免疫化学実験法

(5)

Tyoku MATUHASI 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

III. 溶血反応，補体結合反応

赤血球や細菌などの細胞性の抗原が抗体と反応するとき，補体が存在すると細胞は溶解し，赤血球なら溶血反応，細菌なら溶菌反応が起こる．この原因は，細胞性抗原の膜上の抗原決定基と反応した抗体により，酵素である補体が活性化されて，膜上の基質を溶解するためである．

補体(complement, 以下 C と略す) は，動物の新鮮血清中にふつうに存在する物質であるが，単一なものではなく，現在9成分が知られており，C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7, C8, C9 と名付けられている．対応する抗体（溶血素）が結合しているヒツジ赤血球を一般に感作ヒツジ赤血球と呼んでおり，補体成分を比較的効率よく含んでいるモルモットの新鮮血清の希釈液を加えると溶血反応が起こる．このとき，感作赤血球によって活性化される補体成分の順序は C142356789 であり，C8 までで溶血が起こり，C9 により増強されて確実なものになるという．補体はこのほか，活性化されるとき，アナフィラキシーを起こす毒素，chemotoxis, あるいは血管透過性を高める物質を出す⁽²¹⁾．なお，溶菌現象にはリゾチームが必要である．

溶血反応は，比較的敏感な反応であるうえ，抗体価を定量的に測定することが比較的容易なので，抗体産生の研究にはヒツジ赤血球を抗原として注射することがよく行なわれる．また，補体結合反応の indicator として感作ヒツジ赤血球が用いられることが多い．

1. 溶血素価の測定法⁽²²⁾

溶血素価の測定法には，抗血清を倍々希釈によって力価(titer)を決める場合と，さらに細かく希釈して溶血素価を決める場合とがある．また，最近では microtiter の使用が普及し，数多くの試料を少量でしかも短時間内に処理できるので便利である．

▶ 用意するもの

- 小試験管または microplate.
- ピペット (1 ml, 5 ml, 10 ml), または microtiter の dropper および diluter (0.025 ml のもの).
- 37°C 恒温槽または 37°C ふ卵器, および遠心器.
- 抗原となる赤血球.
- GVB⁺⁺ (gelatin-veronal-buffer).
- 補体 (通常, 新鮮モルモット血清を用いる).

▶ 準備

- ① 次のようにして，まず VB 原液 (VB stock solution) をつくり，次いで GVB⁺⁺ をつくる．

- a) 原液のつくり方: NaCl (85 g), 5,5-diethylbarbituric acid (5.75 g), Na-5,5-diethylbarbiturate (3.75 g) を蒸留水に溶かして 2,000 ml とする．氷室に保存する．
- b) GVB⁺⁺ のつくり方: 原液 (200 ml), 0.03 M CaCl₂·2H₂O (5 ml), 0.1 M MgCl₂·6H₂O (5 ml), 2% ゼラチン (50 ml) を蒸留水に溶かして 1,000 ml にする (pH: 7.5, 比抵抗: 78 Ωcm⁻¹, イオン強度: 0.147).

- ② モルモット新鮮血清（以下補体血清と呼ぶ）を抗原赤血球で、低温（0°C）で吸収しておく。補体血清がふつうもっている異種抗体をとりのぞくためである。補体血清の約 1/5～1/3 量の抗原赤血球沈渣（GVB⁺⁺ で 3 回洗ったもの）を氷水中で冷やし、同じく氷水中で冷やしてある補体血清に加えよく混和する。0°C に 30～60 分おいた後、遠心して上清を分離する。これを寒冷飽和と呼ぶ。寒冷飽和した補体血清は 1～2 ml ずつ小分けして -70°C または -20°C に凍結保存し、使用時に必要量だけ融解して用いるようにする。

