寒天層中における補体結合反応の研究 (II)

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33年10月28日

緒　言

寒天層内に起る溶血反応はその強さを溶血帯の長さとして観察しうるが，著者は前報[1]においてこの反応に与る各因子の量的関係を検討し，現われる溶血帯の長さと補体および溶血素濃度の間には厳格な直線関係が成り立つことを知りえた。換言すれば，溶血帯の長さは血球濃度および溶血素濃度が一定ならば重層される補体の濃度のみによつて規定される。したがつて，一定濃度の溶血系を含む寒天層に抗原・抗体・補体混合液を重層した場合，出現する溶血帯は重層液中に含まれる free の補体濃度と反応時間に比例してその長さを変化する。かくしてわれわれは溶血帯の長さを計測することにより，抗原抗体反応の結果消費された補体量を推定することができる。Kolmer 法においては，加えられた補体を抗原抗体結合物が過不足なく引きつけ完全に溶血を阻止するような抗体濃度を求め，50 % 溶血単位法においては血球の 50 % を溶血せしめるに足る補体を free に残す抗体濃度を求めたが，いずれの場合においても用いられる reagents は量的にバランスのとれたものでなければならず，ことに補体の定量が煩雑である。しかるに著者がここに報告する方法においては，補体の残存量と溶血帯の長さとが正しく比例するのであるからとくに補体量を吟味する必要はない。この場合仮りに加えられた補体が過剰であつたとしても，抗原と抗体が少しでも補体を消費する限りその分だけ溶血帯の短縮をきたすから，成績判定には少しも差支えない。すなわち本法において反応の陰陽はあくまでも補体だけを重層した対照との比較によつて判断される。また反対にたとえ補体が過少であつても，溶血帯の長さは反応時間に比例するから観察時間を延長することによつてこれを補うことができる。かくてわれわれは補体の定量を省略し反応の手技をはるかに簡単にしうる。もちろん補体は過不足ともにあまり極端であることは避けるべきであるが，前報で観察した補体量を用いればこの心配はない。

いうまでもなく寒天層内抗原抗体反応の最大の利点は反応系の数を観察しうるところにある。著者ら[2]も寒天層内沈降反応において，ツベルクリンと結核血清の間には少なくとも 10 箇の反応系が存在することを観察しており，補体結合反応においても当然同様な観察をなしうるはずであるが，この問題は別の機会に譲り，ここでは反応の手技とくにツベルクリンを抗原とした場合における反応の現われ方について述べ，併わせて従来の反応との得失を検討してみたいと思う。

実験材料ならびに実験方法

溶血系寒天層：前報において検討したところに従い，1.5 % 血球，100 倍溶血素と 1.5 % の寒天をそれぞれ等量宛よく混合し，口径約 3 *mm*，長さ 6 *cm* の豆試験管に分注して固まらせた。

