抗原抗体反応に関する研究

第3報 抗原抗体反応による妊娠反応の可能性について

河 合 広

大阪市立大学医学部生物物理学研究室 (主任 西脇 安)

(受付: 12月21日1955年)

概 要

妊娠反応として性腺刺激ホルモン即ち Gonadotrophin の有無を単又は家兎を用いて検査する生物学的方法是従来実用化されているが、之を *in vitro* で行うとしたのが本実験の目的である。

原理としては、性腺刺激ホルモンで免疫された家兎血清と、妊娠したと思われる婦人の尿中に予想される Gonadotrophin との沈降反応を重層法で調べるのである。

免疫抗原としては牛又は馬の脳下垂体前葉と中絶妊婦の胎盤から精製した帝国臓器製 Synaphorin を使用した。但し之だけでは家兎を免疫することが困難であるので、Cristalline egg albumin 溶液と混合して一部結合させて免疫した。この抗血清は Synaphorin 溶液とよく反応するので、当然妊婦尿中に存在する Gonadotrophin とも反応すると考えたのである。

然るに実施の結果否定的であつた。確実に妊娠しているいろいろの月の婦人の尿について行つたテストは陰性であり、陽性に出た場合は不妊の人の尿も、又更に無機塩溶液に対しても陽性に出たことがあつて、実用にならない。

陽性に出ない理由としては、尿中の Gonadotrophin が小量すぎて本テストにかゝらないか、抗原の特異性が違うかであろうと考えたが、Heidelberger 氏の意見では恐らく尿中にある他の類似ハプテンによる cross reaction で阻止されるのではなからうか、ということである。

此の反応を成功させるは抗原として更に純粋な製品即ち妊婦尿から精製した Antuitrin S 等で追試してみる必要があろう。

此の方法は現在の所妊娠反応としては実用性をもたないが、免疫原性のない他のホルモン又はステロイド系物質の微量の検出又は定量には応用出来るかも知れない。

緒 論

性腺刺激ホルモン即ち Gonadotrophin は現在次の3種類に分類出来る。

1. 卵胞刺激ホルモン Follicle-stimulating hormone FSH
2. 黄体化ホルモン Luteinizing hormone, LH 又は ICSH
3. 黄体刺激ホルモン Lutetrophic hormone, Lutetotrophin: LTH 泌乳ホルモン Prolactin

脳下垂体前葉は此の3種をすべて含む¹⁾。之に反して妊婦尿中には LH のみ含まれ、之は胎盤の産生による^{1,2)}。脳下垂体前葉の産生する LH と胎盤 LH と同じものかどうかは不明である。

馬の胎盤では FSH を産生するが、人間の胎盤では FSH が産生されるかどうか不明である。LTH は胎盤には少くも Prolactin としては含まれていない³⁾。

妊婦尿中の LH を主とした Gonadotrophin は絨毛性 (Chorionic) Gonadotrophin C. G. と呼ばれ之を生物学的に検査して妊娠鑑別反応とすることが出来る。即ち、

1. Aschheim-Zondek 反応 (雌マウス又はラット)
2. Friedman 反応 (成熟雌兎)
3. Galli-Mainini 反応 (雌ガマ、トノサマカエル)

1の Aschheim-Zondek 反応は雄マウス又はラットに妊婦と推定された婦人の尿を注射し約2日後卵巣を観察して卵胞内出血又は黄体形成を認めれば妊娠と判定する。

Hiroshi KAWAI: Studies on the antigen antibody reactions. III. Possibility of the serological diagnosis of conception. —Jap. J. of Bact., 11(8), 661-666, 1956.

此の実験の概要は1955年9月上旬大阪市医学会において発表したものである。

2. の Friedman 反応は 2.3kg 以上の経産兎に尿を注射し、48時間後観察して排卵による出血点と卵胞血腫を認めれば妊娠と判定する。

3. の Galli-Mainini 反応は 雄マウス又はトノサマカエルを用い、気温を約20°Cにして妊婦尿を皮下リンパ嚢内に注射後1～6時間及び24時間に排精を検査する。1及び2より早く判定出来るが確実性が稍劣る。現在は2がよく利用される。

筆者は上記の生物学的検査法に代るものとして *in vitro* の抗原抗体反応を利用した検査が可能かどうかを試みた。即ち婦人が妊娠してから2週間位の間に LH を主体とする Gonadotrophin が尿中に現われ、之は分娩直前迄及ぶ。そこでこの LH で免疫した家兎血清を用いて抗原抗体反応を行えば尿中の LH が検出出来るわけである。