- ③ 試料または検討すべき抗血清は、56°C で 30 分加温して非働化しておく。

▶ 実施法

- ① 抗原赤血球を GVB⁺⁺ で 3 回洗い、2% 浮遊液をつくる。
- ② 抗血清の希釈系列をつくるための希釈液分注を行なう（希釈液は GVB⁺⁺。試験管で行なう場合には 0.25 ml の希釈系列、microtiter では dropper の 1 滴の 0.025 ml）。試料によって高い値が予想されるときは、10～100 倍希釈から出発して倍々希釈系列をつくる。
- ③ 10～20 倍に希釈した補体血清（寒冷飽和したもの）を試験管の場合にはピペットで 0.25 ml、microtiter では diluter で 0.025 ml 加え、混和する。
- ④ 2% 赤血球浮遊液を試験管の場合には 0.25 ml、microtiter では dropper で 0.025 ml 加えて、よく混和する。
- ⑤ 対照として、GVB⁺⁺-補体-赤血球の組合せをつくる。
- ⑥ 試験管の場合には 37°C 恒温槽に 30 分、microtiter では 37°C のふ卵器に 1.5～2 時間おく。
- ⑦ 試験管の場合には、よく振って液の透明度で溶血の有無を判定する。microtiter の場合には、plate の底に沈んだ赤血球のつくる円の大きさと、上清の色によって溶血の程度を読む。判定は完全溶血を示す最高希釈を力価とする場合と、溶血の程度を 4～0 の 5 段階に分けて、2+ までを陽性として 2+ を示す最高希釈倍数を力価とする場合とがある。各自の実験系で決めればよい。

以上は、一般の試料の溶血素価の測定法である。補体結合のための感作ヒツジ赤血球をつくる溶血素価の決め方は、次の補体価測定の項に述べる。

▶ 実施上の注意

- 1) 判定の規準となる種々の溶血程度のサンプルをつくらせて目をならすとよい。そのつくり方は次のようにする。

- (1) 2% 赤血球浮遊液を 5 ml とり、遠心して上清を完全にすてる。
- (2) 蒸留水を 2.4 ml を加えて、赤血球沈渣を完全に溶血させ、これに 1.7% 食塩水を 2.5 ml 加える。
- (3) このようにしてつくった 2% 赤血球の溶血液を、溶血させていない 2% 赤血球浮遊液および GVB⁺⁺ と次の割合に混合する。

試験管 No.	1	2	3	4	5
溶血液	1.0 ml	0.75	0.5	0.25	0
浮遊液	0	0.25	0.5	0.75	1.0
GVB ⁺⁺	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

- (4) よく混合し、それぞれを 1 ml ずつ別の試験管にとり、実際の試料の溶血度と比較する。microtiter 法の場合には、それぞれを dropper で 3 滴ずつ穴に入れ、底にできる赤血球の円を、試料のそれと比較する。
- (5) 溶血度は、たとえば 4, 3, 2, 1, 0 で示すとすれば、試験管 1 が 4 (100% 溶血)、試験管 2 は 3 (75% 溶血)、試験管 3 が 2 (50% 溶血)、試験管 4 が 1 (25% 溶血)、試験管 5 が 0 (不溶血) である。
- 2) 実験によって、は產生された溶血素の免疫グロブリンのクラスを決めたい場合がある。それには、次のような方法がある。

- a) 2-Mercaptoethanol (2-ME) 処置: 0.1 M 2-ME で 2 時間処置により抗体活性を失うものは、19 S の rM に属する抗体といわれている、7 S rG に属する抗体は 2-ME 抵抗性であるという。生理食塩水で 0.2 M 2-ME 溶液をつくり、この 1 容と試料 1 容を混合し、37°C に 2 時間おく。次いで生理食塩水で 1 晩透析して 2-ME をのぞき、溶血素活性を測定する。ただし、急ぐときは透析を省略してもよい。われわれ⁽²³⁾は試料が少量の場合に、microplate 上で 2-ME 処置を行なっている。すなわち、microplate の第 1 列めの穴に GVB⁺⁺ を 0.025 ml を滴下し、それに試料（われわれではマウス血清）を 5 μ l 加えて混和する。次に 0.2 M 2-ME を 0.025 ml 加えて、37°C のふ卵器に 3 時間半おいてから dilut-

er で倍々希釈を行なって、前述のように溶血素価を測定する。

- b) 抗免疫グロブリンによる溶血反応の augmentation (増強法): γ G グロブリンクラスに属する溶血素は、倍々希釈して抗原赤血球を反応させてから (このときはまだ補体を加えない) 抗 γ G の適当な希釈液を加えて反応させ、次いで補体を加えると溶血の力価が著しくのびることが、Riha⁽²⁴⁾ により報告された。試料がマウス血清の場合には、ウサギでつくった抗マウス γ 2, 抗マウス γ 1, 抗マウス γ M などの適当な希釈液 (通常 50~100 倍) を用いる (これらはあらかじめ抗原赤血球でよく吸収しておく)。試料の倍々希釈系列に抗原赤血球浮遊液を加え、室温に 30 分おき、次に抗グロブリンの適当な希釈液を加え、室温に 30 分おく。さらに、補体希釈液を加えてよく混和し、37°C のふ卵器に 2 時間おいて判定する。

