ジフテリア毒素抗毒素間の補体結合反応に関する研究

第1報 血清種による補体結合反応の相違について

石 坂 照 子

國立予防衛生研究所血清部 (主任 中村敬三部長)

〔受付: 11月6日 1953年〕

緒 言

補体結合反応の機序に関しては、従来数多くの研究があるが、そのいずれも、なお仮説の域に止まり、しかもその裏づけとなる実験の根拠に乏しい現状である。例えば、Goldworthy (1928)¹⁾は補体結合反応と沈降反応との関係について実験を行い、沈降反応の最適比と補体結合の最適比とが、略々一致する事、及び沈降反応の沈澱を除いた上清では、補体結合が起らない事から、両反応の抗原抗体系は同一のものであるとし、又補体は抗原抗体結合物が或程度の大きさに達した場合、最もよく結合される事を認めている。又 Heidelberg (1941)²⁾は沈降反応に於ける沈降物の窒素量を精密に定量した結果、補体が実際に抗原抗体結合物に結合する事を証明し、沈降反応の機序に関する彼の説から推論して、補体は常に抗体及び抗原と解離しうる結合を行つてゐるが、抗原抗体反応が起ると、この結合が安定化され、補体結合が起ると考えている。

一方私共は先にジフテリア毒素抗毒素間のアナフィラキシーを試験管内に於て証明し³⁾、更にこれを利用して、フロキュラシオンの機構について研究を行つてきたが⁴⁾、更に今回は補体結合反応の機序を解明してゆく一つの手がかりとして、ジフテリア毒素抗毒素間の補体結合反応について実験を行つた。

従来ジフテリア毒素抗毒素間の補体結合反応については、補体結合が起るといふ報告¹⁰⁾も、又起らないといふ報告⁹⁾もある。しかも補体結合が起るといふ報告については、これが眞の毒素抗毒素間のものか否かは疑問である。そこで私は眞の毒素抗毒素間に果して補体結合が起るか否かについて検討した。

実験材料及び実験方法

抗原として用いたのは Pope のトリブシン消化培地によつてつくつたジフテリア粗毒素及び粗トキソイド並に

95%程度に精製されたトキソイドである。この精製トキソイドは Pope の半合成培地によつて濃縮し、硫酸分割及び塩酸処理で精製したもので、予研村田良介博士より分与されたものである。抗血清としては、フロキュラシオン用抗毒素馬血清、Lederle 社製消化抗毒素及び家兎を明礬トキソイドで免疫して得た抗毒素家兎血清を用いたが、いずれも沈降反応による単位と、家兎の皮内反応による単位とは略々一致していた。

なお補体結合反応の術式としては、アメリカ陸軍々医学校法 (Kolmer 変法)、Bengtson 原法、及び中村、田崎法¹¹⁾を用いた。

実験成績

1) ジフテリア毒素と抗毒素馬血清間の補体結合反応
i) 補体結合反応の成績

先ず眞のジフテリア毒素と抗毒素馬血清との間に果して補体結合が起るか否かを明らかにする爲、抗原として粗毒素及び粗トキソイドを用い、抗血清としてフロキュラシオン用抗毒素馬血清を用いて補体結合反応を行つた。即ち抗原抗体共に粗の材料を用いた場合である。この結果は表1に示す如く、補体結合反応は陽性であつた。所が、この際抗原の Lf が同じでも抗原を変えた場合には補体結合の程度が異なる事が認められた。斯様な現象が起るのは、こゝに起つた補体結合反応が、眞の毒素抗毒素間のものでないためか、或は反応は毒素抗毒素間のものであつても、抗原の Kf その他の性質が異なつてゐるためかも知れない。そこで反応を 37°C と 0°C で行い、

ISHIZAKA, Teruko: Studies on the complement fixation reaction of diphtherial toxin and antitoxin. I Difference of Complement fixing activity due to species of antisera. The National Institute of Health of Japan. — Jap. J. of Bact., 9(1), 41-47, 1954.

