	0	0	0	0	
	2.5	1.1	0.4	0	0	0	0	
	1.25	1.3	0.5	0.3	0	0	0	
3 時間	10 %	1.1	0.2	0	0	0	0	
	5	1.4	0.7	0	0	0	0	
	2.5	1.7	0.9	0.4	0	0	0	
	1.25	1.9	1.1	0.6	0	0	0	
5 時間	10 %	1.7	0.5	0	0	0	0	
	5	2.1	0.9	0.1	0	0	0	
	2.5	2.4	1.3	0.6	0.2	0	0	
	1.25	2.8	1.6	1.0	0.5	0.1	0	
24 時間	10 %	3.8	1.2	0	0	0	0	
	5	4.6	1.8	0.2	0	0	0	
	2.5	5.0	2.8	1.0	0.5	0	0	
	1.25	5.3	3.3	1.4	0.9	0.4	0	

れたから、溶血帯の長さをできるだけ長くししかもこれを鮮明に判読しうる濃度として、以下この実験においては 1.5 % の血球を使用した。

2. 溶血素および補体の濃度と溶血帯の長さとの関係——とくに溶血素濃度の検討

前実験においてまず赤血球の濃度は 1.5 % が最適であることを知つたので、次にいろいろな濃度の溶血素を含有する赤血球・溶血素寒天層を作り、その上に種々なる稀釈の補体を重ねて現われる溶血帯の長さを観察した。表 2 の成績はその 1 例を示したもので、これによつて補体と溶血素の各濃度の間には一定の関係のあることが判る。すなわち溶血帯の長さは補体濃度の一定な系列にあつては溶血素濃度の濃いものほど長く、溶血素濃度の等しい系列にあつては、補体濃度の濃いものほど長く現われている。これらの関係は後に述べるごとくほぼ拡散の公式に従うもので、大体直線をもつて結びうる関係にあるが、細部に関してはこれから外れる部分もあつた。表 2 は溶血素を 5¹ 倍から 5⁶ 倍まで稀釈したものであるが、溶血素の濃いものでは補体濃度のきわめてうすい部分まで溶血を起している。この点、溶血素は濃い方がよいように思われるが、5¹ 倍および 5² 倍稀釈までの溶血素は血球を強く凝集せしめるため、混合するさい上手に行わないと成績が揃わない。また凝集のため 0.1 mm まで正確に測定することは困難である。5³ 倍稀釈になるとこれを血球に加えたさい多少の凝集がみられないこともないが、寒天に加えてよく混和することにより、寒天が固まつたのちには肉眼的に認めうるような

凝集はほとんどなくなる。少なくともこの場合、顕微鏡的な凝集はあるにしても実験に支障をきたす程度のものはない。5⁴倍よりうすい稀釈では凝集を起さない代りに高濃度の補体を用いないと溶血がみられなくなる。

表3は同じ実験を稀釈倍数を変えて繰返したもので、上述の成績から溶血素の適当な濃度が5³~5⁴倍付近にあることを知つたので、400倍までを表2より細かく刻んでみた。さらに、赤血球と溶血素を混ぜた場合における血球凝集を、寒天混和前と混和后寒天層内にみられる

