

骨肉腫患者血清の免疫学的研究

金沢大学医学部整形外科教室(主任 高瀬 武平教授)
 金沢大学医学部第二病理学教室(主任 石川大刀雄教授)

河 原 宏

(昭和39年12月21日受付)

本論文の要旨は昭和39年10月第23回中部日本整形外科災害外科学会において報告した。

悪性腫瘍患者の血清は、albumin の低下、 α -globulin の増加、 β -globulin やや増加、 γ -globulin 殆んど常量という傾向を示す。それは何らかの形で癌の代謝に関連するものであろう。例えば α -globulin に関し、その α -糖蛋白の増加には、和田らによると、肝で生成されるもののほかに、かなりな部分、癌細胞自らが生産放出したものが含まれるという。後者の場合、その α -糖蛋白は癌細胞が生産したという意味で、癌特異的ということが出来よう。また前者の場合、甚だしく増加しているという意味で、少なくとも癌を特徴づけていると理解することが出来る。

悪性腫瘍のうち、多発性骨髄腫血清には、 γ -globulin の異常な増加が認められ、それらは抗原分析の結果、いわゆる immune globulins (γ_1 S, β_2A , γ_1M) に相当することが知られている。そしてそれは、腫瘍細胞である plasmocyte の生産し、分泌したところのものである。或いはまた、三宅によると白血病者血清には、抗原分析の結果、骨髄性・リンパ性・単球性白血病にそれぞれ特有な β -globulin 因子の出現することが知られている。そしてそれは、おそらく確実に血液癌ともいふべき腫瘍細胞が生産し、分泌したものであろう。

更に以上を拡大して、然らば胃癌患者血清に胃癌細胞自らが生産し、分泌したものが存するか、胃癌血清蛋白分画像の異常はすべて、それによつて説明し得るかとなると、結論は保留されざるを得ない。あるものは肝で生成され、あるものは和田らの説くように、癌細胞が生産したのかも知れない。胃癌患者血清を骨髄腫、白血病者血清における如くに、免疫拡散法により抗原分析すると、 α_1 , α_2 -糖蛋白因子並びに β -リポ蛋白因子が、少なくとも甚だしく増量していることが検

出される。それは癌特異的であるか否かは別として、少なくとも癌特徴的因子と理解することが出来よう。

それならば肉腫、就中骨肉腫患者血清には、それに特異的な因子が含まれているであろうか。

著者は、人の骨肉腫の他、骨肉腫以外の腫瘍、腫瘍以外の疾患の血清について、免疫化学的解析を行ない、骨肉腫患者血清にかなり特異性を示すと思われる因子を確認したので、以下に報告したいと思う。

実験材料及び実験方法

〔I〕 実験材料

骨肉腫患者血清及び非骨肉腫患者血清(骨肉腫以外の腫瘍患者血清及び非腫瘍患者血清)を被検材料とした。その分類は次の如くである。(表1参照)

骨 肉 腫	20例
軟 骨 肉 腫	3 "
リンパ肉腫	3 "
その 他 の 肉 腫	4 "
肉腫以外の悪性腫瘍	16 "
良 性 腫 瘍	31 "
腫瘍以外の疾患	41 "
合 計	118例

以上のほか、対照として正常人血清10例を選んだ。これらの血清材料は、腫瘍以外の疾患の一部を除き、手術による侵襲、輸血などによる影響を避けるため、いずれも手術前に採血し、術後剔出または試験標本について病理組織学的診断をたしかめた。

〔II〕 実験方法

(1) 抗骨肉腫血清の作製

病理組織学的に骨肉腫と診断された患者の血清を抗原液として用いた。

Immunological Study of the Sera of Patients with Osteogenic Sarcoma. **Hiroshi Kawara**, Department of Orthopaedic Surgery (Director: Prof. B. Takase) and Department of pathology (Director: Prof. T. Ishikawa), School of Medicine, Kanazawa University.

(表1) 実験材料及び免疫反応の成績

材料 番号	性別	年齢	診 断	部 位	レ 線 所 見	免疫 反応	備 考
1	♀	25	骨 肉 腫	左 大 腿 骨	造 骨 型	+	転 移(-)
2	♂	45	"	右 脛 骨	溶 骨 型	+	肺転移(+) 軟部組織への浸潤(++)
3	♂	11	"	右 脛 骨	溶 骨 型	+	転 移(-)
4	♂	9	"	左 大 腿 骨	造 骨 型	+	転 移(-)
5	♂	15	"	右 脛 骨	溶 骨 型	+	転 移(-)
6	♂	35	"	左 大 腿 骨	造 骨 型	+	転 移(-)
7	♀	6	"	右 大 腿 骨	溶 骨 型	+	転 移(-)
8	♂	33	"	右 腸 骨	溶 骨 型	+	転 移(-)
9	♀	12	"	左 大 腿 骨	溶 骨 型	+	転 移(-)
10	♀	10	"	左 脛 骨	造 骨 型	+	転 移(-)
11	♂	37	"	左 脛 骨	混 合 型	+	病的骨折(+) 転移(-)
12	♂	19	"	左 大 腿 骨	混 合 型	+	転 移(-)
13	♂	18	"	右 上 腕 骨	溶 骨 型	+	病的骨折(+) 転移(-)
14	♀	15	"	左 大 腿 骨	造 骨 型	-	転 移(-)
15	♀	27	"	左 大 腿 骨	造 骨 型	-	転 移(-)
16	♂	10	"	左 大 腿 骨	造 骨 型	-	転 移(-)
17	♂	54	"	左 腸 骨	溶 骨 型	+	転 移(-)
18	♂	23	"	左 大 腿 骨	溶 骨 型	-	転 移(-)
19	♂	57	"	左 大 腿 骨	造 骨 型	+	肺転移(+)
20	♂	15	"	左 大 腿 骨	造 骨 型	-	転 移(-)
21	♂	53	軟 骨 肉 腫	左 脛 骨	溶 骨 型	+	転 移(-)
22	♂	40	"	右 脛 骨	溶 骨 型	-	転 移(-)
23	♂	40	"	左 腓 骨	溶 骨 型	-	転 移(-)
24	♀	28	リンパ肉腫	右 肺	中肺野に円形陰影	+	骨転移(-)
25	♀	50	"	右頸部リンパ腺	骨陰影に著変なし	-	骨転移(-)
26	♀	33	"	左 肺	中肺野に円形陰影	+	骨転移(-)
27	♂	10	線 維 肉 腫	左 上 腕 骨	造 骨 型	+	転 移(-)
28	♂	8	細 網 肉 腫	右 腸 骨	溶 骨 型	-	転 移(-)
29	♂	13	Ewing 肉 腫	仙 骨	溶 骨 型	-	転 移(-)
30	♂	51	皮 膚 肉 腫	右 鼠 蹊 部	骨陰影に著変なし	-	骨転移(-)
31	♂	57	腺 癌	右 大 腿 骨	溶 骨 型	+	胃に原発, 大腿骨に転移
32	♂	56	"	仙 骨	溶 骨 型	+	胃に原発, 仙骨に転移
33	♂	50	"	左 上 顎 骨	左上顎洞部全般に濃厚陰影	-	粘膜鼻腺に原発, 骨軟部組織に浸潤
34	♂	76	"	左 上 腕 骨	溶 骨 型	-	左肺に原発, 骨転移, 病的骨折(+)
35	♂	49	"	第 2 腰 椎	溶 骨 型	-	前立腺に原発, 腰椎に転移