第1表 抗毒素馬血清の C.f.R. (中村・田崎氏法)

No.			1	2	3	4	5	6	7	8	9
抗 原 Lf 40/cc			0.25 cc							(一)	
抗 毒 素 血 清 200 u			0.01	0.03	0.05	0.07	0.1	0.15	(一)	0.05	0.15
食 塩 水			0.24	0.22	0.2	0.18	0.15	0.1	0.25	0.45	0.35
×20 補 体			0.25 cc								
37°C 1 時 間											
感 作 血 球			0.5 cc								
37°C 1 時 間											
判 定	粗 毒 素	馬 血 清	2	0	0	0	0	0	3	3	1
		Lederle	3	3	3	3	3	3	3	3	3
	精 製 トキソイド	馬 血 清	3	3	3'	2	1'	0	3	3'	0
		Lederle	3	3	3	3	3	3	3	3	3

その際の補体結合の程度を比較してみたが、補体結合の程度は略々同様で、反応を 0°C で行う事により反応速度を遅延させた場合でも、抗原による差は明らかに認められた。次に抗毒素馬血清として Lederle 社製消化抗毒素を用いた。この製品は抗毒素馬血清をペプシンで消化した後に、分割濃縮して得られたものであるから、純粋の抗毒素ではないが、相当精製されたものである。所がこの抗毒素を用いて粗毒素との間に補体結合反応を行つてみた所、補体結合は全く起らなかった。(表1)そこで更に抗原として 95% 程度に精製されたトキソイドを用い、抗血清としてフロキュラシオン用抗毒素馬血清及び Lederle 社製消化抗毒素を用いて反応を行つたが、いずれの場合にも成績は全く陰性であつた。所で以上の実験に用いた中村田崎法は梅毒血清反応の場合にはかなりよい成績をおさめているが、術式の鋭敏度がわるいため、斯様な結果が得られたのではないかという疑問が残る。そこでアメリカ陸軍々医学校法 (Kolmer変法) Bengtson 原法を用いて同様の実験を行つてみたが、いずれの術式でも、抗原抗体が共に粗の場合にのみ補体の結合が起り、いずれか一方が精製してある場合には、補体結合反応は陰性であつた。(表2)。これらの実験成績より眞の毒素と抗毒素馬血清との間には補体結合は起らないものと考えられる。

ii) 吸収試験

以上の様にジフテリア毒素と抗毒素馬血清との間には抗原抗体が共に粗の場合にのみ補体結合が起ることが認

第2表 抗毒素馬血清の C.f.R.

抗原 Lf/cc	抗 血 清	術 式	成績
粗 毒 素	40 馬 血 清	中, 田	++
	40 馬 血 清	Kolmer 変	++
	40 Lederle	中, 田 (0°, 37°C)	—
	8 馬 血 清	中, 田	—
	8 馬 血 清	Kolmer 変	—
	8 Lederle	Kolmer 変	—
精 製 トキソイド	40 馬 血 清	中, 田 (0°, 37°C)	—
	40 Lederle	中, 田 (0°, 37°C)	—
	8 馬 血 清	中, 田	—
	8 馬 血 清	Bengtson 原	—
	8 馬 血 清	Kolmer 変	—
	8 Lederle	Bengtson 原	—
	8 Lederle	Kolmer 変	—

められた。そこでこの補体結合が、果して毒素抗毒素以外の抗原抗体系によつて起るものか否かを検討するため粗毒素と Lederle 消化抗毒素を最適比に混合して沈降反応を起させその沈降物を除き、吸収前後の抗原とフロキュラシオン用抗毒素馬血清との間に補体結合反応を行つた。その成績は表3に示す如く、吸収後の抗原と粗の抗毒素馬血清との間にも明らかに補体結合が起り、しかも吸収前後の抗原による補体結合の程度は全く同様であつた。即ち粗毒素と抗毒素馬血清との間に認められる補体結合は明らかに毒素以外の抗原抗体系によるものであ

