

寒天層内沈降反応による臓器抗体の研究

第 1 編

同種臓器抗体に関する研究

岡山大学医学部第一内科教室 (主任 小坂淳夫教授)

名 越 一 馬

〔昭和34年9月28日受稿〕

1. 緒 論

近時寒天メジウム中における特異的沈降反応¹⁾の研究が盛んに行われるようになった。Reiner et al (1927) を始め Petrie²⁾ (1932) Kirkbride & Cohen³⁾ (1934) 等多くの研究者の報告がみられるが、中でも寒天層内における抗原抗体反応に真の意義を与えたのは Oudin で、小試験管の中で固めた solid immune serum agar mixture の上に抗原を重層する時に、抗原は寒天層内下方に進み沈降帯 (band) を生ずるのを認め、抗原が single の時には single の沈降帯を生じ multiple の時には multiple の沈降帯を生ずるとしている。

又 Oudin は沈降帯の数は抗原抗体反応系の minimum number を示すものである事及び同一の速度の migration を示す反応系は一個の沈降帯として現われることを明かにしている^{4) 5) 6)}。Munoz 及び Kabat は従来の重層法とは反応条件及び反応発現状態等根本的に異つたものであることを明かにした。

又 Ouchterlony⁷⁾ (1949) も Oudin と同様に寒天中に於ける抗原抗体反応に就いて二次元拡散法により実験してその意義をたしかめた。Ouchterlony 反応は同時に二種以上の抗原を抗血清と反応させることが出来、それら抗原の相互関係を明瞭にすることが出来るとしている。

又 Gordon⁸⁾ 等は寒天層内で種々の蛋白質の電気泳動を行い、紫外線吸収法等を用いて泳動状態を知ると共に、泳動に用いた寒天を小さきごみにして、水抽出液を作り、pauly 試薬でその中の蛋白質の量を測定することによつても泳動状態を観察している。

Pasteur 研究所の Grabar & William⁹⁾ は Gordon の寒天内電気泳動法と Ouchterlony の平板寒天内二次元拡散法を組合せて、先ず蛋白質を寒天内で電気泳動を行い、電気泳動方向に平行につてあ

る溝に抗血清を入れると各々の成分は寒天層内で反応して、蛋白質成分の最も濃度の高い部分を頂点とする山形の沈降帯が、頂点を溝の方に向けて現れるのを認め、この方法を免疫電気泳動法と呼んだ。

本方法により Pasteur 研究所では、ジフテリヤ毒素、抗毒素の研究、人血清の抗原分析、卵白アルブミンの血清学的検討など、従来の電気泳動法ではわからなかつた新しい知見が報告され、且又電気泳動された寒天内物質の同定が試みられるようになった。即ち寒天内を泳動した蛋白質、脂質などの染色が Uriel & Scheidegger 等により行われるようになり、免疫電気泳動法の成績と組合せて比較検討することが容易となり、その分析的意義が一段と高まつた。

以上のように免疫電気泳動法が広く行われるようになり、実用的価値が認められるようになるにつれて、これを応用した研究が諸家により多数報告されている。

肝炎をはじめとして諸種の肝疾患に際して肝組織抗原に対応する物質が流血中に出現することが近時諸家^{10) 11) 12) 13) 14) 15)}により注目されているが、著者はその生物学的意義を明らかにする目的で、先ず動物実験的に諸臓器 (肝、腎、脾、リンパ腺等) について臓器特異抗体の産生の有無及び各臓器抽出抗原相互間の関連性及びその特異性等について血清学的に検討するために Oudin 氏寒天層内反応、免疫電気泳動法、及び Ouchterlony 法等を使用して若干の知見がえられたので報告する。

2. 実験材料並びに実験方法

2. 1. 臓器抗原の調製

家兎肝、腎、脾、リンパ腺は家兎を脱血死させ、生理的食塩水にて充分灌流洗条し、各臓器を取り出し細片とし、滅菌蒸溜水及び生理的食塩水等で可及的に血液を除去し濾紙で十分水分を吸着して、秤量し、生理的食

塩水を加えて homogeneizer で 40% の臓器粥を作成し、その遠沈上清を用いて臨んで稀釈して用い、なお防腐の目的で 0.01% の割にマーソニンを添加して冷蔵庫に保存した。臓器抗原は可及的新鮮なものを使用した。

肝、腎及び脾ホスファチッドの調製。荒木氏法¹⁶⁾に準じて調製した。即ち上述の方法で家兎及び犬の肝、腎、脾臓を摘出しよく水洗して血液を除き秤量する。(防腐の目的に加えた 10% フォルマリンは流水中にて充分水洗しフォルマリンを完全に除去する。)各臓器 45 g を細挫し乳鉢内で泥とし、約 5 倍量の無水酒精を加えて 5 日以上室温に放置する。次にこの酒精を濾過して水浴上で蒸発乾燥させる。残渣をベンゾール約 160cc に溶解し、一旦加熱後冷却し濾過する。ベンゾールは再び水浴上で蒸発乾燥させる。此の残渣にアセトン約 65cc を加え、一旦加熱後冷却してアセトンを捨て、残渣を石油エーテル約 20cc に溶解し濾過する。石油エーテルを蒸発させ残渣を無水酒精約 25 cc に溶解し、更に之を徐々に加熱して出来るだけ濃縮し抗原は 1 cc 中に肝、腎、及び脾ホスファチッド 0.5mg 含有されるように調製し試験抗原とした。

2. 2. 感作方法

2.1. の方法でえられた 40% の臓器抗原を健康家兎の耳静脈及び腹腔内に 3 cc 宛 3 日間隔で 15 回注射し、採血は感作終了後 1 週間後に行い経時的に該当抗原に反応する物質の生成の有無を検討した。

