非 γ -globulin 型非定型抗体検出用の抗ヒト補体 血清のつくり方の研究

札幌市立病院内科

宮 田 亮

東京大学医学部血清学教室

白 井 美 津 子 松 橋 直

STUDIES ON THE PRODUCTION OF ANTI-HUMAN COMPLEMENT ANTIBODIES FOR DETECTION OF NON- γ -GLOBULIN TYPE INCOMPLETE ANTIBODIES.

by

Makoto MIYATA

The Department of Internal Medicine, Sapporo City Hospital

Mitsuko USUI and Tyoku MATUHASI

The Department of Serology, Faculty of Medicine, University of Tokyo

Abstract

The method for producing anti-human complement antibodies previously reported by Matuhasi and Usui was further investigated. The immunization of rabbits was carried out as follows: Egg white saline to 1:5 and anti-egg white rabbit serum were mixed together with fresh human serum at the serological optimum ratio. After the precipitate was centrifuged, the complement titer of the supernatant was titrated. It was found that the titers were one tenth or one fortyfifth of the initial titer of the fresh serum, in other words, about 60 to 100 units of complement were fixed to the precipitate.

The three times washed precipitate was injected into rabbits subcutaneously twice a week for 3 to 4 weeks. Ten days after the last injection the rabbits were bled and the obtained antisera were tested by direct and indirect Coombs tests, the Ouchterlony technique and the analysis by the field reaction of the ring test. It was confirmed from these techniques that the antisera contained mainly anti-non- γ -globulins, in particular anti-complement antibodies.

The anti-human globulin antisera containing mainly anti- γ -globulin were prepared by immunizing the rabbit red blood cells treated with the heated supernatants which human complement had already been absorbed with the precipitate. The rabbit red blood cells were expected to be coated by human heteroantibodies belonging to the γ -globulin and to fix only small quantity of complement. In fact it was observed by the various serological techniques that the immunized rabbits mainly produced anti- γ -globulin antibodies.

These findings would lead to the conclusion that anti-human complement antibodies can be easily produced by immunization with antigen-antibody complex which is able to fix human complement.

Coombs 試験によつて見出される非定型自己抗体は γ -globulin に属すると考えられていたが Dacie, Mollison 等¹⁾の研究により非定型冷式抗体, 抗 Le^a あるいは抗 P 非定型抗体のあるものは, むしろ抗- α -, - β -globulin 抗体のみを含む抗血清で証明されることがわかり, このことか

ら最近では、抗- γ -globulin 抗体によつて検出される非定型自己抗体を γ -globulin 型抗体といい、抗- α -、 β -globulin 抗体で検出される抗体を非- γ -globulin 型抗体、あるいは補体結合性抗体と呼ぶようになった。この非- γ -globulin 抗体も実際には γ -globulin に属するのであるが、非- γ -globulin (おそらく補体) が感作赤血球の表面に結合しているため、一見非- γ -globulin 抗体が結合しているような態度をとるものであらうといわれている。

彼等が上記の事実を証明するにあつて、一応純粋と考えられる抗- γ -globulin 血清及び抗- α -、 β -globulin 血清をもちいたのであるが、前者はヒト血清でウサギを免疫してえられた抗ヒト血清を、agammaglobulinemia の患者血清で吸収してつくつたものであり、かかる患者が比較的稀であるところから、いつでもこのような方法が簡単に利用出来るものではない。又後者の抗血清として Mollison がもちいたものは Gell²⁾ が供給したものであるが、ヒト血清でウサギを免疫して偶然にも抗- γ -globulin を含まず、抗非- γ -globulin のみをふくむ血清がえられたものであるという。Gell の発見は多分に偶然的な所産のように思えるが、このことはわれわれの前の報告⁴⁾ からわかるように免疫の比較的早期に採血日を適当にえらべば容易にうることができるが、力価の高いものはえがたいし、又理論的に確実な方法とはいひ難い。さきにわれわれは、卵白とそれに対応するウサギの抗体との沈降物にヒト血清補体を結合させたものでウサギを免疫すると、ヒト血清の補体成分に対する抗体をつくることを経験したので、抗非- γ -globulin 抗体あるいは抗- γ -globulin 抗体のみを夫々単独に含む抗血清を、一定の方法で確実にえようとして、つぎのような実験をおこない、注目すべき結果がえられたので、つぎに報告する。

