



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	寒天層中における抗原抗体反応の研究：(第1報) Oudinの方法による結核血清の沈降反応について
Author(s)	板倉, 益夫; ITAKURA, Masuwo; 今井, 忠 他
Description	
Citation	結核の研究, 5, 11-16
Issue Date	1956-11
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/26602
Type	departmental bulletin paper
File Information	5_P11-16.pdf



原 著

寒天層中における抗原抗体反応の研究

(第 1 報) Oudin の方法による結核血清の沈降反応について

板倉益夫・今井 忠・高橋和男

(北海道大学結核研究所細菌部：主任 大原 達教授)

(昭和 31 年 7 月 10 日受付)

まえがき

抗体を含む Gel 中に抗原を拡散させた場合、抗原抗体反応に基く沈降物の Band が形成されることは早くから知られていたが、これについて最も詳細な研究を行ったのは Oudin (1946—49)^{1)~6)} である。彼は溶融せる寒天、または gelatin 中に抗血清を混じた半流動の medium を作り、この上に、対応する antigen を重層して徐々に滲透せしめた所、鮮明な白い沈降帯が生じ、これが時間とともに移動することを観察した。彼の研究によれば、界面から移動する距離は、抗血清の濃度が一定の場合時間の平方根と抗原濃度の対数に比例する。多くの場合、かかる Band は数本生ずるが、Oudin はこれを抗原抗体系の最少数を表わすものと考えた。すなわち抗原が単一なものならば唯一本の沈降帯を生ずるが、抗原が多数の抗原性物質から成っている時はこれら部分抗原に対応する precipitating antibody との間にそれぞれ specific な Band が形成される。したがってこの方法によれば antigen の complexity を調べることが出来、今日 Oudin の technique は色々な方面において抗原分析の研究に広く応用されている。

しかしながら、歴史的にみるとこの technique の始まりは古く 1905 年の Bechhold⁶⁾ に遡る。彼は抗山羊家兔血清を含んだ 0.5% gelatin gel 中に山羊血清を拡散せしめ、2本の分離した“ring”を観察した。しかし Bechhold はこれを2つの抗原抗体反応系に基く沈降反応の結果とは考えず、この ring を Liesegang's ring と考えたため、それ以上の免疫学的な発展はみられなかつた。

Gel diffusion precipitin reaction の免疫学的な意

義について最初に考究した学者は Petrie (1932)⁷⁾ である。彼は meningococcus の R 型と pneumococcus の S 型とをそれぞれ対応する免疫血清を含んだ agar plate に培養した際、生ずる集落の周囲に雲霧状の暈ができることを発見した。これを数週間放置しておく、暈は次第に変化して同心円をなした数本の ring になる。また肺炎双球菌から取りだした purified polysaccharide を homologous な免疫血清寒天に滴下した場合も同じ現象がみられたので、この暈は抗原と抗体の interaction によつて形成される沈降物であると彼は結論した。その後 Sia & Chung (1932)⁸⁾, Brown (1940)¹⁰⁾ は肺炎菌について、Kirkbride & Cohen (1934)⁹⁾ は meningococcus について、Petrie & Steabben (1943)¹¹⁾ は gas gangrene について、それぞれ同様な観察をしている。

前記 Oudin 以来、かかる gel diffusion による血清反応は多大の興味をもつて多くの学者に追試されるようになり、特に Oakly & Fulthorpe¹²⁾, Ouchterlony^{13)~18)}, Björklund^{16)~22)}, その他²³⁾²⁴⁾ はそれぞれ方法的にも多少の改良を加えつつ、diphtheria toxin, tetanus toxin, streptolysin などの抗原構造の研究や各種臓器の抗原的特殊性の追求などいろいろな実験を行つている。

しかし結核性抗原、特にツベルクリンなどについて行われた研究は極めて少い。ツベルクリンはその製法上からも複雑な抗原的組成をもつていることが容易に想像されるので、著者等はまずツベルクリンを抗原とした寒天層内沈降反応を Oudin の方法によつて実施してみた。われわれはこれによつてツベルクリンの抗原的な多元性を確かめるとともに、沈降帯の現われ方について 2, 3 観察したので、