2. 3. 実験方法

2. 3. 1. Oudin 氏法

前述の被検血清を滅菌生理的食塩水で 2 倍連続稀釈法で稀釈し、各稀釈血清に同量の 0.6% 寒天を加えてよく混合する。本操作は 56°C の水槽中で行う。各稀釈血清寒天溶液を清浄な乾熱滅菌した内径 3 mm 長さ 8 cm 位の小試験管の底部に約 2 cm の高さに長い注射針をつけた注射筒を使って分注し、冷蔵庫に保つて寒天層を凝固させる。更に 45°C の 0.25% 寒天溶液を試験管口に至る迄分注し、直ちに吸い出し試験管壁に寒天の薄い膜を作っておき、この血清寒天の上に各種稀釈臓器抽出抗原を重層し 3~5°C の氷室中に保つて 1 週間後に沈降帯を観察した。

2. 3. 2. 免疫電気泳動法

寒天平板：ガラス板 (5 cm × 8 cm) を支持台とし、この上に 4~5 mm の寒天層を作る。寒天を磷酸塩緩衝液 (NaH₂PO₄ + Na₂HPO₄ pH 7.5) に溶解させ、溶解濃度は 1~1.5% とする。この寒天溶液を上ガラス平板上に 8 cc 注加する。抗原を入れる池と、抗血清を入れる泳動方向に平行な溝を作るために、あらかじめプラスチック製の型を作っておき、先

ずガラス平板上に寒天 8 cc を注ぎ、未だ凝固しないうちにプラスチック製の型をのせ、室温で凝固させる。

濾紙の貼付：寒天ゲル板と緩衝液をつなぐため、5~6 cm²位の濾紙の一端を、寒天ゲル板の両端 1 cm 位のところに寒天で貼付する。

電気泳動の実施：ひろく用いられている濾紙電気泳動装置をそのまま用いた。すなわち前記寒天ゲル板の両端の濾紙の他端を電極を入れた緩衝液槽から寒天橋によつてつながれた緩衝液槽にひたす。電圧は 150~200 V、電流 30 mA とし、この時寒天ゲル板の両端の電圧を 3~6 V/cm になるように、全体の電圧を調節する。通電時間は 4 時間とした。

抗血清の分注：電気泳動方向に平行な溝に抗血清を分注する。

反応の実施：乾燥を防ぐために密封した容器に入れ、フォルマリンガスによりカビの発生を防止し、室温に放置し 1 週間後観察した。

2. 3. 3. Ouchterlony 法

真鍮性鋳型：1 辺 9.5 mm の正立方体 1 個 9.5 mm × 9.5 mm × 5 mm の立方体 4 個作る。

寒天平板の作製：生理的食塩水にて 1.5% 寒天溶液を作る。PH を 7.0 に調製し先ずシャーレに 5 cc の寒天を注入して寒天層を作る。次にその凝固した後真鍮性鋳型を正立方体を中心に他の 4 個を 9.5 mm × 9.5 mm の面を下にして置き、15~18 cc の寒天を注加する。充分室温冷却した後、鋳型をとると 5 個の池が出来る。

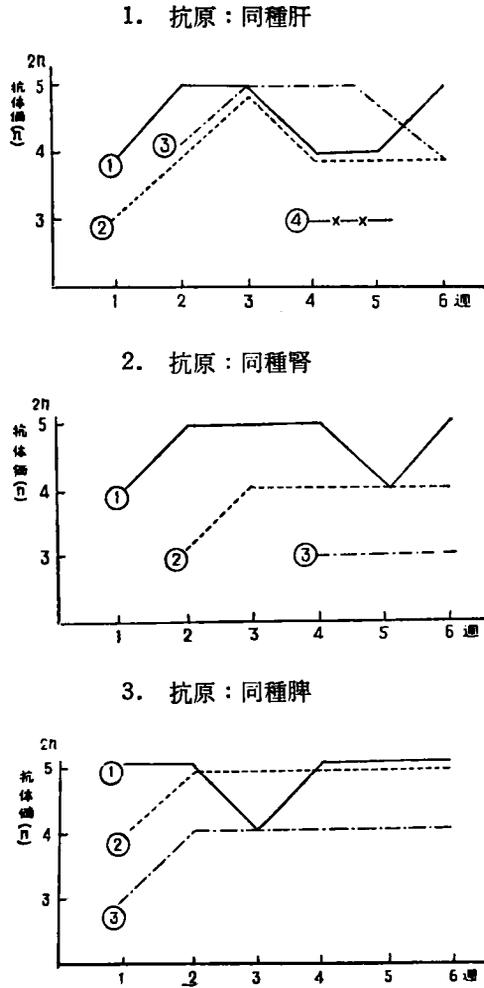
反応実施：中央の池に抗血清、周囲の 4 個の池に抗原を入れる。室温に放置し 1 週間後に観察する。

3. 実験成績

3. 1. 臓器抗原による感作過程について

家兎の肝、腎、及び脾の生理的抽出抗原を用いて健康家兎を感作した際に、感作家兎の流血中に該当臓器抗原に反応する物質の出現の有無を検討したところ、沈降反応 (重層法) によつても観察した結果は、該抗体価々は免疫負荷終了後二週間目にはすでに最高に達している。これを Oudin 氏寒天層内沈降反応で観察すると、感作家兎血清中には各臓器抗原に対応する数個の沈降帯が生ずるが、各沈降帯の出現状況は図 1 のように Oudin 氏反応においては普通の重層法と比較して最高抗体価の出現時期は各臓器感作群とも大差は見られないが、該当臓器抗原に反応する全沈降帯の出現するためには、少くとも感作終了後 4 週間を要するものと思われる。