実験方法

1. 免疫方法 a) 抗-非- γ -globulin 血清 (抗ヒト補体血清) のつくり方: まず抗ニワトリ卵白ウサギ血清 (ab)・5 倍稀釈ニワトリ卵白 (Ew)

反応系の最適比を、沈降反応重層法による場の形、混合法および補体結合反応等から求める。この最適比の Ew と ab に、補体として Ew (1:5) と等量の新鮮ヒト血清 (HC') を加える。沈降物を大量にうるため、たとえば、ab: Ew の最適比が 1:2 であつたらば、ab 5 ml, HC' 10 ml, Ew 10 ml の順序で混合し、一昼夜氷室に放置後遠沈、えられた沈降物を更に冷却遠沈により生理食塩水で3回洗う。最後の遠心沈渣に 6 ml の生理食塩水を加え、その 2 ml 宛を 3 匹のウサギに週 1~2 回、総計 5~8 回皮下注射し、最終注射より 10 日目に全採血した。この抗血清を抗ヒト補体血清 (抗 Ew ab HC') と名づける。

b) 抗- γ -globulin 血清 (抗-RRC・nha (—HC')) のつくり方: a) の混合液の遠沈上清は後述のように大部分補体を消費されたヒト血清を含んでいるわけであるが、一部 (約 3 ml) を後述の補体価測定用に氷室に保存し、残りの約 20 ml を加温 (56°C 30 分) する。この加温上清の $1/3$ すなわち約 7 ml 宛を、食塩水で 3 回洗つた 3 匹のウサギ赤血球 (RRC) 沈渣約 2 ml 宛のそれぞれに加えて、37°C のユブネに 2 時間保つ。これを食塩水で 3 回洗つたのち、再びそれぞれの元のウサギの皮下に注射する。要するに上清中に含まれるヒト血清中の RRC に対する異種凝集素 (nha) で感作された RRC を再び元のウサギに自家注射したわけである。このような免疫注射を週 1~2 回、計 6~8 回くり返し、最終注射より 10 日目に全採血した。この抗血清を抗- γ -globulin 血清 (抗-RRC nha (—HC')) と名づける。

2. 補体価の測定

免疫の前日すなわち上述の抗原作製時もちいた新鮮ヒト血清を一部翌日までドライアイス中で凍結保存したものと、1・b) で不活性化せずに保存した上清の両者を同時に測定した。

測定方法は Wassermann 反応緒方法の補体価測定に準じたが、補体として使用した新鮮ヒト血清は 20 倍および 40 倍稀釈とし、上清はそのままもちいた (但し上清中のヒト血清はの場合 Ew および ab で 2.5 倍に稀釈されている)。光電比色

計を用いて測定する関係上、各成分（補体，Mg 食塩水および2%感作ヒツジ血球）を緒方法の補体価測定の場合の倍量宛混合し、37℃、30分ユブネで加温したのち、各試験管に更にMg 食塩水を2ml 宛加え総量を4ml とし、これを遠沈、その上清について溶血度を光電比色計（日立製U型、波長530mμ）をもちいて比色し、50%溶血価を求め、それぞれの補体単位を測定した。

3. Coombs 血清（抗-globulin 血清）の血清学的検定.

上述の免疫方法でえた2種類の抗血清について、夫々免疫電気泳動法（Grabar 法）、Ouchterlony 法、沈降反応重層法、間接 Coombs 試験を試みた。

実験成績

1. 抗原抗体複合物によるヒト補体の結合：各回免疫抗原作製時における新鮮ヒト血清と上清の補体価測定値は表1の通りである。すなわち上清

表1 新鮮ヒト血清及び上清の補体単位

	新鮮ヒト血清 (単位)	上清 (単位)
第1回抗原作成時	68.06	6.77
第2回 "	94.80	3.40
第3回 "	60.20	2.11
第4回 "	106.96	6.20
第5回 "	78.16	4.60
第6回 "	85.04	2.52
第7回 "	86.72	2.30
第8回 "	108.32	2.35
第9回 "	70.84	1.93

中のヒト血清の補体価は新鮮ヒト血清の $\frac{1}{10} \sim \frac{1}{45}$ に低下している。このことから、前述の実験方法1a)の免疫原作製法によりHC'の大部分がEw・ab複合物にとりこまれたことになり、沈降物中のヒト補体の結合量は600~1000単位と考えられる。この沈降物中でウサギに対して抗原性をもつものは卵白とヒト補体だけで、ヒト補体成分に対する抗体が産生される可能性は充分にある訳である。また上清においては補体活性がきわめて低下しており、従つて、実験方法1、6)においては、不活性化した上清に混じっているヒト血清

