

ヒト血漿製剤の抗原抗体反応による分析

第 1 報

Plasmanate を中心として

金沢大学医学部病理学教室

石 川 太 刀 雄

金沢大学結核研究所細菌免疫部

岩 倉 衛

金沢大学医学部病理学教室

白 崎 重 雄

(受付：昭和34年10月31日)

I 緒 言

近時臨床技術の進歩、並びに血液銀行の発展によつて、輸血は広く適用されるに至り、その需要量と供給量はますます増大しつつある。ヒト血漿は循環血液量減少の際、全血輸血に代るものとして最もすぐれている外、非経口の蛋白補給源としても重要であり、また血液凝固機転に障害あるものにも有効である。しかし血漿の使用にあたり血清肝炎発生の危険が常に問題になる。血漿輸液による血清肝炎予防のため、肝炎 Virus 滅菌法として今まで諸種の考案がなされており、またこの問題を解決すべくいくつかの試みがなされている。すなわち紫外線照射、薬剤の添加、液状のまま長期間室温に貯蔵することによる滅菌法、同型血液型血漿の使用、Virus を含まぬ蛋白分層の使用、及び Plasma-expanders の使用等である。このうち紫外線照射による滅菌は、基礎及び臨床実験によつて完全でないことが明らかにされており、薬剤添加もいまだ実験的段階の域を脱しない。同型血漿単一供血者の使用は適合試験を要し、製造方法にも難点がある。Plasma-expanders としては

PVP, デキストラン, ゼラチン, オキシポリゼラチン, アカシヤ液及び Plasmonal 等があり、Plasmonal は異種動物性血漿蛋白中の溶血素、凝集素を破壊して非特異化したものであるが、元来異種動物蛋白であり、その精製処理の度合により人体にアレルギー反応を起したり、肝や脾等の機能障害または血液を凝集して血液型判定を誤らす等の副作用がしばしばあつて、その使用は限定される。加うるに大量輸血によつて従来少量輸血においてみられなかつた身体反応がみられること及び需要の増大により代用血液をもつて一部を血液に代えざるを得ぬ實際面が多いことなどの理由から代用血液の必要性は一段と高くなつてきた。代用血液は補液と加工血液とに大別でき、後者は加工血漿と血球浮遊液を含む。多くの救急の目的には、血球よりも血漿の補給が必要であることから、加工血漿の利用には特に意義がある。これは正常血液の血漿成分に含まれている特異性、抗体性を脱却し、長期保存にも安定であり、特にヒト血清中の肝炎 Virus 伝染の危険度を最小に低下せ

しめ, Plasma-expanders に比して最も新鮮ヒト血漿に近い血清蛋白を同時に補給でき, 血液を薄めることにより大量輸血を行つても血液凝固因子の欠乏を防ぎうるという長所を有している. 加工血漿として現在用いられているものには, ヒト乾燥 Plasma (日本ブラッド・バンク) と Plasmanate (Cutter 社) があり, その他血清 albumin 及び Fibrinogen 等も単独で精製されそれぞれ特殊の目的に利用されている. 理想的輸血材料とは成分が全血漿に最も近似し, 細菌 Virus の汚染がなく, 発熱物質を含まず, 抗原性及び不適抗体価が低く, 廉価でしかも大小有事の際の要求にも応じうるように調整されていなければならない.

そこで現在用いられている各輸血材料がその蛋白組成においてヒト血清にどれだけ近似して

いるか, また重大な副作用の起因となる異常蛋白が製造過程の操作によつて生成されることはないか検定してみたい.

蛋白組成を最も鋭敏に検定するものに抗原抗体反応を用いての抗原分析法があげられる. 多価抗原である各加工血漿についてそれぞれの抗血清を作製し, ろ紙電気泳動法, Agar gel double diffusion 法に Immunoelectrophoresis 法を併用して抗原抗体系の数とその localization を沈降線 spectrum で示しヒト血清と比較吟味した. Plasmanate を中心として, ヒト乾燥 Plasma 及びヒト血清 albumin について行い, 更にサル血清並びにウシ血清のヒト血清との共通因子を追求して今までに得た知見を報告する.

II 実験材料並びに実験方法

実験材料

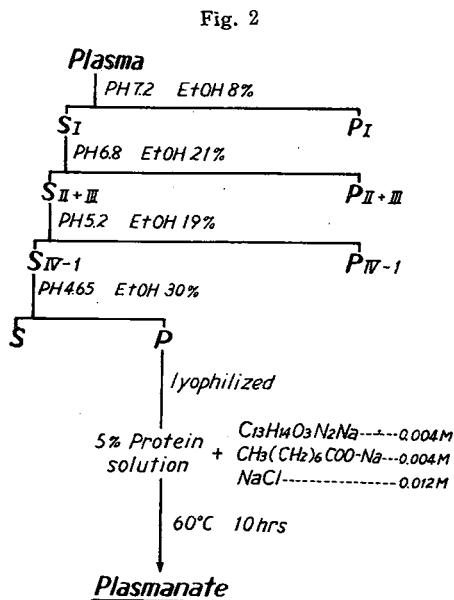
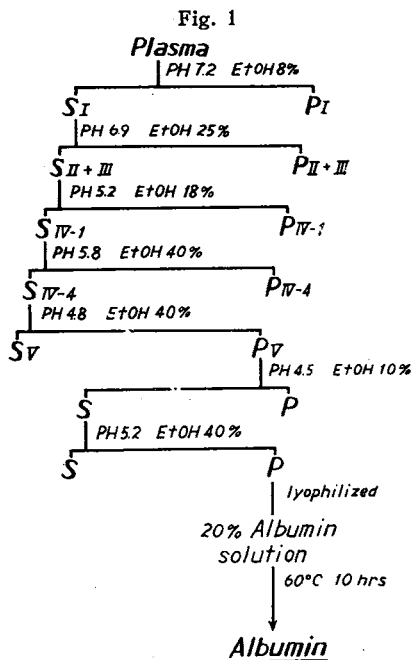
i) 実験動物: あらかじめ10日以上飼育した体重 2.0~3.5kg の成熟ウサギを各抗原につき 2匹ずつ使用した.

ii) 免疫抗原(輸血材料)

イ) 正常ヒト血清: 健康成人の肘静脈から採血してその血清を分離した.