36	♀	33	〃	脊髓腫瘍(硬膜外)	骨陰影に著変なし	+	原発巣不明
37	♀	76	皮膚癌	右足背部	骨陰影に著変なし	-	骨転移(-)
38	♀	61	扁平上皮癌	左坐骨 右第3肋骨, 左第11, 12肋骨, 左肩胛骨, 左腸骨	溶骨型	-	子宮に原発, 坐骨に転移
39	♂	39	Grawitz氏腫瘍	第1, 4腰椎, 左大腿骨	溶骨型	-	副腎に原発, 骨に転移
40	♀	52	Grawitz氏腫瘍	右第3, 9肋骨, 第3胸椎, 第2腰椎	溶骨型	-	副腎に原発, 骨に転移
41	♂	58	肝細胞癌	右大腿骨, 右脛骨	溶骨型	-	肝に原発, 骨に転移
42	♂	64	悪性無色素性黒色腫	右第2肋骨	溶骨型	-	原発巣不明, 病的骨折(+)
43	♂	46	骨髄腫	第7, 8胸椎	溶骨型	-	肝及び脾腫大(+)
44	♀	33	〃	左大腿骨, 左脛骨	溶骨型	-	
45	♀	12	悪性骨巨細胞腫	左上腕骨	溶骨型	-	
46	♂	9	細網上皮腫	右上腕骨	骨透明像	-	
47	♂	22	良性骨巨細胞腫	右大腿骨	骨透明像	-	
48	♂	25	〃	右大腿骨	骨透明像	-	
49	♂	23	〃	左大腿骨	骨透明像	-	
50	♂	19	〃	右大腿骨	骨透明像	-	
51	♂	70	〃	左大腿骨	骨透明像	+	
52	♂	35	〃	左大腿骨	骨透明像	-	
53	♂	21	〃	左脛骨	骨隆起像	+	
54	♀	69	軟骨性外骨腫	左恥骨	骨隆起像	-	
55	♂	30	〃	両大腿骨, 両脛骨	骨隆起像	-	
56	♂	15	〃	右排骨	骨隆起像	-	
57	♀	50	〃	右手根骨	骨隆起像	-	
58	♀	42	内軟骨腫	右第4指基節骨	骨透明像	-	
59	♀	15	〃	右第2指基節部	骨透明像	-	
60	♀	20	〃	左第4指基節骨	骨透明像	-	
61	♀	33	線維性骨異形成症	頭蓋骨 両上腕骨, 左恥骨	骨硬化像 骨透明像	-	
62	♂	30	〃	下顎骨	骨硬化像	-	
63	♂	17	〃	下顎骨	骨硬化及び隆起像	-	
64	♀	30	軟骨腫	右第10肋骨	溶骨型	-	
65	♂	11	良性軟骨芽細胞腫	右脛骨	骨透明像	-	
66	♂	7	骨嚢腫	左第3中手骨	骨透明像	-	
67	♀	23	〃	左上腕骨	骨透明像	+	病的骨折(+)
68	♀	32	〃	右上腕骨	骨透明像	-	
69	♀	18	〃	左上腕骨	骨透明像	-	病的骨折(+)
70	♂	19	〃	右大腿骨	骨透明像	-	
71	♂	14	〃	左大腿骨	骨透明像	-	
72	♀	40	〃	右橈骨	骨透明像	-	

73	♀	50	"	左 脛 骨	骨 透 明 像	—	
74	♂	1	LettererSiwe 氏病		第2腰椎, 扁平化 第5, 6腰椎, 骨破壊像	—	前胸部, 腹部に発疹(+)
75	♀	22	脂 肪 腫	右 足 背 部	骨 変 形 像	—	皮下脂肪腫 足趾変形(+)
76	♀	15	脂肪腫性髄膜腫	脊髄腫瘍(髄内)	骨陰影に著変なし	—	
77	♀	16	神 經 鞘 腫	脊髄腫瘍(硬膜内, 髄外)	骨陰影に著変なし	—	
78	♂	23	骨 髄 炎	右 大 腿 骨	骨 透 明 像	+	瘻孔(-), 膿瘍形成(+)
79	♀	45	"	左 腓 骨	骨 膜 反 応 像	—	瘻孔(-)
80	♂	15	"	右 脛 骨	骨 透 明 像	—	瘻孔形成(-)
81	♂	17	Brodie 氏骨嚢瘍	左 大 腿 骨	骨 透 明 像	—	
82	♂	20	化膿性関節炎	右 股 関 節	骨 破 壊 像	—	瘻孔形成(+)
83	♂	32	肋骨 カリエス	左 第 1 肋 骨	骨 軟 化 像	+	膿瘍形成(+)
84	♂	68	脊 椎 カリエス	第 5, 6 胸 椎	骨 破 壊 像 椎間腔狭小	+	膿瘍形成(+)
85	♀	41	"	第 5, 6 胸 椎	骨 破 壊 像 椎間腔狭小	—	膿瘍形成(+)
86	♂	68	"	第 8, 9 胸 椎	骨 破 壊 像	—	膿瘍形成(+)
87	♀	60	結核性関節炎	左 膝 関 節	骨 破 壊 像	—	不良肢位強直, 瘻孔形成, 混合感染(+)
88	♀	11	リウマチ性関節炎	多 発 性	骨陰影に著変なし	—	RA Test(+) 赤沈↓
89	♂	16	"	多 発 性	骨陰影に著変なし	—	RA Test(±) 赤沈→
90	♀	44	"	左 足 関 節	踵 骨 棘 形 成	—	RA Test(-) 赤沈↓
91	♀	66	"	右 膝 関 節	顆 間 隆 起 変 形	—	RA Test(-) 赤沈↓
92	♀	48	仮 関 節	右 大 腿 骨	余 剰 化 骨	—	
93	♀	14	Recklinghausen 氏病	全 身	第6, 7頸椎変形 腰椎, 骨棘形成 左大腿骨, 尺骨, 骨改變腫, 全般に 骨萎縮像	—	Neurofibromatosis 軀幹両下肢に色素沈着 腫瘍(+)
94	♀	63	いたいたい病	全 身		—	
95	♂	40	頸腕症候群	左 上 下 肢	骨陰影に著変なし	—	
96	♂	58	痙性脊髄性麻痺	両 下 肢	骨陰影に著変なし	—	
97	♀	63	三叉神経痛	左 顔 面	骨陰影に著変なし	—	
98	♂	30	皮下組織線維化	右 下 腿	骨陰影に著変なし	—	打撲後遺症による
99	♂	30	Dupley 氏病	右 肩 関 節	骨陰影に著変なし	—	
100	♀	55	Dupley 氏病	左 肩 関 節	骨陰影に著変なし	—	RA Test(-) 赤沈→
101	♂	49	脊 椎 迂 り 症	第 7 頸 椎	第7頸椎前方に転位	—	
102	♂	17	椎間板ヘルニア	腰 部	骨陰影に著変なし	—	
103	♀	18	"	腰 部	骨陰影に著変なし	—	
104	♀	34	"	腰 部	骨陰影に著変なし	—	
105	♀	53	ガングリオン	右 膝 窩 部	骨陰影に著変なし	—	
106	♀	56	オステオコンドロマトーシス	左 肩 関 節	左肩関節内米粒状 濃厚陰影多数	—	
107	♂	38	筋々膜痛	腰 部	骨陰影に著変なし	—	RA Test(+) 球沈→
108	♂	38	"	腰 部	骨陰影に著変なし	—	RA Test(±) 赤沈→
109	♀	39	"	腰 部	骨陰影に著変なし	—	RA Test(-) 赤沈→