のnhaでRRCを感作したのであるから、HC'がこれに結合することはそれほどないと考えてよいであろう。しかもRRCに対するnhaは、ヒト血清中のγ-globulin 分画に属すると考えられるので、ヒトγ-globulin で感作されたRRCをもちいて免疫したことになり、ヒト血清成分に対する抗体としてはγ-globulin に対する抗体のみが産生される可能性が考えられる。

2. 抗血清の免疫電気泳動法の成績（表2）：抗Ew ab HC' 血清においては、ヒト血清のα₁、α₂、β₁、β₂-globulin 分画に分布する3~4本の沈降帯が証明されたが、albumin およびγ-globulin に対する沈降帯は証明されなかつた（図

表2 ヒト補体結合沈降物による免疫血清と補体をとりのぞいたヒト血清で感作したウサギ赤血球による免疫血清の特性

ウサギ番号	免疫原	Grabar			Ouchterlony				間接Coombs試験		重層法 (血清と赤血球)	
		γ	β_2	Al	ヒト血清	F-V	P	PII	抗体価	低温抗体価		
656					2				0	1:128	1:4	
658	卵白・抗卵白・				2	0	1	1	1:2	1:256	1:32	4 ⁵
659	ヒト補体				3	1	2	1	1:4	1:256	1:32	5 ⁶
801	結合沈降物				2	0	1	1	1:8	1:512		4 ⁶
(Ew-ab-HC')					2	0	1	1	1:8	1:4096		4 ⁸
802					3	0	2	2	1:64	1:4096		4 ⁸
799	補体を除いたヒト血清で感作したウサギ自己赤血球				1	0	1	1	1:28	1:2		2 ³
804	(R6C-nha-HC')				1	0	1	1	1:256	1:4		3 ⁹
805					1	0	1	1	1:128	1:8		4 ¹⁰

1). 抗RRC・nha (—HC') 血清では後述重層法の成績が示すとおり、抗体価が極めて低いためか、一般に沈降帯の形成はわるく、No. 766、804のウサギにおいて、ヒト血清γ-globulin 分画に分布する細い沈降帯の形成が認められたが、No. 805ウサギでは証明できなかつた（図2）。

3. Ouchterlony 法の成績（表2）：ヒト血清、Cohn 分画のF-V., P.II_{1,2} および P.III₀ を抗原としてもちい、前述の2方法で免疫して得られた抗血清の抗体分析をおこなつた。ただし、これらのCohn 分画は前報⁴⁾でものべたように電気泳動法的には純粹でなく、P.II_{1,2}は主としてγ-globulin を含むほか、β-globulin もふくんでおり、P.III₀は多量のβ-globulin をふくむほか

α -, γ -globulin もふくんでいる。従つておのの分画に対する沈降帯は必ずしも1本とは限らず、また互に融合するものがあり、同一成分を含んでいることを示している。その成績は表2のとおりである。

すなわち、抗 Ew・ab・HC' 血清群では、ヒト血清に対して2~3本、PII_{1,2} および P-III₀ に対しては夫々1~2本の沈降帯をつくつたが、F-Vに対しては全く形成されなかつた。

又抗 RRC・nha (-HC') 血清では一般に沈降帯の発現が前群に比し遅れ、3~4日後にようやく出現し始めた。ヒト血清、P-II_{1,2}, および P-III₀ に対してそれぞれ1本宛の沈降帯がみられ、しかもこれらには連絡がみられた。F-Vに対してはやはり沈降帯の形成はみとめられなかつた。

以上の成績からは各抗血清がもつ抗体の種類のおよその推定は出来るが、決定することは難しかつた。しかしこの Ouchterlony 法の成績が免疫電気泳動法で数種の抗- γ -globulin 抗体が検出された抗 Ew ab HC' 血清では上述のように数本の沈降帯が形成され、抗- γ -globulin 抗体のみ検出された抗 RRC nha (-HC') 血清ではそれが単一であつたことから、両法の成績がよく一致していることがわかる。

4. 間接 Coombs 試験の成績(表2): 抗 Ew ab HC' 血清では何れも非- γ -globulin 型の非定型冷式抗体、抗-Le 抗体で感作した赤血球に対して強い凝集価を示した(非定型冷式抗体に対する終価に1:512~4096, 抗-Le 抗体に対する終価は1:4~1:32が、 γ -globulin 型の非定型抗 D 抗体で感作した赤血球に対しては一般に低く、No 803のみ1:64であつたが、他は何れも1:8以下であつた。