ロ) ヒト血清 albumin (日本ブラッド・バンク)

Fig. 1 に示すごとくヒト血漿から Cohn の第6法



によつて Alcohol fractionation して得た分画を真空凍結乾燥して、再び水をもつて 20% 溶液とし、肝炎 Virus 滅菌の目的で 60°C, 10 時間熱処理したものである。これを生理的食塩水で蛋白濃度 5% に希釈して用いた。なおこれと同じ過程で製造されたと思われる某社製 18% ヒト血清 albumin (N.Y.) を同じく蛋白濃度 5% に希釈して用いた。

ハ) Plasmanate (Cutter 社：以後 (B.B.) と記す)

Fig. 2 に示すごとくヒト血漿から Cohn の第 6 法に準じて Alcohol fractionation して得た分画 (IV₄+V) を凍結乾燥して蛋白の 5% 溶液とし、これに安定剤を加えて肝炎 Virus 滅菌の目的で 60°C, 10 時間熱処理したものである。なお熱処理による蛋白組成の異常を吟味するため加熱処理以前の凍結乾燥製品 (Cutter 社) を生理的食塩水で 5% 溶液としたもの、及びこれに教室で安定剤を加えて 62~63°C 10 時間加熱したもの(この条件で極微の沈殿を生じた)をもあわせ試みた。更に教室高柳がヒト血漿から同じ過程で Alcohol fractionation して得た分画 (Plasmanate-P) を比較に用いた。ただしこれは他の実験に供するためその Albumin 含量は少なく β -globulin は多くなるよう加減して得たものである。

ニ) ヒト乾燥血漿(日本ブラッド・バンク)ヒト血漿を紫外線照射を施したのち、真空凍結乾燥したものである。クエン酸 0.1% 含有溶解液で 5% 溶液として用いた。

ホ) サル血清：成熟日本ザルから採血して血清を分離して用いた。

ヘ) ウシ血清：と殺場で得た新鮮ウシ血液から血清を分離して用いた。またウシ血漿にアルカリを加えて Formaldehyd とともに 60°C, 5 分間熱処理した製品 Plasmonal-V を併用した。

iii) 抗血清

抗血清の作製は大體 Freund¹⁾²⁾ の Adjuvant 法に従つた。教室三宅³⁾ は抗体産生に関して免疫方法を吟味して Adj 2 回筋注法が最良であるとの結論を得ているので、ここでもこの方法に従つた。すなわち Paraffin-oil 2 ml, 乾燥 BCG 4 mg, 抗原輸血材料 1 ml, Falba-oil を混じた乳剤を 3 ml ずつ 1 週間間隔で 2 回ウサギ背筋内に注射した。最終注射 4 週間後耳静脈から採血して血清を分離し、0.01% にマーゾニンを加えて 4°C に保存し用事実験に供した。

実験方法

1) ろ紙電気泳動法

スエーデンの Arne Tiselius により考案された蛋白泳動装置(1937)は近年血清蛋白質の研究に偉大な貢献をなしたが、他方ペーパークロマトグラフィーの発達を経て Durrum (1950), Cremer & Tiselius (1950), Turba & Enenkel (1950) 及び Kunkel & Tiselius (1951) 等によりろ紙を用いて血清を電気泳動的に分離して定性または定量するろ紙電気泳動法が報告された。この原理は直流電気回路に挿入した Buffer 液で湿したろ紙上に血清を塗布すれば、蛋白質の各分層の易動度の相違によりろ紙上において各分層に分離泳動され、これを染色し可視状態にして、定性あるいは定量せんとするものである。ここでは小林式ろ紙電気泳動装置、東洋ろ紙 No. 51, Veronal buffer (pH 8.6, $\mu=0.05$)を用い、試料を 0.01 ml 添加し電流 0.4mA/cm 電圧 20~25 volt/cm で 7 cm (5~6 時間) 泳動した。泳動後ろ紙を 100~110°C で 20 分間乾燥し、次いで B.P. B. 液で 20 分間染色した後 2% 醋酸液で数回脱色し、自然乾燥した。定量にはろ紙をアンモニヤで発色させてパラフィンで透明化し、デントメーターにかけた。

2) Agar gel double diffusion 法 (Ouchterlony)

抗原抗体反応が Gel 中でも起ることを観察した歴史は古く、Bechhold (1905) は Gel の中で液性の抗原と抗体とが反応して Liesegang 現象と同じような白輪のできることを観察している。のちに Reiner and Kopp (1927) も血清学的反応における Liesegang 現象として同様な観察を報告している。その後 Oudin⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾ (1946) は試験管内で抗血清を含む寒天をかたまらせ、その上に液性抗原を含む寒天を重ねて放置しておく、抗原と抗体は Gel 中を拡散して、抗原抗体の濃度比が適当になつた所で沈降物を作ることを見出し、ここに Agar gel diffusion 法の考案並びに理論は画期的な進歩をもたらした。抗原または抗体を形成する因子はそれぞれ Gel 中を拡散する速度において固有係数に差を示すから、多価抗原においてはその組成を固有の拡散速度をもつた抗原に解析することができる。Ouchterlony⁸⁾ は Oudin のこの理論を試験管から寒天平板に移して用い、抗原抗体双方に double diffusion を行わしめ、沈降帯が出現する位置と、隣接する沈降帯間の交差連続の状態から数種の抗原または抗体の組成因子を同定しうることを明らかにした⁹⁻¹³⁾。すなわち Oudin 法は抗原の多元性または

抗体系の数を決定するのに役立つ Ouchterlony 法では更に2種以上の抗原または抗体の Homogenicity または Heterogenicity を証明しうる利点をもっている。

術式は大体 Wilson & Pringle 法¹⁴⁻¹⁷⁾に従った。すなわち良質の寒天粉末を4%濃度に加熱溶解して固化する。これを1cm角の骰子状に切り、24時間以上流水で、次に48時間以上蒸留水で透析し、4°Cにて保存する。使用に際してはこの寒天にメチルオレンジ、マーズニン、蒸留水を加えて2%寒天液として加熱溶解し、木綿布を用いてろ過する。これをペトリーのシャーレに約10ml入れて固まらせ、適当な位置(写真参照)に真鍮製鋳型(Mold)をおいて更に寒天液を約20ml加えて固まらす。充分固まらせた後にMoldをぬくとため池(Basins)ができる。この池に抗原と抗血清を入れて室温に放置し、沈降線の出そつた時写真撮影して記録した。

3) Immunoelectrophoresis 法¹⁷⁾⁻²⁰⁾ (I. E. P.)

Pastuer 研究所の Williams & Graber¹⁸⁾⁻²¹⁾ (1925) は Agar gel 中であらかじめ抗原を電気泳動的に分画し、次にこれに対応血清を拡散させると、電気泳動で得られるよりも更にくわしい成分を解析できることを指摘した。これが Immunoelectrophoresis 法で Zone electrophoresis 法に Agar gel double diffusion 法を併用したものである。したがって両者の特徴が加わり

Ouchterlony 法では分析困難な複雑抗原でも容易に解析できる。しかもこれらの方法は沈降反応を用いるため Tiselius の電気泳動法の分析可能域(約10 μ g~3mg)やろ紙電気泳動法のそれ(約10~100 μ g)に比較して非常に鋭敏(1~4 μ g)となりきわめて微量の蛋白をも識別しうる特徴がある。

