

昭和35年度科学試験研究費による

〔Rh 判定用血清の国産(産量)への研究〕報告 (II)

昭和36年7月7日受付

信州大学医学部法医学教室

野田金次郎 若月岩雄 金箱房枝
沼田 一 青山幸次郎

東京標準血清株式会社技術部長兼松本工場長

早川善郎

Studies on the Mass-production of Anti-Rh Anti-body
of Animal OriginKinjiro Noda, Iwao Wakatsuki, Fusae Kanebako,
Hajime Numata and Kojiro AoyamaDepartment of Legal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Zenro Hayakawa

Technical Chief: The Tokyo Standard Serum Co.,

まえがき

第I報〔信州医誌. 10(2): 32-40. 1961.〕に於いて、我々は下級猿血球中 Rh₀ 抗原性の強い個体をえらんで免疫原とし、モルモットを選んで免疫する事によつて従来考えられていたより、極めて容易に動物免疫抗 Rh₀ 抗体を産生せしめ得る事を確認し、大量生産の途を拓き、且その抗体使用に際しての条件の2~3について検討し、より使い易い、判定用血清の途を進んでいる状況について一部報告したが、引続き、更にその他の点について続報する。

実験方法其他について

この点に関しては(1)報記載通りであり、且引用文献についても(1)報を参照されたい。

実験成績並説明

I 各種人由来抗血清について

従来常用されている人由来の抗血清が如何なる性状を示すものであるかという事は、本判定用血清作製に際し、如何なる性状を附与すべきかという事に重大な関係を有するのである。これは、Rh式のみならずすべての血液型判定用血清について言える事であるが、今後Rh式血液型判定が、高度に拡大された範囲に於いて実施される可能性を考えると、これらの点は、判定の誤り、型の誤認という重大な事態を来す外因たりうるのである。

そこで我々は、現在本邦に於いて使用されている外来の抗血清を、出来る限り多数種手許に取揃えと共に、我々の従来使用している panel cells 及米国より送られた米国の panel cells を用いて、実際型判定を行う場合に於ける種々な条件を考慮して、2~3の点の検討を行つた。(勿論、実際使用時に於ける問題点のみであり、基礎的な血清学的な検討ではない事を附言しておく。)

使用した人由来抗D抗体は、A. S. Wiener Lab. 製及 Ortho Pharmaceutical Corp. 製の saline agglutinin の外は、何れも所謂 albumin (or incomplete) agglutinin であつた。その事情は表中で知られたい。

先づこれらの抗血清を用いて、夫々手持血球4種について先づ検してみた結果は第1表の如くであつた。茲で先づ使用血球の性状を示してみよう。

Ki 血球: Rh incompatible pregnancy で Erythroblastosis foetalis の子を産んだ母の血球であり、その人の血清中には incomplete Anti-D agglutinin が認められた。勿論 Wiener Lab. 及 Ortho 製の Anti-D saline agglutinin で共に陰性である。

Ha 血球: Wiener Lab. の Anti-D saline agglutinin で (-), Ortho. 製の Anti-D saline agglutinin で (+), Wiener Lab. の Anti-variant D ++ 即 D^u。

第1表 各種抗血清を、分与を受けた際示された検査法(使用法と異なる)に則つて検査した結果

使用抗血清別	試験法	Ki.	H.	S.	Ha.	T.
Knickerbocker Laboratories (incomplete)	室温15分, Slide test	-	+	+	+	/
	室温, Tube test, 即時遠心	-	+	+	+	/
Blood Bank Foundation (incomplete)	37°C 60分, Tube test, 遠心後	-	+	+	+	/
Blood Bank Foundation	室温15分, Slide test	-	+	/	-	-
Ortho Ph. Corp. (incomplete)	27°C 5分, Slide test	-	+	+	+	+
Ortho Ph. Corp. (complete)	37°C 60分, Tube test, 遠心後	-	±	/	.	.
Hyland Lab. (incomplete)	27°C 5分, Slide test	-	+	/	+	+
No. 1801 (incomplete) (東医歯大・法医)	室温, Slide test	-	+	+	+	/
No. 1790 (incomplete) (東医歯大・法医)	室温, Slide test	-	+	+	+	/
S氏血清 (日赤中央病院・産科)	37°C 60分, Tube test, 遠心後	-	+	-	-	/
Y氏血清 (日赤中央病院・産科)	37°C 60分, Tube test, 遠心後	-	+	+	?	/
T氏血清 (日赤中央病院・産科)	37°C 60分, Tube test, 遠心後	-	±	-	-	/
A氏血清 (日赤中央病院・産科)	37°C 60分, Tube test, 遠心後	-	/	-	-	/