免疫抗原としては哺乳動物の脳下垂体前葉と胎盤から抽出した Gonadotrophin の混合物たる 帝國臓器製の Synaphorin の20又は50家兎単位を用いた。

実験の結果を先に述べれば、現在迄の実験によれば妊娠反応としての実用性是否定的であるが、更に立入った検討が必要であるように思われる。

実 験

A. Synaphorin による免疫

重さ約3kgの雌家兎に帝國臓器製 Synaphorin を毎回20家兎単位宛5日及び7日の間隔で3回注射した。第3回注射後4日を経て3cc採血、遠心して血球分離、30分間57°Cで非働化して試験血清とした。抗原としては Synaphorin 20家兎単位を生理食塩水1ccに溶かし、同食塩水で倍数稀釈列を作った。対照抗原には生理食塩水を用いた。予め村田試験管に分注された試験血清上に上の稀釈列を重ねた。

結果は最初対照共皆一様に極めて微弱な白輪が界面に現われたが、30分間37°Cの incubator に入れた後も、更に1時間氷室に入れた後も界面の状態は変わらなかった。翌朝はそのわづかの白輪は皆消失していた。

此の実験によると Synaphorin の免疫原性は殆ど無いものと考えられる。

尿中の性腺刺激ホルモン、即ちこの場合は胎盤から抽出した Gonadotrophin が蛋白であることはそれが蛋白分解酵素で不活性にされることによって明かである。即ち Haurowitz 等によるとそれは pepsin, trypsin で不活性化されるが peptidase の場合は影響がない。

大抵の場合蛋白は免疫原性があると期待されるが上のわづかの実験では免疫原性があるにしても微弱で重層反

応で Gonadotrophin の存在を確めることは困難である。そこで筆者は Synaphorin を免疫原性ある蛋白で入手し易い Egg albumin 結晶の水溶液に混合し、albumin と結合させて免疫する次の実験に移った。

B. Synaphorin と Egg albumin 混合液による免疫

Synaphorin 50家兎単位を生理食塩水2ccにとかす。之に2% Egg albumin 結晶溶液（八洲製薬）2ccを加え混合し二昼夜おく。

此の混合液を半分宛雌家兎A、Bに注射する。別表の如く3回注射してから耳静脈より採血する。

	A 家 兎	B 家 兎
注 射	6 月 22 日	6 月 23 日
	6 月 27 日	6 月 27 日
	7 月 2 日	7 月 2 日
採 血	7 月 6 日 8cc	7 月 6 日 5cc

血球を遠心分離し、57°Cで30分間加熱非働化して更にわづか出来た沈澱をとるために No. 5 濾紙で濾過したものを実験血清とした。

抗原としては2% Egg albumin 水溶液を水で倍数稀釈したもの、及び20家兎単位の Synaphorin を生理食塩水1ccにとかして更に生理食塩水で倍数稀釈したもの、対照としては前者は水、後者は生理食塩水を用意した。村田試験管に先づ試験血清を入れ、其の上に上記抗原を重ねた。結果は次の Table 1 に示す。

即ちB家兎血清は加えた2% Egg albumin 溶液は血清を乱したため白輪が出来なかつたが他は全部明確な白輪を生じ、対照には殆ど白輪が見られなかつた。

以上の結果から Synaphorin 単独では免疫原性が殆どないが、Egg albumin と混合しておけば一部 albumin と化学的に結合して免疫原性をもつて来るので、この抗血清と Synaphorin と反応出来ると考えられる。即ち此の場合 Synaphorin は蛋白ではあるが、免疫原性のない hapten のように考えられる。

C. 妊婦尿を抗原とした抗原抗体反応

実験BにおいてA、B家兎血清が Synaphorin と反応することが分つたので妊婦尿と反応試験を試みた。前記A、B家兎血清の残りを使用し後Aより再度採血して使用した。

当大学医学部附属病院産婦人科より妊婦尿を貰い上記血清に重ね30～40分後境界面に白輪が出来るか否を見た。此の結果を Table 2 に掲げる。

Table 1

抗 原 家兔血清	Synaphorin				Saline	Egg albumin				Water
	1	1/2	1/4	1/8		2 %	1 %	0.5 %	0.25 %	
A	+	+	+	+	—	+	+	+	+	—
B	+	+	+	+	—	—*	+	+	+	—

* 界面乱れて diffuse

Tabel 2で分るように8月11日迄は確実に妊娠している婦人の尿について殆ど陰性に出たが、14日以後は不妊の婦人の尿迄陽性に出ている。陰性に出るのは尿中のホルモン濃度の不足ではないかと考えて微温で蒸発させ容積を減らせて重ねて見たが、矢張り陰性であつた（7月10日）。更に久保氏によるホルモン濃縮法（Kaolin を用うる Scott の簡易法⁴⁾）を試みると今度は妊婦尿も不妊