本実験では次のように行つた。写真用ガラス乾板(12 \times 16.5cm)上に厚さ5mmの寒天層を作る。寒天メジウムは、4%精製寒天、リン酸 buffer pH 7.5, $\mu=0.06$, マーズニン液及び蒸留水から成る1.5%濃度のものである。寒天平板に真鍮製 Mold を用いて抗原をおく Basin (5 \times 10mm)と、抗血清をいれる溝を泳動方向に平行して作り、両端寒天層中にろ紙片(東洋 No. 51)を挿入して Buffer 液に浸す。Buffer 槽は、プラスチック製容量150ml, この中に寒天メジウムと同種の Butter を入れ pH, イオン強度を同一とする。Butter 槽は寒天 Bridge により電極槽と連結する。試料抗原は0.1ml 抗原池に入れ300~320 V, 20~24 mA, 6~8時間泳動する。泳動中泳動部分はすべて密閉箱中におさめる。泳動後直ちに寒天平板を泳動装置よりはずし、抗血清溝に抗血清を入れる。両液は寒天層中を拡散して反応後2日目頃より沈降線を形成し始め、次第にその数、濃度を増していく。写真撮影して沈降帯の Pattern を記録した。

III 実験成績

1) ヒト血清 albumin の解析

Fig. 3 に示すごとくろ紙電気泳動法によつて Albumin (B.B.) は主成分 Albumin (a)と、少量の α_2 -globulin (b) に分離される。これに比して Albumin (N.Y.) は Albumin の他に α_1 -globulin (b') 及びかなり多い α_2 -globulin, 更に原点から泳動し難い(C)に分かれる。ここで(C)は製造過程に生じた変質蛋白によるものではないか。そしてこれが正常血清の抗原分析において該当するものが見出されないのではないかという懸念が起る。よつてこれを Agar gel double diffusion 法によつて解析してみる(Fig. 4)。すなわち Anti-Albumin (B.B.) に対して Albumin (B.B.), Albumin(N.Y.), 乾燥 albumin 及び乾燥血漿を反応させると、それぞれ(a)

(b) 2本の沈降線を生ずるが Anti-Albumin (N.Y.) に対して Albumin (N.Y.) は(a)といくつかの Subfraction に分かれた(b)及び(c)の沈降線を示す。(c)は乾燥 albumin 及び乾燥血漿との反応においてはみられないものである。更に Immunoelectrophoresis 法でみると(Fig. 5), Anti-Albumin (B.B.) と Anti-Albumin (N.Y.) の両者に対して Albumin (B.B.) はともに(a)及び(b)2本の沈降線を示す。ここで(a)は Albumin 分屑に属し Fig. 4の(a)組成がこれに相当し、(b)は α_2 -Globulin に属し Fig. 4の(b)組成はこれに相当するものである。Anti-Albumin (N.Y.) に Albumin (B.B.) を加えても Albumin (B.B.) には反応にあずかるべきものが2組成しかないから Anti-Albumin

(N.Y)の含む因子が複雑であつても2本の沈降線を生ずるのみである。しかし Anti-Albumin (N.Y)に Albumin (N.Y)を加えると(a), (b, b')及び(c)の沈降線を生ずる。(c)は Fig. 4において、乾燥 albumin 及び乾燥血漿との反応では見出されないから凍結乾燥処理以前のものではなく、加熱処理によつて生じた変質蛋白質でないかと考えられる。

2) Plasmanate の解析

Cutter 社製 Plasmanate のろ紙電気泳動図及び Immunoelectrophoresis 法で得た Pattern は Fig. 6のごとく、主成分 Albumin と α_1 -及び α_2 -globulin から成ることを示す。先ず Plasmanate と Anti-Plasmanate との間に認められる因子(沈降線)で正常ヒト血清と Anti-Plasmanate との間に認められる因子以外のものが存するか否かをきわめるため、すなわち前者に正常ヒト血清に含まれない異常成分があるか否かをきわめるため Agar gel double diffusion 法によつて Anti-Plasmanate (B.B)にヒト血清及び Plasmanate (B.B)を反応させてみた (Fig. 7)。慎重を期するため抗原量をそれぞれ $\frac{1}{2}$ 、 $\frac{1}{4}$ 及び $\frac{1}{8}$ に希釈して加えた。これは抗原抗体比をさまざまにとつて最も適切な量的比を考慮すれば、ごく少量の抗体がある時でも見逃すことなく検出できるからである。沈降線 Spectrum にみるごとく Plasmanate (B.B) against Anti-Plasmanate (B.B)において数本の沈降線を認めるが、これはすべて Human serum against Anti-Plasmanate (B.B)において認められる8本の沈降線のいずれかに相当するものである。また Anti-Human serum に対するヒト血清と Plasmanate (B.B)との態度を比較検討することが必要で、これは Fig. 8及び Fig. 9に示す。Anti-Human serum に対してヒト血清自体のもつ反応因子は十数本であるが Plasmanate (B.B)のもつ因子は数本でそのすべてが前者の十数本のいずれかに該当するものである。この場合にも異常因子は現われない。したがつて Anti-Plasmanate に対しても Anti-Human serum に対し

ても Plasmanate (B.B)の示す因子には、正常ヒト血清以外のものがこの抗原分析法では見出せないということである。なお Anti-Human dried plasma に対する Plasmanate の反応をみると Fig. 10のごとく Plasmanate のもつ因子はすべてヒト乾燥血漿のもつ各因子と共通であり、Anti-Plasmanate (B.B)に対するヒト乾燥血漿と Plasmanate の態度を比較しても (Fig. 11)同様のことがいえる。

次に熱処理によつて抗原組成に変化を来さないかを Immunoelectrophoresis 法によつて吟味してみる。すなわち Anti-Plasmanate (B.B)に対して Plasmanate (B.B)及び同じ Cutter 社製で熱処理以前のものを反応させてみると Fig. 12の示すごとく、各沈降線は両者一致しており、他に異常因子もみられない。また Agar gel double diffusion 法によると (Fig. 13), Anti-Plasmanate (B.B)に対して Plasmanate (B.B)自体は数本の沈降線を示し、加熱処理以前のものが示す Pattern と全く同じである。今度は熱処理の条件を変えて行つてみる。すなわち Cutter 社熱処理以前の凍結乾燥製品を、5%溶液としてこれに安定剤を加えて 62~63°C, 10時間加熱処理したものを Anti-Plasmanate (B.B)に反応させてみた。熱処理によつて極微の沈殿が生じこれは Fig. 13-3が示すごとく b 分画の減少、c 分画の消失としてみられる。しかし異常組成の出現は認められない。すなわち熱処理が 62~63°C に動揺すると、抗原組成に量的変化として現われることを示すもので加熱処理が大変デリケートであるといえる。Plasmanate (B.B)は Cohn の第6法に準じて作製されたもので Cohn の各分画には変性蛋白質が存しないことは既知のところであり、教室で作製した分画 (Plasmanate-P)についても吟味を行つて異常蛋白質組成はみられなかつた。Plasmanate は肝炎 Virus を滅菌する目的で加熱処理が施してあるが、操作が忠実に行われる限り抗原組成に変化を来すものではなく、ヒト血清蛋白質組成に大変近似した製品をうることができる訳である。