1: 不検

T血球: H血球同様な反応を呈し D^u と判定された。唯 Ortho 製抗-D には Ha 血球よりやや強い反応を示した。

S血球: Wiener Lab. Anti-D saline agglutinin (-), Ortho の Anti-D saline agglutinin (+)

H血球: Wiener Lab. Anti-D saline agglutinin (-), Ortho Anti-D saline agglutinin (+)

つまり, Ki 血球は問題なく Rh₀(-), (d) 型血球であり, Ha 血球, T 血球は, Ortho の抗-D では極めて弱い陽性を示し, Wiener Lab. 血清で D^u と判定されたものであり, S 血球, H 血球は Wiener Lab. 血清では陰性を示した(抗-Variant では検査しえなかつた)。

それでも判る様に, 同一血球に対して, 各種の抗血清が, 必ずしも同一の反応を示さない事がある事実が判つたが, これはその血清の製造方針に基く部分がある事は勿論である。Wiener Lab. 製のものでは, その Anti-D に対して陽性血球は Rh₀(+), (D) 型であり, それに対して陰性の血球は更に Variant 血清を用いて判定し, これに陽性であれば D^u 型, 陰性であれば Rh₀(-), (d) 型と判定するものであり, Ortho 製のものは, 反応陽性な血球は, Rh₀(+), (D) 型反応陰性な血球に対しては, 同製不完全抗体で検査して, 陽性を呈したものは D^u 型, 陰性を呈した血球は Rh₀(-), (d) 型と判定する様に作られている。

所が, 本邦に於いて Rh 式血液型を判定している所の様子を問合せてみると, 自己作製人由来抗血清又

は、外国よりの不完全抗体を用いている向が多いと考えられる様子を知つたので、前記の血球を用いて夫々の抗血清に対する反応を検討してみた。その状況を第1表に示してある。この場合、試験法欄に記載した通りの方法で検査したのであるが、これは、本邦でその抗血清を使用して居られる方々の常用している方法に則つたものであり、各抗血清製造元指定の方法とは多少異つた点が見られる。(後述)

この結果をみると、外来の血清では incomplete の抗体は同様の結果を示し、Ki. 血球に対してのみ陰性であつたが、complete の抗体 (Ortho. 製) では、Ki. 血球は勿論陰性であつたが、H. 血球では±, Ha. 及 T. 血球では全く陰性とは言いがたいザラツキを示していた。参考の為使用した本邦での血清は夫々 Ki. 血球にはすべて陰性を示し、H. 血球には陽性を示したが、S., Ha., T., 血球には種々な態度を示していた。

そこで、Hyland Lab., Blood Bank Foundation, Ortho Ph. Corp. の incomplete を用いて使用書に則つた方法を中心に検討した所第2表の如き結果をえた。使用書では、何れも反応時間2分と限つてゐるが、本実験の結果をみると、先づ2分での反応では、Ha 血球は、Ortho. 血清に極めて弱く反応(±)するのみであり、T. 血球は、Blood Bank 血清にのみ陰性を示し、S. 血球は全例陰性、H. 血球は全例に極めて弱い反応(±)を示しているが、対照として用いた被凝集性の強い明かなD型であるO. 血球では、全例で著明な凝集が発現している。以下3分、5分とたつにつれ反応が増強されつゝ陽性化の例も増加し、10分に至れば、強弱の差こそあれ全例の組合せに於いて陽性反応を示す事が確認された。

