免疫化学実験法

(2)

Tyoku MATUHASHI 松橋直

Mitsuko USUI 臼井美津子

Hideo NARIUCHI 成内秀雄

東京大学医科学研究所

- I. 免疫学的研究に使われるおもな動物とその扱い方
- II. 免疫拡散法 (沈降反応)
- III. 溶血反応, 補体結合反応
- IV. 間接赤血球凝集反応
- V. 標識抗体法
- VI. 抗体産生細胞の検査法

7. 抗血清のとり扱い方

免疫注射動物の抗体の力価が研究の目的に十分適合するようになったときに、全採血あるいは大量採血をして抗血清をつくるが、その方法や注意事項を簡単に述べる。

空腹時に採血すること：免疫注射動物は絶えず飼料を食べているので、血清を分離すると乳び状となり、種類の抗原抗体反応に使いにくい。したがって、採血するときはその前日の夕方から水だけを与えて絶食しておけば、清澄な血清を得ることができる。

無菌的で、化学的に清浄な採血用器具を用いること：採血用の注射器類は、化学的に清浄でかつ無菌的であるほうが、雑菌類の汚染がないので後で扱いやすい。しかし、生菌や培養細胞を用いる抗原抗体反応以外の多くの反応では、無菌操作をそれほど必要としないし、無菌的な抗血清の必要な場合でも、ミリポアフィルターを用いれば、比較的簡単に無菌化することができるので、血清類は雑菌類に汚染されやすいことを意識しながら、化学的に清浄な器具を用いて血清を分離し、防腐剤を入れてよいものであれば、 NaN_3 を用いると操作は簡単である。また、血液が凝固すると扱いにくいので、抗凝固剤を入れることがあるが、抗原抗体反応系によっては、血漿であると反応が起こらなかったり、他の血清類を入れると Ca^{++} が補給されて線維素が析出したりすることがあるから、抗凝固剤はなるべく用いない。無菌操作がめんどうなため、ペニシリンやストレプトマイシンなどを入れることがあるが、このような抗生物質には、抗原抗体反応を阻害したり補体結合を抑制するものがあるから、用

いないほうがよい。

血清の分離法：採血した試験管は、そのまま室温あるいは 37°C に15~30分保ち、血液を凝固させる。つぎに、清浄なガラス棒などで血餅を試験管壁からはがして氷室に1晩入れ、血餅を十分に収縮させて血清をできるだけ浸出させる。この際、血餅を試験管壁からはがさないで血清の分離が悪い。血清が分離したら血餅ごと遠心沈殿して、上清の血清をとり出す。

すぐに血清を分離する必要があるときは、小試験管に採取した血液をただちに2,500~3,000 rpmで3分間遠心すると、赤血球は沈殿し、上清に血漿が残り、線維素が析出してプリン状になる。このプリン状の線維素の網状の塊をガラス棒で押しつぶし、さらに同条件で遠心沈殿すると、上清として血清をとることができる。

血清の保存法：多くの抗原抗体反応では、抗血清中の補体成分をこわしておいたほうがよいので、 56°C で30分加温する。急ぐときは $60\sim63^{\circ}\text{C}$ で3分間加温する方法もあるが、この場合、抗体にはそれほどの変化はないが、血清成分の中には変性するものもある。

一般の保存法としては、 NaN_3 を0.1%の割合に抗血清に加えて氷室に保存すれば、数年間保つことができる。抗血清を小分けして -70°C の冷凍庫に保存すればさらによい。なお、マーサイオレートなどを0.1~0.05%加えることも行なわれている。ことに、抗血清を生体に注射するときは、 NaN_3 は毒性が強いので、マーサイオレートのほうがよいが、長い間には結晶が析出するものがあり、防腐の役に立たなくなることがある。また、フェノールを0.5%加える方法もあるが、血清

成分の沈殿や、補体結合の阻害があるから、用いないほうがよい。

新鮮なまま保存したときは、無菌的に小分けした抗血清を -70°C の冷凍庫に保存する。 -20°C 程度の冷凍保存では、抗体の力価が下がるものがある。ただし、凍結保存した抗血清類を何回も融解・凍結をくり返すと、抗体の力価が著しく低下するから注意する。