得たる成績をここに報告したいと思う。

実験材料および実験方法

抗原： ソートンツベルクリン

抗体： BCG生菌で免疫した家兔血清（沈降反応において 32 倍稀釈まで陽性のもの）

寒天： 1% NaCl, 1 万倍マーズニンを含む 0.6% 寒天。寒天は良質のものを溶解して上記の濃度とし、NaOH で略々中性とした。この反応に用いるには pH 6.5~7.5 位が良い。寒天は加熱溶解した後 4000 廻転 15 分間遠心沈澱し、夾雑物を含む不透明な沈澱部を棄て、透明な上清部のみを保存して使用した。

試験管： 口径約 3 mm, 長さ 6 cm 以上のなるべく一様なものを選び、クロム硫酸に漬けた後完全に水洗し、乾燥後 1% 寒天で試験管の内壁を coating した。これは血清寒天が固まる際に管壁から離れて間隙を作ることがあり、これを伝つて抗原液が下に漏れるのを防ぐためである。

反応実施： 寒天を加熱溶解し略々 50°C (45°C ~ 54°C) に冷えたとき、同じ温度に温めた免疫血清を等量混じり、固まらないうちに同じく温めた capillary pipette で手早く上記の試験管に 1/2 ~ 1/3 の高さまで分注し、冷所において固まらせる。抗原は 1% マーズニンを含む食塩水をもつて所要の濃度に稀釈し、寒天に重層後は蒸発を防ぐため試験管の口を蠟封した。これらの試験管は試験管立に直立させて 37°C の孵卵器に納め、毎日境界面から沈降帯の下縁までの長さを 0.1 mm まで測定した。われわれは測定に当り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から計測を行った。投影像は 1 mm までは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 まで正確に読み得ることになる。なお実験はいずれも同じ稀釈のものを 3 本宛作り、測定にはその平均値を取った。

別に血清稀釈を 2 倍, 4 倍, 8 倍としたものも行ったが、原液を用いた場合が最も良い結果を得た。ここでは原液と 4 倍稀釈血清の成績だけを述べる。なお本論文に記載した稀釈倍数はすべて寒天に混ざる前の稀釈で、実際寒天内ではこの 2 倍に稀釈されていることになる。

実験成績

沈降帯の数について

抗原および抗体稀釈の各組合せによる沈降帯の出方は表 1 および表 2 に示す通りである。

表 1 においては免疫血清を稀釈せずツベルクリンを 1

倍, 10 倍, 100 倍, 500 倍, 1000 倍と 5 通りに稀釈した。表中の数字はそれぞれ上欄記載の日時に抗原・寒天の境界面から沈降帯までの距離を実測し、これを mm で表わしたものである。同一欄に 2 個以上の実測値が記載されているのは、その数だけ沈降帯が現われたことを示す。

この表でみられるごとく、ツベルクリン原液では 16 時間で 2 本, 24 時間で 4 本の沈降帯が観察されたが、以後時間の経過について漸次この Band は不明瞭となり、13 日で 1 本, 16 日では測定されなくなつた。すなわち沈降帯はこの期間中に消失したわけではないが、下縁がぼんやりしてきて測定できなくなつたり、または全体がうすくなつて測定困難となつたものである。

10 倍稀釈ツベルクリンでは 16 時間目に 3 本, 24 時間目に 4 本を示し、以後次第に増加して 16 日目には最高の 10 本を観察したが、25 日目には再び減じて 7 本となつた。