110	♂	39	〃	腰部	脊椎側彎症	-	RA Test(-) 赤沈→
111	♀	48	〃	右大腿部	骨陰影に著変なし	-	RA Test(-) 赤沈↓
112	♀	48	〃	右腓腹筋部	骨陰影に著変なし	-	RA Test(-) 赤沈→
113	♀	14	筋硬結症	両腓腹筋部	骨陰影に著変なし	-	RA Test(-) 赤沈→
114	♀	28	〃	両腓腹筋部	骨陰影に著変なし	-	RA Test(-) 赤沈↓
115	♂	31	〃	両肩部	骨陰影に著変なし	-	RA Test(-) 赤沈→
116	♂	42	筋肉痛	右上肢	骨陰影に著変なし	-	RA Test(-) 赤沈→
117	♀	67	変形成関節症	両膝関節	膝関節部骨棘形成	-	RA Test(+) 赤沈↓
118	♀	18	脊椎過敏症	背部	脊椎側彎症	-	赤沈→

- 〔注〕 (1) レ線所見及び備考欄の症状は、すべて採血時のものである。
 (2) レ線所見の記載は、例えば骨腫瘍の如く、溶骨性の像と造骨性の像が混在する場合には主たる所見のみを記載した。
 (3) 赤沈値の記載は1時間値 15mm 以内は→で、15mm 以上は↓で示した。
 (4) RA-Testの成績は陽性 (+)、弱陽性 (±)、陰性 (-) と記載した。

三宅は種々なる抗血清作製法中 adjuvant による2回筋注法が抗体価の持続期が最もすぐれていると述べているので、その方式に従った。

著者は Freund の adjuvant 法に準じて、抗骨肉腫血清 (Anti-Osteogenic sarcoma-serum, Anti-Os. Sa.-serum と略す) を作製した。

{	骨肉腫患者血清 (蛋白量 80mg 相当)	2.0cc
	生理的食塩水	
	Falba oil	1.0cc
	流動パラフィン	2.0cc
	B.C.G. 死菌	4.0mg

以上の混合液を 50~55°C に熱しつつ攪拌、乳剤とし、体重 2.2~2.5kg の成熟家兔の両肩胛下腔に数箇所に分けて注射、更に1週間後再び同量の同乳剤を注射する。

第2回注射から3週後に、耳静脈から試験採血し、沈降反応重層法により抗血清の力価を測定し、その後も1週間隔で採血して力価を測定する。そのうち最高の力価を示すものを選んだ。

採血後分離した血清は、凍結保存する。

抗血清作製に際しては、家兔の個体差により抗体産生能が異なるため、同一患者血清につき、同時に2羽宛の家兔を免疫した。4例の骨肉腫患者血清につき、それぞれ2羽宛の家兔を免疫した。

かくして得られた抗骨肉腫血清を、Ouchterlony 法によって、抗原として用いた骨肉腫患者血清と反応させ、最も鮮明な沈降線パターンを生じるものを選び出し、以下の実験に用いた。

(2) 抗血清の力価測定

(1) の如くして得られた家兔抗血清について、100倍稀釈液から出発して倍々稀釈液を作り、抗原として用いた患者血清と反応させる。反応は試験管内で沈降反応重層法を用い、室温で行ない、1時間後に判定する。

倍々稀釈液の系列番号を n とする。すなわち ×100 を1、×200を2、×400を3……とする。また第1回に採血した抗血清を S₁、第2回に採血したものを S₂ とすれば、S₁ では n=5、S₂ では n=10、S₃ では n=11、S₄ では n=11、S₅ では n=13、以下 S₁₂、S₁₃ の場合でも n の値は13前後を示す。

それ故、実際の実験に用いた抗血清は、S₆~S₁₂ の間のものであった。

(3) 吸収抗骨肉腫血清の作製

抗骨肉腫血清に、相当量の正常人血清を加え、室温で12時間反応させた後、4°C の氷室内に24時間放置し、生じた混濁を遠心除去し、上清を吸収抗骨肉腫血清 (Absorbed Anti-Osteogenic sarcoma-serum, Abs. Anti-Os.Sa.-serum と略す) とする。

吸収抗骨肉腫血清を調製するには、抗骨肉腫血清 1cc に正常人血清を 0.1cc、0.2cc、0.3cc、0.4cc、0.5cc、0.6cc を加え (0.3cc 以上を加える時は 0.1~0.2cc 宛 2~3回に分けて行なう。) 上述の如く反応させ、その上清液と正常人血清とを Ouchterlony 法によって反応させ、沈降線を生じなくなった最少正常人血清量を適量とする。

著者の実験では、吸収に要する最少正常人血清量は、抗血清 1.0cc に対し 0.4cc であった。

(4) Agar gel diffusion 法 (Ouchterlony 法)

寒天ゲル中の抗原抗体反応は、Oudin (1946) によつて、試験管内寒天ゲル中の劃期的な研究が発表されるに及んで飛躍的な進歩を遂げると共に、これによつて今日の gel diffusion 法の基礎が築かれた。gel diffusion 法の原理とする所は、抗原または抗体の組成因子は、それぞれ固有の拡散係数を有するという事実に置かれている。したがつて寒天ゲル中に出現する沈降線の数によつて、抗原または抗体の組成を分析することが可能となつた。次いで Ouchterlony (1948) は gel diffusion 法の原理を更に二次元的空間に広げ、シャーレの中で固化させた寒天中で抗原抗体反応を行なう方法を発表した。Oudin 法が tube technique または simple diffusion technique といわれるのに対して、Ouchterlony 法が plate technique または double diffusion technique といわれる所以である。Ouchterlony 法は単に抗原、抗体組成の分析にすぐれた方法であるばかりでなく、相隣る資料間の免疫学的な異同を同定し得る利点があり、最近では血清学の研究、特に抗原、抗体分析に広く応用されている。