図1 臓器生理的抽出抗原による感作過程



沈降反応（重層法）と同様 Oudin 氏寒天層内沈降反応においても抗原過剰域，抗体過剰域のあることは E. L. Becker and Munoz (1949-1953) がすでに認めているが，本実験でも図2のように抗原及び抗体の何れの濃度が高くても，沈降帯の出現が見られず，抗原過剰抑制帯，抗体過剰抑制帯のあることが認められ，即ち40%各種臓器抗原を原液として用いた場合，肝感作例では肝抗原の16倍稀釈において沈降帯が多く見られ且明瞭に現われる。腎，及び脾感作例では各該当抗原の8倍稀釈において沈降帯の出現は良好であった。該抗血清の稀釈倍数が多いほど，沈降帯は抗原寒天層界面より離れて出現する。

抗原及び抗体がともに高濃度のさいは沈降帯は界面に近く高濃度に現われるため区別が困難な場合が多かった。

観察期間は各実験例により多少の相異は認められたが室温に放置した場合は，概ね1週間の観察期間の間に各臓器系共全沈降帯の出現がみられた。

図2 家兔同種臓器生理的抽出抗原感作による寒天層内沈降反応

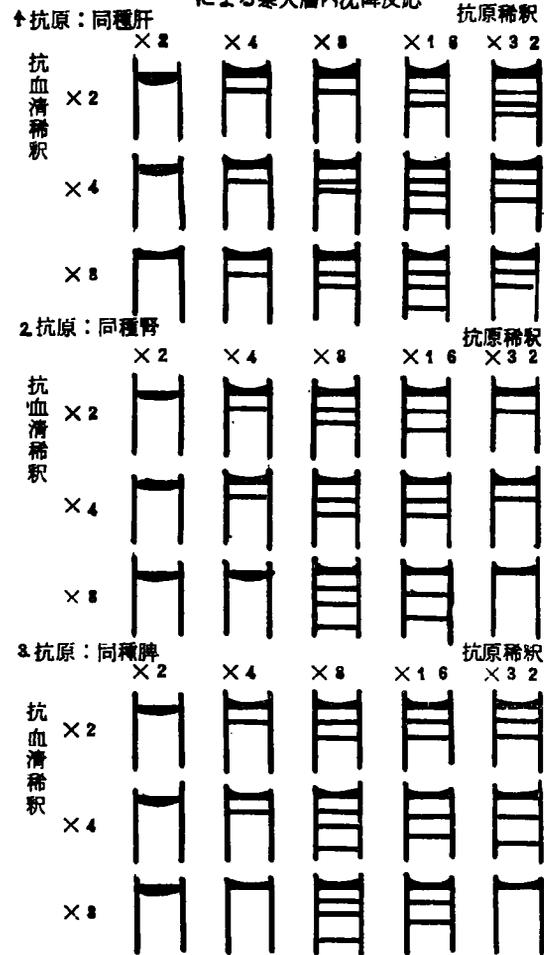
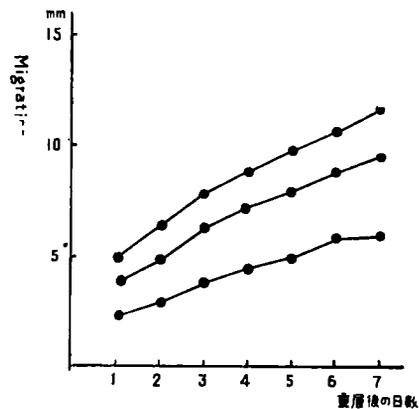


図3 家兔同種感作時 Migration と時間との関係
抗原：家兔同種肝



3. 2. 沈降帯の migration の長さ：図3に示すように沈降帯の抗原抗体境界面からの移動距離 (migration) は概ね重層後の時間の平方根に比例して観察される。

表1 同種肝感作例抗原稀釈：16倍

家 兔 番 号	抗 原					
	前		後			
	肝	腎 脾 リンパ 腺	肝	腎 脾 リンパ 腺		
1			1	1	1	0
2			2	0	0	1
3	1		2	2	1	1
4			3	1	1	1
5		1	0	0	0	1
6			2	0	0	1
7			3	1	1	1
8			0	0	0	0
9			0	0	0	0
10			1	1	0	0
11			2	0	0	0

(注) 数値は沈降帯数を示す

表2 異種(犬)肝感作例抗原稀釈：16倍

家 兔 番 号	抗 原					
	前		後			
	肝	腎 脾 リンパ 腺	肝	腎 脾 リンパ 腺		
1			2	1	1	0
2			4	1	0	0
3			2	1	1	0
4			3	0	0	0
5			1	0	0	0
6	1	1	1	1	1	0
7			1	0	0	0
8			3	0	1	0
9			2	1	1	1
10			3	0	1	0
11			1	0	0	1

(注) 数値は沈降帯数を示す

3. 3. 沈降帯数

3. 3. 1. 同種動物臓器抗原を用いて感作した場合、

肝感作例：家兔肝抗原を用いて家兔を感作したさい表1にみるように、11例中感作前家兔に沈降帯1本を認めたものは肝抗原に対し3例、腎抗原に対し1例で他臓器抗原に対しては認められなかった。

表3 同種腎感作例抗原稀釈：8倍

家 兔 番 号	抗 原							
	前		後					
	肝	腎 脾 リンパ 腺	肝	腎 脾 リンパ 腺				
1			1	0	0	0		
2			2	2	0	1		
3	1		1	0	0	0		
4			0	0	0	0		
5			3	0	1	2		
6			3	1	1	0		
7			0	0	0	0		
8					1	1	1	
9					1	1	0	0
10			0	0	0	0		