第3表 抗毒素馬血清による C.f.R.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
粗 毒 素 Lf 40	0.25 cc							(—)		0.25	
抗毒素馬血清 200 u	0.01	0.03	0.05	0.07	0.1	0.15	(—)	0.1	0.15	0.05	
食 塩 水	0.24	0.22	0.2	0.18	0.15	0.1	0.25	0.4	0.35	0.45	
×20 補 体	0.25 cc									(—)	
37°C 1 時 間											
感 作 血 球	0.5 cc										
37°C 1 時 間											
判 定	吸 收 前	3	3′	2	2′	1	0	3	3	3′	0
	吸 收 後	3	3′	2	2′	1	0	3	3	3′	0

り、眞の毒素と抗毒素馬血清との間には補体結合は起らないと思われる。

iii) 補体成分の結合

所でこの毒素と抗毒素馬血清間の反應に於ては如何なる補体成分も結合されないものであろうか。補体が4成分から成る事は周知の事実であるが、各成分の量は季節により変動すると云われて居る(田崎)¹²⁾。従つて若し実際には補体成分の結合が起つていても、主として結合された成分が補体の最少成分でない場合には、或は全然補体の結合が起らない様な観を呈するかも知れない。そこでモルモット血清を Liefmann の CO₂ 導入法によりアルブミン分割とグロブリン分割とに大別した。このア

ルブミン分割中には主として C'2, C'4, グロブリン分割中には C'1 及び C'3 が含まれている。このアルブミン分割: グロブリン分割をそれぞれ 3:1, 1:1, 1:3 の割に混合し、その各々について補体の Titration を行い、各々の2充單位を用いて、Kolmer 変法で補体結合反應を行つた。この際用いた抗原は精製トキソイド、抗血清は Lederle 消化抗毒素である。

その結果は表4に示す如く C'1, C'3 が最少成分である様な補体を用いた場合でも、C'2, C'4 が最少成分である補体を用いた場合でも、共に補体結合反應は陰性であつた。従つて眞の毒素抗毒素馬血清間の反應ではいずれの補体成分も結合されないものと考えられる。

第4表 抗毒素馬血清と補体成分の結合

No.		1	2	3	4	5	6	7
精 製 ト キ ソ イ ド Lf=40/cc		0.25 cc						(一)
Lederle 消 化 抗 毒 素 200u/cc		0.01	0.03	0.05	0.1	0.15	(一)	0.15
食 塩 水		0.24	0.22	0.2	0.15	0.1	0.25	0.35
補 体 2 充 單 位		0.5 cc						
・		37°C						1 時 間
感 作 血 球		0.5 cc						
		37°C						1 時 間
判 定	補 体 GL/AL	1 : 1	3	3	3	3	3	3
		1 : 3	3	3	3	3	3	3
		2 : 1	3	3	8	8	3	3

第5表 抗毒素家兎血清の C.f.R.

No.		1	2	3	4	5	6	7	8	9
抗 原 Lf 8/cc		0.25 cc							(－)	
抗 毒 素 家 兎 血 清 200 u		0.05	0.07	0.1	0.16	0.2	0.25	(－)	0.16	0.25
食 塩 水		0.2	0.18	0.15	0.09	0.05	(－)	0.25	0.34	0.25
×20 補 体		0.25 cc								
37℃									1 時 間	
感 作 血 球		0.5 cc								
37℃									1 時 間	
判 定	粗 毒 素	0	0	0	0	0	0	3	3	3
	精 製 ト キ ソ イ ド	0	0	0	0	0	0	3	3	3

II ジフテリア毒素と抗毒素家兎血清間の補体結合反応

i) 補体結合反応の成績：実験に用いた抗毒素家兎血清の沈降反応の単位は12.5単位/ccであり、家兎の皮内反応による中和試験では10～15単位/ccであつた。補体結合反応の術式は抗毒素馬血清の場合と同様、中村田崎法、アメリカ陸軍々医学校法、Bengtson 原法を用いた。その成績は表5に示す如く、抗原として粗毒素を用いた場合でも、精製トキソイドを用いた場合でも補体結合は著明に認められた。しかも精製トキソイドを用いた場合の補体結合反応の場をしらべた結果、補体結合反応の最適比と、沈降反応の最適比は略々一致していた。(表6)

