

昭和35年度科学試験研究費による

「Rh 判定用血清の国産(量産)への研究」報告 (I)

昭和36年4月3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-Rh₀ Antidody
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: Tokyo Standard Serum Co.,

まえがき

Rh 式血液型の発見^①(1940), それに引続いて臨床医学に於ける意義の発見^{②-④}が為されてから既に20年を経た今日, 欧米諸国では ABO 式血液型以上に臨床家によつても注目されている事は, 次の事実を見ても明かである。即,

(1) 輸血の際必ず Rh 式血液型を検査している。即, 受血者, 供血者について検査すると共に, 勿論保存血についても必ず Rh₀ (D) 因子の在否を ABO 式血液型と同時に調べて併記している。

(2) 結婚の際, 或は初めての妊娠に際して, Rh 式血液型を検査する事を奨励している。人工受精の際 Rh 式適合型の男子の精子を用いる様指導されている。

(3) 溶血性疾患の子供を生んだ母親では必ず調べられるようにされている。

(4) その他, 後天性溶血性貧血等いろいろな疾病の際にも調べられている。

所が, これらの検査には, 人由来の抗体を用いて居り, それによつて Rh 式血液型が発見された動物免疫抗血清は全くかえり見られていない現況である。

所が本邦に於いては20年後の今日に於いても, 研究機関乃至大病院に所属する極く少数の特殊な研究者によつてこの面の調査研究が為されているのみであり, その報告の大半は, ABO 式適合輸血時の副作用の原因となつた抗体の同定, 溶血性疾患の新産児を生んだ

母体内の抗体の同定結果の報告に止まつている状態であり, 事後の問題のみを論じている感が深い。これらの報告例は本邦では貴重なものではあるが, その大部分は事前に Rh 式血液型を検して対策を講ずるならば, 殆どが救はれた可能性の多いものである。かく考える時, 本邦臨床面で Rh 式血液型の検査がなおざりにされている事は, 公衆福祉の増進を計るべき任務とは逆行的な事態であるといつても過言ではない。併し, この点を深く考えてゆくと一つの大きな壁に突当つてしまい, 日本の現況は必ずしも医師への不満とばかりは言えないのであり, 更に我々血液型関係者の努力が足りなかつた点もいなめない。それは何如なる点に於いてかという点, 本邦では, Rh 式血液型判定用血清は現在の所では, 非常に高価な輸入品を用いなければならない現況であり, 必ずしも大量を常備しえないという点である。その由つて来る所を考察してみると, 次の様な事が挙げられよう。

i. 本邦人の Rh₀ (-) 型の頻度が低い事

野田は戦後この方面の研究に手を染めたが, なかなか人由来の抗体を見出しえず, 1948年^⑤に至つてやつと病理学的並血液型学的検査の結果明かな, Rh₀ 因子不適合妊娠による Erythroblastosis foetalis の症例をつかみ, 而もその母体内の抗体は不完全抗 Rh₀ 抗体である事を確認し, Rh 式血液型に一つの先鞭を付けたのであるが, 始は本邦人では Rh₀ (-) 型はないのではないかと思はせる程少いものであるという感をいただいた。その後ぼつぼつ本邦人についての頻度の

報告も出されたが、Random Sampleによると思われるものは少なかったが、野田(金次郎)、早川(善郎)^②(1960)は、家族的重複をさげ、又地区的事情もなるべく片寄らない様にとの注意の下に、松本市(人口約15万)の全中学校の、3年生全員3,232人を調査して、Rh₀(-)型0.84%の価をえた。これでも明かな如く欧米のそれの約¹/₂₀に過ぎない事を知つたが、これよりみて明かに欧米人に比してRh₀因子不適合による種々な障碍の起り方、換言すれば人由来抗Rh抗体の発見率は極端に低い事が当然である事は明かである。

ii. 本邦人の因習による障碍

その一つは『うまずめ(石女)』的あきらめ観であり、他の一つは、自身の肉体に関係しない事に——つまり、他人の為に用いる判定用血清としての目的に——自らの血液を大量に供出する事を嫌う事である。

殊に両者共、大都会より、地方にゆくに従つて強い。検査してみればよいのに、唯単に、子供が育たない、子供がさづからないといつて諦めてしまつている家族や、ひどいになるとそんな検査はいやだという風な感情がある。又我々がせつかく幾例かの抗体保有者を確認しても、後々迄こころよく血液を提供してくれる人は案外少い。

iii. 人体免疫の困難さ

野田(金次郎)等^③(1954)は本人の承諾の下に、Rh₀(-)型の人にRh₀(+)型血球を注射して抗体産生の状況について報告したが、これとて前項以上に本人の承諾を得る事が困難であつた。一方参議院決議で、人体を実験に供する事はいけないという風な事にもなつて居り、このVolanteerを得て抗体産生を計画する事にもかなりの困難が予想される。