表2 溶血素および補体濃度と溶血帯の長さとの関係

時間	溶血素	補体稀釈					
		2 ⁿ n=1	2	3	4	5	6
3時	5n n=1	1.4	1.2	0.8	0.5	0.2	0
	2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.1	0
	3	0.8	0.5	0.3	0.2	0	0
	4	0.6	0.4	0.2	0.1	0	0
	5	0.5	0.3	0.1	0	0	0
	6	0.4	0.2	0	0	0	0
6時	1	2.0	1.6	1.3	0.7	0.4	0.1
	2	1.4	1.2	0.8	0.5	0.3	0
	3	1.1	0.7	0.5	0.4	0.1	0
	4	1.0	0.6	0.4	0.3	0	0
	5	0.9	0.5	0.2	0	0	0
	6	0.5	0.3	0.1	0	0	0
9時	1	2.3	1.8	1.4	0.8	0.5	0.2
	2	1.6	1.3	0.9	0.6	0.4	0.1
	3	1.4	0.9	0.6	0.5	0.2	0
	4	1.2	0.8	0.5	0.4	0.15	0
	5	1.0	0.6	0.3	0.2	0.1	0
	6	0.6	0.4	0.1	0	0	0
24時	1	3.8	3.2	2.5	1.8	1.2	0.7
	2	2.8	2.1	1.6	1.2	0.8	0.4
	3	2.6	1.9	1.4	0.9	0.4	0.1
	4	2.4	1.8	1.2	0.6	0.3	0
	5	2.2	1.4	0.6	0.2	0.1	0
	6	1.2	0.5	0.2	0	0	0

表3 溶血素濃度、補体濃度と溶血帯の長さおよび血球の凝集との関係

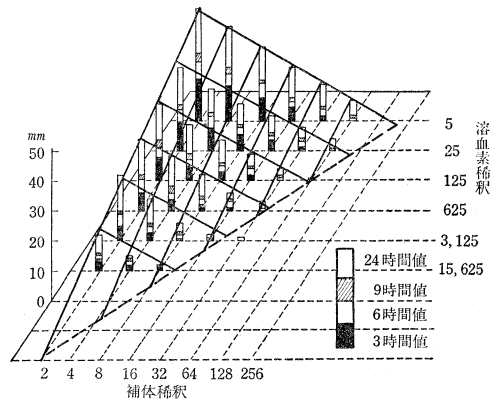
溶血素稀釈	補体稀釈倍数							血球の凝集	
	3	6	12	24	48	96	192	寒天混和前	寒天内
30倍	*	*	*	*	*	+	-	(#)	(#)
50倍	1.5	1.2	1.0	0.5	0.2	+	-	(#)	(+)
70倍	1.5	1.2	0.9	0.4	0.1	-	-	(#)	(+)
100倍	1.5	1.1	0.8	0.2	+	-	-	(+)	(-)
200倍	1.4	1.1	0.7	+	-	-	-	(+)	(-)
400倍	1.4	1.0	0.6	+	-	-	-	(+)	(-)

* 測定せず + : <0.1

るとはつきり差がでてくる。

表において血球凝集の強く起る30倍稀釈の溶血素は全く使用に耐えない。寒天層内の凝集が(+)のもの、すなわち50倍、70倍稀釈の溶血素は使用できないことはないが成績が不確実となるので避けた方がよく、したがって寒天内凝集が肉眼的に(-)となる100倍稀釈以下のものを用いるべきである。表2, 3を通覧して、血球凝集が起らずしかも補体のうすい濃度まで溶血帯の観察し得られる溶血素濃度を求めれば、大体100倍稀釈が適当ということになる。

図1 溶血素・補体濃度と溶血帯の現われ方との関係



次に表2から溶血素濃度および補体濃度と溶血帯の長さとの関係を図示してみると図1が得られる。図から明らかなごとく、溶血素および補体濃度の非常にうすい部分を除けば3者の関係はきわめて美事な直線関係をもつて表わされる。溶血帯出現に対する補体および溶血素の量的ならびに時間的相互関係は図の三角錐をもつて表わすことができ、溶血反応陽性の「場」はその底面である三角形をもつて示される。

一般に血清反応においては反応の出現に対し抗原抗体の最適比を考慮しなければならないが、この実験の場合

凝集の強さとに分けて表の右欄に記入した。表において全く凝集のないものを(-)、凝集はあるが弱いもの(寒天内では溶血帯の測定にほとんど支障のないもの)を(+), やや強いものを(#+), 凝集高度のものを(##)とした。30倍稀釈の溶血素については凝集が強かったため、正確を欠くものとして、溶血は認めたが長さを記入しなかった。表のごとく溶血素の稀釈が30倍、50倍、70倍というごとく濃度にあまり差がないものについては、高濃度の補体に対して溶血帯の現われ方にほとんど差がでない。すなわちこの場合、計測値の差は0.1mm以下であることが多い。しかし補体濃度がうすくな

