Au 抗原, 抗体の検出法の比較検討

—counter-immunoelectrophoresis 法を中心として—

小 島 峯 雄 福 田 信 臣 宮 川 武 彦 白 井 公 之
辻 孝 夫 亀 谷 正 明 高 橋 善 弥 太*

緒 言

Australia 抗原 (以下 Au 抗原) は 1964 年 Blumberg により発見され, その後 hepatitis associated antigen (HA antigen), serum-hepatitis related antigen (S H-antigen) と呼ばれているように, 肝炎関連ウイルスとして注目されている. Au 抗原は, 当初考えられていたように血清肝炎ばかりでなく, 伝染性肝炎, 慢性肝炎, 肝硬変症, 最近では原発性肝癌¹⁾の起因ウイルスとしても論議されている. Au 抗体に関しても, 不活化した Au 抗原を接種することにより, MS-2 型肝炎を予防できるとの報告²⁾もあり, 近い将来には肝炎の予防接種の可能性が期待されている. これらのことから抗原や抗体を検索することは, 診断学的にも予防医学的にもきわめて重要な意味を有するものと考えられる.

一方, Au 抗原の検出には micro-Ouchterlony 法 (MO 法) に始まり, 現在もっとも多く市販されている一元免疫拡散法, 著者らがすでに実用性を強調した counter-immunoelectrophoresis (CIEP 法)³⁾, 主に外国での報告の多い補体結合反応法 (CF 法)^{4,5)}, 大河内らの immune adherence hemagglutination (IAH 法)⁶⁾, 抗体検出に鋭敏な passive hemagglutination (PHA 法)⁷⁾, さらに実用化が期待されている Radioimmunoassay 法⁸⁾などが報告されている.

著者らはすでに CIEP 法が簡便で日常検査においてもっとも手軽に使用でき, かつかなりの感度を有することを報告³⁾した. 今回はこの CIEP 法をより鋭敏なものとし, また実用に供しやすくするため, 種々の agar, 泳動における電圧, 電流, 抗体濃度, 緩衝液の pH 等の基礎的検討を加えて Au 抗原検出を試み, MO 法, 一元免疫拡散法 (SRI 法), 免疫電気拡散法 (IED 法), CF 法, IAH 法, PHA 法を合わせて行い, 感度, 検出

時間, 操作の難易について比較検討し, 若干の知見をえたので報告する.

方 法

1) Counter-immunoelectrophoresis 法 (CIEP 法)

著者らが従来行っている方法³⁾に従ったが, とくに次の点に留意した. すなわち泳動後プレートを生食塩水に約 10~20 分間浸すことにより沈降線が明瞭となり, 不確実なものが判定しやすくなる. また最終的には生食塩水に約 12 時間浸し, amido-black 10 B にて約 10 分間染色し, 5%酢酸にて 1~2 時間脱色して判定するのがよい. なお比較検討のため一部には自家製プレートのほか, 市販の CIEP 用プレートを使用した.

2) Micro-Ouchterlony 法 (MO 法)

Agarose をトリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) に 1% の割合に溶かして, agarose 板を作製し, 小孔の直径を 4 mm, 中心の間隔を 8 mm とした自家製 MO 法用 agarose 板で型のごとく施行し, 48 時間後に判定した. なお一部には市販の MO 法用プレートも使用した.

3) 補体結合反応法 (CF 法)^{4,5)}

マイクロプレート法によった.

4) Immune adherence hemagglutination 法 (IAH 法)⁶⁾

マイクロタイター板を利用した大河内らの方法⁶⁾に従った.

5) 一元免疫拡散法 (SRI 法)

MO 法と同様に agarose 8 ml に Au 抗体 0.2 ml を含む自家製の一元免疫拡散法用 agarose 板を作り, 直径 3 mm の小孔をあけ, 被検血清を加え, 白色の沈降輪を生じたものを陽性とした. 判定は 48 時間後に行った. また市販の北里研製, エーザイ製, 東京標準血清製のプレートも使用した.

