

人成人並胎児と二三動物ヘモグロビンの血清学的 相互関係に就いて (続報)

昭和34年11月10日 受付

信州大学医学部法医学教室 (主任: 野田金次郎教授)

若 月 岩 雄

Supplementary Studies on the Serological Relations Between Human Adult and Fetal Hemoglobin, compared with Hemoglobins of Several Animals

Iwao Wakatsuki

Department of Legal Medicine, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. K. Noda)

1. まへがき

ゲル中に於ける抗原抗体反応は最近免疫血清学的方面に於て広く利用されている術式であるが、初めて此の現象を認めた人はH. Bechhold (1905)^①である。彼はヤギ血清免疫血清を含む gelatin 内にヤギ血清を拡散せしめて Liesegang 現象と同じ様な白輪の作られる事を観察している。又 L. Reiner and H. Kapp (1927)^②はブタ血清を用いてその免疫血清を含む寒天ゲル中での沈降輪を認めたと報告している。更に Nicolle et al (1920)^③, G. F. Petrie (1932)^④, R. H. P. Sia and S. F. Chung (1932)^⑤, 及 M. B. Kirkbride and S. M. Cohen (1934)^⑥等数多くの研究者は細菌毒素又はその抗毒素を用いて寒天ゲル中に於ける抗原抗体反応を観察している。

其の後フランスの J. Oudin (1946)^⑦は小試験管内に抗血清を含む寒天ゲル層を作り、固まらせた後に其の上に液性抗原を重層し、抗原が抗体ゲル層の中を拡散し、抗原抗体の濃度比が最適となつた所に沈降帯を形成する事を発見し、更に抗原が種々の蛋白成分を含む場合には、其の各々の最適比の場所に沈降帯を作る為、白輪が幾重にもなつて観察される事を認め、此の方法に依り抗原分析の可能な事を提唱し、免疫化学分析法 (L'analyses immunochimique) として種々の研究発表を行つている。更に Ö. Ouchterlony (1947)^⑧はベトリのシャーレの中に固まらせた寒天中に数個の凹みを作り、之れに抗原或は抗血清を入れ夫等が寒天中に拡散して反応を起す事を発表し、Oudin 法に依つては1種類の抗原と抗血清の反応のみであるのに反し、Ouchterlony 法に依ると2種類以上の抗原(或は抗血清)を同時に抗血清(或は抗原)と反応させ其等の抗原(或は抗血清)の相互関係を明瞭に知る事が出来る為、血清免疫学の研究特に抗原分析に広く

応用されるようになった。

其の後 Oudin 法 及 Ouchterlony 法は種々の学者によつて研究され、現在寒天ゲル中の抗原抗体反応の術式については次の四つに大別されると思う。

- 即ち、
1. Oudin 原法及其の変法
 2. Oakley 法及其の変法
 3. Ouchterlony 原法及其の変法
 4. Grabar の免疫電気泳動法

Oudin 法は抗原分析法としては非常に秀れたものであり、且つ其の術式も簡単な為尚広く利用されているが、その目的とする点は反応系の数を観察するだけなので最近では Ouchterlony 法の方が抗原分析法としては広く用いられている様である。而し最近欧米では盛んにジフテリー毒素、Toxoid 又は抗毒素の homogeneity の研究に用いられているようである。我が國に於ても伊藤(時哉)^⑨は Oudin 法を用いてジフテリー毒素の heterogeneity に就いての研究を報告している。又鈴木(成美)^⑩、影山(成章)^⑪等は Oudin 法を少し modify し両層寒天法と假称して抗原と抗体の両層を共に寒天層とする事により従来 Oudin 法では認める事の出来なかつた抗体過剰域の反応系をも確認し得たと報告している。J. Oudin (1955)^⑫も最近此の術式を報告している。

C. L. Oakley (1953)^⑬は此の Oudin 法を更に modify して抗原層と抗体層との中間に普通寒天に依る中間層を設け、抗原と抗体とを中間層に拡散せしめて其の部に沈降帯を形成せしめる方法を報告した。此の術式については我が國に於ては大原(達)(1957)^⑭が既に紹介している。R. Gispén (1955)^⑮は Oudin 法を一側拡散法 (One-side diffusion technique) と呼び Oakley 変法を試験管内二重拡散法と呼んでいる。又 Oudin 変法と同様此の場合に於ても抗原層を