はとくにそれを考慮する 必要はない。なんとすれば補体, 溶血素のあらゆる濃度の組合せにおいて図 1 のごとき美事な直線関係が成立する以上, 理論的にはどのような濃度比をとつてもよい訳である。したがって表 2, 3 から観察した理由によつて, 以後の実験には 100 倍稀釈の溶血素を用いることに定めた。

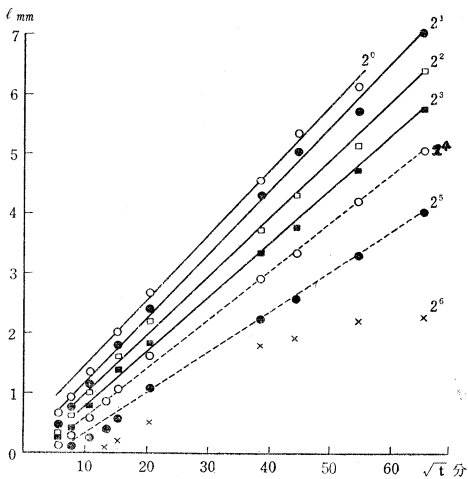
3. 溶血帯の現われ方に対する時間的影響——とくに補体濃度の検討

上記の実験から溶血素は 100 倍稀釈, 赤血球は 1.5% 浮游液を用い, これを寒天層においていろいろな稀釈の補体を重層し, 現われる溶血帯の長さを時間を追つて観

表 4 溶血帯の現われ方に対する時間的影響

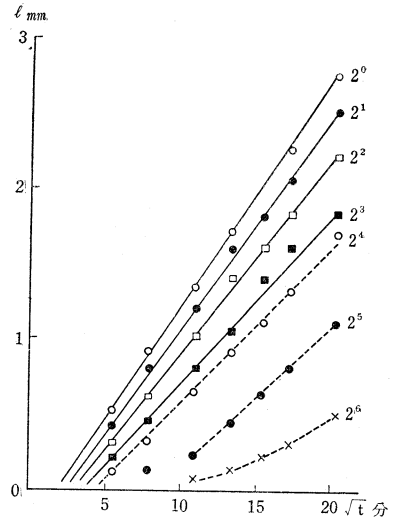
測定時間	補体稀釈						
	2^n n=0	1	2	3	4	5	6
30 分	0.5	0.4	0.3	0.2	0.1	0	0
1 時間	0.9	0.8	0.6	0.4	0.3	0.1	0
2 時間	1.3	1.2	1.0	0.8	0.6	0.2	0.05
3 時間	1.7	1.6	1.4	1.0	0.9	0.4	0.1
4 時間	2.0	1.8	1.6	1.4	1.1	0.6	0.2
5 時間	2.2	2.0	1.8	1.6	1.3	0.8	0.3
7 時間	2.7	2.5	2.2	1.8	1.6	1.1	0.5
25 時間	4.5	4.3	3.7	3.3	2.9	2.2	1.8
30 時間	5.3	5.0	4.3	3.7	3.3	2.5	1.9
50 時間	6.0	5.7	5.1	4.7	4.2	3.3	2.2
73 時間		7.0	6.4	5.7	5.0	4.0	2.5

図 2 溶血帯の長さ と 反応時間 と の 関係 (1)



察した。表 4 は 2^0 倍から 2^6 倍までの補体を重層して, 30 分後より 73 時間後までの測定値を記録したものである。この表から溶血帯の長さ と 反応時間 と の 関係 を 図 示 して みる と 図 2, 3 の ごと く なる。図において縦軸には溶血帯の長さ 1 mm, 横軸には時間の平方根 \sqrt{t} 分をとつた。図 2 は煩雑を避けるため反応初期