真空度のよい凍結乾燥器を用いて乾燥し、できた標品を氷室中に保存すれば、抗体類は5年以上、補体類で1年以上安定した力価を保つことができるが、真空にするまでのスピードが遅く、含湿度が高いと、抗体の力価は低下する。抗血清の保存には、むしろ NaN_3 を 0.1% の割合に加えて、氷室中に保つほうが安全である。

II. 免疫拡散法 (Immunodiffusion technic)

——沈降反応——

免疫拡散法は、抗原と抗体とを寒天などの支持体の中を拡散させ、抗原と抗体の濃度比が沈降物をつくるのに最適の条件になった位置で沈降線をつくらせ、その沈降線を目で明らかに見えるように工夫をした抗原抗体反応である。しかも、抗原液中に抗体と反応する部位 (抗原の特異性を定める一定の化学構造をもつ部位で抗原決定基とよぶ) をもつ分子が何種類もあり、抗血清中にもその抗原決定基に対応する特異性をもつ沈降性の抗体が抗原分子の種類だけあると、それに対応する数だけの沈降線ができるので、免疫学、血清学のみならず、蛋白や多糖体など、抗原性をもちうる物質の解析には欠くことのできない手法となっている。

この方法は、今世紀のはじめに、Bechhold⁽¹⁾ (1905) が現在の Oudin 法に近いものを試みている。また、小試験管に抗血清を入れて、その上に静かに抗原液をそそぎ、境界面にできる沈降輪を観察する重層法 (ring test) でも、沈降輪が2重、3重にできることがあり、その原因は、反応系が多種類あるためであると指摘されていた。

こうした研究は長い間かえりみられずにいたが、1944年、Oudin⁽²⁾ は、抗血清を含む寒天を小試験管に入れ、その上に抗原液を重ねて放置し、抗原と抗体とをゆっくり反応させたときにできる多数の沈降線が多数の抗原抗体反応系に対応するものであることを明らかにした。つづいて、Ouchterlony⁽³⁾ (1948) により、平板寒天に小さ

な穴を三角形の頂点の位置にあけ、抗原液と抗血清とを向かい合わせて拡散させる二重拡散法 (double diffusion) が工夫された。これは、未知の物質と抗血清との間にできる沈降線が、既知の物質と抗血清との間にできる沈降線と融合した場合は同一物質、交差した場合は異なる物質であることから、物質の同定にきわめて有効である。さらに、Grabar⁽⁴⁾ (1953) により、寒天の電気泳動法と Ouchterlony の方法とを組合せた免疫電気泳動法 (immunoelectrophoresis) が出現するに及んで、抗原性をもちうる物質の同定や分析には欠かすことのできない方法となった。その後、免疫拡散法に種々の改良がなされ、免疫学、血清学をはじめ、基礎医学、臨床医学、動植物学、生物学、化学などの領域で広く応用されるようになってきている。

今日までに工夫されている方法を大別すると、抗原または抗体が、抗体または抗原を含んでいる寒天中に拡散してゆく一次元拡散法 (simple diffusion) と、抗原と抗体とがそれらの間にある寒天の中をそれぞれ向かい合って拡散してゆく二次元拡散法 (double diffusion) とがある。そのいずれにも、多種類の 방법이工夫されているが、その代表的なものを次に述べる。なお、これに関する総合的な文献としては、Weir⁽⁵⁾、および Crowle⁽⁶⁾ の成書があるので参照されたい。

1. Oudin 法

従来の沈降反応重層法の抗血清層を、寒天で固まらせゆっくり沈降反応を起こさせたもので、沈降輪が幾重にも出るのが特徴である (図1右)。この沈降輪は、原則として抗原と抗血清との間にあり、沈降反応が起こる抗原抗体反応系の数だけ生ずると考えられている。なお、抗原および抗体の拡散方向が一次的であるため反応は敏感である。

▶ 用意するもの

- 小試験管 (内径 2~5 mm, 高さ 6 cm くらいのものが一番使いやすい)。
- 試験管台 (小試験管を1列に並べたとき、管底から 3~4 cm の高さまでが完全に見えるものを用いる。箸箱などにゴム粘土をつめたものでもよい)。
- 毛細管ピペット、普通のピペット類、湯槽 (56°C 前後)、ふ卵器など。
- パラフィルム。

Oakley 法 Oudin 法
図 1 抗ヒト血清とヒト血清との間の Oudin 法と Oakley 法

○精製寒天粉末 (Difco Noble, Agar-EPI, Agarose, Behringwerke Rein-Agar, J-Agar など).