こう考えて来ると、本邦に於いて充分量の抗Rh抗体を製造するには、動物免疫によらざるをえないのではないかと考えられるに到り、ここに、動物免疫による抗Rh抗体の作製法の再検討の要にせまられたのであるが、幸に文部省科学試験研究費の補助を得る事が出来、この問題について、先づ抗Rh₀抗体を取りあげて検討を加える事が出来た事は、我々の感謝に堪えない所であり、茲に記して、当局の補助に深甚の感謝をさげざるものであります。

茲に先づ抗Rh₀抗体を取りあげたのは、周知の如く、Rh系各種抗原の内、Rh₀(D)因子が臨床的に最も重要な役割を有している事より、先づこの点を明めて後、他因子に及ぶのが、目下の本邦の現状を打開するに最適と考えられたからである。

実験法其他について

本研究に當つて用いられた実験方法は、殆どが血液型学一般法のみであり、列挙する事はかえつて繁雑さを加えるのみであるので記載を省略し、必要最少限の部分のみ各項に記載する事とした。

又、本研究であつた内容については、人由来抗体では殆ど既に一般常識化した事であり、本研究に於いてはそれらが動物免疫抗体では、如何にあるべきかという点についての問題を取扱つていたのであるが、この事については殆ど先人の報告は少い。そこで、本研究に直接関係する先人の報告のみを文献に引用するに止める事とし、もし諸賢に於いて更に必要とせられる場合は、それらの文献中の引用文献を参照せられる事を希望してその責を果す事としたい。

実験成績並説明

著者の一人青山(幸次郎)^④(1960)は、本研究報告に先立つて、その一部を既に公にしたが、それによれば、猿血球中にも、Rh₀抗原性の殆ど認められないもののある事を確認し、免疫原としては当然Rh₀抗原性の強い猿血球を用うべきを先づ指摘し、次でこれらの血球を用いて、正常血清中に人血球凝集素を含まないモルモットを免疫する事によつて、非特異性凝集素の上昇を低位におさえ、更にその吸収除去も容易である事を確認して、猿血球による動物免疫抗Rh₀抗体の量産えの可能性の途を拓いた。

これに続いて、然らば猿血球免疫モルモット血清中の抗Rh₀抗体は実用に際しては、如何に改良さるべきかが問題である。その点につき、次に列挙する種々な点につき検討を加えたのである。

I 各種猿血球による特異性の差異

猿の種類によりRh₀抗原の構造に差異があるか否かの点が先づ重要である。我々はニホン猿、カニクイ猿、アカゲ猿を用いて、これらの血球によつて産生された抗Rh₀抗体は、同一性状を示すものか何うかの点について先づ検討してみた。即、人Rh₀(-)型血球で吸収してえた夫々の抗Rh₀抗体を、夫々の猿血球で吸収し、その前後に於ける猿血球並人Rh₀(+)型並Rh₀(-)型血球に対する態度を比較検討したのであるが、その結果を表示すれば、第1表乃至第6表の如くであつた。表現を簡略化する為、例えばアカゲ猿血球免疫により産生された抗Rh₀抗体をアカゲ猿抗体と呼び、その他もこれにならう事とする。

第1表乃至第3表に見られる如く、何れの猿による

第1表 ニホン猿抗体の各猿血球に対する凝集反応 (血清番号 12)

| 作用血球 \ 血清稀釈 | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 | :128 | :256 | :512 | :1024 | :2048 |
|-------------|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| OMNCCDE | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - | - | - | - |
| ABMNccde | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ニホン猿 (T) | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| アカゲ猿 (N) | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| カニクイ猿 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - | - |

第2表 アカゲ猿抗体の各猿血球に対する凝集反応 (血清番号 11)

| 作用血球 \ 血清稀釈 | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 | :128 | :256 | :512 | :1024 | :2048 |
|-------------|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| OMNCCDE | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - | - | - |
| ABMNccde | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ニホン猿 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - | - |
| アカゲ猿 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - |
| カニクイ猿 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | ± | - |

第3表 カニクイ猿抗体の各猿血球に対する凝集反応 (血清番号 9)

| 作用血球 \ 血清稀釈 | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 | :128 | :256 | :512 | :1024 | :2048 |
|-------------|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|------|-------|-------|
| OMNCCDE | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - | - | - | - | - |
| ABMNccde | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| ニホン猿 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| アカゲ猿 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - |
| カニクイ猿 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 |

抗体も、人 OMNCCDE 型、三種の猿血球には強い凝集反応を示しているが、人 ABMNccde 型血球には凝集を起さない。即、何れの抗体も人血球については Rh₀ 特異性を示している事は明かであるが、人血球のみで吸収した抗体であるので、勿論三種の猿血球に対しては、多少の強弱の差はみられるが、何れも強く凝集している。先づ説明の都合上、この部分の抗体について記すこととする。この部分に対して猿血球で吸収した抗体について、数頭宛の猿血球を作用せしめてみると第4表乃至第6表の如くであつた。これらによれば、アカゲ猿抗体は、三種の猿血球で吸収後は、吸収血球と同属の血球は勿論であるが、他属の血球に対しても凝集反応を示さなくなる(第4表)が、カニクイ猿抗体、ニホン猿抗体については、カニクイ猿血球、ニホン猿血球で吸収した後では、前述例と同様三種の血球に凝集反応を殆ど全く示さなくなるが、夫々の抗体をアカゲ猿血球で吸収した後では、5頭のアカゲ猿血球には勿論凝集反応を示さなくなつたが、カニクイ

