微量血液 (0.05—0.1ml) 中の Streptolysin “O” 抗体測定法及び母子 (臍帶血) 抗体の比較

飛 松 源 治 多 比 良 公 子

(埼玉県衛生研究所)

曾 根 政 隆

(産科婦人科浜田病院)

[受付: 7月15日・1957年]

I. 序 言

人体感染を起す溶連球菌は、その大部分がA群並びにC, G群に属するとされているが、此等の菌の菌体外代謝産物によつて、生体で産生される抗体としては、ディック毒素抗体、ストレプトリヂン (SLO) 抗体、ストレプトカイネース抗体、ストレプトドルネース抗体、ハイアルロニデース抗体、プロティネース抗体、等が挙げられる。それ等の抗体で、産生率及び特異性の高いこと、検査の容易な点でSLO抗体の測定が一般に行はれる。

此の抗体の測定は、Rantz 及び Randall 等¹⁾ による抗原製品化の完成と共に、欧米においては既に普通検査の列に入れられ、本邦にても、その試みが為されたが、飛松²⁾ はその製造過程の短縮と能率化を計り、安定且使用簡易な製品の大量供給の目的を達した。

最近本邦にても漸くSLO抗体の測定が、溶連球菌疾患の診断に応用されるようになりつつあるが、その実施にあたり、小児よりの採血、僻地での集団検索、或いは小動物での実験的研究で頻回の測定を要する時等、その採血に困難を感ずるため、採血法の簡素化が望まれることが屢々ある。

著者等は、その解決の為“エルマ”加藤ヘマトクリット管を用い、耳朶穿刺微量血液 (0.05~0.1 ml) を以て容易且正確に行い得るSLO抗体測定法を確定した。

尚一部本測定法の助をかりて、出産時における邦人母子 (臍帶血) のSLO抗体値を測定比較したので併せて報告する。

II. 微量血液による抗体測定法

A 材料及び方法

1. 溶媒: pH 6.5等張リン酸バッファーは菌の発生

防止と保存便宜の為に4倍濃縮のものを調製する (NaCl 29.6 g, KH_2PO_4 12.68 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.36 g, 蒸溜水 1 l) 用に臨み、蒸溜水で4倍 (本液 1 容, 蒸溜水 3 容) に稀釈し、血球洗滌, 血球浮遊液調製, 血清及び血漿稀釈に使用する。

2. ピペット及び試験管: 血漿分離及び定量に“エルマ”加藤ヘマトクリット管を使用する。血漿稀釈, SLO及び血球添加に検定附, 先端 1 ml 目盛附ピペットを使用する。試験管は普通の小試験管でもよいが、倍数稀釈用には、管壁附着を防ぐ為、丈の短いカーン氏反応用試験管が適當である。

3. 血球浮遊液: 綿羊, 家兎, 又は人血液が脱纖維素乃至はクエン酸ソーダ加血液として採取され、数回洗滌遠心後、5%浮遊液とされた³⁾。

4. 抗原: ディフコ標準及びコペンハーゲン血清学研究所標準を以て調製した乾燥SLOが用いられた⁴⁾。

5. 血液凝固阻止剤: 加藤⁵⁾ による二重蓚酸塩を用いた。即ち蓚酸カリ 0.75 g, 蓚酸安門 1.25 g を蒸溜水 100 ml に溶解し、その 0.1 ml を試験管に分注、自然乾燥せしめ血液 1 ml の凝固防止剤とする。なお、上記試験管に 0.5 ml の蒸溜水を加えたものか、又は上記塩類処方中の蒸溜水を 500 ml としたものかの何れかを陥凹スライドガラスに 0.05 ml 宛分注乾燥せしめて、穿刺血液 0.05~0.1 ml 用にする。

TOBIMATSU Genji, TAIRA Kimiko & SONE Masataka: Estimation of Antistreptolysin “O” using capillary blood (0.05ml) and comparison of Antistreptolysin “O” in maternal and cord sera. Institute of Hygiene, Saitama Prefecture, Hamada's obstetrics and gynecological Hospital—Jap. J. of Bact., 12(9), 727-731, 1957.