こゝに用いた抗血清は、言わば Screening 用として使用するべき rapid test 用のものであり、これで予検して後、Saline agglutinin によつて本格的検査を

第2表 Slide Test による時間と凝集の状態

血球別	観察時間(分)	使用抗血清別並使用書抄		
		Hyland Lab. (incomplete) 30秒以内に発現し、2分で完了する	Blood Bank Foundation. (incomplete) 30秒以内に発現する。2分以上見ない様	Ortho Ph. Corp. (incomplete) 2分以内でみよ
Ha.	2	—	—	±
	3	+	—	±
	5	++	+	++
	10	+++	++	+++
T.	2	+	—	±
	3	±	—	++
	5	++	—	++
	10	+++	+	+++
S.	2	—	—	—
	3	+	—	+
	5	+	±	+
	10	+++	+	+++
H.	2	±	±	+
	3	+	+	+
	5	+	+	±
	10	+++	++	+++
O.	2	+++	++	++
	3	++++	++	+++
	5	++++	+++	+++
	10	++++	++++	++++

備考: (i) 抗血清は充分に有効期間内のものである
(ii) 血球は検査前時間以内に採血したものである

実施するという手順をふむべきものであるから、この抗血清を用いて、反応時間を多少長めにして検した第1表に於ける結果は、陰性血球と判定されたものは問題なく Rh₀ (-), (d) 型血球であるが、D^u 型或は恐らく非常に稀にみられるであろうと考えられるD型の極めて弱い血球（例えば、A型に対するA₂, A₃, A₄……の如きもの）等に関しては、各種血清によつて必ずしも同じ様な態度を示さないと考えられ、或は、或種のものでは弱い非特異性凝集様変化を示す何物かが含まれているのではなからうかとも考えられる。そうであれば、更に Rh₀ (-), (d) 型血球の或る血球に対しては疑わしい様相を示すかも知れないとも考えられる。

そこで米国より入手しえた panel cells について更に検討してみた。

cde 型 5例を検したが、何れの血球も同様な態度を示し、Blood Bank Foundation 製、Hyland 製の incomplete の抗Dは Slide Test, 室温15分では全く陰性を示したが、Ortho 製のものは、2分後では全く陰性であるが、10分頃から、疑はしい様相（ザラツキ）を示し始め、15分では+程度の凝集を示した。

これらの結果からみると、外来の人由来抗D血清でも、前述の如き或る特殊な血球に対しては、必ずしも同一の反応を示すとはいい難い点のみられる事を知つたが、動物免疫抗D-血清作製上、非常に参考となる所見であつた。

II 紛らわしい凝集様態度の除去について

Iに述べた如く、D^u 型、Dの極めて弱い或る例等に対しては必ずしも、型判定は容易ではない事が判り、抗血清作製上大に参考となる所見を得たが、この点を検討中、更に1例この如き反応を示す Rh₀ (-) 型と判定される血球を得たので、それにつき1~2の点を検討したので茲にその概要を示してみよう。

その血球を Ak. 血球と呼び分ける事とした。

本検討に用いた抗血清は、Ortho. Ph. Corp. 製、Hyland Lab. 製、及 Blood Bank Foundation 製の抗血清と我々の作つた動物免疫抗-D 血清 T. P.-6 とである。

Ak. 血球の外来3種抗血清に対する態度を検すると第3表の如くであつた。指定の時間内では何れの抗血清でも陰性を示したが、時間の経過と共に Ortho. に、次で Hyland. に疑わしい反応を示して来る。併し参考として、saline agglutinin を用いて Tube Test を行つてみると、Ortho. 製抗血清には全く陰性であつた。

第3表

抗血清別	観察時間(分)		
	2	5	15
Ortho.	-	±	+
Hyland.	-	-	±
Blood Bank Foundation	-	-	-

備考：浮遊液濃度 50%

媒体：吸収済A B型人血清
37°C, Slide Test.