2. 補体価の測定法⁽²⁵⁾

血清中の補体価の変動を云々したり、補体結合反応によって抗体または抗原の検出を行なう場合の補体価の測定は、正確に行なう必要がある。分光光度計の普及している現在では、50% 溶血法による補体価の測定を行なうようにしたい。

▶ 用意するもの

- 分光光度計。
- 37°C 恒温槽、および遠心器。
- 試験管 (15ml のものが充分混和するのに都合がよい)。
- ピペット (10 ml, 5 ml, 1 ml)。
- 溶血素 (抗ヒツジ赤血球。よい抗血清を選ぶ)。
- ヒツジ赤血球。
- GVB⁺⁺。

▶ 準備

感作赤血球をつくるために、各 lot の溶血素についてあらかじめ最適量を下記のようにして測定しておき、よい溶血素を選ぶ。一度測定しておけば、その lot の溶血素については当分の間その量で用いることができる。

- ① ヒツジ赤血球 (沈渣で約 6 ml) を GVB⁺⁺ で 3 回洗う。
- ② 1×10^9 /ml の赤血球浮遊液をつくる。血球自動血算計などによる正確な血算ができないところでは、溶血させてその吸光度を測定し、それで調整する。 1×10^9 /

ml の赤血球浮遊液 1 ml を 14 ml の蒸留水に溶血させたときの吸光度 (OD) は 0.700 である (波長 541 m μ)。吸光度を測定して 1×10^9 /ml の赤血球浮遊液をつくるには次のようにする。

- (1) 5% 浮遊液を GVB⁺⁺ でやや濃い程度につくる。
- (2) 浮遊液を 1 ml とり、14 ml の蒸留水を加え、よく混和して溶血させ、波長 541 m μ で吸光度を測定する。
- (3) 正確な濃度の浮遊液を V_f ml つくるには、

$$V_f \times \frac{0.700}{OD} = V_i$$

の式で V_i を計算し、先の浮遊液を V_i ml とり、GVB⁺⁺ で全量を、 V_f ml にする。

- ③ 溶血素の 400, 600, 800, 1200, 1600, 2400, 3200, 6400 倍希釈液を GVB⁺⁺ で 10 ml 前後つくる。
- ④ 9 本の試験管 (径 3 cm くらいの太めのもの) に②でつくった赤血球浮遊液を 5 ml ずつ分注し、試験管をたえず振りながら、それぞれに③でつくった溶血素希釈液を 5 ml 加え、残った 1 本の試験管には GVB⁺⁺ を 5 ml 加える。この際、赤血球浮遊液に溶血素希釈液を混和しながら加える。順序を逆にすると赤血球は平等に感作されない。
- ⑤ 室温に 30 分おいてから、その 1 ml を 5.5 ml の GVB⁺⁺ に加えた後、氷水中で冷やす。
- ⑥ 新鮮補体血清の 200 倍溶液 1 ml ずつを氷水中で冷やしたまま加え、よく混和する。
- ⑦ 37°C で 90 分 加温する。
- ⑧ 90 分たったらただちに氷水中に移して冷やす。次いで遠心して、上清を別の試験にとる。
- ⑨ 上清の吸光度を測定する (6.5 ml の GVB⁺⁺ に、⑥の補体 1 ml を加えた液を 0 にする)。
- ⑩ 吸光度と溶血度との関係のグラフをつくっておき、吸光度から溶血度がわかるようにしておく。そのために②でつくった赤血球浮遊液を蒸留水で次のような溶血液をつくる。