婦尿と共に陽性に出た（Table 3）此の Kaolin 濃縮法の操作は次の通りである。

1. 尿約 100ccに20%醋酸 4 ccを加えて振る。
2. 20% Kaolin 又は白陶土液 5 ccを加えて3分間振る。
3. 15~20分放置して上清をすて、残液を No. 5 B の濾紙で濾過。

Table 2

測定月日	被検者氏名		妊娠週	判 定	
7月7日	三	木	8	A家兔血清	+
	福	田	12	(7月6日採血)	—
	久	保	13		—
	地	木	15		—
7月8日	工	藤	7	A家兔血清	重層不能
	村	瀬	13	(7月8日採血)	—
	笠	原	16		+
	三	木	8	重層不能	—
	福	田	12		±
	地	木	15		±
	中	尾	8		—
	小	林	7		+
7月10日	中	尾	8	} 38°C で容積を 1/8 に尿を濃縮しこの上に血清を重ねる	—
	小	林	7		—
	井	上	10	} 以下平常通り血清の上に尿を加える	—
	山	本	31		—
7月11日	工	藤	7	} 3時間後に白輪の跡見えた	—
	村	瀬	13		—
	笠	島	16		—
	三	木	8		—
	福	田	12		—
	地	木	15		—
	小	林	7		—
	中	尾	8		—
	山	本	31		—
	井	上	10		—

Table. 2 (続き)

測定月日	被検者氏名	妊娠週	判 定		
7月14日	山 田	9	A家兎血清	++	A家兎血清
7月15日	山 田	9	(7月11日採血)	+	(7月15日採血)
	岡 本	8		+	
	林	16		+	
	大 平	10		+	
	大 財	6			
	絨 藤	8			
	八 反	12			
	森 下	12			
	栗 原	13			
7月16日	不 妊	○			+
7月23日	○ ○	16	A家兎血清	+	C家兎血清
	奥 村	14	(7月21日採血)	+	(7月21日採血)
	大 津	10	境界乱る		Egg albumin のみで免疫
	中 村	9		+	境界乱る
	○ ○	6.5		+	
	不 妊 1	0		+	
	不 妊 2	0		+	

Table 3

7月16日

Kaolin 濃 縮 尿	抗血清		A家兎血清 (7月15日) Synaph, E. Alb. で免疫	B家兎血清 (7月15日) Synaph, E. Alb. で免疫	C家兎血清 (7月15日) E. Alb. のみで免疫
	妊 娠 週	妊 娠 週			
財 藤	6		+	+	+
不 妊	0		+	+	+

Table 4

7月22日

抗 原	抗 血 清		A家 兎 血 清 7月21日採血	B家 兎 血 清 7月21日採血	C家 兎 血 清 7月21日採血
	添 加 直 後	添 加 直 後			
Synaphorin			+	-	-
リンゲル液 (冷血動物用)			-	-	-
Synaphorin	数 時 間 後	数 時 間 後	+	+	+
リンゲル液 (冷血動物用)			+	+	+

4. 濾紙の沈渣を5ccの0.1N NaOHで洗い流す。
その濾液に20%醋酸3滴落して試料液とする。

Kaolin濃縮をしない妊婦尿も不妊婦尿も14日以後はすべて陽性に出るので、此の陽性はGonadotrophinによる陽性ではない。対照に加えた食塩水でも重層反応で白輪が出来ることがあるという事を聞いているので、冷

血動物用リンゲルを試験血清に重ねてみると矢張り陽性に出た。(Table4)。リンゲル液は塩化カリ、重曹、塩化カルシウム、食塩を含むからA、B、C血清全部に白輪を生じたことは、上記尿の陽性が無機塩によることを示唆すると思われるが、何故無機塩が血清反応で白輪を作るかは未だ分らない。とにかく抗原抗体双方に不純物

があるために反応が定まらないと思われるので先づ抗体を精製して反応を見ることにした。

D. 精製抗体による反応

A, B家兎を再び同様に Synaphorin, Egg albumin 混合液で3回追加免疫して、試験採血をしてSynaphorin に対する抗血清が存在することを認めて3日後全採血をした。血球を分離し、血清を非働化して10% phenol を $\frac{1}{20}$ 容加えて氷室に保存した。全採血してから13日後同血清を10cc宛混合して25% Na_2SO_4 溶液を29cc滴下して氷室に保存、2日後之を遠心して上清を除き、更に Na_2SO_4 溶液を沈澱濃度で加えて濾過し、濾紙上の残渣を水で完全に洗い流した洗液を3日間氷室において水で透析したものを精製抗体とした。以上が吉川氏による無水亜硫酸ソーダを用いた血清分割法である⁵⁾。吉川氏によれば Na_2SO_4 の11.3%から沈澱が始り、14.8%で最高の沈澱が生じ、18.5%で沈澱が止む峰が塩析法のEuglobulin であるが、之が γ -globulin と一致するとMajoor は云う⁶⁾。然しMilne はそれは β -globulin をかなり含むという⁷⁾。