(注) 数値は沈降帯数を示す

表4 異種(犬)腎感作例抗原稀釈：8倍

家 兔 番 号	抗 原						
	前		後				
	肝	腎 脾 リンパ 腺	肝	腎 脾 リンパ 腺			
1			2	1	1	0	
2			2	2	1	0	
3			1	0	0	1	
4	1	1	1	3	0	0	1
5			1	0	0	0	
6					1	1	1
7			0	1	0	0	
8			2	1	0	0	
9			2	0	0	0	
10			2	0	0	0	

(注) 数値は沈降帯数を示す

感作後家兔血清は、肝抗原に対して沈降帯3本のもの2例、2本のもの3例、1本のもの2例、全く沈降帯を生じないもの3例であつた。このさい腎抗原に対する交叉反応を観察すると沈降帯2本のもの1例、1本のもの4例、全く生じないもの7例であつた。

リンパ腺抗原に対する交叉反応では沈降帯1のもの6例、全く生じないもの5例であつた。

腎感作例：家兔腎抗原を用いて家兔を感作した場合表3にみるように10例中感作前に沈降帯1本を認めた

表5 同種脾感作例抗原稀釈：8倍

家 兔 番 号	抗 原			
	前		後	
	肝	腎 脾 リンパ 腺	脾 肝	腎 リンパ 腺
1			1 1 1 0	
2			3 1 1 1	
3			2 1 1 0	
4			1 0 1 0	
5			2 0 0 0	
6			2 1 0 0	
7			0 0 0 0	
8	1	1	2 0 1 0	
9			1 0 1 0	

(注) 数値は沈降帯数を示す

表6 異種(犬)脾感作例抗原稀釈：8倍

家 兔 番 号	抗 原			
	前		後	
	肝	腎 脾 リンパ 腺	肝 脾	腎 リンパ 腺
1			0 0 0 0	
2			1 1 0 1	
3		1 1	3 1 1 1	
4	1 1		0 0 0 0	
5			1 0 0 0	
6			3 1 1 0	
7			1 0 0 0	
8			2 0 1 0	
9			2 0 0 0	

(注) 数値は沈降帯数を示す

ものは肝抗原に対し1例、脾抗原に対し1例、リンパ腺抗原に対し2例であった。

感作後の家兔血清は、腎抗原に対して沈降帯3本生ずるもの2例、2本生ずるもの3例、1本生ずるもの2例、全く生じないもの3例であった。

肝抗原に対する交叉反応では、沈降帯1個生ずるもの4例、リンパ腺抗原に対する交叉反応では沈降帯1本生ずるもの3例、脾抗原に対する交叉反応では沈降帯1個生ずるもの3例であった。

脾感作例：家兔脾抗原を用い家兔を感作した場合表5にみるように9例中感作前沈降帯1本生ずるものは肝抗原に対し1例、脾抗原に対し1例であった。

感作後家兔の血清は、脾抗原に対して沈降帯3本生ずるもの1例、2本生ずるもの4例、1本生ずるもの3例、全く生じないもの1例である。

肝抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの4例、リンパ腺抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの1例、腎抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの6例であった。

3. 3. 2. 異種動物臓器抗原を用いた場合。

肝抗原例：犬肝抗原を用い家兔を感作したさい表2のように、11例中感作前家兔血清との反応で沈降帯1本を認めたもの、肝抗原に対し1例、腎抗原に対し1例、脾抗原に対し1例、リンパ腺抗原に対し1例であった。

感作後家兔の血清は、肝抗原に対して沈降帯4本生ずるもの1例、3本生ずるもの3例、2本生ずるもの3例、1本生ずるもの4例であった。

腎抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの6例、脾抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの6例、リンパ腺抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの3例であった。

腎抗原例：犬腎抗原を用い家兔を感作した場合表4のように、10例中感作前家兔血清に対し沈降帯1本を認めたもの肝抗原に対し1例、腎抗原に対し1例、脾抗原に対し2例である。

感作後の家兔血清は、腎抗原に対して沈降帯3本生ずるもの1例、2本生ずるもの6例、1本生ずるもの2例、全く生じないもの1例である。

肝抗原に対する交叉反応では、沈降帯2本生ずるもの1例、1本生ずるもの4例、リンパ腺抗原に対する交叉反応では沈降帯1本生ずるもの3例、脾抗原に対する交叉反応では沈降帯1本生ずるもの3例であった。

脾抗原例：犬脾抗原を用い家兔を感作したさい表6のように、9例中感作前家兔血清に対し沈降帯1本を認めたもの肝抗原に対し1例、腎抗原に対し2例、脾抗原に対し1例である。

感作後の家兔血清は脾抗原に対して沈降帯3本生ずるもの2例、2本生ずるもの2例、1本生ずるもの3例、全く生じないもの2例であった。

肝抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの3例、リンパ腺抗原に対する交叉反応では沈降帯1本生ずるもの2例、腎抗原に対する交叉反応では、沈降帯1本生ずるもの3例であった。