3) ヒト乾燥血漿の解析

ヒト血漿に真空凍結乾燥操作を加えた製品はヒト血清と比較してその抗原組成に変化がないか検討してみた。この電気泳動図は Fig. 14 に示すが、ヒト血清と比較して α_2 -及び β -globulinの減少がみられる。抗ヒト血清に対して gel double diffusion法 (Fig. 8, 9) と I. E. P. 法でヒト血清と比較すると Albumin, α_2 -及び β -globulinの各因子に減少ないし消失がみられる。また Anti-Human dried plasma に対してヒト乾燥血漿の作る沈降線 Pattern はヒト血清の作るものとすべて共通であり、異常組成の出現もみられなかつた。

4) サル血清とヒト血清

サル血清の電気泳動図はヒト血清と比較して β -globulin 分層にやや近いピークがみられる以外に差はない (Fig. 15)。Agar gel double diffusion法において抗ヒト血清にサル血清を反応させてみると数本の沈降線を示す (Fig. 16)。すなわちサル血清にはヒト血清と沈降反応を起しうる組成の存することを示している。しかし各

沈降線のつながりを追求すれば、ヒト血清のものの一部共通する以外は非連続である。Spectrum 上、線の連続しているのが共通因子、線にかけているのがかけている因子、そして非連続線ははねて記してある。沈降組成の主体をなすものは Albumin であるが、ヒト Albumin とは抗原分析的にほとんど異質である。更に吟味するため抗ヒト血清 albumin に対する Plasmanate とサル血清の沈降線のつながりを追求すると一部を除きほとんど共通していないことがわかる (Fig. 17)。他方抗サル血清に対してみると (Fig. 18) サル血清の示す沈降線でヒトの材料には存在しない因子が認められる。

5) ウシ血清とヒト血清

ウシ血清及び Plasmonal-V の電気泳動図は Fig. 19 に示す。Anti-Plasmonal-V に対するヒト血清の反応を Agar gel double diffusion 法でみると (Fig. 20), わずかに沈降しうる抗原が Albumin に存するが共通因子はほとんどない。また Fig. 21 によつて Anti-Plasmanate (B. B) に対してもはなはだ異質であることがわかる。

IV 総括並びに考案

各輸血材料の蛋白組成を抗原分析法によつて解析して、正常ヒト血清と比較吟味した。

Fig. 22 は以上の実験成績を総括したものである。ヒト血清の抗原因子は Albumin, α_1 -, α_2 - β -及び γ -globulin 分画に基づく十数本の沈降線として示された。Williams & Graber (1955)²¹⁾ はウマ抗血清で16本以上, Wunderly²⁰⁾ は12本, Bargob 等 (1958)²²⁾ はウサギ抗血清で13本の沈降線をそれぞれ I.E.P. 法によつて解析できたと報告している。ここでは三宅の実験に基づいて Adj. 2 回筋注法を行い、抗血清は免疫最終注射後4週目に採血して得たが、抗血清を用いる場合には常に種々の吟味が必要である。同一抗原についても、免疫動物の個体差、免疫方法、採血時期等によつて、抗体価に変動があり、沈降線の現われに差を生ずる。更に完全な沈降線

Pattern をうるには抗原と抗体の相対的濃度を変えることによつて最適比を考慮する必要がある。ここでは抗原希釈のみを行つてみたが、抗血清の希釈によつて沈降線の数及び濃度が減少し、特に α -、 β -globulin に対する沈降線は減少した。また各沈降線の形成速度の差が大で globulin に対するセットが出そろふ頃には早く現われた Albumin に対するセットが不明瞭化することがあつて、この場合観察を適当な間隔において何回も行つて総合的に判定する必要がある。Williamsは正常ヒト血清においても、各分層に変動があつて特に α_2 -globulin にはなはだしいと報告している。したがつて正常ヒト血清と比較する時、これらの点が考慮されねばならず、特に異常抗原因子の出現を判定する場合慎重であらねばならない。

A列における抗ヒト血清に対するヒト乾燥 plasma の反応では Albumin 及び α_2 、 β -globulin のおのおの一部に減少ないし消失がみられる。しかしすべての抗原因子はヒト血清のものに含まれている。抗ヒト乾燥 plasma に対する態度も全く同じで、凍結乾燥、紫外線照射によつて異常組成の出現はないといふことができる。

ヒト血清 Albumin 及び Plasmanate 両製品は Cohn のアルコール分画法によつて得たものを 60°C、10時間加熱処理したものであるが、これらの抗原性はいずれもヒト血清に保有されている分画に相当している(C列、D列)。

Plasmanate については、特に加熱処理が抗原組成に異常を来さないかを検討した。Plasmanate は熱処理以前のものに比して Albumin のごく一部にわずかに減少しているのみであるが、条件を 62~63°C、10時間に変えると更に Albumin の一部及び α_1 -globulin の一部に減少及び消失する因子がみられた。某社製ヒト血清 Albumin にみられた変質蛋白は加熱操作に慎重をかけた結果生じたものであると思われるが、これは非経口的蛋白補給源としての目的から離れるばかりでなく、なんらかの副作用の起因になることも考えられる。

各動物血清蛋白の種特異性に関しては古くから知られており、各動物種類の血清蛋白の化学的組成も明らかにされつつある。

Landsteiner (1954) は、交差反応なる現象は構成蛋白の構造類似性に基づくことを明らかにしたので、類似蛋白質を有する諸種動物間の系統発育の関係が明らかとなり、Nuttall (1904) は血清の交差反応性の程度は、動物学的近縁関係の程度に平行すると述べている。Adair 及び Hamilton (1939)²⁰⁾ は、ヒトとウマの血清 Albumin 間の交差反応を研究し、異種血清 Albumin 中に類似の抗原成分が存在することを追求

している。Melcher (1953)²¹⁾ 等も、ヒトとウシの血清 Albumin の交互的交差反応を Heiderberger & Kendall (1935)²²⁾ 等の定量的沈降素試験によつて確証している。しかし Albumin 間の抗原的類似性は種の近縁関係のみならず、免疫程度にも関係することを Hooker and Boyd (1941)²³⁾ は述べている。すなわち動物を長期にわたり抗原的刺戟にさらすと、広い cross-reactivity をもつた抗体が形成せられ、定量的沈降素試験では equivalence Zone における抗原抗体比が大となることわかる。したがつて蛋白抗原相互の正しい交差反応性を調べる際には、やや免疫度の低い、すなわち等価域における抗原-抗体比が低い血清を使用することが合理的である。

ここでは Agar gel double diffusin 法によつて異種動物間の免疫学的に均一な因子を追求した。Fig. 15 に示すごとく、サル血清は、抗ヒト血清に対して沈降しうる抗原の存在を示すが、主体をなすべき Albumin 分画には沈降反応を示す要素も少なく、共通因子も更にこの一部に存するのみである。

ウシ血清はヒト血清に対して定量的沈降素反応では Albumin の 15% が交差反応すると報告されている。F 列にみるごとく、一部の Albumin と沈降するがほとんど異質である。Plasma-expanders として用いる際にも厳重な吟味が必要である。