第6表 抗毒素家兎血清による C.f.R. の場の形

血清 精製トキソイド Lf 8/cc	8u ×2	×4	×8	×16	×32	×64	抗原 対照
原	0	0	0	1'	2	3'	3
×2	0	0	0	1'	2	3	
×4	0	0	0	1'	2	3	
×8	1	1'	0	1	2	3	
×16	3'	2	2	2'	3'	3	
×32	3'	3'	3	3	3	3	
×64	3'	3'	3	3	3	3	
×128	3	3	3	3	3	3	
血清対照	3	3	3	3	3	3	

従つて家兎の抗毒素血清を用いた場合には、眞の毒素抗毒素間にも補体結合が起る様に思われる。

ii) 吸収試験

次に毒素—抗毒素家兎血清間における補体結合が果して眞の毒素—抗毒素間のものか否かを明らかにするため、吸収試験を行つた。即ち抗毒素馬血清の場合と同様に、精製トキソイドを Lederle 消化抗毒素で吸収し、その吸収前後の抗原を用いて家兎抗毒素血清との間に補体結合反応を行つた所、表7に示す様な結果を得た。即ち吸収抗原によつては補体結合は起らなかつた。この実験より抗毒素家兎血清の場合には眞の毒素抗毒素間にも、補体結合の起る事が証明された。なお抗原として粗トキソイドを用いた場合には、これを Lederle 消化抗毒素で吸収しても、吸収上清と抗毒素家兎血清との間に、なお或程度補体結合が起る所から、毒素抗毒素以外の抗原抗体系によつても補体結合が起る事は明らかである。

III 人補体による補体結合反応

上述の如く、モルモット血清を補体として用いた場合には、抗毒素血清として家兎血清を用いれば、毒素抗毒素間に補体結合反応が起るが、馬血清を用いた場合には補体結合は起らない。一方 Cushing¹³⁾(1945) は、抗血清として馬血清を用いた場合、補体としてモルモット血清を用いば、インフルエンザ菌に対し殺菌作用を呈しないが、補体として人血清を用いると、殺菌作用を示す事を報告している。そこで毒素—抗毒素間の補体結合反応に於いても、補体としてモルモット血清を用いた場合と、人血清を用いた場合とでは何等かの相違が認められるのではないかと考え、この点について検討した。この場合正常人血清は、それだけで綿羊血球を溶血する作用を有しているので、血球としては牛血球を用いた。

先ず抗毒素馬血清を用いた場合には、その抗血清がフ

第7表 抗毒素家兎血清による C.f.R

No.			1	2	3	4	5	6	7
精製 トキソイド Lf 2.5			0.25 cc					(一)	
抗毒素家兎血清 5 u			0.05	0.1	0.15	0.2	(一)	0.1	0.2
食塩水			0.2	0.15	0.1	0.05	0.25	0.4	0.3
×20 補体			0.25 cc						
37°C 1 時間									
感 作 血 球			0.5 cc						
37°C 1 時間									
判 定	吸 收 前		0	0	0	0	3	3	3
	吸 收 後		3	3	3	3'	3	3	3

第8表 人補体による抗毒素馬血清の C.f.R.

No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
精 製 ト キ ソ イ ド Lf 10/cc	0.25 cc							(－)		
抗 血 清 20 u/cc	0.05	0.1	0.125	0.15	0.2	0.25	(－)	0.1	0.25	
食 塩 水	0.2	0.15	0.125	0.1	0.05	(－)	0.25	0.4	0.25	
×10 人 補 体	0.25 cc									
37℃ 1 時 間										
感 作 血 球	0.5 cc									
37℃ 1 時 間										
判 定	抗 毒 素 馬 血 清	3	3	3′	3′	3′	3′	3	3	3′
	Lederle 抗 毒 素	3	3	3	3	3	3′	3	3	3

第9表 人補体による抗毒素家兎血清の C.f.R.