図 3 溶血帯の長さ と 反応時間 と の 関係 (2)



の計測値を一部省略して 73 時間目までの値を plot したものであるが, 全体としてみると溶血帯の長さは反応時間とほぼ直線関係にあることが判る。この場合補体濃度が濃いものは大体直線とみなして差支えないが, 濃度がうすくなるにつれて ($2^4 \sim 2^6$) 次第に S 字型に近い曲線になつてくる。図 3 は反応初期の値をより詳細に観察するため, 反応時間 30 分から 7 時間までの間の測定値を詳しく描いたもので, この図においては 2^6 倍稀釈の補体を除き他はすべてよく直線をなしている。両図からみて反応初期のもの と 後期 の も の では 溶 血 帯 の 移 動 に 差 が ある よう に み う け ら れ る。す な わ ち 反 応 初 期 に お い て は 大 体 拡 散 の 基 本 公 式 に 従 う が, 時 間 の 経 過 と と も に 少 し ず つ 測 定 値 が 理 論 値 より ず れ て くる よう である。しかしながら全体的にみて 2^5 倍稀釈の補体までは直線的な移動を示すとみて差支えなからう。図 4 は縦軸に溶血帯の長さ 1 mm, 横軸に補体濃度の対数 $-\log_2 C$

図 4 補体濃度 と 溶血帯の長さ と の 関係 (1)

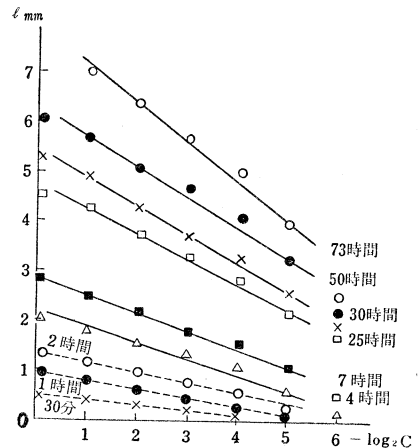
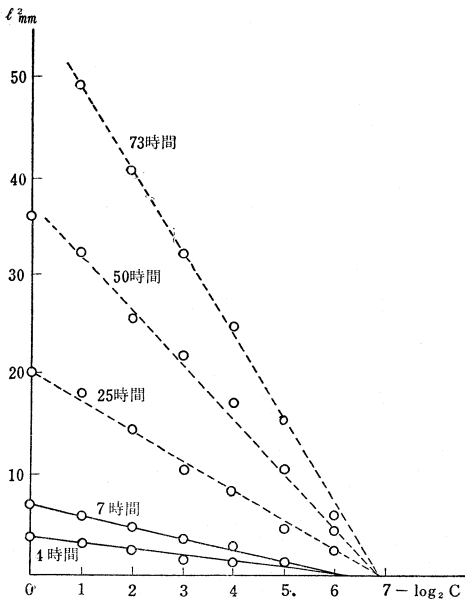


図5 補体濃度と溶血帯の長さとの関係(2)



C をとつて溶血帯の長さ と 補体濃度 との 関係 を 調べた もの で ある。図 の ご と く 両 者 の 間 に は 直 線 関 係 の あ る こ と が よ く 判 る。

以上のことから本試験に使用する補体の至適濃度を求めるには、補体濃度の対数と溶血帯の長さとの比例することから理論的にはいずれの濃度を用いてもよい訳である。表3の成績からみれば、溶血素が濃い場合、補体濃度はある程度うすい方が溶血帯の長さには差が現われ反応の強弱を判断するのに適当と考えられるが、一方溶血帯はある程度の長さがなければ測定が困難であり誤差も大きくなる。この意味において溶血帯は1.5mm以上の長さに達することが望ましい。また測定時間も1日のうちに実験結果をみるためには5~7時間が限度である。ゆえに測定に便利なよう、反応実施後5~7時間で1.5mm以上の溶血を起すような補体濃度を選ばばよい。この場合2³倍~2⁴倍稀釈の補体がこの条件に適う。ただし本試験のさいは抗原と抗体がこれに加わるため、ここに得た値より3倍濃い補体を用いた。