猿、ニホン猿の血球には殆どの例に於いて凝集素を殘在している。これらの結果からみると、ニホン猿、カニクイ猿は略同様な抗原を保有していると思われるが、アカゲ猿血球については、前二者よりやゝ低次の抗原構造をもつていると考えられる。次に、併らばこれらで吸収後の抗体は、人 Rh₀(+) 型血球に対しては如何なる態度を示すかという(と(表略)、何れの組合せでの吸収後であつても、人 Rh₀(+) 型血球に対する凝集反応は消失してしまう。この事は、猿血球中の Rh₀ 抗原には全く差異が認められず、それ以外の血球抗原の構造に於いて、ニホン猿 ≒ カニクイ猿 > アカゲ猿の関係が成り立つ事を示している。

II 猿血球免疫モルモット血清中の1価並2価抗体の様相

本研究に於ける抗 Rh₀ 抗体なるものは、1価抗体としても存在するか2価抗体としてのみ取扱つてよいものかの点も製品化の場合問題となる点である。2価

第 4 表 アカゲ猿抗体を他の猿血球で吸収した結果

| | | | | | | | | | |
|-----------|---------|------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| カニクイ猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 757 | | | | |
| | | - | - | - | - | | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| ニホン猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 742 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | ? | - | - | - | - | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| アカゲ猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |

第 5 表 ニホン猿抗体を他の猿血球で吸収した結果

| | | | | | | | | | |
|-----------|---------|------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| ニホン猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| アカゲ猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | + | + | + | - | + | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | + | + | + | + | + | + | + | + |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| カニクイ猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |

抗体であれば、検査術式が今迄の他系の血液型判定と同様であるが、1価抗体であれば、複雑となり、従つて一般使用に際して、不知の誤判の因がふえる事になり望ましくない。勿論製作の都度調べるべきである

が、一応何れの抗体が産生されているかを知つておく事は意味なしとしない。

Ortho 製人アルブミンを、抗体稀釈用及血球浮游用 Media として使用し、凝集素価の変動を検し

第6表 カニクイ猿抗体を他の猿血球で吸収した結果

| | | | | | | | | | |
|-----------|---------|------|-----|-----|-----|-----|----|----|----|
| カニクイ猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| ニホン猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | +? | - | - | - | - | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |
| アカゲ猿血球吸収 | カニクイ猿血球 | 1032 | 724 | 764 | 766 | 767 | | | |
| | | + | + | - | - | - | | | |
| | ニホン猿血球 | 太郎 | 次郎 | 五郎 | 四郎 | 三郎 | 松子 | 竹子 | 梅子 |
| | | + | + | + | + | + | + | ? | ? |
| | アカゲ猿血球 | 春子 | 夏子 | 秋子 | 冬子 | 花子 | | | |
| | | - | - | - | - | - | | | |

てみると第7表乃至第9表の如くであった。反応は37°C, 1時間後軽く遠心沈澱して判定した。

表示の9例についてみると、何れも2価の抗体として存在し、Albumin Titer が、最高2管上廻つた1例、1管上廻っていた3例の外は、両 Media で差異を認め難い結果を示した。

2価抗体を高度に上廻つて1価抗体の産生が認められた例はなく、これらよりみて、猿血球免疫によるモルモット血清中の抗体は、2価抗体として取扱つて行つてよいと考えられる結果を示していた。この事は判定用血清の性状としては、better であると考えられる。

第7表 アカゲ猿免疫抗D血清の1価及2価抗体の比較

| 血清番号 | 血清稀釈 溶媒の種類 | 血清稀釈 倍数 | | | | | |
|------|---------------|------------|----|----|-----|-----|-----|
| | | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :63 |
| 1 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 4 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 5 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |

第8表 カニクイ猿免疫抗D血清の1価及2価抗体価の比較

| 血清番号 | 血清稀釈 溶媒の種類 | 血清稀釈 倍数 | | | | | |
|------|---------------|------------|----|----|-----|-----|-----|
| | | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| 15 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 17 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | ± |
| 19 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |

第9表 ニホン猿血球免疫抗D血清の1価及2価抗体価の比較

| 血清番号 | 血清稀釈 溶媒の種類 | 血清稀釈 倍数 | | | | | |
|------|---------------|------------|----|----|-----|-----|-----|
| | | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| 101 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 103 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| 112 | Albumin | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |
| | Saline | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | - |

III 阻止帯現象

抗原過剰, 抗体過剰域, に於いて, 凝集反応, 沈降反応に於いて反応が陰性である場合のある事は古くから知られているが, Rh 系抗体に於いても抗体過剰域に於ける反応の陰性が報ぜられている (阻止帯現象)。判定用血清としては, 決してこの事があつてはならない。陽性であるべき人が陰性と判定される可能性が生ずるからである。