No.	1	2	3	4	5	6	7	
精製トキソイド Lf 2.5	0.25 cc					(—)		
抗毒素家兎血清 5 u	0.05	0.1	0.15	0.2	(—)	0.1	0.2	
食塩水	0.2	0.15	0.1	0.05	0.25	0.4	0.3	
×10 人補体	0.25 cc							
37°C				1 時間				
感作血球	0.5 cc							
37°C				1 時間				
判定	吸 收 前	0	0	0	0	3′	3	3′
	吸 收 後	3′	3′	2	1	3′	3	3′

ロキュラシオン用抗毒素馬血清の場合でも、Lederle 消化抗毒素の場合でも、使用した抗原が精製トキソイドである限りは補体結合反応は陰性であつた。(表8) 之に反し抗毒素血清として家兎血清を用いた場合には、補体結合反応は陽性であり、精製トキソイドを、Lederle 消化抗毒素で吸収する事により、補体結合の程度は著しく低下した。(表9) 即ち補体として人血清を用いた場合でも、抗毒素血清が馬血清の場合には、毒素抗毒素間に補体結合は起らないが、家兎血清を用いた場合には補体結合は陽性であり、モルモット血清を補体として用いた場合と同様であつた。

考 察

従来ジフテリア毒素抗毒素間に補体結合が起るか否かは疑問とされていた所であるが、私は上述の実験の結果抗毒素血清として馬血清を使用した場合には補体結合は起らないが、家兎血清を使用すれば補体結合が起る事を確認する事が出来た。即ち抗血清として抗毒素馬血清を用いた場合には、抗原又は抗体の一方を精製すると、補体結合が起らなくなる。しかも抗原抗体共に粗の場合に起る補体結合の程度は、抗原を精製抗毒素で吸収する事により全然影響を受けない所から、この際に起つた補体結合は、眞の毒素抗毒素系以外の抗原抗体系によつて起つたものと考えられる。なお Pillemer¹⁴⁾ によれば、補体結合の際抗原抗体結合物に結合する補体成分は、C'1, C'2, C'4 であるとされている。一方田崎¹⁵⁾ はモルモットの補体成分に関して研究した結果、季節により C'2, C'4 が C'1, C'3 に比して少い場合のある事をのべている。従つて若し主として結合される成分が C'1 であれば、あたかも補体は結合されない様な観を呈するかも知れない。そこで私はモルモット血清を C'1, C'3 を含むグロブリン分割と、C'2, C'4 を含むアルブミン分割とに分け、之を種々の量に混ざる事により、最少成分が C'1, C'3 となる様な補体、及び C'2, C'4 となる様な補体をつくり、各場合に於て補体結合反応を行つてみたが、いずれの場合にも補体結合反応は陰性であつた。即ち、毒素と抗毒素馬血清間の反応では如何なる補体成分も結合されないものと考えられる。しかるに抗血清として家兎抗毒素血清を使用した場合には、精製トキソイドの間に強い補体結合反応を呈し、その最適比は略々沈降反応の最適比と一致していたし、この抗血清の沈降反応の単位と皮内反応の単位も略々一致していた。従つて補体結合反応を起した抗原抗体系は恐らく眞の毒素抗毒素系であろう。しかも精製トキソイドを馬の精製抗毒素で吸収してしまうと、吸収抗原と家兎抗毒素血清との間

には補体結合反応が起らなくなる。この事実は家兎抗毒素血清によつて起つた補体結合反応が、眞の毒素抗毒素間のものであることを裏書きすると思われる。なお前述の如く、Cushing¹³⁾ は同じ抗血清を用いても、補体として人血清を用いるか、モルモット血清を用いるかにより、殺菌作用を呈したり又は呈しなかつたりする事を報告しているので、人血清を補体として用いて実験を行つてみたが、矢張り抗血清が馬血清の場合には補体は結合されず、家兎血清の場合には補体結合が起る事を確認し得た。

斯様な抗血清による補体結合能の相違は、既に種々の抗原抗体系について報告されている。

即ち Zinsser¹⁶⁾ (1923) は I 型肺炎菌とその抗血清について、Puttman & Goodner¹⁶⁾ (1935) は *Hemophilus influenzae* type B の多糖類を抗原とした場合について、又 Goodner & Horsfall¹⁷⁾ (1936) は肺炎菌多糖類を抗原とした場合について、Rice¹⁸⁾ (1948) は *Salmonella pullorum* とその抗血清について、いずれも抗血清が馬血清の場合には補体結合が起らないが、抗血清が家兎血清の場合には補体結合が起る事を報告している。