第 1 表 抗原濃度と経過時間に対する白帯の現われ方

測定時間 「ツ」 稀釈	日数								
	16	24	90	144	216	312	384	480	600
1 倍	0.8	0.8	1.0	1.0	1.5	2.0			
	6.8	4.5	2.0	4.5	2.0				
		8.5	5.0	8.0					
		15.0	17.0						
10 倍	0.4	0.5	0.5	0.5	0.5	3.5	0.6	0.5	0.5
	3.0	3.5	1.5	3.0	3.0	5.5	3.0	3.5	3.0
	6.7	7.0	4.8	5.0	5.0	7.0	7.0	5.5	4.8
		9.0	6.5	7.0	7.0	8.5	8.2	7.0	7.0
			13.0	8.0	8.0	10.5	10.0	8.5	8.0
			18.0	15.0	10.0	12.0	11.0	10.0	10.0
				23.0	26.0	18.0	13.0	11.5	11.0
						21.0	15.5	16.0	
							18.5	18.0	
							21.0		
100 倍	2.5	3.5	0.8	1.5	4.0	4.0	1.5	2.0	2.0
			3.7	4.0	7.0	6.0	3.5	4.0	4.0
			6.5	6.5	10.5	10.0	6.0	7.0	7.0
			8.5	9.0	13.5		10.5	11.0	11.0
				11.0			19.0	18.0	25.0
								22.5	
500 倍		0.8	0.7						
			3.0						
			4.0						
1000 倍			0.5						

100 倍では 24 時間目まで 1 本, 4 日目 4 本, 6 日目 5 本, 20 日目に最高の 6 本であった。

500 倍では 24 時間目 1 本, 4 日目 3 本で以後測定困難となった。

1000 倍では 4 日目に 1 本観察されたが間もなく消失している。

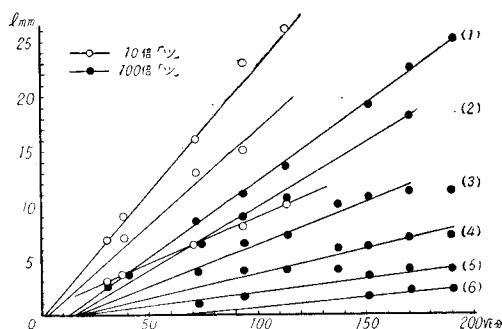
本実験においてツベルクリン原液を用いた場合 10 倍稀釈のものよりも Band の数が少くなっているのは, 実際の数が多いということだけではなく, ツベルクリンによる着色のためうすい Band の測定が困難であったことと, Band の移動が極めて速いため, 一部の沈降帯が短時間で管底に達し測定できなくなったことなどもその原因である。故にツベルクリンの着色を除く目的で透析を行ってみたが, 透析の程度により沈降帯の数が変わり, ほとんど色素を取り除くほどにすると 10 倍稀釈ツベルクリンよりも Band の数は少くなった。また活性炭で脱色するとほとんど沈降帯は現われなくなる。このような理由でわれわれの場合ツベルクリンは 10 倍に稀釈の方が原液よりも良好な成績が見られた。

また 100 倍稀釈ツベルクリンにおいて, 9 日目, 13 日目にその前後より Band 数が少くなっているのは, うすい沈降帯を測定しなかつたためである。

つきに沈降帯の長さ(境界面から沈降帯下縁までの距離)と時間との関係を調べてみると図 1 のごとくなる。

この図は縦軸に沈降帯の長さ l mm, 横軸に反応時間の平方根 \sqrt{t} 分を取り, 10 倍ツベルクリンについては移動速度の早いもの 3 本を, 100 倍ツベルクリンについては

第 1 図 沈降帯の長さとの関係



その全部を図示したものである。図のごとくいずれの場合も略々直線が得られるので, 沈降帯の移動は時間の平方根に比例することが確かめられた。ただし図において傾斜のゆるい直線は, 2 週間を過ぎるころから次第に移動速度が緩くなり, 稍直線からはずれてくるように思われた。