しかし Agar gel double diffusion 法は常に免疫学的均一性、部分的均一性、異質性を示すものではなく、相対的濃度の變化、親近性の程度、材料の免疫学的純粋性等によつて種々の態度を示すから、これらの点に留意せねばならず、更に詳細な吟味には、抗体を分画化して得たものについて行つたり、必要な分層についてのみ行つたり、抗体と抗原の Charge の時期をずらしてみることも等も必要である。

V 結 語

加工血漿として今日使用されているヒト血清

albumin, Plasmanate 及びヒト乾燥血漿につい

て、その蛋白組成を正常ヒト血清のものと比較検討した。蛋白組成を最も鋭敏に検定するものに抗原抗体反応を用いての抗原分析法があげられるが、ここでもこの方法を適用した。すなわち各材料の抗血清を Adj. 2 回筋注法によってウサギに免疫して最終注射 4 週後に採血して得た。

そして Agar gel double diffusion 法及び I.E.P. 法によつて、各材料の抗原抗体系の数とその localization を決定し、各抗原因子は沈降線 Spectrum として示し、正常ヒト血清のものと比較吟味した。

Plasmanate を中心として特に肝炎 Virus に対する 60°C, 10 時間の加熱滅菌処理がその蛋白組成に及ぼす影響を検索し、更にサル血清並びにウシ血清のヒト血清との共通因子を追求して今までに得た知見を報告する。

1) ヒト血清 albumin (B.B) は主成分としての Albumin と α_2 -globulin から成るが、その抗原因子はすべて正常血清のものに含まれる。また肝炎 Virus 滅菌を目的として行われた 60°C, 10 時間の加熱操作も蛋白組成に異常を来すことはみられなかつた。同じ方法によつて某社製品

を検定して変質蛋白の存在を知つたが、これは加熱操作に慎重をかけたためと思われる。

2) ヒト血漿は凍結乾燥または Cohn のアルコール分画化の操作によつて、2, 3 の抗原因子にわずかな減少を来す以外その蛋白組成に変化を来すことはない。

3) Plasmanate は主成分 Albumin と α_1 -及び α_2 -globulin から成るが、その抗原因子はすべて正常ヒト血清のものに一致する。60°C, 10 時間の加熱処理が蛋白組成に及ぼす影響をみるため、加熱処理以前のもの、加熱条件を 62~63°C に変えたもの及び教室でアルコール分画化して得たもの等を併用して比較吟味した。そして加熱操作が忠実に行われる限り、その抗原組成に意味ある変化を来さないことを知つた。

4) サル血清にはヒト血清と沈降しうる抗原が存するが、これは主体をなすべき Albumin のごく一部で、共通因子は更にその一部に存する。

5) ウシ血清にはヒト血清と沈降しうる因子が Albumin に存するが、ほとんど異質である。

稿を終るに際し、本研究に材料を提供頂いた日本ブラッド・バンク内藤博士に謝意を表します。

文

- 1) Freund, J. & Bonanto, M. V.: J. Immunol., 48, 325, 1944.
- 2) Freund, J.: J. Clin. Path., 21, 645, 1951.
- 3) 三宅康夫: 倉敷中央病院年報, 28, 1, 38, 1959.
- 4) Oudin, J.: Ann. Inst. Pasteur, 75, 30, 1948.
- 5) Oudin, J.: Ann. Inst. Pasteur, 75, 109, 1948.
- 6) Oudin, J.: Method in Medical Research, 5, 1952.
- 7) 鈴木成美: 細胞化学シンポジウム, 3, 251, 1954.
- 8) Ouchterlony, O.: Acta Path. Microbiol. Scand., 32, 231, 1953.
- 9) Wilson, M. W., Pringle, B. H.: J. Immunol., 73, 4, 1954.
- 10) Wilson, M. W., Pringle, B. H.: J. Immunol., 75, 460, 1955.
- 11) 鈴木鑑・木戸義昭: 日新医学, 45, 154, 1958.
- 12) 大原達: 日新医学, 44, 138, 1957.
- 13) Korngold, L., Van Leenwen, G.: J. Immunol., 78, 3, 1957.
- 14) Wilson, M. W. & Pringle, B. H.: J. Immunol., 75, 460,

献

- 15) 松橋直: 臨床病理, 特集 II, 203, 1955.
- 16) 鈴木鑑・木戸義昭: 日新医学, 43, 342, 1956.
- 17) 高柳尹立: 十全医誌, 60, 701, 1958.
- 18) Graber, P. & Williams, C. A.: Biochem. et biophys. acta, 17, 67, 1955.
- 19) Kohn, J.: Nature, 180, 986, 1957.
- 20) Wunderly, Ch.: Dtsch. Med. Wchshr., 83, 407, 1958.
- 21) Williams, C. A. & Graber, P.: J. Immunol., 74, 158, 1955.
- 22) Bargob, I., Cleve, H. et al.: Dtsch. Arch. Klin. Med., 204, 708, 1958.
- 23) Adair, M. F. & Hamilton, J.: J. Hyg., 39, 170, 1939.
- 24) Melcher, L. R., Masonredis, S. P. and Reed, R.: J. Immunol., 70, 125, 1953.
- 25) Heiderberger, M. & Kendall, F. E.: J. Immunol., 30, 269, 1935.
- 26) Hooker, S. B. & Boyd, W. C.: Proc. Soc. exp. biol. & Med., 47, 187, 1941.

Fig. 3 P. E. P. patterns of human serum albumins

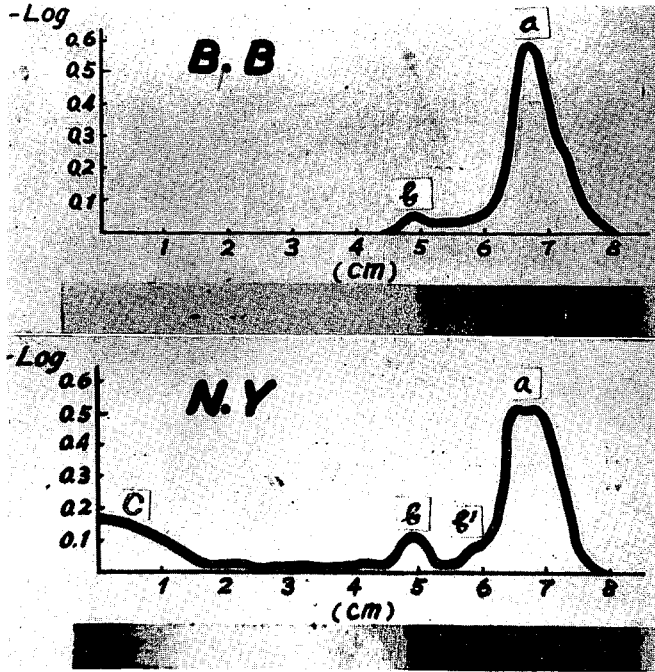


Fig. 4 Patterns of precipitin lines by Ouchterlony
Anti-Alb. (B.B) Anti-Alb. (N.Y.)