著者も先ず Ouchterlony 法を利用して実験を行なつた。

図 1

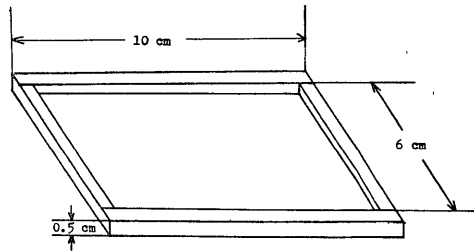


図1の如く、縦 10cm、横 6cm、高さ 0.5cm のプラスチック枠を作り、これを手札形写真用ガラス乾板にパラフィンで固定する。

- 4%寒天ブロック 10g
- PB_{7.6}Na_{1.7} 15cc
- 1000倍マーズニン水 3cc
- 蒸溜水 2cc

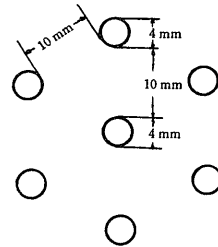
(註)

- PB_{7.6}Na_{1.7}
 - PB_{7.6} μ 0.12
 - 100cc
 - NaCl 1.25g
- Na₂HPO₄·12H₂O 13.5g
 - 1M·NaH₂PO₄ 6.0cc
 - 水を加えて 1l とする。

上記を加温溶解し、数枚重ねたガーゼで濾過する。濾液を前記の枠内に流し、固化後に使用する。

抗原抗体反応を行なわせるためには、適当な抗原抗体比が必要である。そのために先ず寒天平板に穿つ抗原及び抗血清用の well の大きさ、配列の種々なる組み合わせで実験を行ない、その中から最適なものとして、図2の如き条件のものを選んだ。

図 2



中央の well には抗血清を、周囲の6個の well には被検血清を充たして、恒湿の箱に入れ、室温で反応せしめ、24時間、48時間、72時間、7日間に沈降線の状態を観察し、適宜写真撮影を行なう。

沈降線は24~36時間目から現われ始め、72時間でほぼ完全に出揃う。

(5) 免疫電気泳動法 (Immunoelectrophoresis)

Ouchterlony (1948) によつて基礎づけられた寒天ゲル中の抗原抗体反応は、更に Grabar, P. & Williams, C. A. によつて始められた免疫電気泳動法によつて、複雑反応系の解析に飛躍的な進歩をもたらされた。

免疫電気泳動法では、先ず抗原を寒天ゲル中で電気泳動的に分画し、次いでこれに対応する抗血清を作用させ、寒天層中の沈降反応によつて抗原を分析する。本法によれば、抗原各分屑の電気易動度を知り得、問題とする抗原組成が albumin, α, β, γ-globulin のいずれに相当するかを定め得る利点がある。

したがつて著者も Ouchterlony 法によつて解析した血清を、更に免疫電気泳動法によつて解析することを試みた。

実験に際しては、あらかじめ下記の如く Veronal 緩衝液を調製する。

- 1/10Mol Veronal Soda 770cc
 - 1/10N-HCl 230cc
- (pH 8.2, μ=0.1)

反応用寒天メジウムとしては

- 4%寒天ブロック 30.0g
- Veronal 緩衝液 22.5cc
- 蒸溜水 28.5cc
- 1000倍マーズニン水 9.0cc

上記のものを水浴中で時々攪拌しながら十分に熱

し、溶解後熱いうちに数枚重ねたガーゼで濾過する。濾液 30cc を手札形写真用ガラス乾板 (8.0×12.0cm) に置くと厚さ約 0.3cm となる。充分固化せる後、この寒天平板に、図 3 の如く被検血清用の well を 2 個作る。

図 3

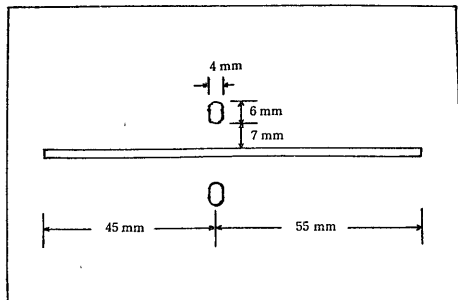
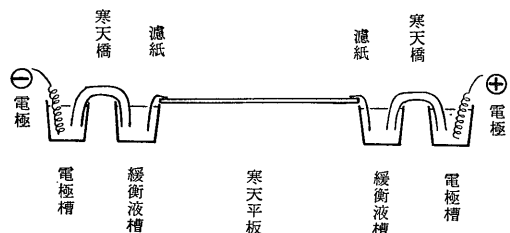


図 4



この寒天平板を図 4 の如き装置で定電流発生装置につなぎ、電気泳動を実施する。

電極としては、直径 0.8mm、長さ 50cm の銀線を螺旋状として用いる。

電極槽には 5% KCl 液を、緩衝液槽には 2 倍希釈した Veronal 緩衝液を入れる。

寒天ブリッジは U 字形にしたガラス管に、5% の割合に KCl を加えた 2% 寒天を充たし、寒天が固化した後を用いる。

寒天平板の両側の濾紙 (東洋濾紙 No.50) を緩衝液に浸し、15 分間放電した後、抗原用の well に被検患者血清を充たし、放電を開始する。

この寒天平板で 15mA 流す。電圧は最初 70~80 volt を示すが次第に下り、10~15 分後より 50~55 volt となり、この状態が続く。15mA、50~55 volt で 1.5 時間泳動する。

電気泳動終了後、図 3 の如く寒天平板の中央部に 0.2cm×10cm の抗血清溝を作り、これに抗血清を充たす。

抗血清溝に非吸収抗骨肉腫血清及び吸収抗骨肉腫血清を入れた場合について実験を行なう。

寒天平板は恒湿の箱に入れ、室温で反応させ、日を

追って観察する。抗血清溝の周辺には、24~36 時間後より弧状の沈降線が現われ始め、48 時間後にはほぼ完全に出揃う。

実験成績

〔I〕 Ouchterlony 法による成績

実験成績を述べる前に、成績の判読に必要な基礎的事項を記しておく。

(i) 沈降線の位置

抗原各因子固有の拡散係数によつてきまらるが、これに大きな影響を与えるものは、抗原と抗体との相対濃度である。すなわち抗原濃度が抗体濃度に対して相対的に高い時 (抗原過剰) は沈降線は抗血清池に近く出現し、抗血清池側に広がって行き、逆に抗体濃度が高い時 (抗体過剰) は、沈降線は逆の関係となる。抗原、抗体が最適比の状態にある時は、沈降線は鮮鋭な細い線状となる。