動物免疫抗 Rh₀ 抗体についてこの点を確認しておかねばならないので, 種々の抗体について検してみた結果の一部を表示すれば第10表の如くであつた。

第10表 凝集反応の阻止帯現象

| 血清番号 | Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 | :128 | :256 |
|----------|------|----|----|----|-----|-----|-----|------|------|
| S- No.25 | ± | + | + | + | + | + | + | + | + |
| S- No.17 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| No. 6 | ± | + | + | + | + | + | + | + | - |
| No. 9 | ± | ± | + | + | + | + | + | + | - |
| No.11 | ± | ± | + | + | + | + | + | + | + |

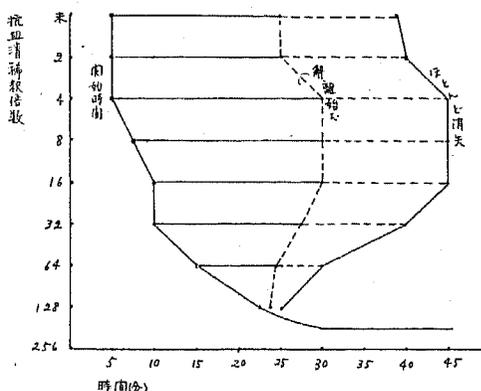
S-25 についてみると, ×8 迄はやゝ弱く ×16 に於いて始めて最強を示している。同様の現象は, 何れの抗血清についてもみられた現象であり, 平均的数値を以つて表せば, 何れの抗血清でも, 2~8 倍稀釈程度迄に於いて軽度の阻止帯現象が現れている事を知つた。

IV 凝集持続時間について

型判定を行う場合, 可視的凝集開始に要する時間 (Avidity) 以前に判定を行えば誤認の基である事は当然であり, 従つて ABO 式判定用血清の国家基準にも, この時間を秒単位を以つて規定している。この程度であれば, 急いで判定する場合であつても, あまり誤認を来さないかも知れないが, 我々の本研究に於いて取扱つている抗 Rh₀ 抗体は, 原血清を食塩水で稀釈して作った場合, つまりかなりの低蛋白での場合, 可視的凝集開始時間は, ABO 判定用血清に比して可成り長いので, この点を検討してみる事が又必要である。

稀釈液並血球浮游用 Medium として生理食塩液を用い, 抗 Rh₀ 抗体の各稀釈に OMNCCDE 型血球の 2% 浮游液を用い, 凝集の強さが + を示すに要する時間を求め更に凝集塊が解離し始め, 殆ど判定不明に至る迄の時間を判定し, この時間と, 抗 Rh₀ 抗体稀釈率との関係を調査した。ホールグラス法によるその 1 例を図示すれば, 第 1 図の如くであつた。

第 1 図



抗 Rh₀ 抗体 (Titer: 128) を生理食塩液で 256 倍まで通減稀釈を行い, OMN-cCDE 型血球の 2% 生理食塩水浮游液を加えたあと 2 (+) の凝集反応を示すに要した時間と, 凝集が崩れ始め (解離し始める) 次いでほとんど消失するにいたるまでの時間を測定し, グラフにこの時間と凝集価との関係を図示してある。

[備考]

- 1) 試験の温度 室温 (12°C)
- 2) 実線は 2 (+) 凝集維持時間 } を示す。
点線は 凝集維持時間 }
- 3) 抗血清と血球浮游液の混合直后から, 凝集開始を認得るようになるまで, 極く軽く揺り動かしたつづけた。

これで見ると稀釈率の低い方が, 開始時間が早いのは当然であるが, 又凝集持続時間も, 或一定稀釈以後に於いて——この図では (16~32) で——段々と短くなり, 解離終了時間も同様の傾向を示している。最も良い条件の所をみると, 凝集開始に 5 分を要し, 以後 25 分間持続し, 更に 15 分程で不明瞭となる。これらの点は ABO 判定用血清と異つた様相を示している点である。

試験管法については何うかと検してみた。倍数稀釈各段階の抗体 1 滴宛を型の如く試験管に加え, それに血球浮游液各 1 滴宛を加え, 室温で混合直後遠心判定し, 以後室温に放置, 30 分毎に検した結果の 1 例を示せば, 第 11 表の如くであつた。これらによれば, 6 時間に至るもあまり変化を示していない。

同様の試験を 37°C に於いて行つたが, 室温に於けると殆ど同様の様相を示していた (表略)。

これよりみると, 試験管法に於いては, Slide 法に於ける如く, 解離 → 不明瞭化の段階は少くも 5~6 時間では現れて来ず, 型判定時, 時間的にルーズである場合には少くも試験管法の方がより誤りが少いと見られたが, 型判定に際して, 他の系の血液型, 例え

第11表 室温(19°C)に於ける状態
(37°Cに於ける第3群と対照されたい。)