寒天層とする変法は利用されている。又最近進藤^⑭は破傷風毒素及其の抗血清を用いて Oudin 法及其の変法と Oakley 法及其の変法とに依る寒天層内沈降反応の様相を比較検討し、寒天層内沈降反応の抗原抗体系を検索するには Oudin 法では重層する抗原液に寒天を混合した変法が良く、Oakley 法では抗原液だけを重層する原法の方が都合が良いと報告している。又影山(成章)^⑮は此の Oakley 変法を利用して2種以上の抗原(又は抗体)の異同を比較検討した。即ち Oakley 変法の間寒天層に抗体(或は抗原)を混じ上下の寒天層に抗原(或は抗体)を混ざる事に依り Ouchterlony 法のもつ意義を同時に満足せしめ得る事を知った。又 C. C. Pope et al. (1951)^⑯も此の Oakley 法と略同様な術式を発表している。Ouchterlony 法に関しては松橋(直)^⑰、鈴木(鑑)^⑱(1957)^⑲及大原(達)^⑳(1957)^㉑等に依り詳細に紹介せられているが、此の方法の特徴とする点は2種以上の抗原を同一の反応層の上に抗体と作用せしめて種々の型の反応帯を観察し得る事である。Ö. Ouchterlony^㉒は此の反応系を次の3種類に分類した。即ち(1):一致反応(reaction of identity), (2):不一致反応(reaction of non-identity), (3):部分的な一致反応(reaction of partial identity)がそれぞれである。即ち夫々の抗原が抗血清と反応して生ずる沈降帯が融合した場合((1)の場合)は此等の抗原は同一のものである事を示す。又夫々の沈降帯が全く交叉する場合((2)の場合)は此等の抗原は異なるものである事を示し、又一方の沈降帯が他方の沈降帯の中に入りこむ場合((3)の場合)は後者の抗原成分は複雑で前者の抗原とも共通部分を有する事を示すものである。

此の3種類の分類に依つて Ouchterlony 法に依る成績を解釈し、各々の抗原の相互関係を知る事が出来るのである。此の判定法を正確にする為には相方の沈降帯の先端が充分に接し得るように沈降帯を形成せしめる事が必要であり、又之れが為には反応の基礎条件を適当にしなければならぬ。此の基礎条件の検討に就いて Ö. Ouchterlony^⑳(1948, 1953), J. Oudin^㉑(1952), M. W. Wilson and B. H. Pringle^㉒(1954, 1955)等に依つて詳細に報告されている。

最近 M. W. Wilson and B. H. Pringle^㉓(1956)は Ouchterlony 法に於て牛血清 albumin と同ハロゲン化血清 albumin とを用い各々の対応抗血清を作り各抗原及抗血清を種々に交叉反応せしめて、一般に血清学的に近縁関係にある抗原の寒天ゲル中の反応を説明するには主交叉反応(major cross-reaction)と副交叉反応(minor cross-reaction)との二つに分けて

“Spur”の生ずる反応は主交叉反応にあづかるものであり、其の他の反応は副交叉反応に属するものであるとした。そしてゲル中の抗原抗体反応には免疫学的に identity, non-identity, 及 partial identity と云う反応は必ずしも起り得るものではなく、此等の反応は各々の相対濃度、及び反応因子の免疫学的親和性の程度等に左右されるもので、更に其の因子の型や免疫学的純粋性等に依る影響も考慮すべきものであると述べ Ouchterlony の所謂3種の反応型を(1):融合型(pattern of fusion), (2):交叉型(pattern of intersection)及(3):部分的交叉型(pattern of partial intersection)と云う三つの表現を使用すべきであると述べている。又鈴木(鑑)^㉔は此の Ouchterlony 法は2種類以上の抗原或は抗血清の相互関係を知り得る点に最大の特徴があるが、其の鋭敏度の点では沈降反応重層法におよばないと述べ、複雑反応系を分析する為には、共通成分をもつ他の抗原と組合せる以外に種々の濃度の抗原を同時に用いる事がよく、又数本の反応帯が認められた場合、其等の相互の位置は主として夫々の反応系にあづかる抗原と抗体の相対濃度に依て定まるものであると述べ、更に複雑な抗原や抗体を分析するには沈降反応重層法と Ouchterlony 法とを併用して夫々の特徴を生かすように組合せ、其の結果総合的に判定するのが最も妥当であろうと結論づけている。又 B. Björklund^㉕(1952)は Ouchterlony 法に於ける複雑な反応系に於ては、寒天層中に予め1つの Component を混じて置く事に依り其の特異反応を単純に出現させる事が出来ると報告している。又最近金沢大学の石川教授^㉖は此の Ouchterlony 法を利用して Ehrlich 腹水癌マウスの癌性腹水液、担癌マウス血清、正常血清の抗原組成に夫々差異のある事を認めている。

最後に Grabar の免疫電気泳動法に就いては松橋(直)^㉗の其の術式に就いての詳細な報告があるが、此の方法は反応系の数を最も正確にあらはし、且つこれに与る各抗原分劃の電気泳動度を同時に追究し得る点に優れた方法であると思はれるが、反応術式が複雑な為 Oudin 法ほど広くは応用されていないようである。

以上寒天ゲル中の抗原抗体反応に応用されている術式の概要を述べたのであるが、其の何れの術式も夫々長短があり、其の目的に依つて単独或は各々を併用し用いてるべきものであると思はれる。著者^㉘は先に成人並に胎生ヘモグロビンと、二三動物ヘモグロビンの相互関係に就いて、血清学的に沈降反応重層法を用いてその種族特異性を報告したのであるが、今回は此の

