ブルセラの Resin (イオン交換樹脂) 凝集反応の研究

第 I 報 Resin 抗原調製ならびに反応条件

鈴木 恭

農林省家畜衛生試験場 (部長 藤田 壽吉)

〔受付; 12 月 14 日・1960 年〕

不溶性の粒子に可溶性の抗原を結合させて抗体と反応させると凝集反応として表現できる場合のあることが、多数の研究者によつて報告されてきた。現在までに使用された不溶性の粒子としては、コロジオン¹⁻⁶⁾、細菌体⁷⁾赤血球⁸⁻¹¹⁾、コレステロール¹²⁻¹⁴⁾結晶および珪藻土¹⁵⁾をあげることができる。しかしこれらの凝集反応のなかには、食塩水や陰性血清に対して非特異的とおもわれる凝集をしめす傾向のあるもの、あるいは抗原を吸着させる粒子は再現性のある形で大量に得ることが困難なものもある。また抗原と粒子の結合様式についても明確な欠点が多い。可溶性抗原を赤血球に吸着させることによつて該抗原の独立性を証明した例もあり、このような術技は細菌のような複合抗原系の各抗原についてその行動を個々に追跡することを可能にしよう。最近、イオン交換樹脂が合成され、化学分野では勿論、生物科学の分野においても盛んに利用されるようになった。このものは合成品であり、規格が比較的均一であると考えられ。その反応性がイオン交換能にもとづくものであることが知られている点で操作し易いと考えられる。1954年 Evans¹⁶⁾等がイオン交換樹脂に *Cryptococcus neoformans* の夾膜の可溶性抗原を結合させて初めて血清反応に応用した。その後、1957年 Segre¹⁷⁾によつて逆に豚コレラおよび、Vesicular stomatitis 陽性血清の γ グロブリンをイオン交換樹脂に結合させて凝集反応を行なつており、多くの分野にこの種の凝集反応の応用が期待される。

ブルセラ病は人畜共通伝染病として重要であるので、その診断法としての各種の血清反応の価値が種々論ぜられてきている¹⁸⁾。Hirschberg¹⁹⁾らはブルセラ菌の抽出抗原のコロジオン凝集反応が赤血球凝集反応より特異性の高いことを見出した。著者はイオン交換樹脂凝集反応をその他の血清反応と併用して検討し、ブルセラ病診断法の拡張を試みた。第 I 報においては反応症術式の検討お

よび樹脂に吸着される抗原の性状についての推論を述べる。

実験材料ならびに方法

イオン交換樹脂: イオン交換樹脂は Evans らが推奨している強塩基性の Amberlite IRA-400(Resin)を使用した。樹脂を乳鉢で細かに磨砕し、これを蒸留水に浮遊させ、内径 28.5mm, 高さ 228.0 mm の容量 100ml のシリンダーで 4 時間静置した。その上清を 1500r.p.m. 15 分間遠心し、沈渣を 1 N の苛性ソーダに浮遊して室温に一夜放置し活性化した。この樹脂末を遠心操作によつて蒸留水で洗滌し、遠心上清が蒸留水の pH と同じになるまで洗滌を繰返した。その後、沈渣は 50% 浮遊液とし氷室に保存し、東京光電製分光光度計の $\lambda=450$ で必要な濃度に修正して使用した。

ブルセラの可溶性抗原: 可溶性抗原抽出には、透析培養法によつてえられた *Brucella abortus* 19 株を使用した。培養菌は、8000r.p.m. 30 分間の遠心で 3 回洗滌し Hirschberg¹⁹⁾の抽出法に準じ、1% 石炭酸食塩水で 30% になるように浮遊させた。この方法は、補体結合抗原の抽出法とほぼ同じであつた。また別に、加温は、補体結合抗原の抽出を促進するので、60°C, 7 時間抽出し、8000r.p.m. 30 分間遠心した上清を抗原とし、この化学的性状その他は、第 1 表に示した。

供試血清: ブルセロシスセンターに保存されている自然感染牛血清を陽性血清として用いた。この牛からは *Br. abortus* が分離されており、血清の凝集価は 640 倍

SUZUKI Kyo: Studies on the Resin (anion exchange resin) Agglutination Test in Brucellosis. I. Optimal Condition of the Resin Agglutination Test. First research Division, The National Institute of Animal Health.—Jap. J. of Bact., 16(7), 546-552. 1961