之に反し、抗 RRC・nha (-HC') 血清では抗 D 感作赤血球に対しては、1:128~1:256であつたが、冷式抗体、抗 Le^a 抗体感作赤血球に対しては1:8以下の価にすぎなかつた。

したがつて、ヒト血清補体を結合したウサギ抗体による沈降物でウサギと免疫してえられた抗血

清は、抗-非- γ -globulin 抗体を主として含み、補体をほとんどりのぞいたヒト血清中の抗ウサギ赤血球抗体を結合したウサギ赤血球でウサギを免疫してえられた抗血清は、抗- γ -globulin 抗体を主としてふくむであろうというわれわれの予想はあたっているようである。

5. 沈降反応重層法の成績(表2): 正常ヒト血清を抗原として両群の抗血清の沈降反応重層法による場の形をみると、両群共大体において矩形であつた。又免疫電気泳動法で α -, β -globulin に対する抗体のみ検出された抗 Ew ab. HC' 血清では pG₁₀ 7~8, pP 4~5であつた。抗- γ -globulin 抗体のみ検出された抗 RRC nha (-H') 血清では pG₁₀ 9~10であつたが、pP 2~4にすぎなかつた。

総括

以上の実験成績を総括すると次のことがいえる。

1) 卵白、抗卵白血清沈降物にヒト補体を結合させた免疫抗原をもちいて免疫した抗 Ew・ab・HC' 血清では、沈降反応重層法の成績からもわかるように、抗体価は一般に上り易く、免疫電気泳動法ではヒト血清 α -, β -globulin に対する抗体のみが検出され、間接 Coombs 試験では非- γ -globulin 型抗体(不完全冷式抗体(Dacie), 抗 Le^a 抗体)で感作した赤血球を強く凝集し、 γ -globulin 型(抗-D抗体)抗体で感作した赤血球に対しては No. 803 ウサギをのぞいては凝集価はきわめて低かつた。すなわち、この免疫方法で、非- γ -globulin 型非定型抗体検出に使用し得る満足すべき Coombs 試験血清をうる事ができるといえる。

2) 前述の免疫抗原をつくるとき沈降物を除去した上清中には、ヒト補体が殆ど結合しさられるが、この上清中のウサギ赤血球に対する異種凝集素で感作したウサギ自己赤血球を免疫抗原としてウサギを免疫してえられた抗-RRC・nha (-HC') 血清では、抗体価はきわめて上昇しにくかつた。したがつて免疫電気泳動法でも、Ouchterlony 法でも沈降帯の形成は弱く、しかも前群に比しお

くれて証明せられたが、前者においてはヒト血清 γ -globulin に対する抗体のみが検出され、後者においては単一の抗体が産生されていることが推定される成績がえられた。間接 Coombs 試験では、 γ -globulin 型抗体で感作した赤血球に対する凝集価は高く、非- γ -globulin 型抗体で感作した赤血球に対する凝集価は極めて低かつた。

結語

以上の実験成績から、われわれはこの実験の目的であるヒトの非- γ -globulin ことにヒトの補体成分に対する Coombs 血清をつくることに成功し、免疫血液学的疾患において意味があるといわれる γ -globulin 型抗体あるいは非- γ -globulin 型抗体（補体結合性抗体）の鑑別をたやすくする

方法を案出したものと信ずる。

文 献

- 1) Mollison, P.L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, pp 299—310, Oxford, 1956.
- 2) Gell, G.H.: 同上301.
- 3) 松橋直: Coombs 試験, 臨床病理, 5 (4): 315, 昭32.
- 4) 松橋直, 臼井美津子: Coombs 試験血清の簡単なつくり方, 医学と生物学, 42 (3): 88, 昭32; Coombs 試験の特異性に関する研究, 第1報, Coombs 試験血清のいろいろなつくり方, 同誌, 44 (3): 123, 昭32. 第2報, 免疫電気泳動法からみたいろいろな Coombs 血清の特長, 同誌, 46 (6): 258, 昭33.
- 5) 松橋直: Coombs 試験に関する諸問題, 日本の医学の1959年—第15回日本医学会総会, 学術集会記録—第IV巻 pp 142—149, 1959.