○リン酸緩衝食塩水 (PBS, pH 7.0 前後のもの. 反応系によっては最適の pH がある).

○抗血清および抗原.

▶ 準備

- ① 精製寒天粉末を 1 (～1.5) % の割合で PBS に溶かし, これに防腐剤として NaN_3 を 0.1% の割合に加える.
- ② 抗血清, 抗原, PBS などを 56°C 前後に保っておく. 使用する小試験管も湯槽につけて保温し, 毛細管ピペットや 1 ml ピペットなども 56°C の PBS に何回も出し入れしてあたためておく.

▶ 実施法

- ① 100°C で完全に溶かした寒天 1 ml を小試験管にとり, 56°C 前後の湯槽につけて保温する (約 10 分).
- ② 56°C 前後にあたためた抗血清を等量 (1 ml) 加えてよく混和する.
- ③ 毛細管ピペットでこの混合液を吸いとり, 56°C 前後にあたためた小試験管の底にピペットの先端をつけて静かに押し出す. 高さは約 3 cm にする. 小試験管を湯槽の中で静置して, 壁面の寒天を落下させる.
- ④ 56°C 前後にあたためた PBS を小試験管の壁面を

つたわらせて静かに寒天層の上に重層し, 寒天ゲルの上面のメニスカスを水平にする.

- ⑤ 小試験管を湯槽からとり出し, 固まらせる (室温により, 放置する時間は異なる).
- ⑥ 寒天が固まったら, 重層した PBS を毛細管ピペットでとりのぞく.
- ⑦ 抗原液を重層法の要領で抗血清層に重ねる. 抗原濃度は高いほうがよい. 抗原の濃度が低いと思われるときは, 抗原層も寒天にする.
- ⑧ 小試験管の口をパラフィルムまたはゴム粘土で密封して, 37°C のふ卵器に入れる.
- ⑨ 翌日から毎日観察し, できた沈降輪の数および下方への移動状況を観察する.

▶ 観察

抗体層の濃度が一定の場合には, できる沈降輪から境界面までの距離は抗原の濃度に比例し, 沈降輪の移動は反応時間の平方根に比例する. したがって, 濃度既知の物質を数段階に希釈して Oudin 法を行ない, 一定時間 (たとえば 24 時間) 後にできる沈降線の境界面からの距離を測定し, その距離と濃度との関係のグラフをつくる. これを標準曲線として, Oudin 法で得られる濃度未知の同物質の距離を測定し, 前述のグラフから求めれば濃度を知ることができる. また, ある物質を精製する場合, まず粗物質に対する抗血清をつくっておき, これを用いて Oudin 法を行ない 1 本の沈降線が得られるまで精製し, その物質が所期の活性をもっている場合には, かなりの純品が得られたものと考えてよいであろう.

2. Oakley 法

Oakley (1953) により, ガラス管内で寒天ゲルを抗原と抗血清との中間に位置させる二次元拡散法が採用され, Oudin 法で境界面に沈降物が生じて見にくくなりやすい点を改良した方法である (図 1 左). 本質的には Oudin 法と同様なので, 要点を述べるにとどめる.

▶ 用意するもの

Oudin 法と同じであるが, 小試験管は長いものを用いたほうがよい.