3. 4. 各臓器抗原(肝、腎、脾)による感作の経

図4 寒天層内沈降反応
家兔肝同種抗原感作による沈降帯の推移

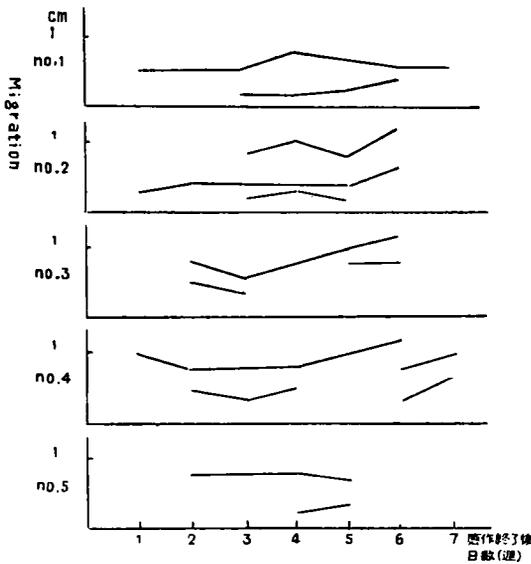


図6 寒天層内沈降反応
家兔脾同種抗原感作による沈降帯の推移

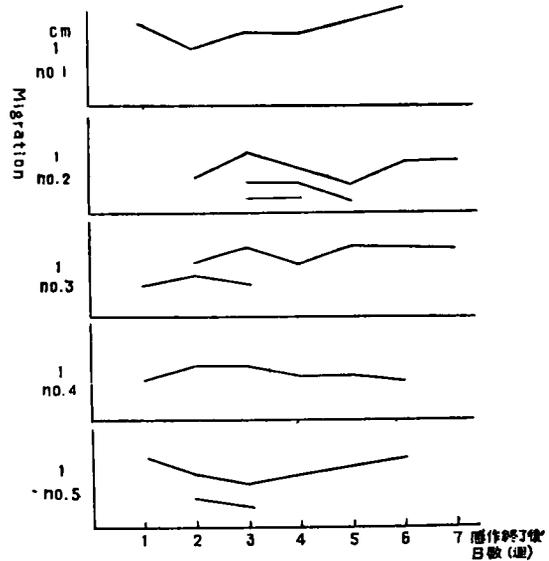


図5 寒天層内沈降反応
家兔腎同種抗原感作による沈降帯の推移

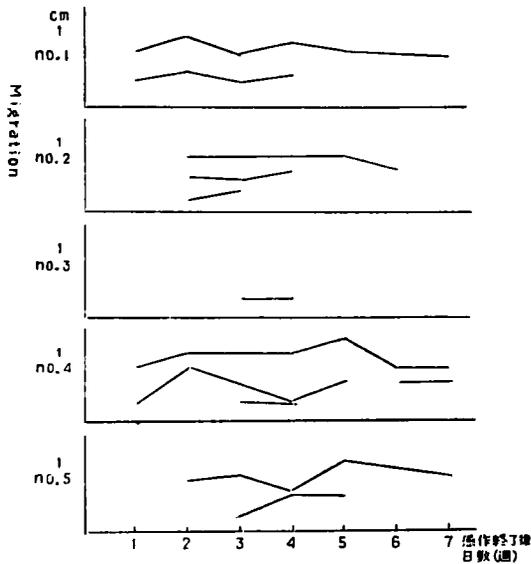


表7 同種肝ホ感作例
抗原稀釈：16倍

家兔番号	抗 原			
	前		後	
	肝ホ	腎ホ	肝ホ	腎ホ
1			1	0
2			0	0
3			1	0
4			1	0
5			0	0
6			0	0
7			1	1
8			0	0
9			0	0
10			1	0
11			1	1

(注) 数値は沈降帯数を示す

表8 同種腎ホ感作例
抗原稀釈：8倍

家兔番号	抗 原			
	前		後	
	肝ホ	腎ホ	腎ホ	肝ホ
1			0	0
2			1	0
3			0	0
4			0	0
5			1	1
6			1	0
7			0	0
8			1	0
9			0	0
10			0	0

(注) 数値は沈降帯数を示す

時的観察,

各臓器抗原による感作過程の各時期に出現する沈降帯の数と migration の長さを図4, 5, 6に示した。

本実験に於ては、各臓器抗原 2cc を3日間隔で10回家兔耳静脈より注射し、感作終了後1週間間隔で採血した。観察時期は重層後1週間後とした。

沈降帯数は感作終了後3週前後に最高となる。脾抗原による感作例では他の二者より早期に沈降帯の出現する傾向がみとめられた。各臓器抗原感作例とも感作終了後、時間の経過と共に出現する沈降帯は減少する

ものが多くみられるが、一度消失した沈降帯が再び出現するとか(肝抗原感作例No.3, No.4腎抗原感作例No.4)或は肝抗原感作例No.4のように感作6週後になり沈降帯数の増加と migration の増大を見るものもあつた。

3. 5. 各臓器 phosphatid 抗原による検討,

臓器 phosphatid 原液 1.0cc に新鮮牛血清 2.0cc を加え、家兔耳静脈より牛血清 phosphatid 原液1.0cc を負荷注射した。

表9 同種脾ホ感作例
抗原稀釈：8倍

家兎番号	抗 原			
	前		後	
	肝ホ	脾ホ	脾ホ	肝ホ
1			1	0
2			1	0
3			1	0
4			0	0
5			0	0
6			0	1
7			0	0
8			1	1
9			0	0

(注) 数値は沈降帯数を示す

表10 異種肝ホ感作例
抗原稀釈：16倍

家兎番号	抗 原			
	前		後	
	肝ホ	腎ホ	肝ホ	腎ホ
1			1	0
2			1	0
3			0	0
4			1	0
5			0	0
6			0	0
7			1	0
8			0	0
9			2	0
10			0	0
11			0	1