抗原：次の 3 つを用いた。

a）ソートンツベルクリン；ソートン培地に植えた青山 B 株より型のごとくして作つた。

b）ツベルクリン沈澱；上記ツベルクリンを三塩化醋酸で沈澱せしめ，沈澱部を流水で透析したもの。

c）中性水加熱菌体抽出液；大原ら[3)4)]が結核の沈降反応に抗原として用いたもので，これと全く同様にして人型菌 H_2 株から作つた。

抗体：BCG 生菌で家兎を免疫して得た血清。使用前 56° *C* 30 分間加熱，非働化して用いた。

反応術式：抗原および抗体はともに階段的に倍数稀釈して各稀釈を組合わせ，それぞれ 0.5 *cc* 宛と，3 倍稀釈の補体 0.5 *cc* を順次試験管に入れてよく混合し，一夜氷室に置く。別に，抗体の抗補体作用をみるため逓次稀釈血清 0.5 *cc* に補体 0.5 *cc*，食塩水 0.5 *cc* を加えたものと，補体のみの対照として補体 0.5 *cc* に食塩水 1.0 *cc* を加えたものとを作り，同様一夜氷室に置いた。翌日これらを氷室から取り出して別に作つておいた上記の溶血系寒天層にこれを重層し，生ずる溶血帯の長さから補体の消費量を求めた。なお抗原の溶血作用と抗補体作用を上記の方法であらかじめ調べておいたが，ツベルクリンは 25 倍稀釈まで抗補体作用があり，50 倍稀釈ではこれがなくなつた。また 10 倍稀釈より濃いものでは溶血作用があつたが，透析するとこの作用はなくなつた。H_2 株の中性水加熱菌体抽出液には溶血作用なく，抗補体作用は 5～6 倍稀釈まで認められた。測定に当つては同じ内容の試験管をすべて 3 本宛作り，その読みの平均値をとつた。

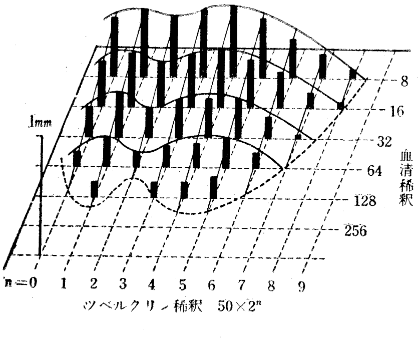
実　験　成　績

著者は上記の3抗原をもつて結核家兎血清の補体結合反応を行つたが，ここでは主としてツベルクリンを抗原とした場合の反応の現われ方について述べる。表1はその1例を示したもので，ツベルクリンは抗補体作用のない50倍からはじめて25,600倍 (50×2^9) まで倍数稀釈し，血清は8倍から256倍まで稀釈して反応の場の形を観察した（血清は4倍稀釈まで抗補体作用があつたのでこの部分を除いた）。すなわち表に掲げた抗原，抗体の各稀釈を組合わせた混合液に3倍稀釈の補体を加え，溶血系寒天層に重層したさい生ずる溶血帯の長さを *mm* で表わしたものが表中の点線より上に書いた数字である。同時に行つた補体のみを重層した対照の試験管では3 *mm* の溶血帯が現われたので，表において溶血帯の長さが3 *mm* より短かいものは，抗原抗体反応によつて補体がそれだけ消費されたことを意味する。この場合，溶血帯の短縮が補体の消費度と正しく比例することは前報において観察したとおりである。したがつて著者は，補体の消費度すなわち補体結合反応の程度を，補体のみを重層した試験管と反応を起した試験管との間にみられる溶血帯の長さの差をもつて表現した。すなわちこの実験においては各試験管にみられた溶血帯の長さを3 *mm* から引いたものが補体の消費度を示す数値となる。表1において点線の下に括弧を付して示した数値がこれで，その値の多いものほど補体結合反応の程度が強く起きたことになる。表1の成績から反応の現われ方を図示してみると図1が得られる。図における太い黒線は補体結合反応の強さを示すもので表1中点線の下段に括弧を付して掲げた数値を立体的に描いたものである。また図において反応陽性の「場」は点線をもつて囲んだ。これから明らかなごとく，ツベルクリンを抗原とする結核補体結合反応においては2つの反応の「場」が観察される。すなわちこの図の場合にはツベルクリン稀釈100倍のところと800倍のところにpeakを有する2つの陽性の場がみられた。

表1　補体結合反応における溶血帯の長さ

抗体＼抗原		ツベルクリン稀釈：50×2^n									
	n	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
血清稀釈	8	1.0	0.7	0.8	0.7	0.6	1.0	1.7	2.2	2.7	3.0
		(2.0)	(2.3)	(2.2)	(2.3)	(2.4)	(2.0)	(1.3)	(0.8)	(0.3)	(0)
	16	1.5	1.2	1.5	1.2	1.0	1.5	1.8	2.5	2.8	3.0
		(1.5)	(1.8)	(1.5)	(1.8)	(2.0)	(1.5)	(1.2)	(0.5)	(0.2)	(0)
	32	2.0	1.5	2.0	1.7	1.7	1.7	2.3	2.9	3.0	3.0
		(1.0)	(1.5)	(1.0)	(1.3)	(1.3)	(1.3)	(0.7)	(0.1)	(0)	(0)
	64	2.5	2.0	2.5	2.3	2.2	2.0	2.5	3.0	3.0	3.0
		(0.5)	(1.0)	(0.5)	(0.7)	(0.8)	(1.0)	(0.5)	(0)	(0)	(0)
	128	3.0	2.5	3.0	2.5	2.5	2.3	3.0	3.0		
		(0)	(0.5)	(0)	(0.5)	(0.5)	(0.7)	(0)	(0)		
	256	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0	3.0			
		(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)	(0)			