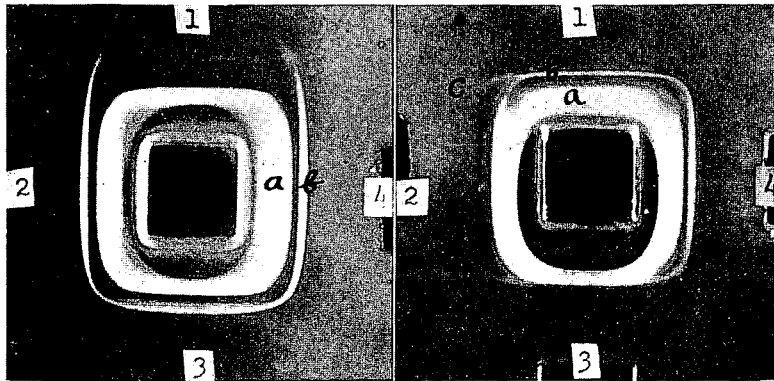
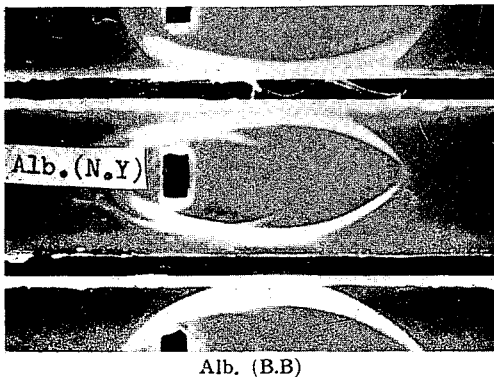


Fig. 5 Patterns of precipitin lines by I. E. P.
Alb. (B.B)



Anti-Alb. (N.Y)

Anti-Alb. (B.B)

	Anti-Alb. (B.B)	Anti-Alb. (N.Y)
Alb. (B.B)	b a	b a
Alb. (N.Y)		c b

Fig. 6 Patterns of Plasmanate by both P. E. P. and I.E.P.

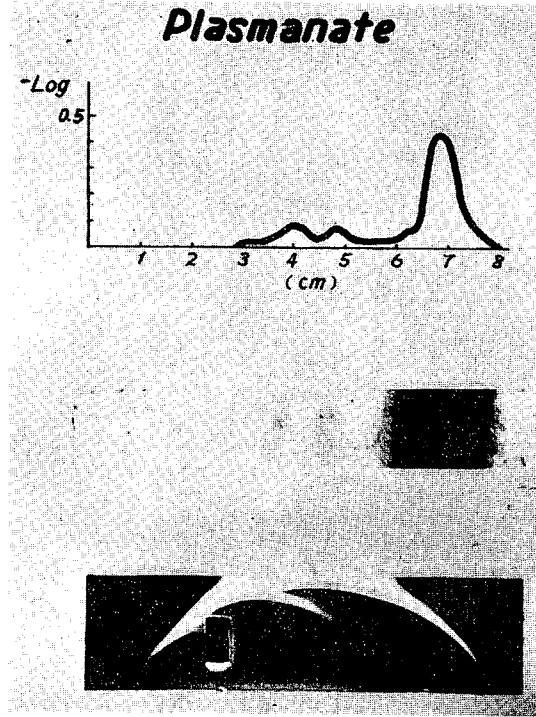
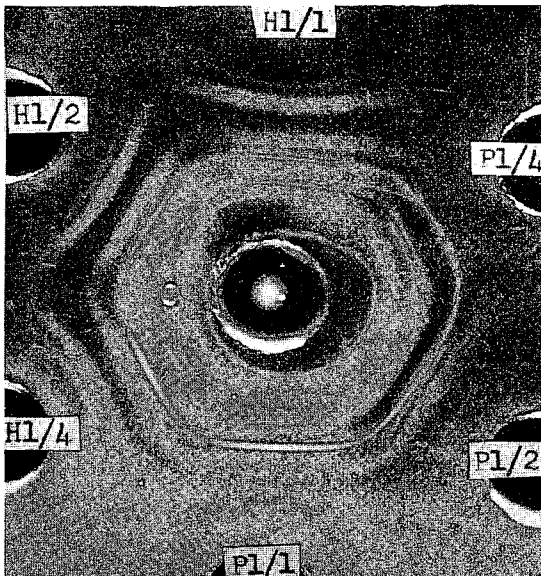
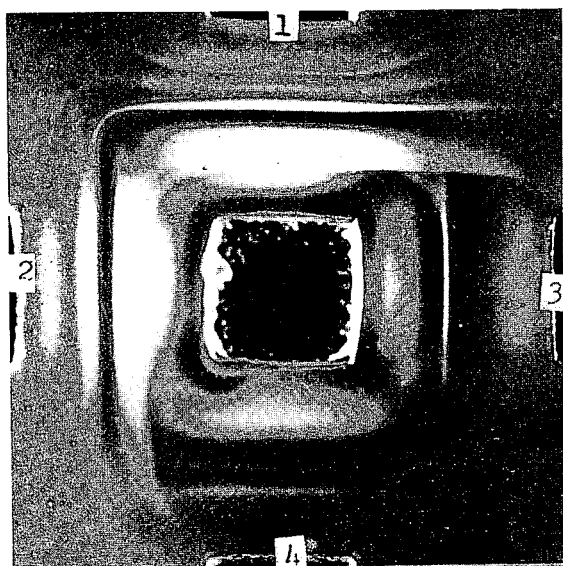


Fig. 7 Patterns of human serum and Plasmanate against anti-Plasmanate by Ouchterlony



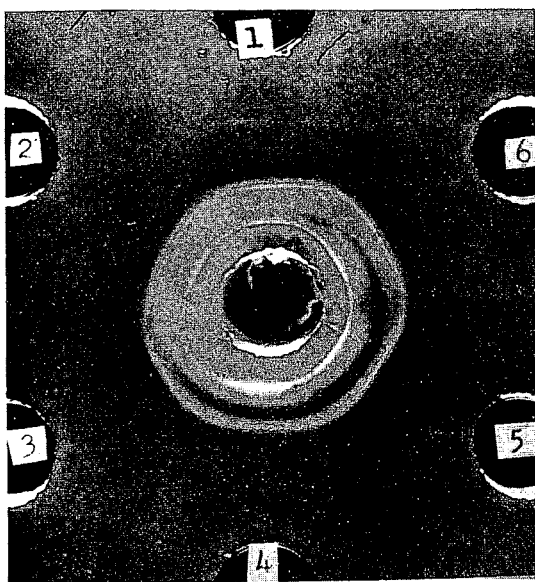
		Anti-P.nate					
A	Human Serum						
B	P-nate						

Fig. 8 Patterns of precipitin lines: against anti-human serum



		Anti-Human Serum
1	Serum (Human)	Two distinct precipitin lines
2	P-nate (Human) B.B	One distinct precipitin line
3	Alb. (Human)	Two distinct precipitin lines
4	Dried P. (Human)	Two distinct precipitin lines

Fig. 9 Patterns of each Plasmanate and dried plasma against anti-normal human serum