(注) 数値は沈降帯数を示す

表11 異種腎ホ感作例
抗原稀釈：8倍

家兎番号	抗 原			
	前		後	
	肝ホ	腎ホ	腎ホ	肝ホ
1			0	0
2			1	0
3			1	0
4			1	1
5			0	0
6			0	0
7			0	0
8			1	0
9			0	0
10			0	0

(注) 数値は沈降帯数を示す

表12 異種脾ホ感作例
抗原稀釈：8倍

家兎番号	抗 原			
	前		後	
	肝ホ	脾ホ	脾ホ	肝ホ
1			0	0
2			1	0
3			1	0
4			0	0
5			0	0
6			1	1
7			0	0
8			1	1
9			0	0

(注) 数値は沈降帯数を示す

3. 5. 1. 同種臓器 phosphatid 抗原感作例：
表7に示すように家兎肝 phosphatid 牛血清にて家兎を感作したさい、感作家兎11例中肝 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの6例、腎 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの2例である。表8にみるように家兎腎 phosphatid 牛血清で家兎を感作した場合、感作家兎10例中腎 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの4例、肝

phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの1例である。

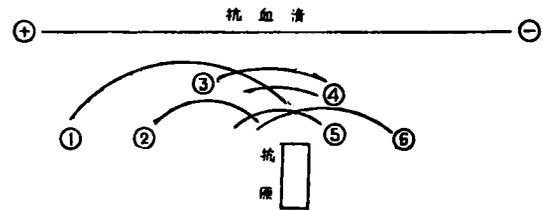
表9のように家兎脾 phosphatid 牛血清で家兎を感作した場合、感作家兎9例中脾 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの4例、肝 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの2例である。

3. 5. 2. 異種臓器 phosphatid 抗原感作例：

表10に示すように犬肝 phosphatid 牛血清にて家兎を感作した場合、感作家兎11例中肝 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの6例、腎 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの2例である。犬腎 phosphatid 牛血清にて家兎を感作したさい表11に示すように、感作家兎10例中腎 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの4例、肝 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの1例である。

犬脾 phosphatid 牛血清にて家兎を感作した場合、感作家兎9例中、脾 phosphatid 抗原に対して沈降帯1本を生ずるもの2例である。(表12)

図7 正常人血清家兎感作による免疫電気泳動法



3. 6. Ouchterlony 法及び免疫電気泳動法。

図7のように正常人血清にて家兎を免疫した場合に現われる沈降帯は石川(1957)¹⁷⁾によると6本であるといわれる。陽極側から①はアルブミンによるものであり、抗血清溝に近く強く大きな弧線を描いて現われる。これはアルブミン分割の多量であることを示す。②はα-グロブリンに相当するものであり、抗血清溝よりやや離れて小さな弧線を描き、本分割の少量なることを示す。③④⑥はβグロブリンに相当するものであり、何れも pH 7.5 の磷酸塩緩衝液を用いた場合には原点より殆んど移動しないといわれる。本分割に数種の抗原因子の含まれることを示す。

家兎肝抗原で家兎を感作したさいの抗血清を用いて本実験を実施すると、沈降帯数は5~7本現れ、概ね前述の正常人血清による家兎免疫例にみられる各分割に一致して出現する。その他に図8のように⑦の不明の分割が現われる。

図8 家兎肝同種抗原感作による免疫電気動法

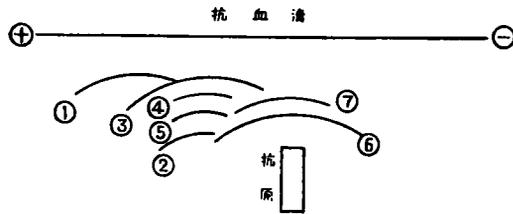
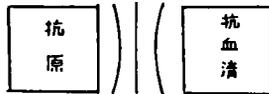


図9 家兎同種肝抗原感作による Ouchterlony 法



①はアルブミン②は α グロブリン③④⑥は β グロブリン⑤は γ グロブリンに相当するものと思われる。

この場合同時に Ouchterlony 法を行えば図9のように3本の明瞭な沈降帯を認める。同様に腎抗原及び脾抗原を用いた場合も大体4~6本の沈降帯を認めるが、肝抗原の場合に比較し沈降帯の数は少ない。

4. 総括並びに考按

以上 Oudin 氏寒天層内沈降反応を用い、肝、腎、及び脾等の各種臓器抗原について検討した結果、家兎各臓器及び犬各臓器抗原にて家兎を感作した場合、該抗原と感作家兎血清とを0.6%血清寒天メジウム中で室温にて反応させ、各臓器抗原に対応する物質を沈降反応にて観察すると明らかに沈降帯の生ずるのが認められた。使用した各臓器抗原は複雑抗原であるから、出現する沈降帯の数も multiple であり多くて4本を生じた。

一般に同種抗体の産生については、産生されるとするもの及び否とするもの等賛否両論があるが、著者の成績からは明らかに同種抗体の産生が確認され、そのさい Adjuvant¹⁸⁾ 法等の操作を必要とせず同種臓器生理的食塩水抽出抗原のみでその産生が可能であることを明らかにした。

各沈降帯の migration の長さを経時的に測定すると Oudin のいうように migration の長さは抗原重層後の時間の平方根に比例することが確認された^{19) 20) 21)}。

各臓器抗原感作例について抗原及び抗体を夫々2倍稀釈して Oudin 氏寒天内沈降反応を実施すると沈降帯の存在が認められるが、そのさい抗原及び抗体の濃度は或る程度稀釈されたところ(肝感作例では抗原8倍、抗血清8倍、腎、脾感作例では抗原8倍、抗血清