Ouchterlony 法に依つて各種ヘモグロビンの相互関係を研したのでここに報告せんとするものであるが、最近のヘモグロビンの問題は澱粉電気泳動法、電気泳動法及 Chromatography 等に依り成人ヘモグロビンの不均質性に就いて多くの学者の論議の中心になつて居る様である。H. G. Kunkel^⑩(1957) は電気泳動法で成人 Hb が HbA と HbA₂ 及び無色の 3 つの要素に分離される事を報じ unfractionated な Hb に対する抗体は純粋な HbA₂ 及び HbA に対して強く反応し而も沈降素曲線は非常に類似して居り、而も此の抗体を各々 (HbA₂ 或は HbA) で吸収すると夫々他方の Hb (A 或は A₂) にのみ反応する抗体となると報じている。而も Ouchterlony 法に依る分析を試みると HbA と HbA₂ に対する主反応帯は融合を示し、Secondary lines は Hb の 2 つの異つた反応系を現して居り、それは免疫学的に homogenous でない事を示していた。之れは 2 つの Hb の間に免疫学的な近縁関係を示すものであると述べている。又 HbA₂ は胎児にはないか又は殆ど低下して居り、同様の Component は或る種の嚙長類には見られるが、他の動物には見られないものであると述べている。又 M. S. Masri et al.^⑪(1958) は澱粉電気泳動法で成人血 Hb を A₁, A₂, A₄, A₈ の 4 つの pattern を見出している。又 A. I. Chernoff^⑫(1958) は Ouchterlony 法で抗 HbA 及抗 HbF とに対し HbA 及 HbF を作用せしめて抗 HbA に対して HbA は 2~3 本の沈降帯を出現せしめ HbF は強く反応して HbA と抗 HbA とで作る沈降帯の 1 つと融合しているのを認め、一般の成人血 Hb 内には HbF が含まれているのであると考へ同時に 3 本の沈降帯の出現は Kunkel の所謂 HbA の不均質性を証明するものではないかと述べている。本邦に於ては桂(秀策)^⑬(1959) が血清学的に成人血 Hb の不均質性を証明している。

以上の如き現況下に此の Hb の不均質性の問題の研究に当つても Ouchterlony 法の利用価値は存在すると思はれるので、此処に著者の試みた実験を報告する次第である。

2. 実験材料及実験方法

i) 抗原及抗血清: 採血後血液 1 に対して少くとも 4 の割合に 1~1.5% の食塩水を加えて攪拌して遠心し、血漿又は血清を分離して後同じ濃度の食塩水を同じ割合に加えて 2000 R.P.M. で 10 分間遠心し上清を吸引する。之れを数回繰返して白血球及トロンボチテンを除去し、生理的食塩水を大量加えて 3000 R.P.M. で 5 分間遠心を 2 回繰返して得た沈澱赤血球に等量の蒸留水と等量のアルミナクリームを加え、更に少量のトルエンを加えて充分に攪拌して、一昼夜氷室に放置して後之れを遠心すると、此の混合液は 3 層に分れ中層の透明な Hb 液の部分吸引して分取する。其の際混入する狭雑物は濾過或は再遠心して除去した。かくして得たる Hb 溶液を原液として、これを試験管内抗原とし、免疫用抗原としては Hb 原液を生理的食塩水にて 5 倍に稀釈したものを用い、1 回 5c.c. 宛同量のアルミナクリームに吸着して、成熟家兎臀部筋肉内に 2~3 日間隔で 5~6 回注射して得た抗 Hb 血清を抗血清として使用した。HbF 溶液は臍帯血血球を用い HbA の場合と同様にして HbF 抗原及 HbF 抗体を作成して使用した。猿及其他の動物の Hb 溶液も HbA の場合と同様にして作成した各 Hb 溶液を抗原として使用した。使用抗血清は表 1 に示す如くで沈降反応重層法にて抗 HbA 血清及抗 HbF 血清は共に沈降素価 25,600、沈降素量 8 で各対応血球にて吸収すると抗 HbA 血清は沈降素価 3,200、沈降素量 2 となり HbF 抗血清の場合は沈降素価 6,400、沈降素量 8 となるものであまり特異性の高い抗血清ではない。抗血清は寒天層内使用の際は殆ど原液を使用した。抗原は原液では寒天層内を着色して沈降帯を不鮮明とするので、主として 100 倍溶液を使用した。

ii) 寒天ゲル作製法及反応条件: 之れに就いては M. W. Wilson and B. H. Pringle^⑭(1954) の詳しい研究があるので、大体之れに従つて行つた。即寒天ゲルは寒天粉末 (Difco) を 1.5~1% に加熱溶解し、pH を 7.8 附近に補正して之に NaCl を 0.9%、窒化ソーダ 0.1% の割合に加えたものを 10c.c. 宛試験管に分注し氷室に保存して置き、反応層作製に際して適宜加熱溶解して使用に供する様にした。反応層は予め滅菌