血球浮游液と抗血清を混合直后 1,000p. r./m
で1分間遠心

| | | | | | | |
|------|----|----|----|-----|-----|-----|
| Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| 卍 | 卍 | 卍 | + | ± | - | - |

30分放置后(遠心せず)

| | | | | | | |
|------|----|----|----|-----|-----|-----|
| Neat | :4 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| 卍 | 卍 | 卍 | + | ± | - | - |

更に90分放置后(遠心せず) 通算 120分

| | | | | | | |
|------|----|----|----|-----|-----|-----|
| Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| 卍 | 卍 | 卍 | + | ± | - | - |

更に120分放置后(遠心せず) 通算 4時間

| | | | | | | |
|------|----|----|----|-----|-----|-----|
| Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| 卍 | 卍 | 卍 | + | - | - | - |

更に120分放置后(遠心せず) 通算 6時間

| | | | | | | |
|------|----|----|----|-----|-----|-----|
| Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| 卍 | 卍 | + | + | ± | - | - |

ば、ABO 式、MN 式等、と同列に判定出来れば、好都合であり、本研究の目標としては、Slide 法を原則として用い、試験管法でも判定出来る抗血清という事にしているの、この点で、本項の Slide 法による結果は、大変参考になり、この凝集開始時を成るべく早くすると共に、凝集持続時間をなるべく延長するという事が、当然の目標となる。

V 添加物の2.3と凝集様相について

既に一部述べた如く、Slide 法による場合、凝集開始時間がやゝおそく、且凝集塊も ABO 判定用血清に比してやゝ弱い一定強度に迄しか成長せず、堅固な結合を示さない点は、毎當我々が試験に際し痛感している所であり、これらの点を改良する事が、一般使用を目的とする判定用血清には必須の事項である事は論をまたない。これらの点の改良手段として、我々専攻者の経験的常識から、先づ抗 Rh₀ 抗体の蛋白濃度の問題、及その添加すべき蛋白の種類の問題が考えられる事は、1価抗体の検出法に高分子溶液が常用されている点からも、一応考えられる点である。そこで我々は次の如き実験を行った。

(A) 人アルブミン添加による Avidity, 凝集塊形成の強さの変化

(i) 先づ抗 Rh₀ 抗体を生理食塩液で稀釈して、OMNCCDE 型血球の 2% 浮游液を用いて試験管法で凝集素価を測定して、256 の値を示したものを使用した。

この抗 Rh₀ 抗体を次の如く稀釈したものを用意した。即、

(a) 生理食塩液で8倍に稀釈したもの

(蛋白濃度≒1%)

(b) 10%人アルブミンで8倍に稀釈したもの

(蛋白濃度≒10%)

この2種について、生理食塩液系を用いて、試験管法で凝集素価を検した所第12表の如くであり、(a)、(b) 共全く同程度の凝集塊を形成し、その凝集素価も、計算量通りの32を示していた。

第12表

| | | | | | | | | |
|------------|--------------|------|----|----|----|-----|-----|-----|
| 抗血清の 種類 | 抗血清濃縮 倍 数 | Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 |
| | (a) | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | + | - |
| (b) | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | 卍 | + | - |

(使用血球: OMN・CCDE)

この2種について、表示の如き各型血球の生理食塩液での 2% 浮游液を用いて型の如くそれぞれの Avidity を測定してみると、第13表の如き結果を得た。

D型に対しては(a)は2分40秒、(b)は1分20秒; D^u型に対しては(a)は7分10秒、(b)は1分30秒の数値を示している。これによれば、人アルブミンを添加する事によつてD型に対する Avidity は 1/2 に短縮されると共に、D型、D^u型に対する差異が著しく減少して来ている。(a)では、D^u型に対してはD型に対するより約2.7倍の時間を要したものが、(b)ではわざわざ10秒の差異しか示していない事は興味ある所見である。更に15分後の減凝集の強さを表示すれば第14表の如くであつた。即この法によつては Avidity は著しく改善されたが、凝集の様相並凝集塊の成長については、殆ど差異を示していない事が判つた。

次で(a)、(b) 2種を用いて、血球浮游の Medium を生理食塩液の代りに10%人アルブミンを用いて同様に比較検査した結果は第15表の如くであり、更に15分後の凝集様相並凝集塊の成長についての結果は第16表の如くであつた。(a)についてみると、D型、

第 13 表

(Avidity)

| 作用血球 抗血清の種類 | OMN -CDE | AMN CD ^u e | BN -d | BM -d- | ABMN -b- |
|----------------|-------------|--------------------------|----------|-----------|-------------|
| (a) | 2分40秒 | 7分10秒 | / | / | / |
| (b) | 1分20秒 | 1分30秒 | / | / | / |

第 14 表

(15分後の凝集の強さ)

| 作用血球 抗血清の種類 | OMN -CDE | AMN CD ^u e | BN -d | BM -d | ABMN -d |
|----------------|-------------|--------------------------|----------|----------|------------|
| (a) | 卅 | 卅 | - | - | - |
| (b) | 卅 | 卅 | - | - | - |