反応に対する温度の影響について

第 2 表は血清を 1 倍と 4 倍に稀釈しツベルクリンを表のごとく 5¹, 5², 5³, 5⁴ 倍の 4 種に稀釈したもので, 現われた沈降帯のうち最も移動の速いもの各 1 本についての成績を記載した。最後の欄には 7 日目に現われた沈降帯の数を示してある。反応に対する温度の影響をみるために同じものを 2 組宛作り, 1 組はそのまま室温に放置して反応させ, 他の 1 組は最初 37°C の孵卵器に 48 時間入れた後とり出し以後室温において反応させてみた。

第 2 表 抗原・抗体濃度と反応時間並びに反応温度との関係

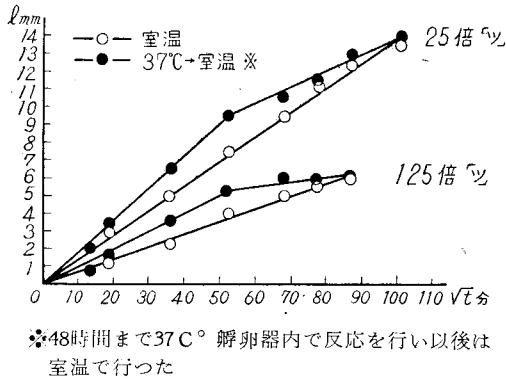
血清 稀釈	「ツ」 稀釈	経過日数 測定時間 温度	7 日目の 白帯の数								
			3	1	2	3	4	5	6	7	
1 倍	5 倍	※ 37°C	1.8	3.0	5.0	14.7	26.0				8
		室温		4.0	6.5	13.5	17.0	19.0	20.0		2
	25 倍	※ 37°C	2.0	3.5	6.5	9.5	10.5	11.5	13.0	14.0	6
		室温		3.0	5.0	7.5	9.5	11.3	12.5	13.5	2
125 倍	※ 37°C	0.7	1.7	3.5	5.3	6.0	6.0	6.2	6.5	3	
	室温		1.5	2.3	4.0	5.0	5.5	6.0	6.5	2	
625 倍	※ 37°C	0.2	1.5	3.0	5.0	5.5	6.0	6.0	6.3	2	
	室温				0.5	0.7	1.0	1.2	1.5	1	
4 倍	5 倍	37°C		5.0	9.0						
	25 倍	37°C		2.8	5.0	7.0					
	125 倍	37°C		0.5	1.5						

※ 48 時間迄 37°C, 以後室温で反応させた。

表において沈降帯の数が最も多かつたのは血清原液に5倍稀釈ツベルクリンを重層しこれを37°Cに48時間置いた場合で、7日目に8本の沈降帯を認めた。以下Band数が多いのはいずれも孵卵器に入れたもので25倍稀釈ツベルクリンで6本、125倍で3本、625倍で2本の沈降帯が認められた。

血清を4倍に稀釈すると沈降帯の数は減じ、ツベルクリン稀釈が5倍の時3本、25倍では3日目に2本現われ、125倍では1本、625倍では全く沈降帯が認められなかつた。

第2図 沈降帯の長さや温度ならびに時間の関係



た。いずれの場合も3日目位から漸次色がうすくなり、1週間後には測定困難となつた。

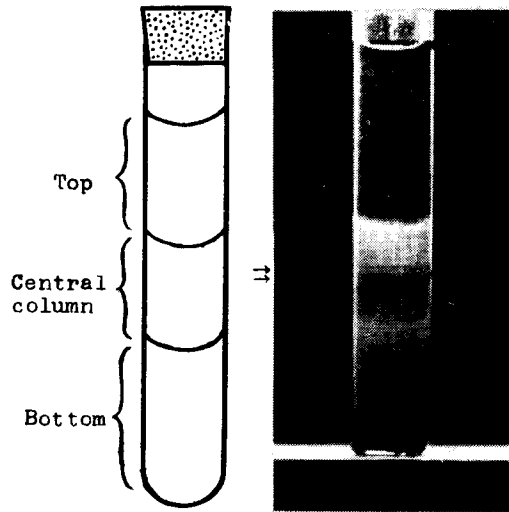
また表にみるごとく反応温度が高い方が沈降帯の移動速度は速いが、それを室温にすると、7日目には最初から室温に置いたものとはほとんど差を認めなくなる。然し孵卵器に入れた場合は沈降帯の数が多しばかりでなく、Bandの現われ方自体も遙かに鮮明であつた。