		Anti-Human Serum
1	Human Serum	Two distinct precipitin lines
2	P-nate (B.B)	One distinct precipitin line
3	P-nate (heated)	No precipitin line
4	P-nate (Unheated)	Two distinct precipitin lines
5	P-nate P.	Two distinct precipitin lines
6	Human dried P.	Two distinct precipitin lines

Fig. 10 Precipitin line spectrum:
Against anti-human dried plasma

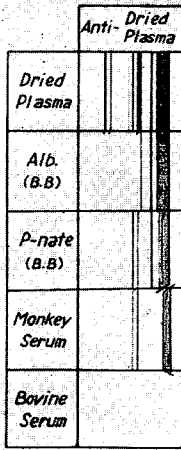


Fig. 11 Precipitin line spectrum:
Against anti-Plasmanate (B.B)

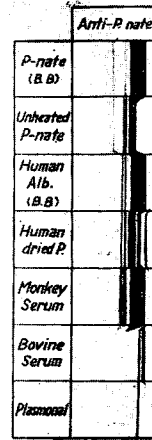
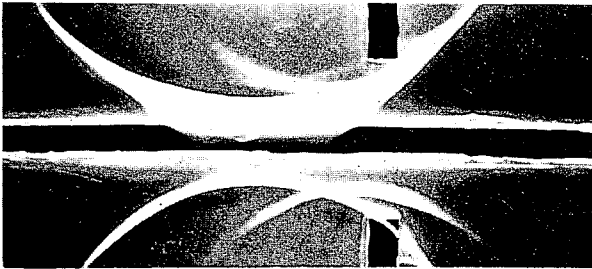


Fig. 12 I.E.P. patterns of Plasmanate (B.B) and unheated Plasmanate
against anti-Plasmanate (B.B)
Plasmanate



unheated Plasmanate

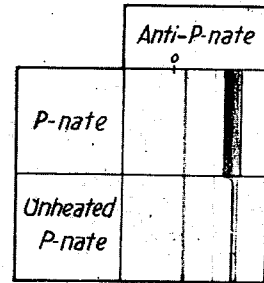


Fig. 13 Patterns of various Plasmanate treated and not treated with heating against anti-Plasmanate

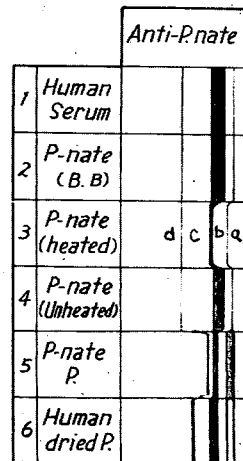
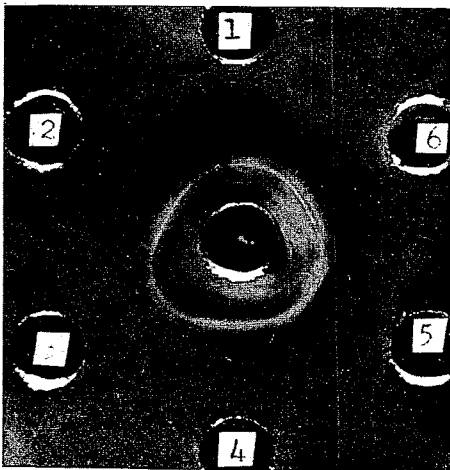


Fig. 14 P.E.P. patterns of human serum and dried plasma

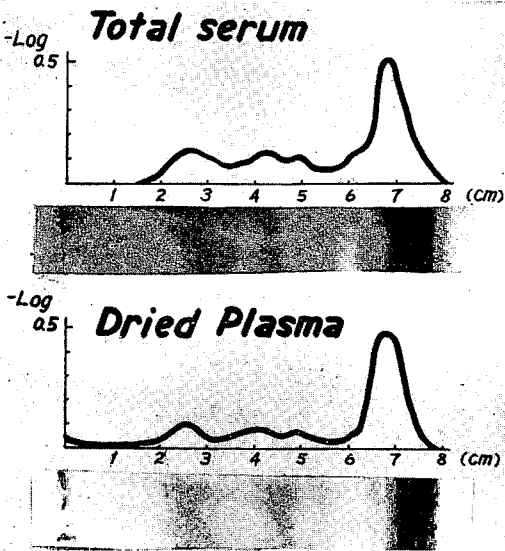


Fig. 15 P.E.P. patterns of human serum and monkey serum

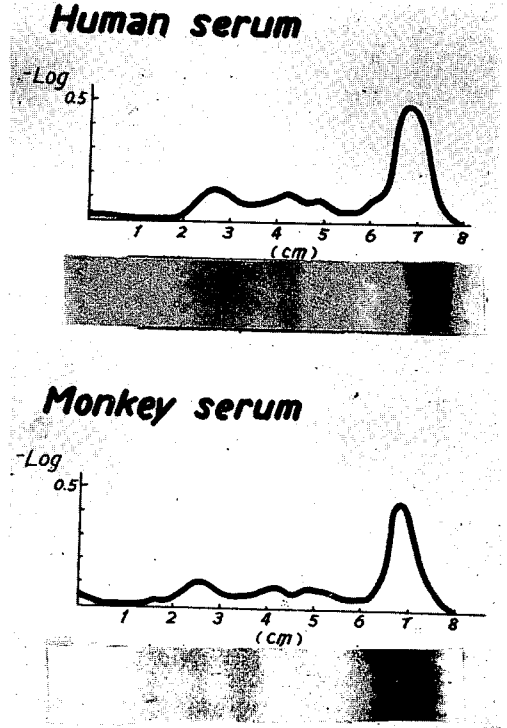
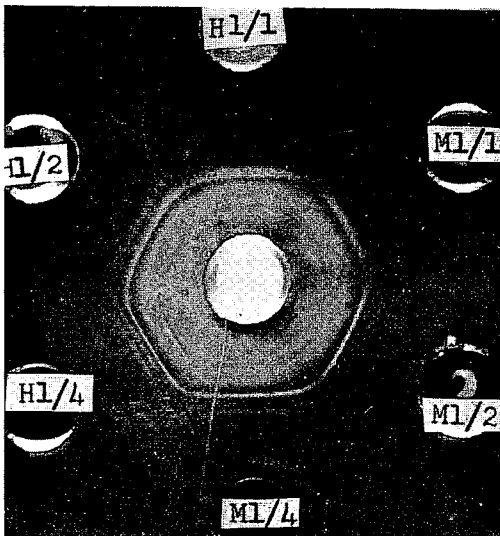


Fig. 16 Showing the common factors between human serum and monkey serum against anti-human serum



	Anti- Human Serum
Human Serum	
Monkey Serum	

Fig. 17 Showing the common factors between Plasmanate and monkey serum against anti-human serum albumin