補体結合価は2560倍であつた。

第1表 St. 19 Phenol 抽出抗原の化学組成

乾物量 mg/ml	窒素量 (Kjeldahl N)		糖量 (Anthrone)	
	mg/ml	%/DW	mg/ml	%/DW
12.2	0.96	7.8	0.176	1.4

抗原力価(補体結合反応に依る)5120倍

陰性血清も同様にプルセローシスセンターに保存されていたもので、凝集反応および補体結合反応ともに血清希釈倍数5倍で完全陰性の血清であつた。

第1図 血清の加熱処理と反応との関係

血清の加熱処理：血清の非動性の温度を検討した結果第1図に示す成績であり、56°C、30分が最適であつたので、血清は使用前56°C、30分加熱して試験に供した。

緩衝液：本試験には一貫して Clark & Lubs の緩衝液を最終濃度 M/50 になるように調製して使用した。

反応術式：補体結合反応は、アメリカ軍医学校法に準じて行ない、イオン交換樹脂凝集反応 (Resin 凝集反応) は、倍数希釈した血清 0.5ml に抗原を 0.5ml 加え室温に静置し、所定の時間に判定した。Resin 凝集反応の判定は、管底の中央に粗大な Resin 凝集塊を示したものを $\pm$ 、管底の周囲に輪状に凝集輪をつくるに至らなかったものを $\pm$ 、凝集塊が全く認められないものを $\pm$ とした。

実験成績

可溶性抗原と Resin の結合を左右する条件として、結合時の pH、食塩濃度、Resin と抗原の量比などが考えられるので、これらの関係を検討した。

1. 結合におよぼす pH および食塩濃度の影響

pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 の5種類の Clark & Lubs の緩衝液の各 pH 段階毎に、食塩濃度 4, 2, 1

0.5, 0.25 および 0 各%のもの、計30種の緩衝液を作り抗原原液を各緩衝液で80倍に希釈し、吸光度20%に修正した Resin 液を等量加え、室温で30分間振盪感作後、過剰の抗原を除くために、結合時と同一組成の緩衝液で2回、2000r.p.m. 遠心洗滌し、その沈渣を原容の緩衝液に再浮遊させ、Resin 抗原とした。この抗原を、Resin 抗原調製時と同一組成の緩衝液で2倍段階希釈した血清と反応させた時の成績は第2図のとおりである。

pH 6.0において、抗原は食塩濃度1%, 2%を除き、陰性血清と非特異的に凝集し、また、食塩濃度の如何にかかわらず血清の力価が低くかつた。pH 8 では、食塩がない時および0.25%で高力価1280倍を示し、塩濃度が高くなるにともなつて低くなつた。したがつて0.25%の食塩濃度では、非特異的な反応もみられず、反応が2時間後には最高に近い力価を示しており、0.25%は最適塩濃度であつた。

pH 9.0においては、食塩がないか、0.25%の時の安定で、力価も比較的高く640倍を示した。

2. 反応時の pH および食塩濃度

反応の最適条件を調べるため、可溶性抗原と Resin を前述のような最適の条件、すなわち pH 8.0, 食塩濃度0.25%で結合させた後、Resin 凝集反応の条件を pH 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 の5種類の各 pH段階毎に、食塩濃度を4, 2, 1, 0.5, 0.25, 0 各%のものの計30種類の緩衝液で反応を行なつた。成績は、第3図のとおりである。pH 6 では、食塩濃度の如何にかかわらず力価が低く、18時間判定では、すべて非特異反応がみられ、この pH は、反応には不適当であつた。pH 7, 8 および 9 までは、差がみられず、食塩濃度の低い0.25%および0%では最も力価が高く、640倍であつた。pH 10では、食塩濃度に関係なく、おおむね同程度の力価(320倍)を示した。したがつて、Resin 抗原の凝集反応は、結合時の条件が重要で、反応時の条件には比較的巾のあることがわかつた。食塩のない時は、反応が不安定である場合が時としてみられたので、結合の最適結合条件と同じ条件、すなわち、pH 8.0, 食塩濃度0.25%で行なうこととした。