6. 採血： 細切した安全剃刀の刃を指間に隠し持つて、耳朶に軽く切傷を加え、その数滴を上述二重蓚酸加陥凹スライドガラスに攪拌しつゝ加える。

7. 血漿の分離及び定量： 上述血液を速かにヘマトクリット管中に 0.1 ml (10倍よりの 倍数稀釈用), 又は 0.05 ml (20倍よりの 倍数稀釈用或いは 100 倍以上の患者用) より一が目盛多く吸ひ入れ、支持金属管中に納めて、遠心し、血漿を分離し、ヘマトクリット値を読み血漿量を知る。

8. 血漿稀釈： 一般臨床検査用には 100倍、実験研究用には10~20倍の倍数稀釈血漿を準備する。即ち吸入した血液量とそのヘマトクリット値より、所定倍数稀釈

血漿を得る為に加えられるべきバッファー量を第1, 2表より求める。該当せるバッファー量を予め小試験管に加え、此れにヘマトクリット管中の血液を全量吹込み、吸い出しの反覆により管壁を2-3回洗滌した後、遠心すると、その上清が所要稀釈の血漿として得られる10~20倍よりの低稀釈測定には血漿を50°30分非働化する。(第1, 2表)

10~20倍或いは 100倍以上の稀釈は第1, 2図に示された如く行う。

稀釈に際し、管壁附着による誤差を可及的小ならしむる為、, ビベットの操作に注意し、添加は管底近くで行う。

第1表 各ヘマトクリット値血液より100倍稀釈血漿を作る爲に加えられる可きバッファー量一覽

1. 血液 0.05 ml の時				2. 血液 0.1 ml の時					
ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量
%	ml	%	ml	%	ml	%	ml	%	ml
14	3.56	23	2.67	27	7.23	39	6.04	51	4.85
15	3.47	24	2.57	28	7.13	40	5.94	52	4.75
16	3.37	25	2.47	29	7.03	41	5.84	53	4.65
17	3.27	26	2.38	30	6.93	42	5.74	54	4.55
18	3.17	27	2.28	31	6.83	43	5.64	55	4.46
19	3.07	28	2.18	32	6.73	44	5.54	56	4.36
20	2.97	29	2.08	33	6.63	45	5.45	57	4.26
21	2.87	30	1.98	34	6.53	46	5.35	58	4.16
22	2.77	31	1.88	35	6.44	47	5.25	59	4.06
				36	6.34	48	5.15	60	3.96
				37	6.24	49	5.05	61	3.86
				38	6.14	50	4.95	62	3.76

第2表 各ヘマトクリット値血液より10又は20倍稀釈血漿を作る爲に加えられるべきバッファー量一覽

1. 0.05ml 血液→20倍血漿				2. 0.1ml 血液→10倍血漿					
ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量	ヘマトクリット値	バッファー量
%	ml	%	ml	%	ml	%	ml	%	ml
14	.68	23	.50	27	.66	39	.55	51	.44
15	.67	24	.49	28	.65	40	.54	52	.43
16	.65	25	.48	29	.64	41	.53	53	.42
17	.63	26	.46	30	.63	42	.52	54	.41
18	.61	27	.44	31	.62	43	.51	55	.40
19	.59	28	.42	32	.61	44	.50	56	.40
20	.57	29	.40	33	.60	45	.50	57	.39
21	.55	30	.38	34	.59	46	.49	58	.38
22	.53	31	.36	35	.59	47	.48	59	.37
				36	.58	48	.47	60	.36
				37	.57	49	.46		
				38	.56	50	.45		