▶ 実施法

- ① Oudin 法と同じ要領で, 抗血清寒天溶液を小試験管に約 2 cm の高さに分注し, 56°C 前後に保ったまま抗血清寒天液が壁面を落下するのをまち, PBS を重

層して抗血清寒天層を固まらせる。固まったら PBS を完全にとりのぞき、メニスカスを水平にする。

② ふたたび小試験管を 56°C にあたため、抗血清層の上に 0.5% 寒天を約 2 cm の高さに重ね、前と同様、PBS を重層してから固まらせ、固まったら PBS をとりのぞく。

③ もう一度小試験管を 56°C にあたため、抗原寒天溶液を 2 cm の高さに重層し、室温で固まらせる。

④ 管口をパラフィルムでふさぎ、37°C の湯槽またはふ卵器に入れる。

⑤ 翌日から寒天層にできる沈降輪を観察する。

注意： 抗原層は多くの場合液状であってもよい。

3. Ouchterlony 法

Ouchterlony⁽³⁾ により創案された寒天ゲル内沈降反応で、二次元の平板内を抗原および抗体が拡散して反応し、最適比のところに沈降線がつくられるのを観察する方法である。Oakley の方法を平板内で行なうものであるが、この方法のすぐれた点は、抗原および抗体の検出のみならず、同定も行なえることである。すなわち、抗原性のわかっている物質と未知の物質とを別々の位置から抗血清と反応させ、できる沈降線が融合するか、交差するか、または部分的に融合するかを観察することにより、既知の物質と未知の物質の抗原性の異同が推定できる。また、動物に免疫して得られた抗血清も、特異性が確実にわかっている別の抗血清と同時に適当な抗原に対して Ouchterlony 法で検討することにより、その特異性を決めることができる。抗血清中の抗体の含み方と、抗原の成分の含み方によりできる沈降線の関係は、図 2 に示すとおりである。

図 2 抗血清および抗原成分の含み方と沈降線との関係

- I : 抗体 A と、左右の抗原 a との間にできる沈降線は完全に融合する。
 II : 抗血清に異なった 2 種の抗体 A と B があると、A と B がそれぞれ抗原 a, b との間につくる沈降線は完全に交差する。
 III : 抗原分子 ab は、右の抗原 b と共通した抗原決定基 b をもつ場合、抗体 A, B を含む抗血清との間にできる沈降線は、spur を形成する。共通部分が多いか少ないかによって、spur の現われ方もちがう。

▶ 用意するもの

○寒天 (J-Agar, Difco Noble, Agar-EPI, Ionagar, Behringwerke, Agarose など。これらの粉末を 1~1.2% PBS に溶かし、 NaN_3 を 0.1% の割に加えておく)。

○シャーレ、またはガラス板。

○ガラス板を用いるときは、それを入れるプラスチック製の箱 (密封可能なもの)。

○抗血清、抗原を入れる穴をあける鋳型、または直径 2~3 mm のスチールパイプ (太い注射針を水平に切ったものでよい) を図 3 のように 6 角形の頂点を中心に、各管の距離が約 3 mm になるように組合せたパンチャー。これらのものがないときは、方眼紙に図 3 のような円をかいておく。

○観察箱、水平台、および実体顕微鏡。

▶ 実施法

A. ガラス板を使う方法 (micro-Ouchterlony 法) :

- ① ガラス板をクロム硫酸混液でよく洗い、水洗後アルコールなどで十分に脱脂する。
- ② 水平な面に高さの等しい棒 (たとえば同じメーカーの同じ種類の鉛筆) をおき、これにガラス板をのせる。ガラス板が水平になっていることを水準基で確かめるとよい。
- ③ このガラス板に寒天溶液をそそぎ、厚さが 1 mm になるようにする。寒天の容量はガラス板の面積 (Acm^2) に寒天の厚さ ($T\text{cm}$) を掛ければ簡単に算出。普通のをセガラスでは 2 ml ぐらいが適当である。また、寒天はのせガラス一面に広がるようにそそぎ、ピペットの先端ですばやく、のせガラスの隅々までゆきわたらせる。