3. イオン交換樹脂の量ならびに抗原濃度の結合におよぼす影響

Resin および可溶性抗原の、量的組合せによる反応の鋭敏度ならびに特異性を検討するため、次の試験を行なつた。可溶性抗原を5, 10, 20, 40, 80および160の各倍数に希釈し、その各10ml ずつに50% Resin 浮遊液を0.03 (R1), 0.06 (R2) (吸光度20%に相当), 0.12

第2図 Resin および抗原の吸着条件

第3図 最適反応条件の検討

(R 3), 0.24 (R 4) および 0.48 (R 5) ml の割に加えて結合させ計 30 系の抗原を得た。洗滌、調製および反応には、pH 8, 0.25% 食塩水を用い、各抗原は反応時 Resin 濃度を吸光度 20% に修正して反応を行なった。その結果は、第 4 図のとおりであった。

5 倍乃至 10 倍の高濃度の抗原と R 1 とを結合させた時に反応は最高値 640 倍を示し、一方、80 倍乃至 160 倍の比較的低濃度の抗原と R 5 とを結合させた時、2 時間値は 20 倍の最低値を示し、同一抗原濃度においては Resin

量が多くなるに従って Resin 凝集反応の力価が低くなる傾向がみられた。12 時間値においても各抗原濃度とも R 1 と結合させた場合最も高い力価を示し、R 2 以上の濃度の場合は、抗原濃度の如何にかかわらず力価には大差がみられなかった。上記 30 系の遠心血清について補体結合反応により血清に残存する抗原の力価を調べたところ抗原濃度が比較的低い 40, 80, 160 倍では Resin 量が多い時は残存抗原が少なく、Resin 量が少ない時は多くなるが、5, 10 倍の高濃度抗原では Resin 量の多少にかかわらず差はみられなかった。

また、pH 8, 食塩濃度 0.25% で抗原と結合させた樹脂を氷室に保存し、一定時間後に凝集反応を行なったが 24 時間までは調製直後と同じ稀釈度の血清と凝集し、1280 倍であったが、48 時間後には、40 倍の高濃度の血清を用いないと凝集しなかった。

4. Resin に結合した抗原の再溶出

pH あるいは塩濃度を、結合時のそれと変えることにより、イオン交換樹脂は、一旦結合した物質を遊離することは周知のことであるので、溶出を認めた。

最適の条件で結合させた Resin 抗原を遠心で集め、原容の pH 2, 4, 6, 8, 10 の 0.25% 食塩水に再浮遊し室温で 30 分間振盪後遠心で Resin を沈降させた。上清については、補体結合反応を試み、沈渣を pH 8.0 の 0.25% 食塩水で洗い、原容に再浮遊し、凝集反応を行なった。その成績は、第 5 図のようである。上清に補体結合抗原の証明されたのは、pH 2.0 および 4.0 の上清であったが、この処理によつて樹脂部分の凝集の感度到大

第4図 Resin および抗原の最適吸着濃度

第5図 抗原の溶出条件の検討

きな変更はみられなかった。

また、塩濃度の影響は、pH 8.0 において行なつたが、この場合、上清に補体結合抗原は証明されなかった。しかし、高い塩濃度で処理することが、抗原に若干の影響を与えているようである。

5. 全菌および Resin 抗原での吸収試験

Resin 凝集抗体が、全菌凝集抗体あるいは補体結合抗体とどのような関連があるかを予備的に知るために、陽性血清を全菌および Resin 抗原で吸収して残存する抗体を検討した。

血清を pH 8.0 の 0.25% 食塩水で 10 倍にうすめ、これにあらかじめ遠心洗滌して集めた加熱死菌、または Resin 抗原の沈澱塊を 100:1 の比になるように加え、

よくまぜ、37°C、30 分間温浴中で吸収後 7.000r.p.m. 15 分の遠心によつて血清を分けた。同様の操作をさらに 2 回行ない、各回の上清の一部を取除き、3 種の反応に供した。

その成績の 1 例は、第 2 表に示したとおりである。全菌による吸収で各反応は、逐次低下し、3 回の吸収で各抗体は、ほとんど完全に失われる。これに反し、Resin 抗原による吸収では、予期に反しこれに対する抗体の低下が著しくなく、補体結合抗体も同様である。