表 1

抗血清 種類	未 吸 収			HbF で 吸 収			HbA で 吸 収		
	HbA	HbF	猿 Hb	HbA	HbF	猿 Hb	HbA	HbF	猿 Hb
抗 HbA 血清	25,600 × 8	12,800 × 8	6,400 × 8	3,200 × 8	0	0	0	0	0
抗 HbF 血清	6,400 × 8	25,600 × 8	6,400 × 8	0	0	0	0	6,400 × 8	0

乾燥した内径 7.5cm のシャーレに寒天 5c.c. を流しこみシャーレの底に薄い基層を作つて固らせて後、写真 1 に見る様な金属の装置を使用して直径約 0.8cm の中空（穴は出来るだけ小なるものがよい）のガラス棒を目的に応じて 3~6 個所定の位置に立て、更に寒天 10 c.c. を注ぎ込む。（写真 2）寒天が充分に固つてから寒天層の縁をこわさぬ様に注意して、ガラス棒を取り除くと寒天層に約 0.2c.c. の液を溶れ得る凹み出来る。これで反応層は出来上つたわけで、之れを一昼夜氷室に放置して充分固つたものを使用した。実験の際には寒天層の凹みに反応液を入れて 36°C の孵卵器内に寒天及反応液が乾燥しない様に注意して保存し、毎日反応液を追加しながら沈降帯の発現状況を観察し、10~14 日目に反応が最強度となり、固定したと思はれる時に写真を撮つた。孵卵器内にて反応液は乾燥し易いので、我々はプラスチックの箱の中にシャーレを入れ、同時に脱脂綿をぬらして入れて置き、管内の湿度を出来るだけ高めて置く様にした。此の際寒天層の濃度は上記の如く常に 1% のものを使用した。Wilson and Pringle も 1% から 2% のものが最も良いと言つている。濃度の高いものは注ぎ込むのに困難であると同時に、沈降帯の発現が遅く又充分に発展しない。又 0.5% のものは沈降帯の発現時間は速いのであるが、シャーレ内の固定に困難で Oudin 法に於ては最適と思はれるが Ouchterlony 法にては不可である。食塩濃度は生理的食塩水を使用した。Wilson and Pringle の実験に依ると、沈降帯の型及位置は何ら食塩濃度とは関係なく、寧ろ食塩を加えない場合には沈降帯は極めて良好に進展すると言つている。寒天層の pH は我々は 7.0~7.8 に補正して使用しているが、酸性の場合には沈降帯がもやのかゝつた様になり、不鮮明で中性或はアルカリ性の場合には、沈降帯は変化しないで残つている。Wilson and Pringle は 7.5 に近いものが最適であると報告している。反応層の保存温度の問題であるが、我々は 30°C 孵卵器内にて反応させているが、それによると第 2 日目乃至第 3 日目には沈降帯が出現し第 10 日目前後に於て maximum に達した。Wilson and Pringle は温度の影響は沈降帯の出現の速度に関係があるが、沈降帯の形や位置には影響しないと云つている。次に凹みの距離即ち抗原と抗体との距離は、其の凹みの辺と辺との最短距離で約 1.0cm にして作製した。これ以上の距離では沈降帯の発現が遅くなり、又これ以下では発現は速いが、反応の場所が狭い為判定に困難を感ずる。次に反応液の濃度の問題であるが、一般に沈降帯の拡り方は抗原と抗体の相対濃度に左右されるものであるが、其の強さは抗体濃

度の増加に依つて其の強さを増すが、抗原の濃度の変化では其の強さに殆ど影響がない。又抗原と抗体の反応の最適比の場所に於ては、両反応液の絶対量の適宜な増加に依つて其の位置に変化を生ぜしめない。依つて我々は抗血清は原液を使用し、抗原は 100 倍液を使用して毎日凹みに反応液を追加する事に依つて、常に抗原液及抗血清を充分に存在せしめる様にした。Wilson and Pringle は此の液の追加は最初の 1 回だけの時とあまり其の反応状況に変化を見ないと云つているが、我々の実験では追加した方が沈降帯は鮮明になるように思はれた。

3. 実験成績

抗原及抗血清に就いて、其の各々の寒天層内反応に対する至適稀釈濃度を検した結果、総ての場合夫々抗原液及び抗血清原液が最も鮮明な沈降帯を示し、抗血清原液に対する抗原稀釈液では 400 倍以上では沈降帯を認められず、又抗原液に対する抗血清稀釈液では 8 倍以上では沈降帯を認められなかつた。又反応出現は 1~2 日目に始まり順次其の鮮明度及び沈降帯の数を増加し 10 日目頃に最高となり、それ以後はあまり変化を認められなかつた。依つて爾後の実験は総て抗血清は原液を使用し、抗原は 100 倍溶液を使用した。