(ii) 沈降線の濃度

抗原、抗血清とも濃度の増す時は、沈降線は濃くなり、その幅を増す。

(iii) 沈降線出現までの時間

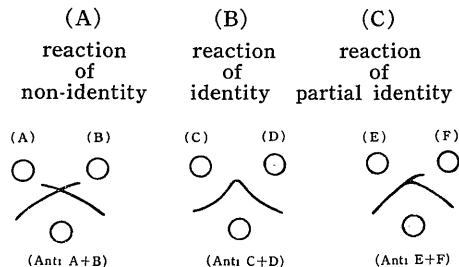
抗原、抗血清ともに濃度の高い時は出現が早く、濃度の低い時は遅い。

(iv) 相隣る資料間の相互関係

図 5 (A) に示す如く、左右の沈降線が交叉する時 (A)、(B) は免疫学的に異なったものと考え、図 5 (B) の如く左右の沈降線が互いに連続する時は (C)、(D) は免疫学的に同一のものとして解し、図 5 (C) の如く一方の沈降線の中に他方が入り込むような時は、前者の一部と後者は免疫学的に共通であるといえる。

(A) を不一致反応、(B) を一致反応、(C) を部分的な一致反応と呼ぶ。

図 5



(v) 沈降線の数と反応系の数との関係

複雑反応系では、少なくとも沈降線の数に相当する独立の反応系があると考えられている。しかし各沈降線は、抗原抗体の最適比濃度で最も鮮明に出現するの

であるから、正確に反応系の数を決定するには、抗原濃度を種々に変えて抗血清と適当に組み合わせ総合的に判断する必要がある。

実験 (1)

抗骨肉腫血清と正常人血清及び骨肉腫患者血清を反応させると、24~36時間から沈降線が現われ始め、48時間後には図6の如く、その中心部には帯状の沈降線のパターンを示し、その周辺に正常人血清では3本、骨肉腫患者では3~4本の沈降線が認められる。この状態は、更に72時間観察しても変化しない。

この実験で認められる中心部すなわち抗血清池周辺の帯状の沈降線のパターンは、単一の反応系によるものではなく、幾つかの反応系の集合したものと考えられる。またその周辺に生じる鮮鋭な沈降線を考慮に入れても、骨肉腫と正常人または他の疾患とを区別することは困難であるので、次の実験を行なった。

第2表 免疫反応の成績

診 断	例数	免疫学的反応		陽性率 (%)
		陽性数	陰性数	
骨 肉 腫	20	15	5	75.0
軟 骨 肉 腫	3	1	2	33.3
リンパ肉腫	3	2	1	66.7
線維肉腫	1	1	0	100.0
細網肉腫	1	0	1	0
Ewing肉腫	1	0	1	0
皮膚肉腫	1	0	1	0
肉腫以外の悪性腫瘍	16	3	13	18.8
良 性 腫 瘍	31	3	28	9.7
腫瘍以外の疾患	41	3	38	7.3
正 常 人	10	0	10	0

実験 (2)

先述の方法で調製した吸収抗骨肉腫血清を用いた場合、当然のことながら正常人血清との間には沈降線は出現しない。しかし図7に示す通り、抗原池に骨肉腫患者血清及びその対照として、骨巨細胞腫、Grawitz氏腫瘍、皮膚癌の患者血清を入れ、吸収抗骨肉腫血清と反応させると、対照に用いた血清の間には沈降線を生じないが、骨肉腫患者血清の間には1本の鮮鋭な弧状の沈降線を生ずる。

更に図8に示す如く、6個の抗原池にそれぞれ異なった骨肉腫患者血清を入れ、吸収抗骨肉腫血清と反応させると48時間後には、全例にそれぞれ1本宛の沈降線を生ずる。

この沈降線は、症例によりその長さ、幅には差があ

るが、相隣る沈降線は互いに一点で融合し、いわゆる一致反応の形態を示す。

しかし骨肉腫でも症例によつては、図9の如く沈降線を認めないものがあり、その陽性率は、表1、表2に示す如く、20例中15例(75%)であつた。

この沈降線が骨肉腫に特有なものであるか否かを検索するために、骨肉腫以外の疾患についても同じ条件で実験を行なうと、図10の如く、骨肉腫以外の疾患でも骨肉腫の場合とほぼ同様の沈降線を示すものがあつた。その不合理陽性率は、表1、表2に示す如く、骨肉腫以外の症例98例中13例(13.3%)であつた。この沈降線が骨肉腫に認められる沈降線と同じものであるか否かを検索するために、図11の如く、骨肉腫と、骨肉腫以外の疾患で沈降線を生ずる症例とを同時に反応させると、生じた沈降線は互いに一点で融合し、いわゆる一致反応の形態を示す。

更に吸収抗血清との間に沈降線を生ずる数例について、被検血清の倍々稀釈液を作り、吸収抗骨肉腫血清と反応させた。その結果、骨肉腫血清では32~64倍に稀釈した場合でも沈降線を生ずるが、これに対し良性腫瘍症例では2~4倍稀釈までは陽性、骨肉腫以外の悪性腫瘍症例では8~16倍稀釈までは陽性であつた。

すなわち骨肉腫症例と非骨肉腫症例とはかなりの量の差異が認められる。

〔II〕免疫電気泳動法による実験成績

実験成績を述べる前に、成績の判読に必要な基礎的事項を記しておく。

寒天層中で電気泳動的に分画された抗原蛋白分屑と対応抗血清との間には弧状の沈降線が生ずる。

この沈降線の性状及び抗血清溝からの距離は、抗原分屑と抗血清との相対濃度に影響される。すなわち抗原が対応抗体に対して、相対的に過剰の時は、沈降線は抗血清溝に近く現われ、しかも太い帯状を示し、極度に過剰の時は、抗血清溝を越えて広くぼやける。両者の濃度が最適比の時は明確な弧状を呈し、両者の濃度をバランスを保ちながら増すと、沈降線も濃くなる。またこれらの逆の関係も成り立つ。

実験 (1)

先述の如く作製した電気泳動用寒天平板の抗原池の一方に正常人血清を、他方に Ouchterlony 法で免疫反応陽性を示した骨肉腫患者血清を充たして電気泳動を行なった後、抗骨肉腫血清と反応させると、図12の如くなる。すなわち正常人血清側には6本、骨肉腫患者血清側には7本の弧状の沈降線を生ずる。両者の差は β -globulin 位に現われる1本の沈降線である。(図12↓印) この1本の沈降線は Ouchterlony 法に