④ これをそのまま放置して固まらせる (約 15 分)。

⑤ 固まったら、パンチャーでパンチするか、あるいは、あらかじめパンチする位置をかいた方眼紙の上にガラス板をのせ、1 つ 1 つスチールパイプでパンチする。

⑥ パンチした部分の寒天を針の先などでとる。

⑦ 抗原、抗血清を分注する。量は、穴の上面までいっぱいに入ればよい。一定量を入れる場合は 4 μl 程度。

- ⑧ これをプラスチック箱に入れる。箱の底には水を含みこませたガーゼなどを敷き、そこへ高さの等しい棒をおいて、ガラス板をのせる。
- ⑨ 密閉して、37°C のふ卵器、あるいは氷室で一定温度に保つ。しかし、ここに記述した微量法は比較的短時間（速いものでは約 30 分、遅いものでも 1 晩）で沈降線が現われるから、手近かにおいて 30 分おきくらいに観察する。これは、数時間ならそれほど室温に変化がないうえ、分子量が小さくしかも抗原濃度が高いものを抗原として使うときは、沈降線は 1~2 時間の間は明瞭であるが、やがて抗血清の側に押しやられ、10 時間以上もたつと消失してしまうものもあるからである。
- ⑩ 光源を斜め下方からガラス面にあてて、暗視野効果を出した観察箱（たとえば、immunoviewer, 常光）などを用いれば、肉眼的観察も容易である。ルーペあるいは実体顕微鏡を用いればさらに細かい観察ができる。写真撮影をすれば、染色標本を保存する必要はない。図 3 にその実例を示す。
- ⑪ 染色するときは、これを水につけて反応に関係しな

い余分の蛋白を抽出する。蒸留水を用いると穴の周囲が白く濁ることがあるので、PBS を用いるとよい。毎日、何回も PBS をとりかえると、4~5 日で余分の蛋白は除去できる。これを 0.5% Ponceau 3 R (3% トリクロール酢酸溶液) などで染色する。

B. シャーレを使う方法：

- ① シャーレに、厚さ 2 mm になるように寒天溶液をそそぎ、固まらせる。
- ② 固まった寒天の上に鋳型をのせ、ふたたび寒天溶液をそそぐ。その量はあらかじめ計算して、穴の深さが 2~3 mm になるようにする。
- ③ 寒天が固まったら鋳型をぬきとる。
- ④ あとからそそいだ寒天が穴の中に残っていたら、それをピンセットなどでとりのぞく。
- ⑤ 抗原と抗血清を分注する。
- ⑥ シャーレに蓋をし、ビニールテープなどで密閉して、37°C のふ卵器、あるいは氷室で一定温度に保つ。
- ⑦ 反応時間は micro-Ouchterlony 法よりも遅いから、10 時間前後から観察する。
- ⑧ 以下は micro-Ouchterlony 法と同様である。

4. Single radial immunodiffusion

Fahey⁽⁷⁾, Mancini ら⁽⁸⁾ により、血漿蛋白などの抗原の定量法として開発されたものである。一定量の抗体を含む寒天平板に直径 2~3 mm の穴をあけ、この中に一定量の抗原を分注して拡散させると、穴のまわりに沈降物の輪ができる。この輪は時間とともに大きくなり、抗原の量に応じて一定のところで止まる。この時期では、沈降輪の面積は穴の中に入れた抗原量と比例することが見いだされ、これより抗原量既知の物質を用いて標準曲線をつくっておけば、未知の物質の抗原量を定量することが可能である。単一の物質とのみ反応する特異抗血清を寒天内に含ませておけば、血清などのような複雑な混合物中の 1 つの物質を定量できる。

▶ 用意するもの

- ガラス板 (8.5×11 cm), 50°C 前後の恒温槽。
- マイクロシリンジ (10 μ l), メスビベット (1 ml, 10 ml)。
- 直径 2~3 mm の金属製の肉薄の管。
- 密封できる容器、および水平台。
- ノギス、あるいは図 4 のようなものさし。
- 寒天 (生理食塩水で 1.2% に溶かす。0.1% NaNa₃ を

図 3 Micro-Ouchterlony 法の実施例
(接写撮影したもの)

1, 3, 5: 患者血清より分離した異常蛋白成分, 2: ヒト γ G の Fc 部分, 4: ヒト γ G, 6: ヒト γ G の Fab 部分, 7: 抗ヒト γ G globulin (抗 Fc, 抗 Fab を含む)

患者血清より分離した異常蛋白成分 1, 3, 5 と抗 γ G 7 との間にできる沈降線は、Fc の沈降線と完全に融合し、Fab の沈降線とは完全に交差している。そして、 γ G と抗 γ G との間にできる沈降線に入りこんで、spur が形成されている。このことから、患者から分離された蛋白は、 γ G の Fc 部分と抗原性が一致していることがわかる。