i) 抗 HbA 血清に対する HbA, HbF, 及び牛 Hb の反応系: 写真 3 に見る如く HbA は 400 倍稀釈まで沈降帯を示し 800 倍の位置では反応を認められない。又 100 倍, 200 倍, 400 倍の各抗原に対しての沈降帯は夫々融合して 1 本の線をなしている。即ち所謂一致反応を示すもので、此等の抗原は同一種類の抗原である事がわかる。又 100 倍稀釈 HbA 抗原に対しては此の主反応帯の他に 2 本の沈降帯が認められる。此の事は此の HbA が抗 HbA 血清に対して 3 つの反応系を有する事を示すものである。次に HbF に対してはかなり強い沈降帯が認められ、此の沈降帯は HbA に依る沈降帯と明らかに交叉している。此れは所謂不一致反応を示すもので HbA と HbF とは其の抗原性が明らかに相異している事を示すものである。而し HbF に依る沈降帯の先端は HbA 側に曲線を作つている点より見て共通反応系をも有するものと思はれる。之れは HbA 液中に少量の HbF を混入する為とも推定し得るのではないかと思はれる。又写真 3 に於て牛 Hb に対する沈降帯は前 2 者の作る沈降帯とは全く異つた位置に数本出現し明らかに不一致反応を示している。之れは牛 Hb が前 2 者とは全く異つた抗原性を有しているものである事がわかる。

ii) 抗 HbF 血清に対する HbA, HbF, 及牛 Hb の

写真 1

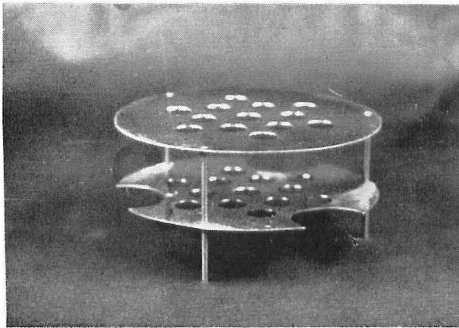


写真 2

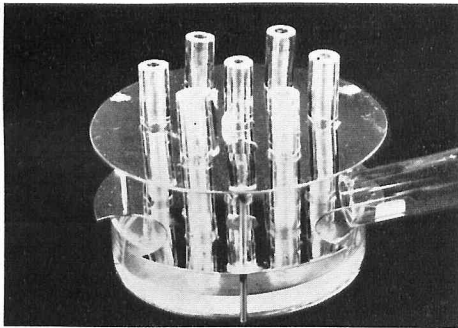
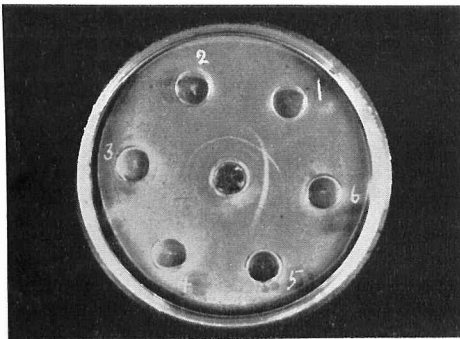
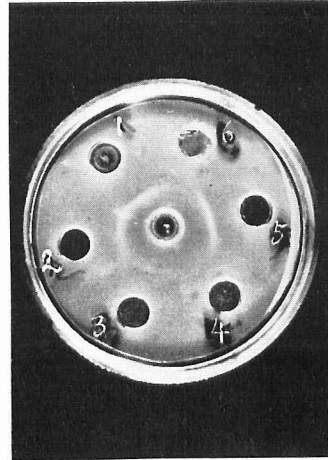


写真 3 抗 HbA 血清に対する HbA, HbF, 及牛 Hb の反応系



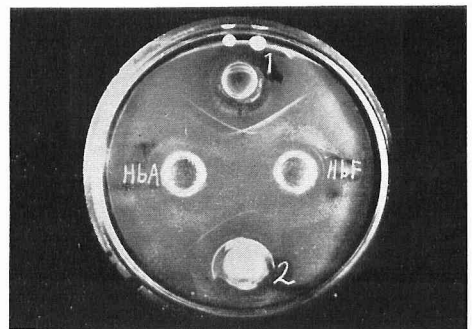
- 中央 抗 HbA 血清
1. 100 倍 HbA 溶液
 2. 200 倍 HbA 溶液
 3. 400 倍 HbA 溶液
 4. 800 倍 HbA 溶液
 5. 牛 Hb 溶液
 6. 100 倍 HbF 溶液

写真 4 抗 HbF 血清に対する HbA, HbF, 及牛 Hb の反応系



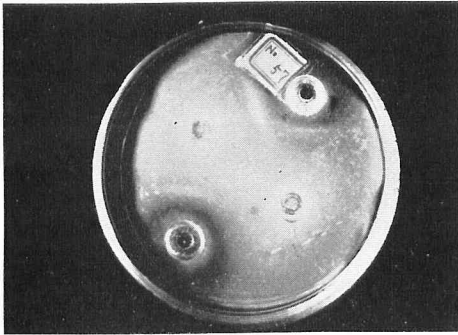
- 中央 抗 HbF 血清
1. 100 倍 HbF 溶液
 2. 200 倍 HbF 溶液
 3. 400 倍 HbF 溶液
 4. 800 倍 HbF 溶液
 5. 100 倍 HbA 溶液
 6. 100 倍 牛 Hb 溶液