出現した1本の沈降線に相当するものと思われる。そこで Ouchterlony 法で行なつたと同様に、吸収抗骨肉腫血清を用いて実験を行なつた。すなわち抗原池の一方に正常人血清を、他方に免疫反応陽性を示す骨肉腫患者血清を充たし、電気泳動終了後吸収抗骨肉腫血清と反応させると、図13の如く、正常人血清側には沈降線を生じないが、骨肉腫患者血清側には、非吸収抗骨肉腫血清を用いた実験で、正常人血清と骨肉腫患者血清の差として現われた沈降線の出現部位、すなわち β -globulin 位に一致して1本の鮮鋭な弧状の沈降線を生ずる。

この沈降線は Ouchterlony 法で免疫反応陽性を示した、他の骨肉腫症例を用いた実験でも図14の如く出現する。

実験 (3)

免疫電気泳動法による反応終了後、寒天平板を乾燥させると、ガラス板に寒天の薄片の密着した標本が出来る。

吸収抗骨肉腫血清を用いた実験で1本の弧状の沈降線を生じた骨肉腫の症例について、その沈降線の化学的性状を検討するために、上記の如き乾燥標本作製し、以下の如き染色を行なつた。蛋白染色には Bromphenol Blue 染色、糖染色には PAS 染色、脂肪染色には Sudan Black 染色を用いた。

(i) Bromphenol Blue 染色 (B.P.B.)

B.P.B.	0.05g
昇 汞	1.0g
醋 酸	2.0g

蒸留水で 100cc とする。染色時間は 30~60 分で、脱色には 2.0% 醋酸を用いる。

(ii) PAS 染色

3.0% 過ヨード酸液	5~30分
水 洗	60分
Schiff 氏試薬	15~30分
亜硫酸水	1.5分宛 3回
流水にて水染	10分

(iii) Sudan Black 染色

染色液： 60% アルコールに Sudan Black を飽和させたもの

分別液： 50% アルコール

以上3種の染色法を実施すると、骨肉腫患者血清に問題の β -globulin 位に現われる沈降線は、B.P.B. 染色では藍色に濃染する。PAS 染色には赤染する。また Sudan Black 染色では黒色に濃染する。問題の沈降線はいずれの症例の場合でも、上述の如く染色された。

考 按

従来担腫瘍動物または担腫瘍患者の血液、尿、腹水などについて、免疫学的方法を用いての研究が多数報告されている。

Darcy は Ouchterlony 法により Walker 腫瘍をもつラット血清と正常ラット血清を比較している。正常ラット血清に対する家兎抗血清を用いて反応した場合、腫瘍ラット血清に特有に出現する線 (K-line) が認められ、更に Walker 腫瘍ラット血清に対する家兎抗血清を用いた場合、その差異は更に明瞭となることを述べている。

建部らはダイコクネズミに p-dimethylaminoazobenzene を投与して肝癌を発生せしめ、その癌化過程について免疫学的研究を行ない、ダイコクネズミの肝癌血清中には、正常ネズミの血清には見られない組成のあることを確認している。

石川、高柳らは Ehrlich 腹水癌をもつハツカネズミ体液を免疫電気泳動法により解析している。それによると腹水中には3種の特異抗原因子が存在し、そのうちの2因子は或る種の mucoprotein 及び一部 lipoprotein が関与していると述べている。更に石川らは癌患者血清に関して検索を続け、胃癌、子宮癌等各種の癌について、特異的抗原組成の存在を明らかにしている。

板倉らは胃癌を主とする人癌組織を正常部と癌部に分け、それらの全ホモジネートで抗血清を作り、抗原にはホモジネートの遠心上清にトリプシン処理を加えたものを用い、免疫化学的解析を行ない、胃癌に特異な1本の沈降線を認めている。しかし胃正常部抽出物には胃癌のない沈降線があり、発癌に伴ない simplification と complication が同時に起るとしている。また他臓器癌の抗血清に対しては、胃癌は特異沈降線を示さなかつたと述べている。

三宅は白血病患者血清を抗原として家兎抗血清を作り、白血病患者血清には正常血清に見られない2種の特異な β -globulin 因子が存在し、更にその特異因子によつて骨髓性、リンパ性、単球性のいずれの病型に属するかを鑑別し得ると述べている。

その他にも担腫瘍動物または癌患者体液に関する多くの報告があるが、骨肉腫に関する免疫学的研究は殆んど報告されていない。

癌血清と同様に骨肉腫血清にも何らかの特異的抗原因子が存在するのではなからうか。その吟味の過程において著者は骨肉腫患者血清に、他の患者に比し高度に出現する抗原因子の存在を確認した。

著者の実験で Ouchterlony 法に抗骨肉腫血清を用

いた場合、骨肉腫患者血清と非骨肉腫患者血清または正常人血清を比較すると、前者では他の疾患の患者血清に現われない1本の沈降線が認められる。しかし多くの場合、諸沈降線は錯綜してその1本を明らかに鑑別することは困難である。

しかし、いわゆる吸収抗骨肉腫血清を用いて比較すると、残存する1本の沈降線として、両者の相違を認めることが出来る。この沈降線は Ouchterlony plate において、抗血清池と抗原池のほぼ中央部に出現する弧状の沈降線のパターンであり、幾つかの骨肉腫の症例を同時に比較すると、それぞれの症例により現われる沈降線の長さ、幅、濃度には多少の差があるが、相隣る資料間に現われる沈降線は互いに一点で融合し、いわゆる一致反応の形態を示し、それらが免疫学的には同一の組成を有するものであることを示している。

この沈降線は、骨肉腫症例では75%に出現する。且つこの出現率は表2に示す如く、骨肉腫以外の疾患ではかなり低い。

しかしリンパ肉腫、線維肉腫では、観察症例は少ないが、表2の如き出現率を示し、その血清の免疫学的性状には骨肉腫血清と共通する何らかの因子が存在する可能性も考えさせる。

肉腫以外の悪性腫瘍で同じ沈降線を生じたものは、胃癌2例、脊髄腫瘍1例で組織学的にはいずれも adenocarcinoma であり、且つ胃癌の2例は骨転移を伴ったものである。

良性腫瘍でこの沈降線を認めたものは、外骨腫1例、骨嚢腫1例、骨巨細胞腫1例であるが、骨嚢腫及び骨巨細胞腫の症例は、いずれもレ線学的に高度の骨破壊像を呈したものである。

腫瘍以外の疾患でこの沈降線を認めた症例は、骨髄炎1例、肋骨カリエス1例、脊椎カリエス1例で、いずれも慢性炎症症状を呈したものである。

このように骨肉腫以外の疾患で問題の沈降線を生ずる症例は、その診断は区々であるが、共通して骨破壊が著明であり、この抗原因子が骨破壊に関係のあることを示唆している。しかし軟部組織に発生したリンパ肉腫症例の如く、全く骨破壊を伴わない症例にも反応陽性のことがあるので、骨破壊のみが原因と断定することは出来ない。