図1　ツベルクリンを抗原とした補体結合反応の「場」の形



以上のごとき方法によつて行つた寒天層内補体結合反応の成績と50％溶血単位法によつて行つた場合の成績とを比較対照してみると表2のごとくなる。寒天内反応の成績は表のごとく 2^1 倍から 2^8 倍までの血清稀釈について溶血帯の長さを測定したが，上段の数字（A）はその長さを示し，下段の数字（B）はツベルクリンを加えず血清と補体のみを寒天層に重層した場合の溶血帯の長さで，血清の抗補体作用をみるために行われたもの

表 2　寒天内補体結合反応成績と 50 % 溶血単位法による補体結合反応成績との比較

血清番号	沈降反応	50%溶血単位による補体結合反応成績		血清稀釈 2^n n = 1	2	3	4	5	6	7	8
101	32×(+)	350×	A	0	0	0.1	0.3	0.5	0.7	(0.8)	1.0
			B	0.6	(0.8)	1.0	1.0	1.0	1.0		
1	8×(±)	300×	A	0.1	0.2	0.3	0.4	0.6	(0.8)	1.0	1.0
			B	0.3	(0.5)	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
13	16×(+)	320×	A	0	0	0.2	0.5	0.6	(0.8)	1.0	1.0
			B	0.5	(0.7)	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	
21	8×(+)	150×	A	0.1	0.2	0.4	0.6	(0.7)	1.0	1.0	1.0
			B	(0.6)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	
22	1×(-)	0	A	0.5	0.7	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
			B	0.5	(0.8)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
正常血清	1 (-)	0	A	0.5	0.8	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
			B	0.5	(0.7)	0.9	1.0	1.0	1.0	1.0	

である。この実験において補体のみを寒天層に重層した対照の読みは 1 *mm* であつたので，これより値の少ないものにあつては補体の消費が行われたことになる。したがつて A の段における括弧は反応陽性の上限（抗体価）を示し，B の段における括弧はその稀釈まで血清に抗補体作用のあることを示す。溶血帯の長さが 0.9 *mm* のときは 0.1 *mm* だけ補体が消費されている訳であるが，同じ内容の試験管が 3 本とも同じ値でなく，たとえば 0.9, 1.0, 0.9 と揃わなかつたときは誤差範囲とみて陽性の中にいれなかつた。

表にみるごとく，この方法による抗体価は 50 % 溶血単位法によるそれとよく平行する。抗体価の価としては後者より全般的に低く現われるが，50 % 溶血単位法はきわめて鋭敏な方法であるからこれはやむをえない。しかし，表には載せなかつたが Kolmer 法による抗体価と比較すれば，多くの場合寒天法の方が幾分高かつた。なお表 2 においてはツベルクリンを抗原とする沈降反応の抗体価を参考までに掲げた。

以上ツベルクリンを抗原とした場合の成績についてのみ述べてきたが，著者は実験方法の項に述べたごとく，他にツベルクリン沈澱部および中性水加熱菌体抽出液を抗原として上と同じ方法で補体結合反応を行つた。得られた抗体価の価としてはツベルクリンとツベルクリン沈澱部は同じ値を与え，菌体抽出液を抗原とした場合はこれより低い値しか得られなかつた。ただツベルクリン沈澱部および菌体抽出液を抗原とする反応がツベルクリンを抗原とする反応と異なつていた点は，前 2 者を倍数稀釈して反応の場の形を調べても単一の場しか観察されなかつたことである。