第 15 表

(Avidity)

| 作用血球 抗血清の種類 | OMN -CDE | AMN -CD ^u e | BN -d | BM -d | ABMN -d |
|----------------|-------------|---------------------------|----------|----------|------------|
| (a) | 1分10秒 | 3分25秒 | / | / | / |
| (b) | 1分30秒 | 2分00秒 | / | / | / |

第 16 表

(15分後の凝集の強さ)

| 作用血球 抗血清の種類 | OMN -CDE | AMN -CD ^u e | BN -d | BM -d | ABMN -d |
|----------------|-------------|---------------------------|----------|----------|------------|
| (a) | 卅 | 卅 | - | - | - |
| (b) | 卅 | 卅 | - | - | - |

D^u型に対して略同率の改善率を見せたが、(b)については、略々無変動かやゝ劣つた数値を示している。凝集様相等については、D^u型に対してやゝ増強がみられたが、D型に対しては変動が殆どみられなかつた。つまり人アルブミン添加はAvidityを改善短縮する事を知つた。

(ii) 作用人血球濃度とAvidity並凝集様相について visible agglutination を起すには、血球濃度も関係する事は古くから知られているが、前(i)項の試験と同方法で、20%の血球浮游液を用いた際に如何なる状態を呈するかを検すると、次の如くであつた。

第 17 表

(Avidity)

| 血球 溶媒の種類 | OMN -CDE | AMN -CD ^u e | BN -d | BM -d | ABMN -d |
|-------------|-------------|---------------------------|----------|----------|------------|
| アルブミン浮游液 | 43秒 | 1分56秒 | / | / | / |
| 生理食塩液浮游液 | 3分10秒 | 5分20秒 | / | / | / |

(15分後の凝集状態)

| 血球 溶媒の種類 | OMN -CDE | AMN -CD ^u e | BN -d | BM -d | ABMN -d |
|-------------|-------------|---------------------------|----------|----------|------------|
| アルブミン浮游液 | 卅 | 卅 | - | - | - |
| 生理食塩液浮游液 | 卅 | 卅 | - | - | - |

血球浮游液溶媒は生理食塩液(血球濃度20%)

前(i)項の(a),(b), に対して、生理食塩液、人アルブミンをMediaとして検した結果は、(a)抗体については第17表の如くであり、一見明かな如く、人アルブミンMediaの方では、前項に比し著しい短縮が認められたが、食塩液では逆に延長され、15分後の様相では、生理食塩液Mediaの場合には、明かな減弱がみられた。(b)抗体についても、同様な所見を呈し(第18表)たが、唯生理食塩液Mediaでも、Avidityの延長は見られず、アルブミンMediaに比してはよくないが、明かな短縮が認められた。

(iii) 小括

前2項(i),(ii)の結果よりして、10%人アルブミンは、明かにAvidityの短縮を来す事が判つたが、凝集の様相に対しては、Avidityに於ける程の改善は招来されない事も明かである。

(B) 人血清の添加の影響

(A)項で10%人アルブミンを用いての改善を述べたが、凝集塊の様相並凝集塊の成長にはさして関係をもつていない事を知つたので、その点について種々検

第18表

(Avidity)

| 溶媒の種類 | 血球 | OMN -CDE | AMN -CD ^u e | BN -d | BM -d | ABMN -d |
|----------|----|-------------|---------------------------|----------|----------|------------|
| アルブミン浮游液 | | 30秒 | 30秒 | / | / | / |
| 生理食塩液浮游液 | | 57秒 | 50秒 | / | / | / |

(15分後の凝集の状態)

| 溶媒の種類 | 血球 | OMN -ODE | AMN -CD ^u e | BN -d | BM -d | ABMN -d |
|----------|----|-------------|---------------------------|----------|----------|------------|
| アルブミン浮游液 | | 卅 | 卅 | - | - | - |
| 生理食塩液浮游液 | | 卅 | 卅 | - | - | - |

血球浮游液溶媒は10%人アルブミン(血球濃度 20%)

第19表

| 血清番号 | 溶媒の組成 |
|------|----------------------------|
| 1 | 7%の人アルブミン |
| 2 | 5%の人アルブミン |
| 3 | 1.5%の人アルブミン |
| 4 | AB型人血清を10%の割合に含む 7%の人アルブミン |
| 5 | " " " 5%の人アルブミン |
| 6 | " " " 1.5%の人アルブミン |
| 7 | " " " 10%の人アルブミン |
| 8 | AB型人血清を25%の割合に含む1.5%牛アルブミン |
| 9 | " 10%の " " " |
| 10 | 1.5%の牛アルブミン |
| 11 | 市販γ-グロブリン(蛋白濃度約7%) |

第20表

| 血清番号 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
|--------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|
| O - D | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 |
| A - D ^u | ± | + | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | ± |
| A - d | - | - | - | - | - | - | - | ? | ? | ? | - |
| B - d | - | - | - | ? | - | - | ? | ? | - | ? | ? |
| O - d | - | - | - | ? | - | ? | ? | ? | ? | ? | ? |
| AB - d | - | - | - | - | - | - | ? | - | - | - | ? |