Synaphorin 50家兎単位を3ccの食塩水でなく蒸溜水をとかし、之を濃度1として倍数稀釈列を作る。

γ -globulin に少量のアラビアゴムを入れ之を村田試験管の下方に分注する。アラビアゴムを入れるのは比重を大きくして重層を容易にするためである。之に上記稀釈列を重ねた結果をTable 5に示す。その結果Synaphorin に対する抗体が存在することが分る。

Table 5 10月6日

抗原 稀 釈	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	水
Synaphorin	+	+	+	+	+	-	-
10週水透析尿	-	-	-	-	-	-	-

Table 6 10月7日

抗原 稀 釈	1	$\frac{1}{2}$	$\frac{1}{4}$	$\frac{1}{8}$	$\frac{1}{16}$	$\frac{1}{32}$	水
Synaphorin	+	+	+	-	-	-	-
10週水透析尿	-	-	-	-	-	-	-
I3 "	-	-	-	-	-	-	-
14 "	-	-	-	-	-	-	-

更に水で透析して無機塩を除いた10週の妊婦尿原液を1として、水で倍数稀釈列を作り、 γ -globulin の上に重ねた結果もTable 5に示す。

同様の実験を翌日も繰返した結果をTable 6に示す。

更に念のためまだ透析していない生の10週及び14週の尿を γ -globulin に重ねても同様に全く反応は出なかった。

以上の実験から妊婦尿中のホルモンはSynaphorin 抗血清と反応しないことが分った。

考 察

以上の実験は、抗原抗体反応を利用した妊娠反応の可能性の有無を調べたのであるが、結果はかなり否定的であることが分った。

即ち妊婦尿中に現われる胎盤性 Gonadotrophin の存在を、予め Synaphorin という帝国臓器製性腺刺激ホルモンを用いて免疫した家兎血清と妊婦尿とを重ねさせて生ずる白輪の有無で判定したのである。免疫抗原の Gonadotrophin には妊婦尿の如き雑多な各種の物質を含むものを用うより、一度既に結晶化された性腺刺激ホルモン、即ち哺乳動物の脳下垂体前葉及び中絶妊婦の胎盤から抽出したホルモンを夫々一定の割合に混合した市販品 Synaphorin を用うのが適当と考えた。Synaphorin で免疫した家兎血清と Synaphorin が反応しないので(実験A)、Egg albumin 溶液と Synaphorin の溶液を予め混合して氷室に2日間おいて之で免疫した家兎血清と Synaphorin を試みると反応する事が分った。(実験B)。この事実は既に Haurowitz によつてある程度暗示されている。即ち「Insulin や多くの脳下垂体ホルモンが非抗原性、或は極めて弱い抗原性しか示さないのは恐らくその分子量が低いためであろう」⁸⁾ 又一方⁹⁾ 「Iodine の Picrylchloride やその他のニトロ化合物の様なある種の小さい分子は非経口的に注射すると、その注射した物質の誘導体に対して抗体が形成され、その結果としてアレルギー状態を惹起しようという事が大分以前から知られている。之等の物質はいずれも in vitro で容易に蛋白と結合するから、注射局所においても蛋白と結合するであろうし、こうして形成された複合蛋白が此の場合の真の抗原であろう事が推定される¹⁰⁾。同様な結果は脂質においても観察されており、脂質は蛋白溶液と混合すると矢張り抗原として作用する。この様な低分子量の抗原前駆体 (antigen precursor) は不完全抗原 (proantigen) と呼ばれており¹¹⁾、蛋白は不完全抗原に完全な抗原としての性質を与えるために必要であると考えられる。

此のように Synaphorin, Egg albumin 混合液で免疫された家兎血清は Synaphorin が hapten のように反応するけれども、妊婦尿と反応させた場合は陽性に出る場合も陰性に出る場合もある (実験C)。重層の場合

は往々無機塩溶液を血清に重ねたときも白輪が出る場合もあるので(実験C Table 3), 7月14日, 15, 16及23日の妊婦尿で出た陽性は Gonadotrophin による白輪でなく, 尿中の無機塩が原因ではないかと考えられる。何故なら Gonadotrophin が出ていないとされる不妊の人の尿についても陽性に出ているからである。