考 察

ツベルクリンは云う迄もなく結核菌の培養濾液であるから、その中には培地成分はもちろん、菌の代謝産物な原らびに菌体成分など雑多なものが含まれている。かかる抗的多元性は、上述の Oudin の technigue において10本以上の沈降帯を作ることにより確認することができた。すなわちツベルクリンは少くとも10種類以上の部分抗原から成り立っており、結核血清中にはそれぞれに対する抗体が産生せられている。前記のごとくこの沈降帯の数は Oudin 以来各研究者によつて抗原抗体系の最小限の数を表すものと考えられている。すなわち抗原性物質中に含まれる各部分抗原はそれぞれ寒天層中を拡散して行く速度が違うので、抗体と Optimal な proportion において沈降帯を作る場所が少し宛違つてくる。したがつて形成された Band の数だけ抗原抗体系が存在することになるが、

この際異つた部分抗原でも拡散速度が略々等しいものもあり得るし、また生じた Band がごく近いものではお互に重なり合つて1本にしかみえない場合もあり得る。かく考えると Band の数は抗原抗体系の最少限の数を表わすと考えるのは妥当であるが、一方ある程度反応時間が経過した場合には、Oakley¹²⁾等のいう“splitting”も考慮に入れなければならない。すなわち Oakley の観察によれば、試験管を37°Cにおく場合、incubationの時間が長くなると生じた flocculation line は水平に“splitting”を起し2本の line に分れるという。われわれの実験の場合、例えば第1表のごとく10倍稀釈ツベルクリンでは13日目に Band の数は8本みられ、このあたりまでは比較的はつきりと Band 数を読み取れたが、その後増加してきたものは果して新しい沈降帯であるか又は分離によるものであるか、これをはつきり決めることは難かしい。Oakley によれば“splitting”によるものは同じ density をもっているので、他の部分抗原による異つた density のものとは容易に区別できるというが、沈降帯の数がある程度以上多くなると、實際上この区別はなかなか困難である。

第3図 Oakley & Fulthorpe の変法による寒天内沈降反応



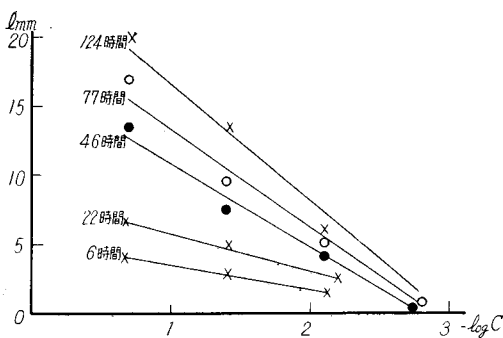
なお Oakley の方法は Oudin の方法を多少改良したもので、抗体層に直接抗原を重ねず、図3のごとく抗原と抗体の中間に寒天だけの層を置きこの中間層に沈降帯を作らせるものである。図3における右側の写真はわれわれが実際にこの方法を追試してみたものの1例で、抗原は10倍稀釈ツベルクリン、抗血清は2倍稀釈のBCG免疫家兎血清である。Oudinの方法とOakleyの変法とを比較してみると、われわれの経験によれば優劣相半ばしていると

いうべきであろう。すなわち生ずる沈降帯は Oakley の方が明瞭で美しいが、中間層を距てるために移動が遅く計測にかなり不便である。また Oudin に比し多量の material を必要とするのも短所であろう。