6) 一元免疫電気拡散法 (IED 法)⁹⁾

患者らが報告した方法⁹⁾に準じた.

* M. Kojima, N. Fukuta, T. Miyagawa, K. Usui, T. Tsuji, M. Kametani, Y. Takahashi: 岐阜大学 高橋内科.

7) Passive hemmagglutination 法 (PHA 法)⁷⁾

今井らの報告⁷⁾に従った。

8) 抗 Au 血清

抗 Au 血清は MO 法, CIEP 法, SRI 法, IED 法, CF 法には Behringwerke 社製 (2032P) を使用した。一部には患者 TO, 東京標準血清製 (9・S・1・3) を使用した。SRI 法には Behringwerke 社製抗血清を含む自家製のプレートのほか, 先に述べた各社製のものを使用した。IAH 法には東大輸血部大河内講師から供与された抗 Au 血清北里研 III 08671 を使用した。

9) 被検血清

感度比較のための Au 抗原陽性血清は, 患者または carrier の血清, および Behringwerke 社のコントロール血清を使用した。また Au 抗原検出のための被検血清は, 岐阜大学付属病院臨床検査部へ肝機能検査のため提出されたもの, 一部は関連病院より依頼されたもの 1,000 例について検討した。

成 績

I Counter-immunoelectrophoresis における検討

1) 各種 agar における感度の比較 (表 I)

Agar は agarose (半井化学), Ion-agar (オキシソイド), Noble-agar (三光純薬), J-agar (三光純薬), agarose (6)+Noble-agar (4) と混合したものなどを検討した。図 1 は各種 agar による pH 8.6 ベロナール緩衝液によるヒト血清の電気泳動像である。Bacto-agar を使って CIEP を行った場合, Bacto-agar の原点は α_2 の位置であるため, 抗体である γ -glob. と β -glob. に位置する Au 抗原とは交叉せず, したがってこの方法には不適当である。他のものはすべてこの条件に満足するため CIEP に用いることができる。

これら agar の比較は陽性血清を倍数希釈し, 一定濃度抗体と反応して沈降線が生じた最終濃度で表わした。判定はそれぞれ泳動直後, 生理食塩水に浸したのち,

表 1. CIEP 法の各種 agar における感度および泳動直後と染色後との感度の比較

支 持 体		Au 陽 性 血 清			注
		K. Y.	H. Y.	J. S.	
Agarose	泳動直後	× 64	× 64	× 64	非特異的沈降物は Agarose が少ない。しかし生理食塩水に浸すことによりすべて消失。
	生理食塩水に浸す	×128	× 64	× 64	
	染色	×128	×128	× 64	
Ion-agar	泳動直後	× 32	× 32	× 16	
	生理食塩水に浸す	× 32	× 32	× 16	
	染色	× 32	× 64	× 32	
Noble-agar	泳動直後	× 8	× 8	× 8	
	生理食塩水に浸す	× 16	× 8	× 16	
	染色	× 32	× 32	× 32	
J-agar	泳動直後	× 16	× 16	× 8	
	生理食塩水に浸す	× 32	× 16	× 8	
	染色	× 32	× 16	× 8	
Agarose (6) + Noble-agar (4)	泳動直後	× 16	× 16	× 16	
	生理食塩水に浸す	× 32	× 32	× 32	
	染色	× 32	× 32	× 32	
H 社製 Plate	泳動直後	× 2	× 1	(-)	非特異的沈降物強く, 生理食塩水に浸しても消失しにくい。
	生理食塩水に浸す	× 4	× 8	× 2	
	染色	× 16	× 16	× 16	

pH 8.6 $\mu=0.05$ 160 V 30分泳動

抗体: Behringwerke (× 2)