骨肉腫の沈降線とその他の疾患に現われる沈降線が、全く同様の組成を有するものであることは、Ouchterlony 法でいわゆる一致反応の形態を示すことから明らかであるが、更に被検血清を倍々稀釈で定量的に検すると、検索した7例では、いずれも骨肉腫の場合32~64倍稀釈まで陽性、非骨肉腫症例では8~16倍

稀釈まで陽性、すなわち前者血清にかなり増加していると判断される。このことは骨肉腫とその他の疾患とを鑑別する一つの拠り所とならう。

Ouchterlony 法で現われた沈降線を更に解析するために Grabar, P. らによる Immuno-electrophoresis を実施した。

先ず正常人血清と骨肉腫患者血清とを対比して電気泳動を行ない、抗骨肉腫血清と反応させると、両者の差としては β -globulin 位に属する1本の沈降線が認められる。更に吸収抗骨肉腫血清と反応させると、当然のことながら正常人血清との間には沈降線を生じないが、骨肉腫血清との間には β -globulin 位に1本の弧状の沈降線を認める。この沈降線は Ouchterlony 法で認められた沈降線に相当するものである。

これに Bromphenol Blue 染色、Sudan Black 染色を行なうと沈降線はいずれにも濃染し、lipoprotein であることを示し、更に PAS 染色を行なうとこれまた陽性なので一部は糖質にも関与することを示している。

以上の如く、著者が骨肉腫患者血清に認めた沈降線は、他の疾患の血清中にもほぼ同じ性状のものを認めることがあるので、これを以て骨肉腫に特異的とすることが出来ないが、その出現率は骨肉腫に最も高く、且つ著しく増量している。この意味で骨肉腫に特徴的な因子とみなすことが出来よう。

総 括

骨肉腫患者血清により家兎を免疫し、得られた抗血清を用い Ouchterlony 法及び免疫電気泳動法により骨肉腫、骨肉腫以外の腫瘍、腫瘍以外の疾患の血清について抗原分析を行ない、次の結果を得た。

1) Ouchterlony 法により骨肉腫血清に特徴的な抗原因子の存在を確認した。

2) 免疫電気泳動法により、その因子が β -globulin 位に属するものであることを確認した。

3) この因子の組成は lipoprotein 及び一部糖質が関与しているものと判断される。

4) この因子は骨肉腫以外の疾患にも認められることがあるが、量的には骨肉腫血清に最も多く含まれている。

5) この因子が骨肉腫以外の疾患の血清に認められる場合、その多くはレ線学的に高度の骨破壊を伴う症例である。

稿を終るにあたり、御懇篤な御指導を賜わった 恩師 高瀬武平教授並びに 本学第二病理学教室石川大刀雄教授に深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 荒川 弥 : 十全医会誌, 70, 354 (1964).
- 2) 朝倉志良 : 十全医会誌, 掲載予定.
- 3) Darcy, D. A. : Nature, 176, 643 (1955).
- 4) Freund, J. : Ann. Rev. Microbiol., 1, 291 (1947).
- 5) Freund, J., Thomson, K. J., Hough, H. B., Sommer, H. E. & Pisani, T. M. : J. Immunol., 60, 383 (1948).
- 6) Gordon, A. H., Keil, B. & Sebesta, K. : Nature, 164, 498 (1949).
- 7) Grabar, P. & Williams, C. A. : Biochim. Biophys. Acta, 17, 67 (1955).
- 8) Haman, R. & Oyama, J. : J. Immunol., 73, 49 (1954).
- 9) 石川大刀雄・高柳尹立 : 日新医学, 44, 361 (1957).
- 10) 市川 取 : 細胞化学 (改訂増補版), 東京, 日本教学出版株式会社 (1957).
- 11) Itakura, K. : Gann, 54, 93 (1963).
- 12) 影山成章 : 日新医学, 45, 89 (1958).
- 13) 建部守昭 : 十全医会誌, 66, 249 (1960).
- 14) 片山 謙 : 日医大誌, 23, 449 (1959).
- 15) Korngold, L. & Van Leewen, G. : J. Immunol., 78, 172 (1957).
- 16) Kabat, E. A. & Mayer, M. M. : Experimental Immunochemistry, 2nd, ed., Springfield, Illinois, U.S.A., Bannerstone House (1961).
- 17) 松橋 直 : 日新医学, 45, 162 (1958).
- 18) 松橋 直 : 臨床病理, 特集, 第2号, 203 (1955).
- 19) 三宅康夫 : 倉敷中央病院年報, 第28年, 第1号, 38 (1959).
- 20) 三宅康夫 : 倉敷中央病院年報, 第28年, 第1号, 79 (1959).
- 21) 森 五彦・小林茂三郎 : 濾紙電気泳動法の実際, 第3版, 東京, 南江堂 (1960).
- 22) Moudgal, N. R. & Li, C. H. : Arch. Biochem. Biophys., 95, 93 (1961).
- 23) Migita, S. & Putnam, F. W. : J. Exp. Med., 117, 81 (1963).
- 24) 右田俊介 : 日本臨床, 17, 547 (1959).
- 25) 長田昌明 : 日血会誌, 19, 698 (1956).
- 26) 大原 達 : 日新医学, 44, 138 (1957).
- 27) 岡 成二 : 医学研究, 22, 492 (1952).
- 28) 大矢昭夫 : 十全医会誌, 64, 387 (1960).
- 29) Pasqualini, C. D., Holmberg, E. A. D., Robasa, S. L. & Pavlovsky, A. : Cancer Res., 21, 387 (1960).
- 30) Rosenthal, F. D. & Soothill, J. F. : J. Neurol. Neurosurg. Psychiat., 25, 177 (1962).
- 31) 鈴木 鑑・木戸義昭 : 日新医学, 43, 342 (1956).
- 32) 鈴木 鑑 : 日新医学, 45, 154 (1958).
- 33) 鈴木 鑑・木戸義昭・櫻木静夫 : 日新医学, 45, 142 (1958).
- 34) 鈴木成美 : 日新医学, 45, 38 (1958).
- 35) 曾我美勝・桃谷好英・井上康夫 : 化学, 10, 851 (1955).
- 36) 佐藤 肇 : 医学のあゆみ, 28, 342 (1959).
- 37) Sorof, S., Cohen, P. P., Miller, E. C. & Miller, J. A. : Cancer Res., 11, 383 (1951).
- 38) 高柳尹立・朝倉志良・建部守昭・石川大刀雄 : Gann, 50, suppl., 232 (1959).
- 39) 高柳尹立 : 十全医会誌, 60, 701 (1958).
- 40) 田中生二 : 久留米医会誌, 22, 2549 (1959).
- 41) 武田勝男 : 日本臨床, 15, 1927 (1957).
- 42) 高井寛一 : 十全医会誌, 64, 414 (1960).
- 43) 和田武雄・大原弘通 : 日本臨床, 15, 520 (1957).
- 44) Weimer, H. E., Mehl, J. W. & Winzler, R. J. : J. Biol. Chem., 85, 561 (1950).
- 45) Wilson, M. W. & Pringle, B. H. : J. Immunol., 73, 232 (1954).
- 46) Wilson, M. W. & Pringle, B. H. : J. Immunol., 77, 324 (1956).
- 47) 弥永耕一 : 久留米医会誌, 17, 110 (1954).