考 察

結核の補体結合反応を寒天層内において観察せんとするに当り、著者はまず寒天内における溶血反応の起り方を本報において検討した。この場合、いうまでもなく溶血反応の結果は溶血帯の長さによつて表現されるから、ここでは溶血帯の長さを規定する因子について考えてみたいと思う。

寒天層中沈降反応において、生じた沈降帯の移動が時間の平方根に比例することは多くの学者によつて認めら

れており^{1) 22)} Oudin はこの関係が Fick の拡散公式 $\frac{\partial c}{\partial t} = D \frac{\partial^2 c}{\partial x^2}$ に従うものであることを指摘している (c : 拡散物質の濃度, D : diffusion coefficient, x : t 時間における移動距離)。しかし寒天層内抗原抗体反応に拡散公式を適用するためには Fick の式において次の条件を仮定しなければならない。すなわち (i) 生ずる precipitate の量が negligible であり、抗原が free に拡散しうるものと考え、(ii) 抗体寒天層および重層する抗原層の長さが無限であると考え、(iii) 抗原・寒天の接触面における抗原濃度が重層された抗原の original concentration Ag₀ に等しくかつそのまま不変であること、(iv) 沈降帯の leading edge における抗原抗体比が equivalence point における比 R' に等しいこと、がこの条件である。Becker et al.²³⁾ はこのような仮定をおいたうえで、t 時間内における沈降帯の移動距離 x はその leading edge における抗原濃度 C の函数として表現されることを発表した。すなわち重層した抗原の濃度を Ag₀、抗体濃度を Ab、拡散恒数を D とすれば、

$$C = R'Ab = Ag_0 \left(1 - 2 \int_0^y \frac{1}{\sqrt{\pi}} e^{-y^2} dy \right)$$

$$\left(\text{ただし } y = \frac{x}{2 \sqrt{Dt}} = \frac{K}{2 \sqrt{D}} \right)$$

が成りたつ。この式からみて沈降帯の移動は抗原濃度と正の関係、抗体濃度と逆の関係を示すはずであるが、われわれ²⁴⁾も結核血清とツベルクリンとの寒天層内沈降反応において沈降帯の移動は時間の平方根と抗原濃度の対数に比例することを観察し、Oudin, Becker らの理論式を実験的に証明している。

溶血帯の場合は沈降帯のごとく band が移動するのではなくその長さを増してゆくのであるが、沈降帯の場合と本質的に異なつた点はみられなかつた。

まず溶血帯の長さとの関係を見るに図2, 3に示したごとく直線関係が成立する。とくに、観察時間が短い場合(反応実施後7時間まで)両者の関係は図3のごとく美事な直線をなす。しかし時間の経過とともに観測値は漸次この直線から外れ全体としてはS字状をなすようになる。すなわち図2のごとく反応後期の観察点を直線で結ぶと初期の点がこの線上に載らなくなるが、これは補体濃度がうすいものほど著しい。補体濃度が2⁶のものでは図のごとくはじめから直線関係を求めることが困難であつた。

次に溶血系を一定にした場合補体濃度と溶血帯の長さとの関係を調べてみると図4, 5のごとき関係が成りたつ。増山²⁵⁾および影山ら^{26) 27)}は寒天層内沈降反応において用いた抗原濃度をC、抗原と寒天との境界面より1だけ離れた距離にある抗原の有効濃度をK、反応開