8倍)で各沈降帯は明瞭に分離され容易に判別することが出来た。

一般に健常家兎の血清と前述の各種臓器抗原とを反応させると沈降帯を生ずることは注目すべきことであるが、Kidd²²⁾ はかかる抗体は正常臓器の代謝過程に生成され、しかもおそらく何らかの自然感染をうける結果産生されるものであろうとしている。

又 Hocker & Boyd²³⁾ は単一の抗原を注射することにより明らかに性質のことなつた2種類の抗体の産生したことを報告しており、一つの異種抗原で長時間感作された結果生じた抗体が次第にその特異性を失うようになり、遂に極めて多くの抗原に対して反応する抗体を生ずる可能性を示唆しているが、何れにしても興味ある所見と考えられる。

次に各種臓器抗原(肝、腎、脾等)で3日間隔15回連続感作してその後1週間隔にて、寒天層内沈降反応を実施した結果によると、各臓器抗原感作例ともに感作中止後、2週目頃より沈降帯の出現数は最高となり、その後時間の経過と共に沈降帯数は減少するが、一度消失した沈降帯が経過とともに再び出現し、或は又沈降帯数が前より増加することを認めた。このことは Munoz & Becker⁴⁾ の指摘しているように migration が殆んど同一であるために、時に2本の沈降帯が一本に見えたり、二本に見えたりするためか、或は又実際に抗体が消失するのか、又は経過中に何等かの蛋白抗原で感作されることにより再び沈降帯を生ずるようになったのか、又長期にわたり感作された結果抗体が多くの抗原に対して反応するようになったものか等種々の要約が考えられるが、その原因にはわかには決定し難い。

鈴木等は抗人血清、家兎血清寒天の上に正常人血清、黄疸血清、猿血清等を重層した場合に生ずる沈降帯の数はそれぞれ異なることを指摘し、それにより各種動物血清蛋白の特異性を証明している。

ところが本実験では血清と同様に複雑抗原である各種臓器抗原を用いて臓器抗原について検討し、各臓器抗原の血清学的特異性を確めた。即ち該当臓器抗原抗体系において生じた沈降帯数は該当しない臓器抗原抗体系における交叉反応のさいの沈降帯数より明かに多く出現することが認められた。

臓器の抗原的特異性が、その臓器の phosphatid 分割にあるということは諸家^{24) 25) 26) 27) 28) 29) 30) 31)} によりのべられているが、著者の成績では各臓器(肝、腎、脾) phosphatid の試験管内の抗原性は該当臓器抗原抗体系にもつとも多くの沈降帯が認められているが、同時に他臓器 phosphatid との交叉反

応を示す場合もみられた。

5. 結 論

寒天層内沈降反応により同種臓器抗体の産生及びその特異性等について検討し次の結果をえた。

1) 同種(家兎)臓器(肝, 腎, 脾)抗原を用いて同種動物(家兎)を感作したさい, 感作家兎血中に該臓器抗原に反応する物質を寒天層内沈降反応(Oudin 氏法)で, 明かに沈降帯が認められ, 同種臓器生理的食塩水抽出抗原による抗体の産生が確認された。

2) 臓器抗原による感作時, 感作終了後4週前後に最も著明に沈降帯が出現する。

3) 寒天層内沈降反応は antigen excess zone 及び antibody excess zone あり, 40%臓器抗原を原液として使用するさい, 肝抗原は16倍, 腎及び脾抗原は8倍稀釈を用い, 抗血清は8倍稀釈を用いて沈降帯の明瞭な分離がみられた。

4) 臓器抗原感作例では沈降帯の migration の速さは重層後の時間の平方根に比例する。

5) 同種動物及び異種動物の肝, 腎, 脾抗原を用い, Oudin 氏寒天層内沈降反応を行う場合, 出現する沈降帯数は異種動物臓器抗原感作例よりも多く, 同系臓器間の抗原抗体反応の場合は, 異種臓器間の抗原抗体反応の場合よりも沈降帯は多く出現し, 臓器抗原

の比較的特異性が認められた。又そのさい出現する沈降帯数は肝抗原感作例では3~4, 腎, 及び脾抗原感作例では2~3にして, 肝抗原感作例では, 他臓器感作例よりも沈降帯数が多く現われるのを認めた。

6) 各臓器感作例につき該臓器抗原との反応を観察し, 沈降帯の出現状況を経時的に観察すると概ね感作終了後3週頃が最もよく出現し, 脾抗原感作例では他臓器抗原感作例より早期に該臓器抗原に対応する沈降帯の出現がみられる。尚一度消失した沈降帯が, 数週後に再び出現し, 或は又数週間後に沈降帯数が増加する場合がある。

7) 各臓器の phosphatid を抽出し, これに牛血清を加えて家兎を感作した場合, その抗血清は該臓器 phosphatid に対して, 他臓器 phosphatid に対してより多くの沈降帯が出現し, 臓器抗原の比較的特異性を示した。

8) 免疫電気泳動で検討すると家兎肝抗原感作例では沈降帯は6~7本出現し, 家兎腎及び脾抗原感作例では5~6本出現する。

又 Ouchterlony 法では家兎肝, 腎及び脾各臓器抗原感作例とも沈降帯は3本認められた。

稿を終えるに当り御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜った恩師小坂教授並に長島助教授に深甚なる謝意を捧げます。