図 4 沈降輪の直径を測定するのに用いるものさし

透明なセルロイドまたはプラスチックでできているが、方眼紙を切りぬいてつくってもよい。下側の斜めの線は、a の 10 cm の目盛りのところで、1 cm 下がっている。このものさを沈降輪にあてて、a、b がちょうど沈降輪の接線になるような位置におき、そのときの a の目盛りをよめばよい。すなわち、a、b 間の距離が、10 倍に拡大された目盛りでよみとれるようになっている。

加えておく)。

○ 定量しようとする物質に対する特異抗血清。

○ 既知量の抗原。

▶ 実施法

- ① ガラス板に広げたとき厚さ約 1 mm になる量の寒天をとり、恒温槽にうつして 50°C 前後に保つ。
- ② あらかじめ検討した抗血清の量を太めの試験管にとり、50°C 前後にあたためる。
- ③ 寒天を抗血清に加えて、よく混和する。
- ④ 水平台においたガラス板に一樣に広げて固まらせる。
- ⑤ 約 1.5~2 cm の間隔に直径 2~3 mm の穴をあける。
- ⑥ 既知量の抗原溶液の 4 段階の希釈溶液をつくり、それぞれを 4 μ l ずつ穴に入れる。
- ⑦ 試料を 4 μ l 穴に入れる。
- ⑧ 容器に入れ、密封して室温で 48 時間水平に保つ。
- ⑨ 穴のまわりにできた沈降輪の直径は、バックを黒くして、斜め下から光があてられる観察箱の上で、ノギスカ、または図 4 のものさしで測定する。この際、わくをおいて寒天面を下にし、ノギスまたはものさを直接ガラスにあてて測定すると誤差が少ない。
- ⑩ 抗原量を横軸に、沈降輪の直径の 2 乗を縦軸に目盛り、検量曲線をつくる。4 点が一直線上にのることが必要である (図 5)。
- ⑪ 試料の沈降輪の直径の 2 乗を検量曲線上に求め、これから試料中の抗原含有量が求められる。

実施上の注意：

- 1) 抗血清の量は、測定するものとそれに対する特異抗血清の強さにより異なるので、それぞれについてあら

かじめ検討する。大体、寒天で 5 倍から 10 倍に希釈される程度の量がある。

- 2) 沈降輪が大きく、かつその輪郭が明瞭になるように抗血清の量を検討する。

- 3) 検量曲線をつくるときの既知抗原量の希釈溶液は 4 段階つくるが、その抗原量は試料により異なるので、あらかじめ検討する。

- 4) 試料の沈降輪の直径の 2 乗が、標準曲線の範囲内にあることが望ましい。著しくずれが大きいときには試料を希釈して測定をやりなおす。また、著しく小さいときには標準曲線の範囲をさらに下げてつくりなおす。このとき、あまり沈降輪が小さくて測定誤差が大きいときには、抗血清の量を減らし沈降輪を大きく出すように標準曲線をつくりなおす。

- 5) 標準曲線の 4 点が一直線にのらないときは、やりな

図 5 標準曲線の一例

おす。これは、試料の希釈、試料の計量の誤り、および反応時間の不足、測定の際の誤りなどが原因である。

5. Reversed single radial immunodiffusion^(9,10)

Single radial immunodiffusion とは逆に、抗原を含ませた寒天平板に抗体を拡散させて、できた沈降輪の面積から抗血清中に含まれる抗体量を測定する方法である。一定量の抗原を含む寒天平板に直径 2~3 mm の穴をあけ、この中に一定量の抗血清を分注し、拡散が平衡に達するまで十分に時間をかけ、沈降輪の直径を測定すると、直径の 2 乗が抗血清中にある抗体量に比例する。したがって、抗血清を 1 つだけ定量沈降反応で抗体含有量を測定しておけば、その抗血清で検量曲線をつくり、同時に抗体量未知の抗血清の沈降輪の直径を測定し、検量曲線から抗体量を求めることができる。定量沈降反応で 1 つの抗血清の抗体量を測定しておけば、他の抗血清はわずか 4 μ l の量で簡単に抗体含有量を測定できる。