小西²⁵⁾はわれわれと同様な実験を馬の血清について行い、ツベルクリン原液を用いた場合に 18 本の沈降帯を認めている。これはわれわれの成績よりかなり多いが、実験条件の差違によるものか、あるいは動物血清に馬と家兎という種属的な相違があることによるものかは遽かに判定できない。更に又小西の場合は、ツベルクリン原液を用いた際に本数が最も多く、以下稀釈倍数が進むにつれて本数は急激に減少している。われわれの成績はこれと反対に 10 倍稀釈ツベルクリンの方が Band 数は多くみられた。これは実験成績の項に述べたごとく事実もその原因の 1 つではあるが、教室におけるツベルクリンを抗原とした他の血清反応の成績から推せば、ツベルクリンとこれに対する抗体の間には一定の Optimal な proportion があることを考えないわけには行かない。また Ouchterlony の方法にしたがつて行つた寒天内沈降反応の場合も、2 倍稀釈血清に対してツベルクリンを 80 倍に稀釈したものが、これより濃いツベルクリンを用いた場合よりも常に強い反応を起した。いつれにせよツベルクリン原液をもつてした場合、小西のごとき多数の Band は、どうしても観察することができなかつた。

つぎに沈降帯の移動は抗原濃度の対数に比例するか否かを調べるため、第 2 表の室温における成績についてこの

第 4 図 抗原濃度と沈降帯の長さとの関係 (1)

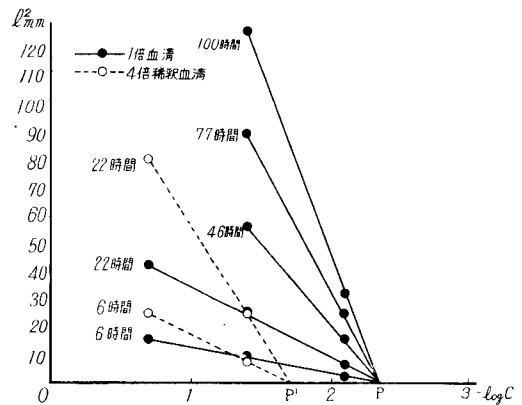


関係を图示してみた。図 4 がこれである。図から明らかのように、大体において直線関係を認めることが出来た。ただしツベルクリンが特に濃いか特にうすいものにおいては 1, 2 例外的に直線からはずれるものもあつたが、これを許容するならば、沈降帯の移動は濃度の対数に略々比例するものと見做することができる。

翻つて図 1 をみるに、各直線が横軸と交る点はすべて

が原点であるとは限らないようであるが、Munoz²⁶⁾によれば沈降帯の観察点を結ぶとそれぞれ定つた傾斜の直線が得られ、これらは横軸と一定の点で交るといふ。しかしその点は彼によると沈降帯の移動しはじめた時期を示すものである。このことは一定の実験誤差を許す範囲内において大体正しいものと考えて良い。遅れて現われた Band は拡散速度が遅いものか、または濃度が低いために移動速度が遅くなる。したがつて図では傾斜が緩く現われる。

第 5 図 抗原濃度と沈降帯の長さとの関係 (2)



増山²⁷⁾は寒天内における一次元拡散の理論式と実験式を發表し、高橋等²⁸⁾はその式の検討を行つてゐるが、用いた拡散物質の濃度を C 液体と媒質との境界面より l だけ離れた距離にある拡散物質の有効濃度を k, 拡散開始後の経過時間を t, 媒質中を物質が拡散する際の拡散恒数を D とすれば、一般に

$$2C > k \text{ の範囲で } \log C - \log 2k = \frac{l^2}{\pi Dt}$$

なる Fick の拡散式が成立する。

これについて影山等^{29)~31)}は、彼等の実験から $C \gg 2k$ の範囲で

$$\log C - 2 \log k = \frac{l^2}{\pi Dt}$$

なる式によつて計算した方がより近い値を得ると述べてゐる。

そこでわれわれは、この式によつて今回の成績を图示してみた。図 5 は表 2 の成績を plot したもので、各時間毎の直線は横軸上の一点 P (4 倍血清の場合 P') において交ることが明らかとなつた (ただしこの図においても 22 時間までは図の通りであるが、46 時間以後になると 5 倍稀釈ツベルクリンの成績が直線上に載らなかつた)。