考　　察

補体結合反応の術式には，完全溶血を指標とし抗原・抗体・補体混合液が完全に溶血を阻止する最高稀釈をもつて力価を決める方法と，50%溶血を指標としてこれを決める方法とがある。後者の方法はきわめて感度の高い方法でとくに spectrophotometer を用いて溶血度を測る場合には非常に正確に力価の測定を行うことができる。

しかしここに述べた寒天層内補体結合反応は上述のいずれとも趣きを異にしている。溶血の起し方は上層液（抗原＋抗体＋補体）と寒天層との境界面から始まり，時間の経過とともにその長さを増してゆく。しかしてまたその長さは上層液中に残存する free の補体濃度と正しく比例する。ゆえにその長さを測定することは，いろいろな程度に起つている部分溶血の強さを測るのに等しい意味をもつ。いうまでもなく抗原抗体結合物が補体を引きつけるさいの結合の仕方には，これを完全に引きつけるかまたは全く引きつけないかという all or none の結合様式をみせるものではない。その間にいろいろな grade がある。したがつて補体結合反応の結果を判定する場合にも完全溶血と完全溶血阻止との間には強弱いろいろな程度の陽性反応が存在するはずで，この意味からいえば種々なる部分溶血を観察することは完全不溶血のみを指標として成績を判定するよりも理論的にははるかに合理的なはずである。

しかし通常の補体結合反応においてはきわめて狭い範囲内に限り溶血度と補体量とが直線関係を示すにすぎないから，上に述べた寒天内反応のごとく部分溶血を連続的に観察することによつて titer を決めることはできない。第1に考えなければならないことは通常の補体結合反応において indicator として用いられる血球は抵抗が一様でないことである。血球の中には溶血に対しとくに抵抗の強いものととくに抵抗の弱いものとが全体の何%かを占める。その分布は normal curve をなすものと考えられるから，厳密にいえば溶血度と補体量の関係が直線的であるのは 50 % 溶血を中心とするごく狭い部分のみで，これより離れるにつれて両者の関係は直線よりはずれ，全体としては sigmoid の曲線を描くようになる。換言すれば 100 % 溶血または 0 % 溶血に近い部分ではきわめて大量の補体量の変化も溶血度に対してはそれほどの変化を現わさない。補体量の変化に対しもつとも鋭敏な 50 % 溶血点が指標として用いられる所以はここにある。

要するに寒天層内溶血反応と一般の溶血反応との相違点は，前者において補体量と溶血度があらゆる部分溶血にわたつて正しく直線関係を示すに反し，後者における溶血度と補体量の間にはこのような関係がなく，Krogh[5]によつて観察された次の式が適用されることである。すなわち補体量を x とし，これによつて起される溶血度を y とすれば，

$$\log x = \log k + \frac{1}{n} \log \frac{y}{1-y}$$ （ただし k は 50 % 溶血に要する補体量，$\frac{1}{n}$ は恒数）

かくのごとく一方は Fick の拡散式に従い，他方は Krogh の式に従う。

第2に考えなければならないことは，従来の方法における溶血反応には寒天層内反応のごとき時間的な factor がないことである。もちろん前者においても反応の完結までには一定の時間を要するが，これは後者にみられるような漸進的な factor ではない。すなわち従来の方法において結果を観察しうるのは反応完結後であつて，寒天層内反応のごとく時間の経過と比例して進展してゆく process を観察することはできない。したがつて本試験に用いられる補体量は任意に選ぶことを許されない。加えられた補体量がただちに結果を左右するからである。もし補体量が過大であるならば抗原抗体間に結合が行われたと否とにかかわらず溶血が起り，反応陰性の結果を招くことはここに断るまでもなかろう。従来行われた部分溶血をもつて反応を観察する方法も寒天内反応のごとく生じた部分溶血の程度如何（すなわちこの場合溶血帯の長さ）を観察するのではなく，一定の溶血を指標として，それだけの溶血を起す補体が free に残存する点を求めるものである。この場合通常 50 % 溶血点が指標として選ばれることはいうまでもない。すなわち 50 % 溶血点付近が補体量の変化に対してもつとも鋭敏なことを利用し，予備試験においてかかる溶血を示す補体量（1 k）を正確に測定したのち，本試験においては 2k を抗原抗体系に加え，反応の結果丁度 50 % を溶血せしむるだけの補体を抗原抗体が引きつける点（換言すれば丁度 50 % 溶血を起すだけの遊離補体を残す点）を観察する。この方法は鋭敏であるだけに，完全溶血を指標とするものよりもさらに一層補体の定量は厳格であることを要する。このためには spectrophotometer を用いて煩わしい定量を行わなければならない。