この Ak. 血球の T. P.-6 に対する態度をみると、Tube Test では、±程度の疑わしい反応がみられた。そこで、この血球による T. P.-6 の吸収試験を行つてみた。

その際の条件は下記の通りであつた。

抗血清 I : Ak. 血球を抗血清の 1/5 Vol. 用いた。

抗血清 II : Ha. (D^u) 血球を抗血清の 1/5 Vol. 用いた。

抗血清 III : アカゲ猿 Rh₀ (-) 型血球を 1/5 Vol. 用いた。

以上の如くにして、室温12時間吸収した。

尚前記の抗血清の稀釈に Saline を用いた場合が第4表に示されA B型人血清を用いた場合が第6表に示されている。

第4表によれば、T. P.-6 をアカゲ猿 Rh₀ (-) 型血球で吸収した場合、D^u 型並 D型に対する凝集素価には殆ど変動をみず、Ak. 血球に対しては全く陰性を示した。これに比し、Ak. 血球、D^u 血球での吸収では、この程度の吸収では、何等の影響をもあたえず、

第4表

抗血清別	血清別	血清稀釈率						
		.1	.2	.4	.8	.16	.32	
I	Ak.	?	?	?	?	-	-	
	Ha. (D ^u)	++	++	+	+	-	-	
	O · D	##	##	++	++	+	±	
II	Ak.	+	?	?	?	-	-	
	Ha. (D ^u)	++	++	+	+	-	-	
	O · D	##	##	++	++	+	-	
III	Ak.	-	-	-	-	-	-	
	Ha. (D ^u)	++	++	+	+	-	-	
	D · O	##	##	++	++	+	-	
対照 T. P.-6	Ak.	+	+	-	-	-	-	
	Ha. (D ^u)	++	++	+	+	-	-	
	O · D	##	##	++	++	+	±	

第5表

		血清稀釈率					
		.1	.2	.4	.8	.16	.23
I	Ak.	?	-	-	-	-	-
	Ha. (D ^u)	卅	卅	卅	卅	+	-
	O・D	卅	卅	卅	卅	卅	+
II	Ak.	±	?	-	-	-	-
	Ha. (D ^u)	卅	卅	卅	卅	+	-
	O・D	卅	卅	卅	卅	卅	+
III	Ak.	?	-	-	-	-	-
	Ha. (D ^u)	卅	卅	卅	卅	+	-
	O・D	卅	卅	卅	卅	卅	+
対照 T.P-6	Ak.	±	±	-	-	-	-
	Ha. (D ^u)	卅	卅	卅	卅	+	-
	O・D	卅	卅	卅	卅	卅	±

紛らわしい反応の除去にも、あまり好影響をあたえたとは考え難い。この関係をA B型人血清を溶媒として用いた際にも、すべての反応の様相の増強がみられる外は、第4表でみられたと同様の結果を示していた。

第I報で述べた如く、Rh₀(-)型猿血球で吸収する事は、人Rh₀(-)型血球の人手難をカバーするのみならず、免疫原である猿血球に由来する不測の非特異部分に対する抗体除去という意味をも含めて、この猿による吸収は非常に有意義であると考えられる。

むすび

D^u型、D型の極めて弱い血球(A型に対するA₂型、A₃型、A₄型……の如きもの)、一部のRh₀(-), (d)型に対する外国より輸入したincomplete (for rapid Test.)の判定用抗血清の態度は必ずしも同一ではなく、使用期間内に、使用法に則つて検査を行う必要があり、且あく迄Screening用として、或は問題ないRh₀(-), (d)型を求める際にのみ使用可能であるが、単なる型判定の際には、この点充分注意し、決定的な判定には、厳重に検定されたSaline agglutininがよい事が知られた。

又本研究の如き作製法では、必ずRh₀(-)型猿血球で吸収を行う事は、紛らわしい反応の除去にも役立つ事を知つた。