図 1. 各種 agar による電気泳動像

amido-black 10 B 染色後の計 3 回行ってそれぞれを比較した。表 1 のごとく agarose は他の agar を支持体とした場合より 2~4 倍鋭敏であり、次に Ion-agar で、agarose と Noble-agar の混合、J-agar と Noble-agar は同程度であった。なお市販プレートは感度が劣ることがわかった。非特異的沈降線は agarose の場合が少なく、また生理食塩水に浸すことによりほとんど消失する。市販のプレートは非特異的沈降物が強く、生理食塩水に浸しても消失しにくい。またどの agar でも泳動直後の判定より生理食塩水に浸したのち、amido-black 10 B にて染色したのち判定することにより 2~4 倍鋭敏となる。

2) 電圧の変化による感度の比較 (表 2)

泳動における電圧を 50 V, 100 V, 150 V, 250 V の各電圧において、ブリッジとして濾紙 1 枚 (東洋濾紙 No. 51), 濾紙 2 枚, スポンジの 3 種につきそれぞれ CIEP を行って Au 抗原検出の感度を比較した。ブリッジとして濾紙 1 枚 50V の定電圧の場合がもっとも感度が劣るようで泳動時間も 1 時間を要した。他の条件では沈降線

表 2. CIEP 法の電圧およびブリッジの Au 抗原検出におよぼす効果

ブリッジ	定 電 圧	時間	抗原 BW	抗原 FN
濾 紙 1 枚*	50V (1.0 mA/cm)	60分	×64	×64
	100V (1.8 mA/cm)	40分	64	128
	150V (2.8 mA/cm)	30分	64	128
	200V (4.8 mA/cm)	20分	64	128
	250V (6.8 mA/cm)	15分	64	128
濾 紙 2 枚*	50V (1.7 mA/cm)	40分	×64	×128
	100V (2.6 mA/cm)	30分	64	128
	150V (4 mA/cm)	25分	128	128
	200V (6.3 mA/cm)	15分	128	128
スポンジ	50V (1.7 mA/cm)	40分	×64	×128
	100V (3.9 mA/cm)	20分	64	128
	200V (6.9 mA/cm)	15分	64	128

* 東洋濾紙 No. 51 pH=8.6 $\mu=0.05$
Veronal-Veronal 緩衝液
(電極槽 $\mu=0.1$)

の出現時間は電流が多く流れるほど短時間であるが、感度はほとんど変わらなかった。しかし急ぐあまり電流を流しすぎると、沈降線が乱れたり、抗体の小孔に重なって判定が困難となるし、agarose 板が乾燥したり、焼けたりすることさえある。結局、著者らが従来用いている 160V 定電圧 (2~4 mA/cm), 20~30 分泳動で十分と思われる。

3) 緩衝液の pH 変化による感度の比較

Agarose を使用した場合、ペロナル塩酸緩衝液において pH 9.2, pH 8.6, pH 8.2, pH 7.5 の 4 種を検討した。pH 8.6, pH 8.2 においては沈降線は陽極側の抗血清の小孔と、陰極側の被検血清の小孔との間のみやすい位置に出現するが、pH 9.2 では陽極側の小孔に接して、また pH 7.5 では緩衝液のペロナルが析出するし、沈降線は陰極側の小孔近くに出現するので判定が困難となった。pH 8.2 と pH 8.6 との間の感度の差はみられなかった。

4) 各種抗 Au 血清による感度の比較 (図 2)

図 2 は抗 Au 血清 Behringwerke 製 (BW) (ウサギ), 東京標準血清 (TH) (ウマ), 患者血清 (OT) の 3 種につき Au 抗原検出感度を比較したものである。抗 Au 血清 BW は 4 倍まで希釈しても検出感度は変わらず、抗 Au 血清 TH は 2~4 倍に希釈したほうが鋭敏となる。抗 Au 血清 OT の 2 倍血清では Au 陽性血清の 4