しかるに寒天層内補体結合反応においてはこの手間を省くことができる。これによつて補体結合反応の手技がいかに簡易化されるかは多言を要しないであろう。ここに従来の technique と寒天層内補体結合反応の優劣を比較してみるに，後者の欠点として数えられるものは，（i）補体，溶血素ともにかなり大量を要すること（高濃度のものを用いなければならないこと），(ii) 計測が細かく熟練を要すること，(iii) 感度において 50 % 溶血単位法には及ばないこと，等の諸点である。しかしながら，常識的な量（濃度）を用いる限り補体の定量を省略しうるという手技の簡単さはこの欠点を補つて余りあるものというべきであろう。さらに寒天層内反応においては反応の進展を時間的に追求することができるから，成績を立体的に眺めうるという利点がある。しかし寒天層内反応の最大の長所は，緒言の項でもふれたごとく反応系の数を観察しうることである。このためには次のごとくすればよい。すなわち寒天層に赤血球，抗体および補体の 3 者を置きこの上に一定時間抗原を重層する。この操作によつて抗原中に存在する partial antigen はそれぞれの抗体と反応し，上層の抗原液をピペットで取り去つたのちにもおのおのの反応帯は原位置に止まる。したがつて取り去つた抗原液の代りに溶血素を重層すれば，反応帯が形成されている部分では補体が全く消費されているから溶血が起らず（ただしこの方法では各 reagent について正確な定量を要す）反応陰性の部分だけ溶血が起る。ゆえにわれわれは非溶血帯の数を数えることにより反応系の数を知ることができる。このような反応系の分析は本論文の目的でないので，ここでは故意にふれなかつたが影山[6]は上記のごとき方法で実験を行つている。

しかし著者がここに検討した寒天層内補体結合反応は，かかる本来の長所を別にしても，その手技の簡単さのゆえに十分利用しうべき方法と考える。

かくして行われた結核の補体結合反応において，ツベルクリンを抗原とした場合 2 つの陽性の「場」が得られることを著者は知りえた。すなわち図1に示した実験例のごとく，ツベルクリンを 50 倍から 12,800 倍ま