写真 5 抗 HbA 血清と臍帯血血球にて吸収せる抗 HbA 血清とに対する HbA 及 HbF の反応系



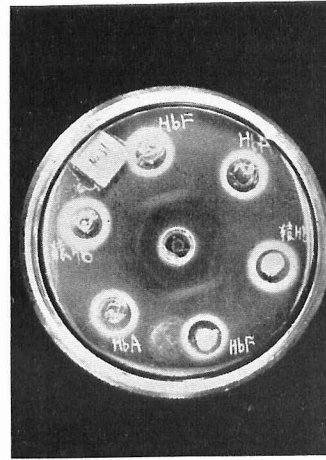
1. 未吸収抗 HbA 血清
 2. 吸収后抗 HbA 血清
- 中央左は 100 倍 HbA 溶液
右は 100 倍 HbF 溶液

写真 6 抗 HbF 血清と成人血血球にて吸収せる抗 HbF 血清とに対する HbA 及 HbF の反応系



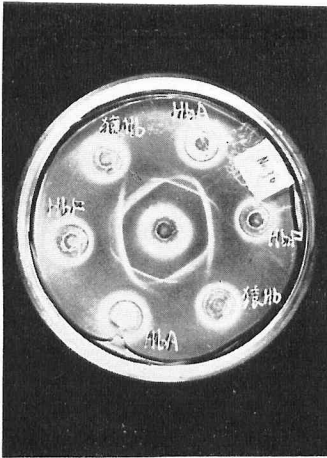
右上方 未吸収抗 HbF 血清
左下方 吸収后抗 HbF 血清
中央左 100 倍 HbF 溶液
右 100 倍 HbA 溶液

写真 9 抗 HbF 血清に対する HbA, HbF, 及猿 Hb の反応系



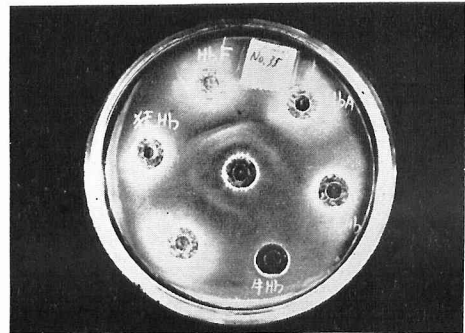
中央 抗 HbF 血清

写真 7 抗 HbA 血清に対する HbA, HbF, 及 猿 Hb の反応系



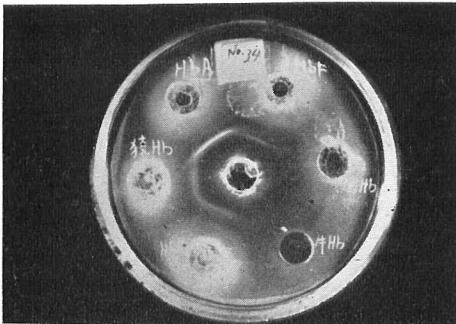
中央 抗 HbA 血清

写真 10 抗 HbF 血清に対する HbA, HbF, 猿 Hb 及牛及馬 Hb の反応系



中央 抗 HbF 血清

写真 8 抗 HbA 血清に対する HbA, HbF, 猿 Hb 及牛及馬 Hb の反応系



中央 抗 HbA 血清

反応系：写真4に見る如く、抗 HbF 血清に対して400倍稀釈までの HbF 抗原に沈降帯を示し其の各々は融合して1本の線となり所謂一致反応を示している。又800倍稀釈の HbF に対しては全く沈降帯を認めない。又 HbA に対しては1本の沈降帯を出現しているが各々の沈降帯は此の場合位置の関係上不明瞭ではあるが、HbF の作る沈降帯とは不一致反応を示すものと思はれる。又牛 Hb との沈降帯は前と同様此の場合にも前2者とは異つた反応系である事を示している。又此の場合抗 HbA 血清の場合と異り HbF に対する沈降帯は1本のみである事は注目すべき事である。

iii) 抗 HbA 血清と、臍帯血血球で吸収した抗 HbA 血清とに対する HbA 及び HbF の反応系：写真5に見る如くで未吸収の抗 HbA 血清に対しては HbA 及 HbF の夫々の沈降帯は不一致反応を示し且つ HbA に対しては2本の沈降帯を作り抗原側の沈降帯は HbF の作る沈降帯と融合して一致反応を示している。即ち抗 HbA 血清は此の場合 HbA と2本の反応系を有し、且つ HbA と HbF とは其の抗原性を異にするけれども、一部共通反応系をも有している事を示している。次に之れを吸収後の抗 HbA 血清に対する HbA 及 HbF の反応系を見るに HbA に対する沈降帯はもはや出現せず、且 HbA に対する沈降帯は1本のみで HbF との共通反応系は消失している。