▶ 用意するもの

○ガラス板 (8.5×11 cm), マイクロシリンジ (10 μ l),
メスピペット (1 ml, 10 ml), 径 2~3 mm の肉薄の管。

○ガラス板を入れる密封できる容器、水平台、恒温槽。

○ノギス、または図 4 のようなものさし。

○寒天 (1.2% の濃度に生理食塩水または pH 7.0~7.2 の PBS で溶かし、防腐剤として NaN₃ を 0.1% の割合に加えておく)。

○測定しようとする抗体に対応する抗原。

○抗体含有量をあらかじめ測定した抗血清。

▶ 実施法

① 寒天を溶かし、10 ml ずつ分注し、恒温槽で 50°C に保つ。

② ①の寒天に抗原を加えて混合する。

③ 水平にしたガラス板に均等に広げて固まらせる。

④ 約 2 cm の間隔で径 2~3 mm の穴をあける。

⑤ 抗血清を 4 段階に希釈し、各 4 μ l ずつマイクロシリンジで④の穴に入れる。

⑥ 被検試料を 4 μ l ずつ④の穴に入れる。

⑦ 水平にした容器に入れて密封し、室温で 48 時間おく。

⑧ ⑤、⑥の穴のまわりの沈降輪の直径を測定する。

⑨ 抗体量を横軸に、沈降輪の直径の 2 乗を縦軸にとつて、⑤に用いた抗血清の値から検量曲線をつくる。

⑩ ⑥の試料の沈降輪の値から、検量曲線を用いて、この

中に含まれる抗体量を求める。

実施上の注意：

- ②に用いる抗原の濃度は種類によって異なるが、BSA の場合には最終濃度が 0.02 mg/ml くらいになるように寒天に溶かせばよい。その他の抗原の場合にはこの濃度を中心にして希釈し、沈降輪の輪郭がはっきりし、しかもできるだけ大きい輪ができるように、あらかじめ抗原濃度を決める。
- 寒天と抗原をよく混和するには太い試験管を用いる。
- ⑧の測定の際は、寒天板を裏返してノギスをガラス板に密着させて測る。
- ⑨の検量曲線は 4 点が一直線上にのることが必要である。
- なお、溶血素の場合には、抗原となる赤血球を寒天に混合して平板をつくり、前と同様に抗血清の拡散を行ない (室温、赤血球の場合は 48 時間が限度)、補体をかけて 37°C に 30~60 分おくと、抗血清を分注した穴のまわりに溶血輪ができる。この直径を測定して溶血素の抗体量を比較できる。この場合は、蛋白抗原の場合とちがって標準となる溶血素血清の抗体の絶対量を測定できないので、各溶血輪の直径の 2 乗で互いに比較する。マウスの血清などのように、ごく少量しか採血できない場合の抗体価の測定には便利である。
- 蛋白抗原などを赤血球に結合させ、寒天内に一樣に含ませたものを用い、5) と同様その蛋白抗原に対する抗体の拡散のすんだ後、補体をかけて、passive hemolysis を行なうこともできる。

文 献

- 1) H. Bechhold : *Z. Physik. Chem.*, 52, 185 (1905).
- 2) J. Oudin : *Compt. Rend. Acad. Sci.*, 222, 115 (1946).
- 3) Ö. Ouchterlony : *Arkiv Kemi. Mineral Geol.*, 26 B, 1-9 (1900); *Progr. Allergy*, V, 1 (1958); *Progr. Allergy*, VI, 30 (1962).
- 4) P. Grabar & C. A. Williams, Jr. : *Biochim. Biophys. Acta*, 10, 193 (1953).
- 5) D. M. Weir : "Handbook of Experimental Immunology", Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1967.
- 6) A. J. Crowle : "Immunodiffusion", Academic Press, N. Y. & London, 1961.
- 7) J. L. Fahay & E. M. McKelvey : *J. Immunol.*, 94, 84 (1965).
- 8) G. Mancini, A. O. Carbonara & J. F. Heremans : *Immunochem.*, 2, 235 (1965).
- 9) Vaerman et al. : *Immunochem.*, 6, 287 (1968).
- 10) H. Nariuchi et al. : *Japan. J. Exp. Med.*, 40, 15 (1970).