図 2. CIEP 法による各種抗 Au 血清の比較

表 3. 各種 Au 抗原検出法における感度の比較

	H. S.	T. H.	K. M.	S. S.	T. H.
CIEP 法					
泳動直後	× 64	× 16	× 64	× 32	× 32
生理食塩水処理	× 128	× 64	× 64	× 64	× 64
MO 法					
自家製	× 8	× 4	× 8	× 8	× 4
H 製	× 2	× 1	× 2	× 1	× 2
SRI 法					
自家製	× 16	× 16	× 8	× 16	× 16
K 製	× 16	× 8	× 16*	× 16	× 16
T H 製	× 2	× 1	—	—	× 2
免疫電気拡散法	× 16	× 16	× 16	× 16	× 16
C F 法**	—	× 512	—	× 512	× 1024
I A H 法**	—	—	—	—	× 2 × 10 ⁵

抗体: Behringwerke

* 3 回添加 (× 64)

**抗体: 北里 III 08671

倍, 8 倍, 16 倍, 32 倍とのみ反応した。このように用いる抗体により反応態度の差がみられるので, 抗体の性質を十分知り使用することが重要である。

II Au 抗原の各種検出法の比較

1) Au 抗原の各種検出法における感度の比較 (表 3)

表 3 は CIEP, MO, SRI, IED, CF, IAH 法による

図 3. 各種方法による Box titration

表 4. 各種検出法による 200 検体の Au 抗原検出率

	陽 性	陰 性
M O 法	24 (1)	176
SRI 法 (K 製)	45 (×1.9)	155
C I E P 法	51 (×2.1)	149
I A H 法	77 (×3.2)	123

* SRI 法, CIEP 法にて陽性で IA にて陰性は 2 例 () 内は MO 法を 1 とした場合の相対感度

各種検出法による 200 検体の Au 抗体検出率

	陽 性	陰 性
M O 法	2 (1)	198
C I E P 法	5 (× 2.5)	195
P H A 法	29 (×14.5)	171

() 内は, MO 法を 1 とした場合の相対感度

感度を比較したものである。CIEP 法は MO 法に比して 32~64 倍, 市販 H プレートに比して 32~64 倍鋭敏であった。さらに自家製または市販 SRI 法 (北里研製) に比しても 4~8 倍の高感度を有したが, SRI 法も試量を 3 回添加することにより CIEP 法と同じ感度にすることができた。また北里研製プレートは自家製とほぼ同じ感度を有しているので, 以後の SRI 法は北里研製プレートを使用した。なお市販のものの中には製品により好ましくないものもあるので注意を要する。IED 法は SRI 法と同じ程度であった。CF 法は CIEP 法に比して 8~16 倍の感度であったが, 抗 Au 血清 BW を 20~30 倍に希釈しえたのみで, 抗体を多量必要とし経済的に不便であった。しかし IAH 法は用いた抗体は異

なっていたが、20 万倍以上の高感度を有し、抗体希釈も 80~120 倍として使用することができた。図 3 は抗原として Au 陽性者 HT 血清と抗 Au 血清 BW との間における各種検出法による Box-titration である。ただし IAH 法のみは北里研 No. III 08671 を使用した。感度の点では明らかに CF 法さらに IAH 法が CIEP 法よりすぐれている。

2) Au 抗原および抗体の各種検出法による検出率 (表 4)

MO 法, SRI 法, CIEP 法および IAH 法による肝炎およびその家族を主とする被検血清 200 例中 Au 抗原陽性例は MO 法で 24 例, SRI 法で 45 例, CIEP 法では 51 例, IAH 法では 77 例であった。MO 法を 1 とすると, SRI 法は 1.9 倍, CIEP 法は 2.1 倍, IAH 法は 3.2 倍であった。このように検出率においては鋭敏度ほどの差は認められなかった。また CIEP 法にて陽性, IAH 法にて陰性は頻回輸血をうけた肝炎の 2 例にみられた。