第4表 耳朶血、微量血液法と血清普通測定法による Streptolysin “O” 抗体値比較

No.	ヘマトクリット値	単位		100	125	166	250	333	500
		方法	方法						
1	32%	微量血液	—	++	++	++	++	++	++
		普通	—	+	++	++	++	++	++
2	46%	微量血液	—	—	—	—	—	—	++
		普通	—	—	—	—	—	—	++
3	48%	微量血液	++	++	++	++	++	++	++
		普通	++	++	++	++	++	++	++
4	46%	微量血液	—	—	—	+	++	++	++
		普通	—	—	—	+	++	++	++
5	46%	微量血液	—	—	—	+	+	++	++
		普通	—	—	—	+	++	++	++
6	46%	微量血液	++	++	++	++	++	++	++
		普通	++	++	++	++	++	++	++
7	42%	微量血液	—	—	—	+	++	++	++
		普通	—	—	—	+	++	++	++
8	38%	微量血液	—	+	+	++	++	++	++
		普通	—	+	++	++	++	++	++
9	42%	微量血液	—	—	—	+	++	++	++
		普通	—	—	—	+	++	++	++
10	44%	微量血液	++	++	++	++	++	++	++
		普通	++	++	++	++	++	++	++

微量血……微量血液法 0.05ml 使用

第5表 微量血液及び普通法による(倍數稀釈)血清 Streptolysin “O” 抗体測定値の比較

No.	単位	方法	10	...	40	80	160	320	...	5120
1	微量血液	—	...	—	—	—	±	...	...	++
	普通	—	...	—	—	—	±	...	...	++
2	微量血液	—	...	—	±	++	++	...	...	++
	普通	—	...	—	±	++	++	...	...	++
3	微量血液	—	...	—	+	++	++	...	...	++
	普通	—	...	—	+	++	++	...	...	++
4	微量血液	—	...	—	—	—	+	...	...	++
	普通	—	...	—	—	—	+	...	...	++
5	微量血液	—	...	—	±	+	++	...	...	++
	普通	—	...	—	±	+	++	...	...	++

微量血液 0.1ml 使用

た。

2 SLO抗体価測定：Rantz & Randall 氏法に従って行つたが、血清微量のものは、ヘマトクリット管を使用して、微量血液測定法を用いた。

3 SLOによるSLO抗体の吸収試験：測定されたSLO抗体が、非特異的なSLO阻止物質ではないとの部分的証明の一助として、Packalén⁽⁴⁾のSLOによる抗体吸収を行つた。即ち血清 0.25ml に 2.25ml の活性SLO (≒300 単位)を加えて10倍稀釈血清としたものを 37°C 15 分加温し、抗原—抗体を結合せしめてから、60°C、30分加熱して、SLOを破壊した。其後は Rantz 及び Randall 氏等の方法により抗体価を測定し、元の抗体価と比較した。対照としては10倍稀釈用のSLOを予め60°30分加熱破壊して同操作を行つた。

B 結果

50例の母児血液中のSLO抗体値の比較が第3図に示された。

第3図 母子 Streptolysin “O” 抗体値比較

$$t_s = \frac{\bar{z} - m}{\frac{u}{\sqrt{N}}} = 4.67$$

n=40

$$\Pr\{|t| \geq 2.704\} = 1.0\%$$

$$\therefore \Pr\{|t| \geq 4.67\} < 1.0\%$$

母血抗体値の平均は 110.3 ± 9.1 単位/ml で、児血の平均は 176.3 ± 18.7 単位/ml を示し、標本平均の比較において明かな両者の差異を認め、児側抗体値の高いことを知つた。

更に各組毎について母血抗体及び児血抗体の比率を計算し、比較したものが第4図に示された。

母児抗体値の相等しきもの 24.0 ± 6.0 %で、過半の 70.0 ± 6.5 %に児血抗体の高きものを認め、母体抗体値の3~5倍の高抗体を保有する児血も少からず見出した。反之、6.0 ± 3.4 %のものは母体血抗体が児血のそれよ

第4図 母子 Streptolysin "O" 抗体値差比

第6表 Streptolysin "O" による Streptolysin "O" 抗体吸収

氏 名	児 性	母 血		児 血	
		原血清	吸収後	原血清	吸収後
矢 〇	♀	50	16	125	12
〇 子	♂	125	<12	333	16
佐 〇	♂	125	<12	166	<12
田 〇	♀	166	33	333	16
中 〇	♀	250	33	500	50