始後の経過時間を t 、寒天中を抗原が拡散するさいの拡散恒数を D とすれば、一般に

$$C \geq 2K \text{ の範囲で } \log C - 2 \log K = \frac{1^2}{\pi Dt}$$

なる式が成りたつと述べている。図 4 はこの式において沈降帯の移動距離を溶血帯の長さ、抗原濃度を補体濃度にそれぞれおきかえ表 4 から $1 - \log_2 C$ との関係を作図したものであり、図 5 は縦軸を 1 の代りに 1^2 としたものである。いずれの場合にも大体において直線関係が認められているが、観察時間があまり長くなるとこの関係がくずれ、沈降反応の場合ほど完全な直線関係は認められなかつた。その原因についてただちに論断はできないが、溶血反応においては溶血素、血球、補体の 3 者の濃度関係により溶血帯の現われ方が左右されること、および補体は時間の経過とともに力価の低下をきたすことが沈降反応の場合と異なる大きな原因と考えられる。図 4, 5 を比較してみると、溶血帯の長さが短かいうちは $1 - \log_2 C$ とが比例し、溶血帯が長くなると 1^2 と $-\log_2 C$ とがよく比例するようである。なおこの論文においては、溶血素と血球を寒天層に入れ補体を重層した場合のみについて述べたが、補体と溶血素を上下逆にしても結果は同じであつたことを付記しておく。

以上述べたごとく、寒天層内における溶血反応は拡散の法則によく従う。このことを念頭において反応に用いるべき血球、補体、溶血素 3 者間の量的関係を定めるならば、最終的には図 1 の三角錐をもつて現わされる陽性の場に含まれる量である限りどの組合せを選んでも差支えないことになる。ゆえに著者は実験の項において検討した理由により、血球濃度は 1.5%、溶血素は 100 倍稀釈、補体は 3 倍稀釈（本試験においては抗原および抗血清を等量加えるためこの稀釈となる）をそれぞれ用いることにした。この量は影山²⁶⁾の定めた成績と大体一致するものである。

以上の実験において問題となるのは 0.1 mm 単位の計測を行わなければならない点であるが、慣れてくれば $\frac{1}{10}$ mm の副尺ノギスにより肉眼でも測定できないことはない。ただしやや主観の混入するのを免れないから拡大鏡を使用して上記ノギスで測定すればさらによい。著者は正確を期するため写真の引伸機を利用した特殊の装置を作り、白い壁に投影した試験管の拡大像について計測を行つた。投影像は 1 mm まで正確に測ることができるから、もし 20 倍に拡大すれば 0.05 mm まで正確に読みうることになる。しかしあまり細かい単位まで測定してもその意義が少ないので、実際問題としては副尺と拡大鏡だけで十分であろう。

なお使用補体量に関しては、使用の都度力価を測定して単位を決めるのが常識であり、影山は溶血の長さをもつてこれを決めている。しかしここに述べた方法におい

ては補体単位のもつ意味が薄弱であり、それを決定することによつて格別の利益がないので、著者は補体単位の測定を行わず一率に 3 倍稀釈の補体を本試験において用いた。補体は数頭の高濃度のものを合わせても必ずしも常に力価が一定しているとは限らないが、たとえ力価が低下していても観察時間を延長することにより溶血帯を一定の長さにすることができ、測定に支障はない。さらに著者の行つた本試験の術式においては補体の消費が対照との比較によつて定められるから、この意味からも予備試験を行つて補体単位を決める必要はない。これについては次報に述べる。

結 論

Oudin の technique によつて寒天層内で溶血反応を行い次の成績を得た。

1) 溶血帯の長さは補体および溶血素濃度が一定ならば赤血球濃度に反比例する。すなわち、血球濃度がうすいほど溶血帯の長さは長くなり計測には便利であるが、ある程度以上うすくなると下縁が乱れて誤差が多くなるし溶血帯もみにくくなる。したがつて溶血帯をできるだけ長くし、しかも鮮明に判読しうる血球濃度としては 1.5% が最適である。