参 考 文 献

- 1) Oudin, J. : Compt. rend. Acad. d. se., 222, 115, 1946.
- 2) Petrie, G. F. : Brit. J. Exper. path., 13, 330, 1932.
- 3) Kirkbride, M. R. and Cohen, S. : Am. J. Hyg., 20, 444, 1934.
- 4) Munoz, J. and Becker, E. L. : J. Immunol., 63, 47, 1949.
- 5) Becker, E. L. & Munoz, J. : J. Immunol., 63, 173, 1949.
- 6) Becker, E. L. : J. Immunol., 70, 372, 1953.
- 7) Ouchterlony, O. : Acta Path, et microbiol. Scandinav., 25, 186, 1948.
- 8) A. H. Gordon, B. keil, and K. Sebesta (Dept. Org. Chem. Tech. Univ., Prague) 164, 498, 1949.
- 9) P. Grabar and C. A. Williams (Serv. Chem. Micr. Tnst. Past. Pares) 10, 193, 1953.
- 10) Eaton, M. D. et al. : J. Exper., 79, 539, 1944.
- 11) Vorländer, K. O. : Ztscht. Ges. Exper. Med., 118, 352, 1952.
- 12) Meyer-Kremmer. : Zschr. Exper. Med., 116, 390, 1950.
- 13) 石井 : 日本消化機病学会雑誌, 54, 1, 1957.
- 14) 長島 : 日本消化機病学会雑誌, 55, 534, 1958.
- 15) 長島 : 日本臨床, 15, 45, 昭32.
- 16) 荒木 : 日本循環器学会雑誌, 13, 245, 昭24.
- 17) 石川 : 日新医学 : 44, 361, 1957.
- 18) Freund, J. : J. Allergy., 28, 18, 1957.
- 19) 鈴木・森・影山 : 総合研究班報告, 133, 1951.
- 20) 影山・打田 : 京都府立医科大学雑誌, 52, 433, 1952.
- 21) 影山 : 最新医学, 6, 1137, 1953.
アレルギー, 2, 22, 1953.
- 22) Kidd, J. G. & Friedewald, W. J. : J. Exper. Med., 76, 543, 1942.
- 23) Hoehner, S. B. & Boyd, W. C. : J. Immunol., 33, 41, 1936.
- 24) Landsteiner, K. : The specificity of serological reaction 1936.
- 25) Landsteiner, K. & van der Scheer : J. Exper. Med., 42, 123, 1925.

- 26) Forssmann, J. : *Biochem. Ztschr.*, **37**, 78, 1911. 29) 馬杉 : 結核の病理とアレルギー, 1946.
 27) 三沢 : 東京医学会雑誌, **39**, 1870, 1925. 30) 前川 : 医学通報, **342**, 5, 1943.
 28) Landsteiner, K. & van der Scheer : *J. Exper. Med.*, **41**, 427, 1925. 31) Anderson, R. J. : *J. Biol. Chem.*, **74**, 525, 1827.

Studies on the Organic Antibody by the Precipitation Test in the Agar Layer

Part I

Studies on the Homogeneous Organic Antibody

By

Kazuma NAGOSHI

The First Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School
(Director : Prof. K. Kosaka)

Conclusions

The production and the specificity of homogeneous organic antibody were investigated by the precipitation test in the agar layer. And the results were as follows.

1. Sensitizing the homogeneous animal (rabbit) by the homogeneous (rabbit) organic (liver, kidney or spleen) antigen, the substance corresponding to the above organic antigen was identified in the sensitized rabbit's blood and the precipitation band was clearly found by the precipitation test of Oudin's method in the agar layer. And the production of antibody by the extracted antigen of homogeneous organ with physiological salt solution was certified.

2. Sensitizing by the organic antigen, the precipitation band appeared most remarkably around the 4th week after the sensitization.

3. There were both of antigen excess zone and antibody excess zone and the precipitation band was clearly separated on the use of liver antigen in dilution of 16 times, kidney and spleen antigen in dilution of 8 times and antiserum in dilution of 8 times, when the organic antibody of 40% was used as the original solution.

4. In the cases sensitized by the organic antigen, the migration velocity of precipitation band was proportional to the square root of time after the accumulation.

5. Carrying out the Oudin's precipitation test in the agar layer on the use of the liver, kidney and spleen antigen of homogeneous and heterogeneous animals, the number of the appeared precipitation band was much in the cases sensitized by the homogeneous antigen than that in the cases sensitized by the heterogeneous antigen. As for the antigen-antibody reaction among the organs in the same system, the precipitation band appeared more numerous on the antigen-antibody reaction among the homogeneous organs than that on the antigen-antibody reaction among the heterogeneous organs and the relative specificity of organic antigen was observed. On the other hand, the number of precipitation band appeared at that time was 3-4 in the cases sensitized by the liver antigen, 2-3 in the cases sensitized by kidney and spleen antigen. In other words, the number of precipitation band showed more numerous in the cases sensitized by the liver antigen than other cases.

6. The reaction of each antigen with the antibody corresponding to each antigen was observed on the cases sensitized by each organ and the appeared state of precipitation band was also hourly observed. The precipitation band appeared the most remarkable around the 3 rd. week after the end of sensitization and the precipitation band corresponding to the organic antigen appeared more early in the cases sensitized by the spleen antigen than that in the cases sensitized by other organic antigen. Moreover, It was seen that the disappeared precipitation band appeared again after several weeks or the number of precipitation band increased after several weeks.

7. On the sensitization of rabbit by the phosphatid, extracted from each organ, with the addition of neat serum, it's antiserum showed more precipitant band to it's organic phosphatid than that to each organic phosphatid, and the organic antigen relatively showed the specificity.

8. Studying on the precipitation band by the immuno-electrophoresis, it appeared 6-7 in the cases sensitized by the rabbit's liver antigen and 5-6 in the cases sensitized by the rabbit's kidney and spleen antigen. On the other hand, the precipitation band appeared 3 by the method in the cases sensitized by each organic antigen of rabbit's liver, kidney and spleen.