している内、非常に興味ある事を知った。その確認しえた事実の点のみに関して実験結果を示すと共に、人アルブミンの濃度についても併せて検討したので、その結果をも一括表示する事にした。ここに述べた興味ある事とは、人血清添加による影響である。

本実験では、凝集素価32の抗Rh₀抗体を使用、第19表に示す如き種々な蛋白を添加し、それらを用いて抗Rh₀抗体を4倍に稀釈し、それらの血清を用いて、室

温30分、Slide法で人血球に対する反応を検した結果を第20表に表示した。これによると、先づ市販γ-グロブリン(7%)は7%~1.5%の人アルブミンと略同様の結果を示している。又AB型人血清を僅かに含んだ7%人アルブミンでも著しい変化がみられなかつたが、この混合液の組成を、人アルブミン%を減少せしめると、その順に凝集塊形成は増強される。又この際1.5%牛アルブミンとの混合

液でも、人血清添加率の多い方が凝集塊形成が増強促進される傾向を示している事が判る。この結果よりすれば、人血清の添加は、凝集塊の形成の増強促進作用をうながすものと解される。

(C) (A), (B) 項の小括

以上より、凝集塊形成の増強促進には人血清の添加が非常に有効に作用すると同時に、人アルブミン、牛アルブミンと同様にAvidityをも改善短縮する事は明かとなつたが、第20表でみられる如く、人血清の濃度が増すと、Rh₀(-)型血球に対する反応がやむラツキを現して来る傾向を示している所からして、抗Rh₀抗体によつて、夫々の場合に最も適した、人又は牛アルブミンと人血清との、混合比による混合液を用いて抗血清の蛋白濃度を調整する事によつて、凝集塊形成、成長促進も人由来血清に対比しうべく、Avidityも何等損色のないSlide Test用を主眼とした抗Rh₀抗体を作りうる可能性を知つた。

VI Rho(-)型人血球の代用血球について

本研究に當つて、人Rh₀(+)型血球を用いる代りに猿血球を用いる事とした理由は、第一に人血球免疫では、非特異性人血球凝集素の産生が高度であり、その吸収除去に非常な困難が考えられるので、異種血球を免疫抗原として用いる事に決したのであるが、前述の青山(幸次郎)の研究結果から、第二の理由が発展して来た。即、Rh₀(-)型猿血球の存在が確認された事よりして、採血した抗血清を、モルモット正常血

清中の人血球凝集素を上回る程度に稀釈して、——実際に、これを上回る程度の稀釈が用いられる——それを Rh₀(-)型猿血球で吸収する事によつて、抗 Rh₀抗体のみを残存しうる筈である。この点を検した結果は、当然の事を確認しえた(表略)。

これによれば、本邦で非常に入手し難い Rh₀(-)型人血球の代用を猿の Rh₀(-)血球に求める事が出来る。

Ⅶ 臍帯血球について

前述した如く臍帯血球は、動物免疫抗体では判定が不可能であるという事を、解決する為には、臍帯血球中の抗原の性状を追及しなければならないので、次の如き 2・3 の実験を行つた。

(A) Rh₀(+)型臍帯血球免疫モルモット血清について

型の如くに免疫してえた抗血清中の抗 Rh₀抗体を検討してみた結果について解説してみよう。

未処置の抗血清の OMNCDE 型, OMNcde 型の血球に対する凝集反応を検した結果は、第21表に示した如くであり、何れも Rh₀(-)型に、より低い凝集価を示していた。これらの内 No.28, No.15, No.8, No.2 の各抗血清を等量混合して、Rh₀(-)型人血球で吸収した結果は第21表に示した如く、一応 Rh₀特異性を示している。この抗血清を Rh₀(+)型カニクイ猿血球で吸収をくりかえしてゆくと、吸収抗原に対して反応が全く陰性となつた際には、人血球に対しても Rh₀(+)型, Rh₀(-)型の区別なく、同様に凝集反応は陰性化してしまつた。

次で、未処置抗血清を Rh₀(+)型人血球で軽く吸収してみると、人血球に対しては Rh₀特異性を示し、Rh₀(+)型カニクイ猿血球(No.1085)に対しても

第21表 臍帯血免疫抗Dモルモット血清の人血球に対する凝集反応

| 作用血球 抗血清 番号 | OMN-CDE | | | | | | | | OMN-cde | | | | | | | |
|-------------------|---------|----|----|----|-----|-----|-----|------|---------|----|----|----|-----|-----|-----|------|
| | Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 | :128 | Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 | :128 |
| 28 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | ? | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - | - |
| 33 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | + | - | - | - | - |
| 18 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - |
| 15 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - | - |
| 13 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - | - |
| 8 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | + | + | 卅 | 卅 | + | - | - | - | - | - |
| 1 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | + | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | ? | - |

No. 28, 15, 8, 2 血清を等量混合 O-Rh₀(-)型血球で充分吸収したあと

| 作用血球 抗血清 | OMN-CDE | | | | | | | | O | A | B |
|-------------|---------|----|----|----|-----|-----|-----|---|---|---|---|
| | Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 | :64 | d | d | d | |
| 混合血清 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + | - | - | - |

第22表 混合血清をOD血球で吸収したあと

| 血清稀釈倍数 作用血球 | Neat | :2 | :4 | :8 | :16 | :32 |
|----------------|------|----|----|----|-----|-----|
| OMN-CDE | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | ± |
| OMN-cde | - | - | - | - | - | - |
| AN-cdE | - | - | - | - | - | - |
| BM-cde | - | - | - | - | - | - |
| ABMN-cde | - | - | - | - | - | - |
| No.1085 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | 卅 | + |
| No.1311 | - | - | - | - | - | - |

凝集反応を残存したが、Rh₀(-)型カニクイ猿血球(No.1311)に対しても凝集反応は殆ど陰性化して来る(第22表)。この Rh₀(+)型人血球での吸収をくりかえすと遂に人血球には全く凝集反応は陰性となるが、カニクイ猿血球(No.1085)にはわづか乍ら——原液で卅程度——凝集反応を残存する(表略)。カニクイ猿血球の代りに、アカゲ猿血球・ニホン猿血球を用いても略同様の結果を示した(表略)。これらの結果からすれば、臍帯血球中の Rh₀抗原も、猿血球, Rh₀

(+) 型人血球中の抗原と差異のない構造を示すものである事がわかり、動物免疫抗 Rh₀ 抗体の、臍帯血球の非特異的の反応部分は Rh₀ 抗原以外の抗原である事が知られた。

青山幸次郎の報告にもある如く、Rh₀(-)型臍帯血球で追加吸収する事により、容易に、臍帯血球についても判定可能な抗抗体を作りうる事は明かであり、目下この Rh₀(-)型臍帯血球の代用品を追及中である。

むすび

以上の如き結果からして、猿血球による動物免疫により抗抗体の量産の可能性が、明かとなり、その反応様相をも人由来抗体に劣らぬものとなしうる可能性の最少限を確認しえ、目下実際に量産の工程を歩んでいるが、これは、必要最少限であり、更に大量生産には、製造工程上思わぬ難点に遭遇する事があると思はれ、又工程の均一化の或程度の目安も立っているので、更にこの研究を続けて、量産法を確立すると同時に、抗-Rh', 抗-Rh'', 抗-Le^a, 抗-Le^b, 抗-e^c等々一連の必要抗体の量産の道をひたすらに進まんとするものである。

主要参考文献

①Landsteiner, K., & Wiener, A. S.: Proc. Soc. exp. Biol. & Med., 43, 233, 1940. ②Wiener, A. S., & Peters, H. R.: Ann. Int. Med., 13, 2306, 1940. ③Levine, P., & Stetson, R. E.: J. A. M. A., 113, 126, 1939. ④Levine, P., Katzin, E. M., & Brunham, L.: J. A. M. A.,

116, 825, 1941. ⑤Levine, P., Vogel, P., Katzin, E. M., & Brunham, L.: Science, 94, 371, 1941. ⑥Livine, P., Brunham, L., Katzin, E. M., & Vogel, P.: Am. J. Obst. Gynec., 42, 925, 1941. ⑦野田金次郎・小川猛洋・神谷 登・綜合医学., 6 (21); 27, 1949. ⑧Noda, K., & Hayakawa, Z.: VIII Cong. of intern. Soc. of Blood transf., Tokyo, 1960. ⑨野田金次郎・国行昌頼: 第38次日本法医学総会., 徳島大学, 1954. ⑩金箱房枝・福田 透・赤羽太郎・今泉 明: 産婦人科の実際., 7 (3), 223, 1958. ⑪野田金次郎: 第13回日本医学会総会第11分科会., 東京大学, 1951. ⑫野田金次郎・福田 透・今泉 明・赤羽太郎・金箱房枝: 第12回長野県医学会., 岡谷市, 1957. ⑬金箱房枝・赤羽太郎: 第119回日本小児科学会東京地方会講話会., 北里講堂, 1959. ⑭上竹正躬: 犯罪学雑誌., 23 (3), 91, 1942. ⑮井上徳治: 日法医誌., 12 (4), 385, 1958. ⑯青山幸次郎: 信州医誌., 9 (5), 747, 1960. ⑰Mollison, P. L., Mouraut, A. E., & Race, R. R.: The Rh Blood Groups and their Clinical Effects. London: Her Majesty's Stationery Office. 1952. ⑱Mollison, P. L.: Blood Transfusion in Clinical Medicine, Oxford. 1956. ⑲Rasch, L. H.: Lehrbuch der Blutgruppenkunde, Berlin, 1954. ⑳Race, R. R. & Sanger, R.: Blood Groups in Man., Oxford, 1954. ㉑野田金次郎: 血液型学実験法, 金原出版: 1957. ㉒古畑種基校関: 新しい血液型因子., 明文堂: 1959. ㉓古畑種基校関: 統新しい血液型因子., 明文堂: 1959.