2) 血球および補体濃度が一定ならば溶血帯の長さは溶血素濃度に比例する。ただしある程度以上に濃い溶血素は血球を凝集せしめ測定誤差を大きくする。したがつて溶血素の至適濃度としては、かかる凝集を起さずしかも補体のうすい濃度まで溶血帯を観察しうるような濃度を選ばばよい。

3) 血球および溶血素濃度が一定ならば溶血帯の長さは補体濃度および時間の経過と比例する。至適補体濃度としては 5~7 時間以内に 1.5 mm 以上の溶血帯を作るような濃度を選ばばよい。

4) 以上を総合するに、溶血帯の長さとは補体濃度、溶血素濃度、および反応時間との間には美事な直線関係が成立する。この関係は大体拡散の基本公式に従うものである。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を戴いた大原教授に深甚なる謝意を表す。なお本論文の要旨は第 30 回日本細菌学会総会（千葉）において発表した。

引用文献

- 1) Oudin, J. : Compt. rend. Acad. Sci., 222 : 115, 1946.
- 2) Oudin, J. : Bull. Soc. Chim. Biol., 29 : 140, 1947.
- 3) Oudin, J. : Ann. Inst. Past., 75 : 30, 1948.
- 4) Oudin, J. : Ann. Inst. Past., 75 : 109, 1948.

- 5) Oudin, J. : Compt. rend. Acad. Sci., 228 : 1890, 1949.
- 6) Oudin, J. : Meth. med. Res., 5 : 335, 1952.
- 7) Oudin, J. : Methods in Medical Research Vol. 5. The Year Book Publishers Inc., Chicago, 1952.
- 8) Pope, C.G., Stevens, M.F., Caspary, E.A. & Fenton, E.L. : Brit. J. Exper. Path., 32 : 246, 1951.
- 9) Oakley, C.L. & Fulthorpe, A.J. : J. Path. Bact., 65 : 49, 1953.
- 10) Gispén, R. : J. immunol., 74 : 134, 1955.
- 11) Augustin, R. & Hayward, B.J. : Internat. Arch. Allergy & Appl. Immunol., 6 : 154, 1955.
- 12) Ouchterlony, O. : Acta path. microbiol. Scandinav., 25 : 186, 1948.
- 13) Ouchterlony, O. : Ark. Kemi. Min. Geol., 263 : 1, 1949.
- 14) Ouchterlony, O. : Acta path. microbiol. Scandinav., 26 : 507, 1947.
- 15) Ouchterlony, O. : Ibid., 26 : 516, 1949.
- 16) Ouchterlony, O. : Lancet, 256 : 1346, 1949.
- 17) Ouchterlony, O. : Ark. Kemi., 1 : 43, 1949.
- 18) Ouchterlony, O. : Antigen-antibody reactions in gels and practical application of this phenomenon in the laboratory diagnosis of diphtheria, Thesis, Stockholm, 1949.
- 19) Elek, S.D. : Brit. J. Exper. Path., 30 : 483, 1949.
- 20) Schiott, C.R. : Acta path. microbiol. Scandinav., 32 : 251, 1953.
- 21) Grabar, P. : Bull. soc. chim. biol., 36 : 65, 1954.
- 22) Munoz, J. & Becker, E. : J. immunol., 65 : 47, 1950.
- 23) Becker, E.L., Munoz, J., Laprosle, C. & Beau, L.J. : J. immunol., 67 : 501, 1951.
- 24) 板倉益夫・今井忠・高橋和男 : 結核の研究 第5集, 11, 昭31.
- 25) 増山元三郎 : 科学, 17 : 158, 昭22.
- 26) 影山成章・打田啓二・森武 : 京府医大誌, 52(3) : 433, 昭27.
- 27) 影山成章・森武 : アレルギー, 2 (1) : 22, 昭28.
- 28) 影山成章 : 日新医学, 41 (12) : 632, 昭29.