一方 MO 法, CIEP 法による Au 抗体検出数は MO 法にて 2 例, CIEP 法にて 5 例, PHA 法では 29 例であった。Au 抗体検出率は抗原検出率に比して検査法によりかなりの差がでるようである。

III CIEP 法による各種疾患における Au 抗原および抗体の検出率 (表 5)

Au 抗原を検索した 1,000 例のうち陽性例は 100 例で全体の 10% であった。各種疾患における陽性者は表に示すように伝染性肝炎 74 例中 26 例と 35.1% の高率を示し、つづいて肝硬変症の 49 例中 12 例の 24.5%, 慢性肝炎 135 例中 22 例の 16.3%, 輸血後肝炎 68 例中 11 例の 16.2% であった。原発性肝癌は症例が少ないが、5 例中 2 例に認められたことは Au 抗原との関連において興味ある事実である。他の疾患では輸血をうけている再生不良性貧血、急性白血病に各 1 例、胃潰瘍に僧帽弁狭窄症を伴った症例で初回輸血翌日に Au 抗原を検出したもの、十二指腸潰瘍、低色素性貧血、梅毒、心室中隔欠損傷、Sjögren 症候群の 6 例であった。

考 察

従来 Au 抗原の検出には臨床的には簡便な MO 法が行われてきたが、もちろん反応の特異性を決定するためには必要であるが、著者らの Box-titration でもわかるように検出率、感度ともにもっとも劣り、検出に要する時間も長すぎる欠点がある。

CF 法は CIEP 法より鋭敏であるが、検体に抗補体性がある場合の判定がむずかしく、抗体も補体結合性で、抗補体性の低い純粋なものを必要とし、抗体量もかなり多くを必要とする。しかし CF 法は抗原抗体複合物を形成しているような際にも応用しうる利点がある^{5,10)}。

IAH 法は必要抗体量は CF 法の 1/5~1/6 にすぎず、抗体によってはさらに少なくてすみ、感度が非常にすぐれている。しかし CF 法の抗体と同様、コントロール血清では陰性像を示す特異性の高い抗体を必要とするため、やはり入手困難であり、著者らも東大大河内講師より供与されたものである。補体原としては市販の乾燥補体は非特異的反応が強く使用できず、若いモルモット血清を使用して良好な結果をえた。次に IAH 法の陽性、陰性の中間の凝集をどう判定するかがむずかしい。すなわちマイクロプレート、補体、抗体、血球、被検血清等による凝集像が異なり、判定が必ずしも容易でない。また抗体数にかかわらず検出に要する時間はほとんど差がなく、少数を扱う日常検査には適していないようである。

その点 CIEP 法は感度は劣るが補体、血球、血清の非働化等の準備も必要とせず、手技も簡単であり、中間体のない抗原抗体の直接反応であるため判定が確実である。また CF 法、IAH 法のような特別な抗体を必要としないし、抗体も 3~4 倍希釈にても使用可能であり、日常検査として実施しやすい。このように CIEP 法が CF 法よりも実用性にすぐれていることは White らの報告¹¹⁾にもみられる。

著者らは CIEP 法を高感度とするため種々の基礎的検討を行った。その結果、支持体としては特異的沈降線が少なく、感度もよい agarose がもっとも好ましいことがわかった。

電圧に関しては低電圧では泳動の時間も長くなるうえ感度も劣るが、あまり電圧を高くすると寒天がとけたり、乾燥したり、また泳動像も乱れ、抗体の小孔に重なって判定しにくくなる。

緩衝液の pH に関しては、pH 8.2~8.6 の範囲では大差ないようであるが、この範囲からはずれるとやはり小孔に接して沈降線が出現し判定しにくくなるので注意を要する。

著者らは一般ルチン検査として 160 V (2~4mA/cm), 20~30 分間泳動して判定しているが、上述の基礎的検討の成績からも妥当なものと思われる。また IAH 法で陰性であったものが、CIEP 法で陽性であったものは 2