iv) 抗 HbF 血清と、成人血血球で吸収した抗 HbF 血清とに対する HbA 及び HbF の反応系：写真6に見る如く抗 HbF 血清に於ても抗 HbA 血清の場合と同様の反応を見る事が出来る。即ち未吸収の抗 HbF 血清に対しては HbA 及 HbF は共に1本の沈降帯を示し、其の夫々の沈降帯は此の場合には部分的な一致反応をなし、HbF に対する沈降帯は“Spur”お作り Wilson and Pringle²⁰⁾の所謂部分的融合型を示している。之れを吸収後 HbF の抗血清に対する反応系で見ると HbA に対する沈降帯は出現せず HbF に対する沈降帯のみが見られる。

v) 抗 HbA 血清に対する HbA, HbF, 及下級猿(日本猿) Hb の反応系の比較：人類に近縁関係があると言はれる下級猿 Hb は他の動物と異つて血清学的に HbA 及 HbF と極めて類似の反応を示す事は先に著者²⁰⁾(1958)は重層法に依つて実験した結果を報告したのであるが、Ouchterlony 法に依つて其の各々の沈降帯の様相を見ると此の3者は極めて近縁関係にある抗原である事を知る。即ち写真7に見る如く抗 HbA 血清に対して HbA の作る沈降帯は明瞭に HbF 及猿 Hb の作る沈降帯と交差し不一致反応を呈している。然して猿 Hb の作る沈降帯は HbF の作る沈降帯と部分的

一致反応を呈し、且 HbF の作る沈降帯は“Spur”を有している。即ち之れは抗 HbA 血清に対して HbF と猿 Hb とは共通の反応系を有している事を示すものである。又写真8に見る如く抗 HbA 血清に対して HbA, HbF 及猿 Hb は夫々沈降帯を作るけれども牛 Hb 及馬 Hb とは此の場合沈降帯は出現していない。而も HbF と猿 Hb との沈降帯は完全な一致反応を呈している。

vi) 抗 HbF 血清に対する HbA, HbF 及猿 Hb の反応系の比較：写真9に見る如く此の場合に於ても抗 HbA 血清に対すると同様 HbA と猿 Hb とが抗 HbF 血清に対して作る沈降帯は一致反応を呈し抗 HbF 血清に対して共通の抗原性を有する事を示している。又此の2者の作る沈降帯は HbF の作る沈降帯に対して部分的な一致反応を呈している。勿論写真10に見る如く他の動物 Hb 即ち牛及馬 Hb は抗 HbF 血清に対して何らの反応も呈していない。

4. 総括並に結論

ゲル内で沈降反応を行う方法は、古くは Bechhold (1950) 等が行つているが、J. Oudin (1946) に依つて免疫化学分析法として詳細に研究され、更に Ö. Ouchterlony (1947) によつて、寒天平板内での同反応が追及され、抗原分析の新しい方法が確立された。著者は前報²⁰⁾(1958)に於て、HbA, HbF と、それと近縁関係にある成熟猿 Hb、一般動物として馬、綿羊の Hb を用いて、本邦で古来より慣用されている重層法に依つて、夫々の特異性の問題を追及して、馬、綿羊の Hb は血清学的反応上前3者の Hb とは明かに区別され、その間に血清学的にかなりの隔りのある事を見、又人由来の Hb (HbA 及び HbF) は、又明かに猿 Hb との間に夫々種属特異性の存する事をも知つた。人由来 Hb についても、HbA と HbF は夫々相互に特異部分の存する事は明かであつたが、7ヶ月及2ヶ月の各1例宛の胎児 Hb と HbF の間には血清学的差異を認め得なかつた事を報告した。

一方鈴木(鑑) (1958) は重層法と Ouchterlony 法との比較を報告している。所が總じての Hb 血清学的研究に Ouchterlony 法を用いた例は極めて少いので著者は前報²⁰⁾(1959)の重層法沈降反応によつて得られた結果を、本法を用いて再検討して見た。

本実験に當つて、一般動物 Hb として牛 Hb を使用したが、抗 HbA 血清並抗 HbF 血清に対して HbA 及 HbF に対すると明かに異つた反応を示して居り、重層法と全く一致した所見を呈していた。(写真3, 4)

抗 HbA 血清による反応よりみると、HbF と猿 Hb とは共通な反応系を有している事がみられ、抗 HbF

血清に対しては、HbA は猿 Hb と共通な反応系を示す事からみて、之又前報に於て重層法により確め得た結果を確認する所見を得た。(写真7~10)

HbA, HbF の関係についてみると、重層法に於てみられたと同様、HbA, HbF 夫々相互に特異性部分を有する反応を示し、更に夫々の抗体を HbF, HbA で吸収した抗血清を用いて検討しても(写真5, 6)、主反応の部分に於ては、何等影響される事なく、副反応は消去されて、主反応のみが残るので、抗体の主反応は明確化される事は当然である。従つて本反応に於ては原著者等も述べている如く、重層法に於ける吸収試験を必要とせず、抗原分析が可能である事である。