結 論

Oudin の方法によつてツベルクリンの抗原的多元性

を実証し、沈降帯の現われ方について観察した。

1) ツベルクリンは最少限 10 個の部分抗原から成る。寒天層中沈降反応において生ずる沈降帯の数は、抗原濃度、抗血清濃度、経過時間などによつて異なるが、ツベルクリンを抗原とした場合、われわれの実験では原液よりも 10 倍稀釈ツベルクリンの方に多数の Band を観察し得た。

2) 沈降帯の移動は度時間の平方根と抗原濃度の対数に比例する。ただし抗原濃度が特に濃いかまたは特にうすい場合、および反応時間が特に長くなつた場合には、この関係が破れてくる。

(稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜わつた大原教授に深謝致します)

引用文献

- 1) Oudin, J. : C. r. Acad. Sci., 222, 115, 1946.
- 2) Oudin, J. : Bull. Soc. Chim. Biol., 29, 140, 1947.
- 3) Oudin, J. : Ann. Inst. Past., 75, 30 & 109, 1948.
- 4) Oudin, J. : C. r. Acad. Sci., 228, 1890, 1949.
- 5) Oudin, J. : Meth. med. Res., 5, 335, 1952.
- 6) Bechhold, H. : Zeit. physik. Chem., 52, 185, 1905.
- 7) Petrie, G. F. : Brit. J. Exp. Path., 13, 380, 1932.
- 8) Sia, R.H.P. and Chung, S. F. : Proc. Soc. Exp. Biol. and Med. 29, 792, 1932.
- 9) Kirkbride, M. B. and Cohen, S. M. : Amer. J. Hyg., 20, 444, 1934.
- 10) Brown, R. : Proc. Soc. Exp. Biol. N. Y., 45, 93, 1940.
- 11) Petrie, G. F. & Steabben, D. : Brit. Med. J., I, 377, 1943.
- 12) Oakly, C. L. and Fulthorpe, A. J. : J. Path. and Bact., 65 (1), 49, 1953.
- 13) Ouchterlony, Ö. : Acta Path. microbiol. Scand., 25, 186, 1948.
- 14) Ouchterlony, Ö. : Ark. Kemi. Min. Geol., 26B., 1, 1949.
- 15) Ouchterlony, Ö. : Acta path. microbiol. Scand., 26, 507, 1949.
- 16) Ouchterlony, Ö. : Ibid, 26, 516, 1949.
- 17) Ouchterlony, Ö. : Lancet, 256, 1, 346. 1949.
- 18) Ouchterlony, Ö. : Ark. Kemi, 1, 43, 1949.
- 19) Björklund, B. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 79, 324, 1952.
- 20) Björklund, B. : Int. Arch. Allergy, 4, 340, 1953.
- 21) Björklund, B. : Ibid., 4, 379, 1953.
- 22) Björklund, B. : Ibid., 5, 293, 1953.
- 23) Halbert, S. P., Swick, L. & Sonn. C. : J. Exp. Med., 101 (5), 557, 1955.
- 24) Parlett, R. & Youmans, G. P. : Amer. Rev. Tuberc., 73, 637, 1956.
- 25) 小西 忠正 : 医学と生物学, 30, 222, 1954.
- 26) Mnuoz, J. and Becker, E. L. : J. Immunol., 65, 47, 1950.
- 27) 増山元三郎 : 科学, 17, 158, 昭 22.
- 28) 高橋 暁正, 佐々木智也 : 東京医学雑誌, 59(1), 1, 1951.
- 29) 影山 成章 : 最新医学, 6(12), 67, 昭 26.
- 30) 影山 成章, 他 2 : 京都府立医科大学雑誌, 52,(3), 433, 昭 27.
- 31) 影山 成章, 森 武 : アレルギー, 2(1), 22, 1953.