SLD 抗体吸収 0.25 ml 血清+2.25 ml 活性 SLO
(>300cu) 37°C 15' 後 60°C 30' 加熱

り高かつた。

5例について、示されたSLO抗体のSLOによる吸収除去試験が行われたが、何れも吸収除去可能で、児側の高い抗体が特異的抗体によるものならんと推定された。(第6表)

IV. 考 案

微量血液によるSLO抗体の測定はCrawford及びRobinson等⁵⁾によつて報告されたが、その方法は血液が0.1~0.2mlを必要とし、(著者等の2倍量)、且ヘマトクリット値の個体差を無視して、一律に平均値の40%と見做し、正確を期せんとすれば、別にWintrobe管によるヘマトクリット値測定を行い補正するのである。又血漿稀釈法も彼等独自のものを採用した為に、慣用されているRantz及Randall等の方法で行つた結果との比較に不便を感じる。著者等は全反応系を半量乃至はそれ以下としても、其の測定値が従来の方法に劣らぬことを知つた。又「エルマ」加藤ヘマトクリット管の利用により、正確な血漿の稀釈が行はれ、且従来の測定法に全く遜色なきことを認めた。尚本法によればヘマトクリット値の外に、血清ビリルビン量も同時に知り得る利点が伴ふ。又本測定法はSLO抗体の測定に留らず、他の血清反応にも応用し得ると考へる。

Crawford等は微量血液より血漿を除去した血球を蓄えて用いることを提唱したが、著者等は、此の残りの血球で0.5%の所要血球液が調製し得ることに着目したが5%血球液使用のものに比し、同値か或いは一管低くなるので、不適と考へた。然しSLO抗原調製に際し、微量血液測定用抗原として0.5%血球浮遊液を以て結合単位を定めたものを準備すれば血漿分離後の血球が使用できるように別に動物血球の準備を要せぬものと考えらる。

母児免疫の機構についての研究は久しく行はれ其の報告も亦多数見られている^{7,8)}。SLO抗体についてはPlummer⁹⁾の報告があるが、母血に比し児血に高い抗体値を見出している。著者等の測定した邦人50例についての比較でも亦同様に児側に高い抗体値を認め、高きは母血抗体の5~6倍に達するものも見られた。その原因についての解明は尚行はれていないが、母血抗体の胎盤通過の外に、胎盤による抗体産生⁷⁾或いは胎児における抗体保存期間の延長による蓄積等も考慮される。

V. 結 論

加藤ヘマトクリット管を用い0.05~0.1 mlの血液を以て行い得る、Streptolysin "O" 抗体の測定法を考案し、その正確なことを証明した。

50例の邦人母児(臍帯血)血液のStreptolysin "O" 抗体を測定比較した結果、児血が母血より高い抗体価を示すことを知つた。

稿を終るに臨み、御懇切な御指導と御援助を賜つた、東大、伝染病研究所、工藤正四郎教授に深謝致します。

本研究は一部文部省科学試験研究費によつてなされ、又研究の要旨は昭和32年4月2日日本伝染病学会総会にて発表された。

引用文献

- 1) Randall, E. & Rantz, L. A.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 414 (1949).
- 2) 飛松, 中島, 早野: 日本細菌学雑誌, 11, 503, (1956).
- 3) 福武, 高橋, 福武: 臨床の日本, 2, 299 (1956).
- 4) Packalén, T.: J. Bact. 56, 143 (1948).
- 5) Crawford, Y. E. & Robinson, H. J.: Amer. J. Clin. Path. 24, 1103 (1954).
- 6) Plummer, H.: J. Immunol. 35, 235 (1938).
- 7) 須永, 野場, 青木: 日本伝染病学会雑誌, 30, 963, (1957).
- 8) 野場: 日本伝染病学会雑誌, 28, 647 (1955).
- 9) 高橋, 土肥: 推計学入門(1953)医学書院刊,