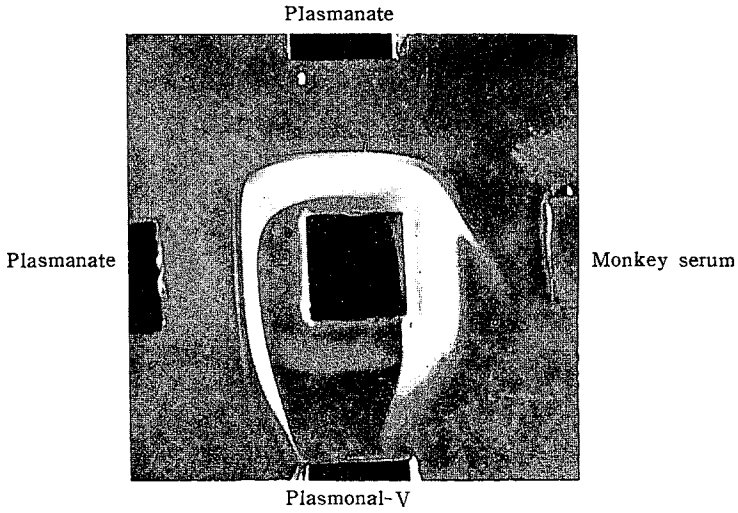


Fig. 18 Showing the common factors between human serum and monkey serum against anti-monkey serum

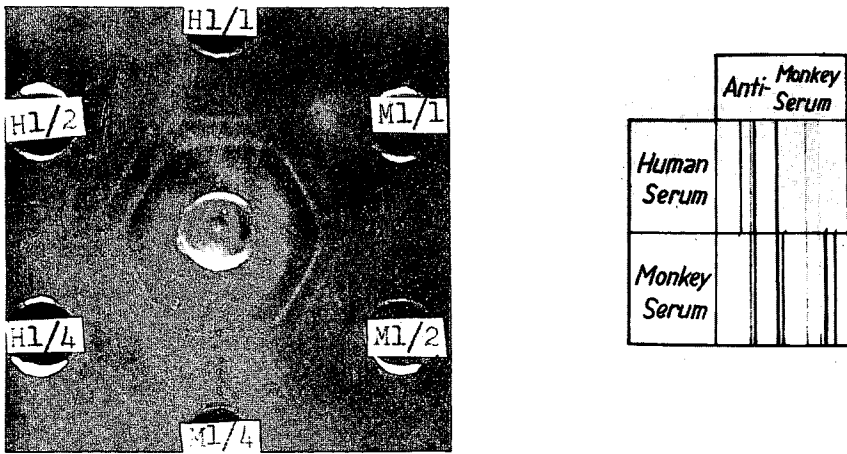
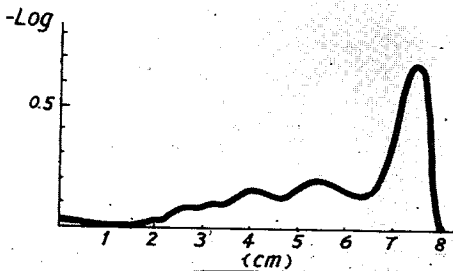


Fig. 19 P.E.P. patterns of bovine serum and plasmonal-V

Bovine serum



Plasmonal V

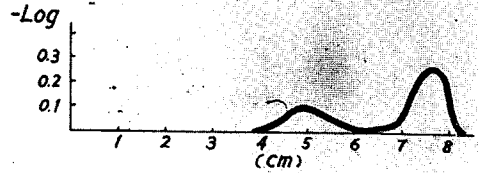
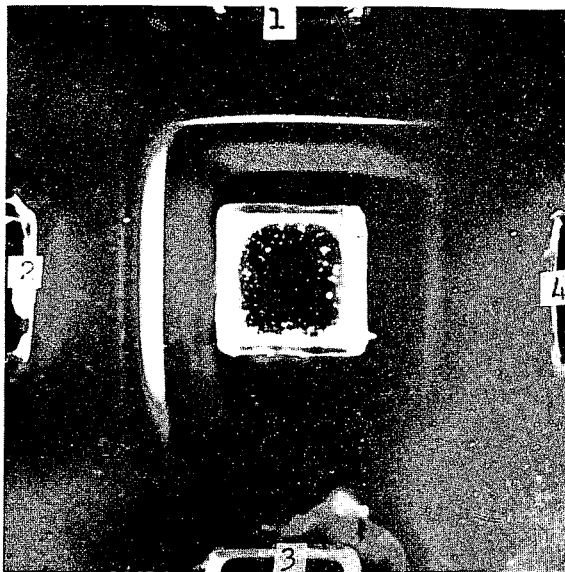


Fig. 20 Ouchterlony patterns: against anti-plasmonal-V



		Anti- Plasmonal V.
1	Plasmonal V.	+
2	Bovine Serum	-
3	Monkey Serum	-
4	Human dried Plasma	-

Fig. 21 Showing the common factors between Plasmanate and bovine serum against anti-Plasmanate (B.B)

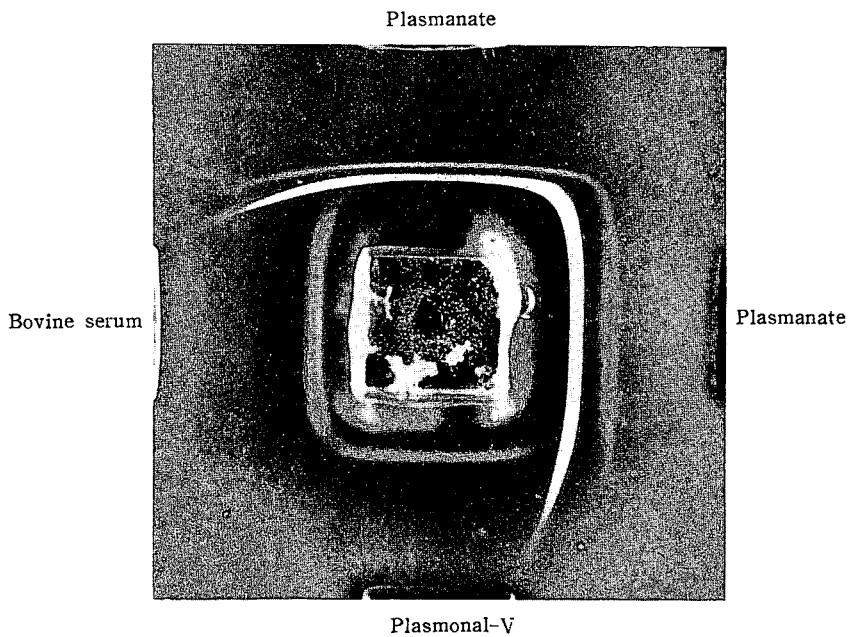


Fig. 22 Summarized table

		A	B	C	D	E	F						
Antigen	Anti-Sera	Anti-Human Serum		Anti-Dried Pl.		Anti-Alb. (B.B)		Anti-P.nate		Anti-Monkey Serum		Anti-Plasmonal	
		β	α_2 α_1 A	β	α_2 α_1 A	α_1 A	α_2 α_1 A	β α_2 α_1 A	A				
Human Serum													
Dried Pl.													
Alb. (B.B)		α_2	α_2										
P-nate		β α_1											
Monkey Serum								α_2 α_1					
Plasmonal										α_2			