試験管 No.	1	2	3	4	5
赤血球浮遊液	1 ml	0.75	0.5	0.25	0
蒸 留 水	14	14.25	14.5	14.75	15
溶 血 度	100%	75	50	25	0

- ⑪ 最大溶血を示すピーク または プラトーに達する溶血素の濃度を最適量とする。

注意： 同じことを2系列同時に行ない、一致した値をとる。また、補体対照、溶血素対照において、これらが不溶血であることを確かめる。また、よい溶血素とは、最適の感作量を求めるとき、溶血度が 50~70 % プレートに達するようなものである。

▶ 実施法

- ① 氷水中で冷却しながら補体血清を 60 倍および 600 倍に正確に希釈する。
- ② 次の順序で各成分を混和する。同じものを 2 系列つくる。

試験管 No.	1	2	3	4	5	6	7	8
GVB ⁺⁺	5.0	4.5	4.0	3.5	3.0	5.5	6.5	6.5
感作赤血球*	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	—
モル C 600 倍	1.5	2.0	2.5	3.0	3.5			
60 倍						1.0	—	1.0

* 感作赤血球は準備の項で述べたように、最適当の溶血素で感作したもの。濃度は 5×10⁸/ml で、この反応条件で完全溶血を示したときの吸光度は 0.700 である。

- ③ 37℃ で 60 分、たえず振って赤血球を混和しながら反応させる。
- ④ 氷水で冷やして反応を止め、ただちに遠心して上清を別の試験管にとる。
- ⑤ 波長 541 mμ で上清の吸光度を測定する。
- ⑥ 試験管 No. 7 の機械的溶血および No. 8 の補体の色の吸光度を No. 1~6 の吸光度より引く。No. 1~5 の値を No. 6 の値で割って、各管の溶血率 y を出す。
- ⑦ No. 1~5 の y/(1-y) の値を求める (文献 25 参照)。
- ⑧ 両対数方眼紙に y/(1-y) と補体量をプロットし、No. 1~5 の各点を結び、その直線が y/(1-y)=1.0 を切る点の補体量を求める。この値が 5×10⁸ml の感作赤血球 1ml に対して 50% 溶血法による補体価 1 単位 (1UCH₅₀) で、この値の逆数が補体 1ml あたりの補体単位である。
- ⑨ 2 系列の値が一致すること、溶血が 10~90% の間で各点が一直線上にあること、直線の勾配が 0.200±0.02 であることを確かめる。

3. 補体結合反応⁽²⁶⁾

抗原と抗体とが結合して複合物をつくと、補体成分はこれに結合ないし活性化されて、補体としての活性を失う。もっとも、すべての抗体にこの作用があるのではなく、ヒトでは rG 1, 2, 3, rM 1, 2 などにあり、

図 III.1 補体結合反応の一例

試験管の左より 5 本目までは、抗原と抗血清とを補体存在のもとで反応させてある。6 本目は抗血清対照。
A：抗原抗体複合物を形成し、補体が吸着されたため、後から加えた溶血素で感作した赤血球は溶血しない。
B：抗血清中に抗体がない例。抗原抗体複合物をつくらず、補体が活性を保っているの、感作赤血球は全部溶血している。

rA, rE には補体結合性がない。したがって、この補体結合性の抗体を検出する際、この抗体と対応する抗原とを補体存在のもとで反応させると、補体は抗原抗体複合物によって結合ないし不活性化されるから、補体の活性の低下を測定することにより、抗原抗体反応が起こったことを間接に知ることができる。この補体の活性低下を知るには、抗体（溶血素）と反応したヒツジ赤血球（感作赤血球）を indicator として用いて、その溶血反応の起こる程度を測定すればよい。すなわち、抗原抗体の反応系において、補体が抗原抗体複合物に結合され、消費されたことを、感作赤血球の溶血を目安として測定するのが補体結合反応である。図 III.1 にその一例を示す。

▶ 用意するもの

- 恒温槽 (56℃ および 37℃ のもの)。
- 遠心器、および分光光度計。
- 小試験管およびその台、または microtiter のセット。
- ピペット (10 ml, 5 ml, 1 ml など)。
- ヒツジ赤血球。
- 溶血素 (抗ヒツジ赤血球。補体価測定の項に述べた方