しかしこゝで注意すべき事は、之等の抗原は殆んど多糖類抗原である事である。所が上述の実験成績によれば明らかな蛋白抗原であるジフテリア毒素とこれに対する抗血清との間に於いても、同様の事実が証明された事になる。然しながらすべての場合に、馬の抗血清では補体結合が起らないわけではない。例えば粗毒素と粗の抗毒素馬血清との間に或程度の補体結合が起る様に、馬の抗血清でも抗原の種類により、補体結合が起りうるものと思われる。

周知の如く、ジフテリア毒素と抗毒素馬血清との間に起る沈降反応は、フロキュラシオン型であるのに対し、抗毒素家兎血清の場合には Precipitin 型である事¹⁹⁾ は、上述の補体結合上の態度の相違と考え合せて興味ある事と思われる。

斯様に抗血清の相違により、或は抗原の相違により、補体結合が起つたり、又は起らなかつたりするという事実は、補体結合の機序解明に當つて興味ある問題と考えられるので、この原因については更に検討中である。

結 論

1) ジフテリア毒素と抗毒素馬血清との間には補体結合反応は起らない。

2) ジフテリア毒素と抗毒素家兎血清との間には強い補体結合を呈し、その最適比は略々沈降反応の最適比と一致する。

3) この抗毒素馬血清、抗毒素家兎血清の補体結合反

應上の相違は、補体としてモルモット新鮮血清を用いた場合でも、人血清を用いた場合でも同様である。

4) ジフテリア粗毒素中に含まれる毒素以外の抗原とそれに対する抗体との間には抗血清が馬の場合でも家兎の場合でも補体結合反応が認められる。

終りに臨み、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜った中村敬三部長に深甚の謝意を表すると共に、絶大なる御支援を頂いた村田良介博士に対し厚く御礼申上げる次第である。

文 献

- 1) Goldworthy, N. E.; J. Path. Bact. 31, 220, 1928.
- 2) Heidelberger, M., Weil, A. J. & Treffers, H. P.; J. Exp. Med. 73, 681, 1941.
- 3) Heidelberger, M., Weil, A. J. & Treffers, H. P.; J. Exp. Med. 73, 695, 1941.
- 4) 石坂公成 : 日本細菌学雑誌, 7, 127, 1952.
- 5) 石坂公成 : 日本細菌学雑誌, 7, 131, 1952.
- 6) 石坂公成, 石坂照子 : 日本細菌学雑誌, 7, 571, 1952.
- 7) 石坂公成, 石坂照子 : 日本細菌学雑誌, 8, 9, 1953.
- 8) 石坂公成, 石坂照子 : 日本細菌学雑誌, 8, 169, 1953.
- 9) Armand-Delille, P. F.; Compt. rend. Soc. Biol. 65, 417, 1908.
- 10) Sindo, T., Meguro, T. & Soejima M; Jap. J. Exp. Med. 20, 301, 1949.
- 11) 中村敬三, 田崎瑛生 : 生体の科学, 1, 7, 昭24 (1949)
- 12) 田崎瑛生 : 日本医大誌, 第17巻 2号, 30, 1945
- 13) Cushing, J. E.; J. Immunol. 51, 61, 1945.
- 14) Pillemer, L., Seifter, S. & Ecker, E. E.; J. Exp. Med. 75, 421, 1942.
- 15) Zinsser H, & Parker J. T.; J. Immunol. 8, 151, 1923.
- 16) Puttman, M. & Goodner, K.; J. Immunol. 29, 239, 1935.
- 17) Goodner, K. & Horsfall, F. L.; J. Exp. Med. 64, 201, 1936.
- 18) Rice, C. E.; J. Immunol. 60, 11, 1948.
- 19) Cohn, M. & Pappenheimer, A. M.; J. Immunol. 63, 291, 1949.