で階段的に稀釈して反応の現われ方を観察してゆくと，抗原濃度の高い部分と低い部分（この場合では100倍稀釈と800倍稀釈）にそれぞれpeakを有する二相性の反応が得られた。かかる現象がconstantに成立することをわが国ではじめて観察したのは教室の池端[7]であるが，これとほぼ時を同じうして彼とは独立にSeibert[8]も同様なことを報告している。その後教室の今井[9]は池端の成績をさらに追求し，これら2つのpeakはそれぞれツベルクリン中に含まれる蛋白画分および多糖体画分に由来するものであることを明らかにした。すなわち旧ツベルクリンを三塩化醋酸によつて沈澱する画分Pと，上清をメタノールで処理して得た画分Sとに分かち，それぞれを抗原として50％溶血単位法による補体結合反応を行つてみると，ツベルクリンの示す2つの反応の場はP反応の場とS反応の場を併わせたものと考えることができる。このような現象を観察しえたのは，結核の補体結合反応を行うにあたつて50％溶血単位法というきわめて鋭敏な手技が用いられたことに負うところが多いと思われるが，著者の行つた寒天層内反応においてもかかる2つの反応の場を観察しえたことは興味深い。ただし50％溶血単位法のごとくconstantな成績ではなく，反応の場が1箇しかみられない場合もあつたことを付け加えておく。なおツベルクリンを抗原とする補体結合反応についてはわれわれの教室の研究のほかに進藤ら[10]の行つたものがあり，それによれば8例中2例ではあつたが三塩化醋酸で沈澱したツベルクリン画分を抗原とした場合2つの反応の場がみられたという。しかし前記池端，今井の観察した2つの反応の場はそれぞれPおよびSに由来するものであり，P単独（進藤らの抗原に相当する）を抗原とする反応では，50％溶血単位法の鋭敏さをもつてしても常に1箇の「場」しかみられなかつた。また得られた「場」の形状も異なるから，進藤らの観察した2つの「場」と上記のそれとは別種のものと考えられる。著者の用いたツベルクリン沈澱部，すなわち進藤らとおおよそ同様にして作つた抗原を寒天層内反応に用いた成績でも，2つの「場」が観察されたことはなかつた。またこの実験において用いられた他の1つの抗原，H_2株菌体抽出液は主として多糖体より成るものであるが，これによつて得られた反応は今井の用いたツベルクリン多糖体画分Sの示す反応に似ているように思われた。しかし本論文においては寒天層内で行う補体結合反応の現われ方とその有用性を検討するに止め，種々なる抗原分画による比較的な研究は別の機会に譲りたいと思う。

結　論

1）寒天層内に溶血系を置き，別に作つた抗原・抗体・補体混合液をこの上に重層すれば，補体結合反応の結果は溶血帯の長さによつて判定しうる。このさい補体だけを重層した対照を置き，生ずる溶血帯の長さを測定しておけば，これより溶血帯の短かいものは短縮した分だけ補体が抗原抗体反応系に引きつけられたことを意味する。すなわちこの方法において反応の陰陽は補体単独を重層して溶血を起させた対照との比較によつて判定される。

2）この方法において生ずる溶血帯の長さは上層液中の残存補体濃度および反応時間に正しく比例するから，補体は常識的な量（濃度）を用いる限りとくに単位測定を行う必要はない。これによつて反応の操作を非常に簡略化しうることはこの方法の大きな長所である。さらにこの方法では時間の経過に伴う反応の進展を立体的に眺めうるという利点がある。

3）その反面，溶血帯の計測に熟練を要すること，および用いられるreagentsの量がかなり大量でなければならぬという欠点を有する。しかし上に述べた長所はこの欠点を十分補いうるものと考える。

4）寒天層内の結核補体結合反応において，抗原および抗体のいろいろな稀釈を組合わせて反応の場の形を観察すると，ツベルクリンを抗原とした場合2つの陽性の場が得られた。しかし三塩化醋酸で沈澱させたツベルクリン画分およびH_2株の中性水加熱菌体抽出液を抗原とした場合には常に1箇の場しかみられなかつた。

稿を終るに臨み，終始御指導，御校閲を戴いた大原教授に深謝する。
なお本論文の要旨は第30回日本細菌学会総会（千葉）において述べた。

引　用　文　献

1）板倉益夫：結核，34：149，昭34.
2）板倉益夫・今井忠・高橋和男：結核の研究，第5集，11，昭31.
3）大原達・中川駿一郎：東京医事新誌，68：5，昭26.
4）大原達・高瀬一・池端隆・萩田友雄・谷野政次・中川駿一郎：結核の研究，第1集，39，昭28.
5）Von Krogh：J. inf. Dis., 19：452，1916.
6）影山成章：日新医学，41：632，昭29.
7）池端隆：結核の研究，第4集，7，昭30.
8）Seibert, F.B. et al.：Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 92：811，1956.
9）今井忠：日本細菌学雑誌に掲載予定.
10）進藤宙二・若倉和美・小峰績：アレルギー，1：36，昭27.