図 III.2 補体結合反応の実施法②の参考図

法で、最適感作量の測定してあるもの)。

○補体 (新鮮モルモット血清)。

○抗血清、および抗原 (濃度 1~5 mg/ml 以上のもの)。

▶ 準 備

① 抗血清を 56°C で 30 分 加温する。

② 5×10^8 /ml の感作赤血球をつくる。補体価測定の前で述べたように、最適感作量の測定してある溶血素の最適の希釈液 1 容を、 1×10^9 /ml の赤血球浮遊液 (1 ml の浮遊液に蒸留水 14 ml を加えて溶血させたときの OD₅₄₁ が 0.700 のもの) に混和しながら加える。

③ 補体価を測定し、補体血清 1 ml 中の 50% 溶血単位を求める。

④ 5 単位/ml (5 UCH_{50} /ml) の補体を用いるので、③で測定した補体価を何倍に希釈したら 5 UCH_{50} /ml になるかを計算する。たとえば、③の値が 320 UCH_{50} /ml であれば、 $320 \div 5 = 64$ 、すなわち補体血清を 64 倍に希釈して用いる。

⑤ 次のようにして抗原および抗血清の溶血阻止量を求める (当日でなくても、前もって検討しておくとい)。

(1) 抗原液 (1~5 mg/ml) および抗血清を、GVB++ で倍々希釈する (試験管法では 0.25 ml, microtiter では 0.025 ml の系列)。通常 $1 \sim 2^{10}$ 倍まで希釈する。

(2) 5 UCH_{50} /ml の補体を試験管法では 0.25 ml, microtiter では 0.025 ml 加える。

(3) 37°C に 1 時間おく。

(4) 5×10^8 /ml の感作赤血球を試験管法では 0.25 ml, microtiter では 0.025 ml 加える。

(5) 37°C に 30 分加温する (microtiter の場合には

1 時間)。

(6) 完全溶血を示す最小の希釈をもって、その抗原液、抗血清の溶血阻止下量 (それぞれを a, b とする) とする。ウサギなどの抗血清では 5~20 倍である。

▶ 実施法

① 抗原および抗血清を、試験管法では溶血阻止下量に希釈したものを 6 ml ずつつくる (microtiter では 2 ml)。それぞれを GVB++ で 3 ml (microtiter では 1 ml) の系列で倍々希釈を 10~15 本行なう。

② 図 III.2 に示すように試験管をならべ、それぞれの希釈度の抗血清、抗原、ならびに 5 UCH_{50} /ml の補体液を分注する。補体液を加える順序は、必ず抗血清と抗原との間で分注する。

各液の量は、試験管法では 0.25 ml (microtiter では 0.025 ml) である。対照には 抗原-補体-GVB++, GVB++-補体-抗原、および GVB++-補体-GVB++ の組合せが必要である。

③ 37°C で 1 時間加温する。

④ 5×10^8 /ml 感作赤血球を 0.25 ml (microtiter では 0.025 ml) 加える。

⑤ 試験管の場合には 30 分 (microtiter では約 1 時間半)、37°C で加温し、結果を判定する。

⑥ 不溶血から部分溶血 (2+) までは補体結合陽性とする。

▶ 実施上の注意

1) 感作赤血球を入れる前の抗原、補体、抗血清の混合物を加温する時間は、37°C で 1 時間としたが、時間が許すならば、初め氷室に 3 時間、次いで 37°C に 15 分加温するほうがよい成績が得られる。

2) 各成分の量は試料の量に応じて増減してもよいが、各成分とも同じ量を用いる。とくに、補体の量と感作赤血球の量の割合はくずしてはいけない。

文 献

- 21) 田村昇: “免疫グロブリンと補体”, 免疫学叢書 6, 医学書院, 1970, p. 128.
- 22) 松橋直 他: “微生物学血清学実験コード”, 南山堂, 1966.
- 23) 成内秀雄 他: 移植, 5(2), 62 (1970).
- 24) I. Riha: *Folia Microbiol.*, 9, 304 (1964).
- 25) G. A. Kabat & M. M. Mayer: “Experimental Immunochimistry”, Charles C. Thomas, U.S.A., 1961, p. 133.
- 26) S. V. Boyden: *J. Exp. Med.*, 93(2), 107 (1951).