表 5. CIEP 法による Au 抗原・抗体の検出率

疾 患 名	Au 抗原陽性	陰 性	Au 抗体陽性	陰 性
伝 染 性 肝 炎	26(35.1%)	48	1(2.1%)	46
輸 血 後 肝 炎	11(16.2%)	57	9(21.4%)	33
慢 性 肝 炎	22(16.3%)	113	4(5.3%)	71
既往: 伝染性肝炎	5	34	1	13
輸血後肝炎	2	16	1	10
肝炎輸血(-)	15	63	2	48
肝 硬 変 症	12(24.5%)	37	7(17.0%)	34
既往: 伝染性肝炎	0	4	1	3
輸血後肝炎	3	6	2	5
肝炎輸血(-)	9	27	4	26
ヘ パ ト ー ム	2(40.0%)	3	0	5
中 毒 性 肝 炎	0	35	0	9
バ ン テ 症 候 群	0	7	0	6
脂 肪 肝	0	4	0	3
閉 塞 性 黄 疸	0	16	0	5
胆 嚢 炎	0	12	0	7
胆 石 症	0	25	0	8
胆 道 癌	0	5	0	3
糖 尿 病 性 肝 障 害	0	17	0	9
再 生 不 良 性 貧 血	1	3	3(100.0%)	0
白 血 病	1	8	0	4
S. L. E.	0	4	0	2
Wilson 病	0	1	0	0
アルコール性肝障害	0	2	0	0
アルコール性肝硬変	0	2	0	1
肝 嚢 胞	0	2	0	2
体 質 性 黄 疸	0	2	0	1
不 明	1	73	0	3
そ の 他	6	375	0	88
家 族	18(26.9%)	49	2	63
合 計	100	900	26	403

* 発生1年以内のもの

例認められたことが注目された。これは IAH 法では抗原抗体複合物は検出されないが、Prince¹²⁾のいう CIEP 法の high voltage 法では low voltage 法により検出されない複合物が検出される報告もあることから、この2例は複合物を形成していたとも考えられる。

現在のところ Au 抗原検出には唯一の方法によっては判定しがたく、確実な直接反応と感度の高い間接反応を併用する必要がある。著者らは特異性の高い CIEP 法

ともっとも鋭敏な IAH 法を選択して使用している。この場合、複合物の判定に問題を残す心配があるが、著者らの症例でも経験したように、high voltage 法によりある程度補うことが可能と考えられる。

抗体検出には MO 法、CIEP 法、PHA 法などが行われているが、PHA 法がもっともすぐれている。しかし現在市販されておらず、著者らの抗体も北里研高橋博士から供与されたものである。Au 抗体は今後肝炎予防

との関連において研究されるべきもので、一般への普及が望まれる。

最近ようやく血液センターでも Au 抗原がチェックされるようになったが、感度の劣る SRI 法に頼っている現状である。著者らは Au 抗原, 抗体の検出をおおの医療機関で行うよりも、高感度の IAH 法, PHA 法などをすみやかに実施できる地域センターの設置を切望するものである。

総 括

1) Au 抗原検出の感度は micro-Ouchterlony 法 (MO) < 一元免疫拡散法 (SRI) = 免疫電気拡散法 (IED) < counter-immunoelectrophoresis 法 (CIEP) < complement fixation 法 (CF) < immune adherence hemagglutination 法 (IAH) の順であり、抗体検出には MO 法 < CIEP 法 < passive hemagglutination 法 (PHA) の順であった。

2) CIEP 法は簡便で、短時間のうちに判定でき、IAH 法, CF 法に必要とされる抗体の制限もなく実用性がある。

3) CIEP 法には agarose を用い、緩衝液の pH は 8.2~8.6, 電圧は agarose が乾燥したり、泳動像が乱れない程度に高くすれば、泳動も早く終了し、そのうえ感度もよい。抗体は希釈して用いたほうが望ましいものもある。また判定には生理食塩水に浸したり、染色すると微弱な沈降線も判定可能となる。