写真3に於て、明かに、抗 HbA 血清に対する場所に、3本の沈降帯を認め得るが、主として電気泳動によつて分類せられた Kunkel^⑩の HbA₁ 並 HbA₂ に対する沈降帯を示すものであるかも知れない。

結 論

前報で、重層法沈降反応によつて、HbA, HbF, 猿 Hb, 馬, 綿羊 Hb について夫々の特異性を報告したが、本報に於て、同様の事を Ouchterlony 法による寒天層内沈降反応を用いて再検討して次の如き結果を得た。

1) 前報^⑩と同様、一般動物として用いた牛 Hb は、猿 Hb のみならず、HbA, HbF に対しても明かに異つた血清学的反応を呈し、猿 Hb, HbA 並に HbF は夫々近縁関係にある事を確認した。

2) 猿 Hb は HbA, HbF に対して特異性部分を有すると共に、HbA, HbF は夫々相互に特異性部分を有する事も確認した。

3) 本法に於て Hb の抗原分析は充分可能である。

4) 抗 HbA 血清に対する HbA の反応に於て(写真3)所謂 HbA, HbA₂ に対応する沈降帯を含むと考へると一番説明しやすい3本の沈降帯-1本は強く正鋭に、他の2本は之に比して稍々薄い-を認められたが、この点に関しては更に今後の追及が必要である。

(編筆するに当り野田金次郎教授の御指導に深謝する。)

主要参考文献

- ①Bechhold, H.: Z. Physikal. Chem.; 52; 185, 1905
 ②Reiner, L. and Kapp, H.: Kolloid. Zeitschrift.; 42; 335-338, 1927
 ③Nicolle et al.: Ann. Invest. Pasteur; 34; 596, 1920
 ④Petrie G. F.: Brit. J. Exp. Path.; 13; 380-394, 1932
 ⑤Sia, R. H. P. and Chung S. F.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med.; 29; 792-795, 1931-2
 ⑥Kirkbride

- M. B. and Cohen S. M.: Amer. J. Hyg.; 20; 444-453, 1934
 ⑦Oudin J.: Act. Sci.; 222; 115-116, 1946
 ⑧Ouchterlony Ö.: Acta. Path. et Microbiol. Scandinav.; 25; 186-191, 1948
 ⑨伊藤時哉: 医学と生物学; 48(2); 92-65, 1958
 ⑩伊藤時哉: 医学と生物学; 48(5); 180-183, 1958
 ⑪鈴木成美: 日新医学; 45(2); 38-54, 1958
 ⑫影山成章: 日新医学; 45(2); 89-102, 1958
 ⑬Oudin J.: Ann. Invest. Pasteur; 89; 531, 1955
 ⑭Oakley C. L. and Fulthorpe A. J.: J. Path. and Bact.; 65; 49-60, 1953
 ⑮大原 達: 日新医学; 44; 138, 1957
 ⑯Gispens R.: J. Immunol.; 74; 134-141, 1955
 ⑰進藤宙二: 日新医学; 45(3); 160-162, 1955
 ⑱Pope C. C. et al.: Brit. J. Exp. Path.; 32; 246-258, 1951
 ⑲松橋 直: 臨床病理; 特2; 203-209, 1955
 ⑳鈴木 鑑: 日新医学; 45(3); 154-159, 1958
 ㉑Ouchterlony Ö.: Acta. Path. et Microbiol. Scand.; 32(2); 231-240, 1953
 ㉒Ouchterlony Ö.: Atti. bel VI Congresso Internazionale di Microbiologica; Voll II, pp. 276-286, 1953
 ㉓Björklund B.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med.; 79; 319-324, 1952
 ㉔Oudin J.: Methods in Med. Reserch, Vol. 5, Year Book Publishers, Chicago, pp. 335-378, 1952
 ㉕M. W. Wilson and B. H. Pringle: J. Immunol.; 73; 232-243, 1954
 ㉖M. W. Wilson and B. H. Pringle: J. Immunol.; 75; 460-469, 1955
 ㉗M. W. Wilson and B. H. Pringle: J. Immunol.; 77; 324-331, 1956
 ㉘石川大刀雄・高柳尹立: 日新医学; 44; 361, 1957
 ㉙松橋 直: 日新医学; 45(3); 162-167, 1958
 ㉚若月岩雄: 日法医誌; 12; 661-670, 1958
 ㉛H. G. Kunkel, R. Ceppellini, u. Müller-Eberhard, and J. Wolf: J. Clinic. Invest.; 36; 1615-1625, 1957
 ㉜M. S. Masri, et al.: Blood; 13; 533-542, 1958
 ㉝Amoz. I. Chernoff; Conference on Hemoglobin; Publication 557; pp. 179-182, 1958
 ㉞桂 秀策: 日法医誌; 13(5); 762-773, 1959