加熱死菌に対する凝集抗体の態度は、極めて興味があり、抗原としての加熱死菌の複雑性と、血清がまた複合抗体系であることを物語るものであろう。

なお、Resin 粒子のみで吸収した場合は、Resin 凝集

表 2 全菌および Resin 抗原での吸収試験

吸収方法	Resin 抗原での凝集反応										全菌での凝集反応										補体結合反応														
	判定時間	血					稀					血	稀					血	稀					血	稀					血	稀				
		20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	20		40	80	160	320	640		1280	20	40	80	160		320	640	1280	2560							
全	1回目	+	+	+	+	+	+	-	-	-	0	0	0	1	3	2	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0		
	2時間 18時間	+	+	+	+	+	+	-	-	-	0	0	0	1	3	2	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0		
	2回目	+	+	+	+	+	+	-	-	-	0	3	4	4	2.5	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0		
菌	3回目	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	2時間 18時間	+	+	+	+	+	+	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
	1回目	+	+	+	+	+	+	-	-	-	4	3.5	1	0	1.5	2	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	
レ シ ン 抗 原	2回目	+	+	+	+	+	+	-	-	-	4	2	0	0	1	1.5	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	
	2時間 18時間	+	+	+	+	+	+	-	-	-	4	2	0	0	1	1.5	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	
	3回目	+	+	+	+	+	+	-	-	-	3.5	1	0	0	0	0	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	
吸 収 前	2時間 18時間	+	+	+	+	+	+	-	-	-	4	4	3	2	2.5	3	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	
	2時間 18時間	+	+	+	+	+	+	-	-	-	4	4	3	2	2.5	3	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4	0	

反応には3回吸収を行なつても、何ら力価に差が認められず、菌凝集反応および補体結合反応にもほとんど力価の低下がみられなかつた。

考 察

著者と同一の樹脂を用いた Evans ら¹⁰⁾ の *Cryptococcus* の多糖類抗原での実験では、pH を重視していないが、食塩濃度は 0.2% であり、血清グロブリンを結合させた Segre ら¹⁷⁾ の実験では、pH を 10.4 とし、食塩は入れていない。イオン交換を行なう場の pH、塩濃度がその反応に大きな影響を与えることは、よく知られており、これをたくみに運用することにより、選択的な結合を行なうことも可能である²¹⁾ ことを考えるなら、この面の検討はさらに慎重であるべきである。著者の用いた抗原が粗抽出物であり、菌から抽出される血清反応と関係がないと考えられる低分子物質、石炭酸および食塩を多く食んでいるので、さらに、純化した抗原を用いて再検討することにより、樹脂と結合する抗原性物質の本態をさらに明らかにすることができよう。しかし、著者の実験では、pH 8、食塩濃度 0.25% に結合ならびに凝集反応の最適点があると認められる。

この処理によつて、樹脂が補体結合抗原を結合することは、第2図から明らかであるが、その結合し得る能力は、あまり大きくはないようである。同一樹脂量で、抗原濃度を高めて結合を行わせれば、単位樹脂量当りの結合抗原量は大きくなるが、それが凝集反応に大きな影響を与えていない。また、pH を下げることにより、この補体結合抗原は、溶出されることができると、この処理によつても Resin 凝集反応は、大きな影響をうけていない。また、吸収試験でも、補体結合抗体の低下が著しくないことから、Resin 凝集反応に関与する抗原は、補体結合抗原とは異なるのではないかと推察される。

加熱死菌によつて、補体結合抗体ならびに Resin 凝集抗体が著しく吸収されることは、この抗原の複合系であることを示すものであり、生菌を加熱抽出することによつて得られる可溶性抗原をなお表面に保持するものと考えられる。従つて、所謂凝集抗原と同じであるか、あるいは異なるかを論ずるのは困難であらうが、後に述べる種々の血清および乳清に対する態度からは、若干異なつていふと考えられる。

Hirschberg¹⁹⁾ は、プルセラ抽出物をコロジオン粒子と結合させた抗原による凝集反応の特異性が、血球凝集反応よりすぐれていると述べている。粒子に可溶性抗原を結合させ、凝集反応として表現する型の反応は、微量の

抗体の証明に有用である²⁰⁾ ことが知られており、上に述べたように、イオン交換樹脂に結合させた抗原が補体結合抗原と異なるのではないかと推測される成績が得られたことから、Resin 凝集抗原により、血清あるいは乳清中のある種の抗体を検出することが可能であると考えられるので、次報以下において、種々の実際例に適用した結果を述べる。