4) 肝炎およびその家族を主とする 200 検体における各種方法による Au 抗原検出率は MO 法を 1 とすると、SRI 法 1.9, CIEP 法 2.1, IAH 法 3.2 倍で、Au 抗体検出率は MO 法を 1 とすると CIEP 法 2.5, PHA 法 14.5 倍であった。

5) CIEP 法による各種疾患 1,000 例の Au 抗原検出率は伝染性肝炎 74 例中 26 例 (35.1%), 肝硬変症 49 例中 12 例 (24.5%), 慢性肝炎 135 例中 22 例 (16.3%), 輸血後肝炎 68 例中 11 例 (16.2%), ヘパトームは 5 例中 2 例であった。

終わりに臨み IAH 法をご指導いただき、抗体を提供していただいた東大大河内講師、真弓忠博士、PHA 法用抗体を提供していただいた北里研究所高橋隆博士、今井光信氏に深謝する。

本稿の要旨は昭和 46 年度第 18 回日本消化器病学会秋季大会シンポジウムにおいて発表した。

文 献 1) Sherlock, S., Fox, R. A., Niazi, S. P. & Scheuer, P. J.: Chronic liver disease and primary liver-cell cancer with hepatitis-associated/Australia/antigen in serum, *Lancet* 1: 1243-1247, 1970. 2) Krugman, S., Giles, J. P. & Hammond, J.: Viral hepatitis, Type B (MS-2 Strain) studies on active immunization, *JA-MA* 217: 41-45, 1971. 3) 小島峯雄, 白井公之, 安藤喬, 福田信臣, 松友啓典, 青山一朗: Counter-immunoelectrophoresis による Au 抗原の検索, *日臨* 29: 2368-2372, 1971. 4) Purcell, R. H., Holland, P. V., Walsh, J. H., Wong, D. C., Morrow, A. G. & Chanock, R. M.: A complement-fixation test for measuring Australia antigen and antibody, *J. Infect. Dis.* 120: 383-386, 1969. 5) Schmidt, N. J. & Lennette, E. H.: Complement fixation and immunodiffusion tests for assay of hepatitis-associated "Australia" antigen and antibodies, *J. Immun.* 105: 604-613, 1970.

6) Okochi, K., Mayumi, M., Hagino, Y. & Saito, N.: Evaluation of frequency of Australia antigen in blood donors of Tokyo by means of immune adherence hemagglutination technique, *Vox Sang.* 19: 332-337, 1970. 7) 今井光信, 高橋隆, 真弓忠, 大河内一雄, 受身赤血球凝集反応による Au 抗体の検出, *医学のあゆみ* 78: 759-760, 1971. 8) Walsh, J. H., Yalow, R. & Berson, S. A.: Detection of Australia antigen and antibody by means of radioimmunoassay techniques, *J. Infect. Dis.* 121: 550-554, 1970. 9) 乾成美, 松友啓典, 安藤宏, 小島峯雄, 林幹夫, 入山等, 吉田健生, 藤田恒雄, 加藤香子: 免疫電気拡散法 (Immunoelectrodiffusion) による微量蛋白の定量に関する研究, *生物物理化学* 14: 173-177, 1969. 10) Shulman N. R.: Virus-like antigen, antibody, and antigen-antibody complexes in hepatitis measured by complement fixation, *Science* 165: 304-306, 1969.

11) White, G. B. B., Lasheen, R. M., Baillie, B. M. & Turner, G. C.: Comparison of three serological methods for the detection of hepatitis-associated antigen, *J. Clin. Path.* 24: 8-12, 1971. 12) Prince, A. M. & Burke, K.: Serum hepatitis (SH): rapid detection by high voltage immunoelectroosmophoresis, *Science* 169: 593-595, 1970.