それで妊婦尿を水で透析して無機塩を除いたものについて同様な実験を試みると(実験D, Table 5, 6)陰性に出た。無機塩で何故白輪が出来るかという点はまだ分っていない。この現象は普通の考えでは起る筈がない。ということになっているが, 時に起ることもある。とも云われている。

妊婦尿との反応が陰性であるのは, 尿中の Gonadotrophin の量が生体反応には十分であつても抗原抗体反応として観察にかゝるには少すぎるのではないかと考えて蒸発又は Kaolin を用いて濃縮してから反応させてみたが, 結果は上と同様妊婦も不妊婦の尿も共に陽性に出ている (Table 2, 7月16日)。

又逆に反応するには濃すぎて所謂抗原過剰になり抗原抗体結合物が溶解して白輪を作らぬのではないかと考えて希釈して反応させても陰性に出た (Table 6)。

以上の結果から妊婦尿と Synaphorin 抗血清とが反応しない理由として, 妊婦尿中に排泄されて来る Gonadotrophin と, 免疫に使用した Synaphorin の成分即ち脳下垂体前葉及び胎盤から抽出した性腺刺激ホルモンとが免疫学的に異つた Gonadotrophin であるか, 或は同一であるとしても重層反応を起すには尿中の濃度が少な過ぎると考えられる。妊婦尿中に排泄される Gonadotrophin は絨毛性性腺刺激ホルモン (L H又は I C S H) で胎盤で産生されると考えられているから, Synaphorin 中の胎盤ホルモンが反応にあづかるべきであるが Synaphorin の hormone の中脳下垂体前葉は牛又は馬から採つており胎盤の方は3~4カ月の中絶妊婦の胎盤を原料としているので種特異性の差異で反応が起らない¹²⁾ というわけではないか, 此の点は更に妊婦尿を原料として精製した英国の Antuitrin, Apestrin, 独国の Prymogonyl 等の製品で確める必要がある(現在日本では此の種の製品はコストの関係でまだ出来ていない)。

1955年10月上旬出版された Michael Heidelberger 教授は此の実験結果について, アメリカでも似たような実験があつたけれども失敗したと述べて, 之は多分多くの

不純物による crossreaction が起り, 主反応が inhibit されるのではないかという意見を述べられた。

感 謝

第2報については大阪市立大学医学部細菌学教室の桑島謙夫教授, 増井正幹助教授及び同教室員の方々から数年間にわたりいろいろ御教示を賜つたことを深謝します。

第3報については同学部産婦人科学教室の藤森速水教授, 山田文夫助教授及び同教室員の方々から多くの御教示を賜り又数回にわたり多数の妊婦尿をわけていただいたことに対し厚く感謝します。

なお終始此の実験に対し御指導を賜つた大阪市立大学医学部生物々理学研究室主任西脇安助教授, 研究に協力して下さつた研究室員村田滋子, 古久保俊子諸氏に対し深く感謝します。

又1955年10月上旬来阪した Michael Heidelberger 教授から此の問題について種々御批判と示唆を与えられたことをあわせて感謝します。

なお以上の第1報, 第2報及び第3報の論文に対し懇切な御検討を賜つた京都大学医学部微生物学教室木村康教授に深謝致します。

文 献

- 1) 藤井久四郎: 産婦人科の世界. 1952年12月, p. 7
- 2) Gey, G. Seeger, G. Hellman L.: Science. 88, 309 (1938).
Haurowitz F.: Chemistry and Biology of Proteins. p. 274 (1950).
- 3) Reiss, M. Schaeffner, A. Haurowitz, F. Endokrinologie. 8, 22 (1931).
Haurowitz F.: Chemistry and Biology of Proteins p. 274 (1950).
- 4) 久保尙: 産婦人科の世界. 1952年12月. p. 107.
- 5) 吉川春寿: 日本医事新報, 第1277, 1278, 1278号. 昭和23年10月
- 6) Majoor: J. B. C. 169, 583 (1947).
- 7) Milne: J. Biol. Chem. 169, 595 (1947).
- 8) Haurowitz: Chemistry and Biology of Proteins p. 284 (1950).
- 9) Haurowitz: Chemistry and Biology of Proteins p. 280.
- 10) Landsteiner K.: The specificity of Serological Reactions. Harvard Univ. Press. Cambridge (1946).
- 11) P. Gell, C. R. Harington, R. V. Pitt Rivers: Brit. J. Exptl. Path. 27, 267 (1946).
- 12) B. F. Chow. Endocrinol: 30, 687 (1942).