Hirschberg ら¹⁹⁾ のコロジオン抗原または血球抗原と Resin 抗原との異同性、同時にイオン交換樹脂と抗原性物質との結合が、イオン交換に基づくものであるか、または、他の多くの粒子と同様な親和性によるものであるかは、別に検討する予定である。

総 括

Brucella abortus 19株の石炭酸抽出抗原を吸着させた強塩基性陰イオン交換樹脂 (Amberlite IRA-400) を用いて、Resin 凝集反応を行なうための最適条件を検討し、次のような成績を得た。

1) 抗原と Resin との最適結合条件は、食塩濃度 0.25%, pH 8.0 であつた。

2) Resin 抗原と抗体との反応条件は、pH 6.0 では力価も低く、また、非特異反応がみられるが、pH 7 から 10 までは、力価に大差がなく、いずれも好適であつた。

3) 抗原および Resin の各種濃度の組合せにおいては、5倍希釈の高濃度抗原を吸光度 20% をうるために必要な量の半量の Resin に結合させた時に最高であつたが、実用的には、より低濃度の抗原を用いて差支えない。

4) 以上の最適条件で結合させた Resin 抗原を、食塩濃度 0.25%, pH 4 または 2 の液で溶出を行なうと補体結合抗体の溶出が見られるが、Resin は血清と凝集した。pH 8 で食塩濃度を高めても溶出はみられなかつた。pH 8.0 食塩濃度 0.25% および 0.5% のとき最も安定で、320 倍の力価を示した。

5) 全菌および Resin 抗原で陽性血清から抗体の吸収を行なつたが、全菌は Resin 抗原より強く種々の抗体を吸収した。特に後者は補体結合抗体の吸収が他の抗体のそれより弱いようであつた。

6) 以上のことから Resin 凝集抗原とその他の抗原との異同性について推論を試みた。

文 献

- 1) Jones, F. S. : J. Exp. Med., **46**, 303, 1927.
- 2) Cannon, P. R. and Marshall, C. E. : J. Immunol., **38**, 365, 1940.
- 3) Pearson, H. E. : J. Immunol., **49**, 117, 1944.
- 4) Cavelti, P. A. : J. Immunol., **57**, 141, 1947.
- 5) Saslaw, S. and Campbell, C. C. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **68**, 559, 1948.
- 6) Boand, A. V. and Kempff, J. E. : J. Lab. Clin. Med., **37**, 914, 1951.
- 7) Roberts, E. C. and Jones, L. R. : Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **47**, 11, 1941.
- 8) Pressman, D., Maynard, J. T., Grossberg, A. and Pauling, L. : J. Amer. Chem. Soc., **65**, 728, 1943.
- 9) Middlebrook, G. and Dubos, R. : J. Exp. Med., **88**, 521, 1948.
- 10) Boyden, S. V. : J. Exp. Med., **98**, 107, 1951.
- 11) Cole, L. R. and Farrel, V. R. : J. Exp. Med., **102**, 631, 1955.
- 12) Kline, B. S. : Microscopic Slide Precipitation Tests for the Diagnosis and Exclusion of Syphilis, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1932.
- 13) Sussenguth, H. and Kline, B. S. : Amer. J. Clin. Path., **14**, 471, 1944.
- 14) Hunter, C. A. : J. Immunol., **77**, 232, 1956.
- 15) Bozicevich, J., Jobie, J. E., Jhomas, E. H., Hoyem, H. M. and Ward, S. B. : Pub. Hlth Rep., **66**, 806, 1951.
- 16) Evans, E. E. and Haines, R. F. : J. Bact., **68**, 130, 1954.
- 17) Segre, D., J. Immunol., **78**, 304, 1957.
- 18) Huddleson, I. F. : Brucellosis in Man and Animals, Monograph 2nd Ed., The Commonwealth Fund, N. Y. 1943.
- 19) Hirschberg, N. and Yarbrough, M. E. : J. Infect. Dis., **91**, 238, 1953.
- 20) カバット・マイヤー共著, 実験免疫化学, 岩波書店, 82, 1956.
- 21) 本田雅健・垣花透武・吉野論吉 ; イオン交換樹脂 3 版, 広川書店, 1957.