Abstract

I have analyzed the sera of patients with osteogenic sarcoma, other various tumors and diseases by the agar gel double diffusion method (Ouchterlony) and immunoelectrophoretic method.

The antisera were prepared by the Freund's adjuvant method.

The results obtained were as follows :

- 1) I found that there was an existence of characteristic antigenic factor in the sera of patients with osteogenic sarcoma by the Ouchterlony's method.
- 2) By the immunoelectrophoretic method, it was confirmed that the factor corresponded to β -globulin fraction.
- 3) It was considered that the factor consisted of lipoprotein and was partly concerned

with polysaccharide.

4) Antigenic factor is also confirmed in the sera of patients with other various diseases, but its quantity was less in these cases than that of osteogenic sarcoma.

5) Except osteogenic sarcoma, most of the cases which had the antigenic factor, showed a strong destruction of bone in the roentgenograms.

附 図 説 明

- | | | | |
|----|---------------------------------------|-----|---|
| 図1 | Ouchterlony plate 用のプラスチック枠 | 図8 | " |
| 図2 | Ouchterlony plate の抗原及び抗血清用の well の配置 | 図9 | " |
| 図3 | 免疫電気泳動法の寒天平板の抗原池及び抗血清溝の配置 | (註) | 写真の(C)(D)の well 付近の白色の陰影は抗原血清が溶血していたためヘモクロビンが浸出して生じたもので免疫反応とは関係がない。 |
| 図4 | 免疫電気泳動装置 | 図10 | Ouchterlony 法による実験 |
| 図5 | Ouchterlony 法における沈降線パターンの模式図 | 図11 | " |
| 図6 | Ouchterlony 法による実験 | 図12 | 免疫電気泳動法による実験 |
| 図7 | " | 図13 | " |
| | | 図14 | " |

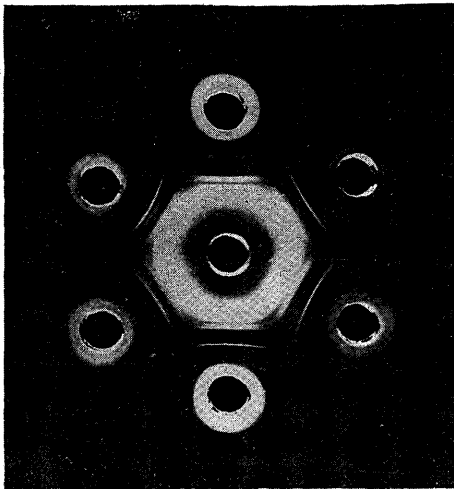
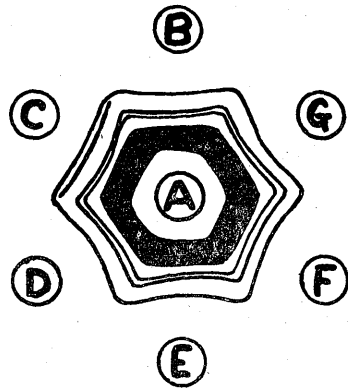


図 6



A: Anti-Os. Sa.-Serum E: Normal human
 B: Normal human F: Osteogenic sarcoma
 C: Osteogenic sarcoma G: Osteogenic sarcoma
 D: Giant cell tumor

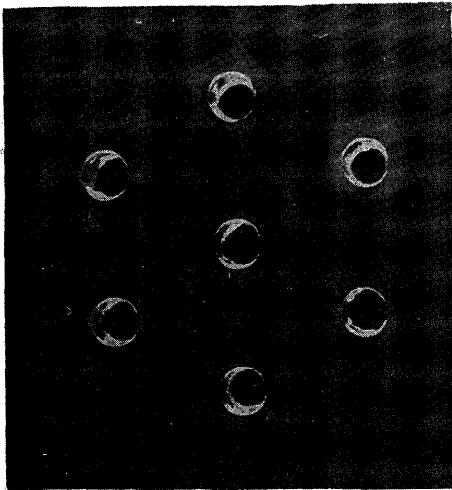
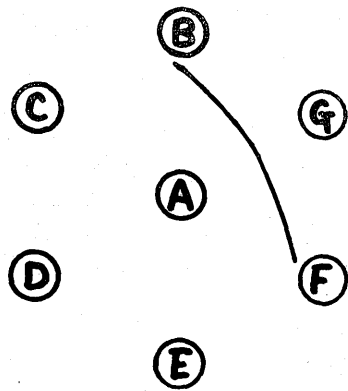


図 7



A: Abs. Anti-Os. Sa.-Serum D: Giant cell tumor
 B: Giant cell tumor E: Grawitz's tumor
 C: Giant cell tumor F: Carcinoma cutis
 G: Osteogenic sarcoma

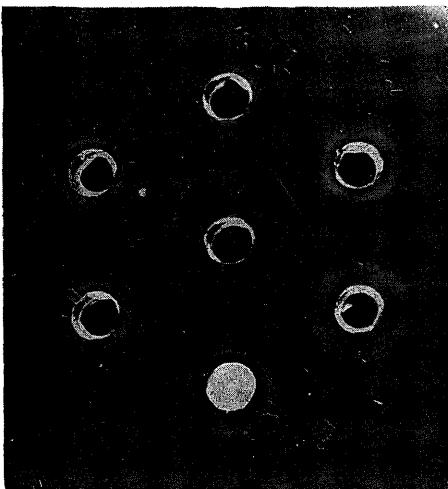
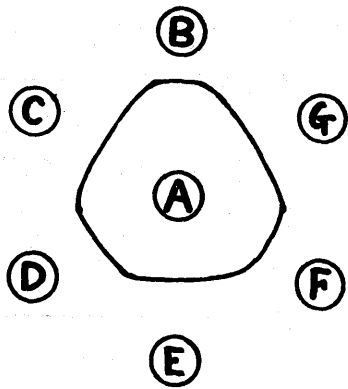


図 8



A: Abs. Anti-Os. Sa.-Serum D: Osteogenic sarcoma
 B: Osteogenic sarcoma E: Osteogenic sarcoma
 C: Osteogenic sarcoma F: Osteogenic sarcoma
 G: Osteogenic sarcoma

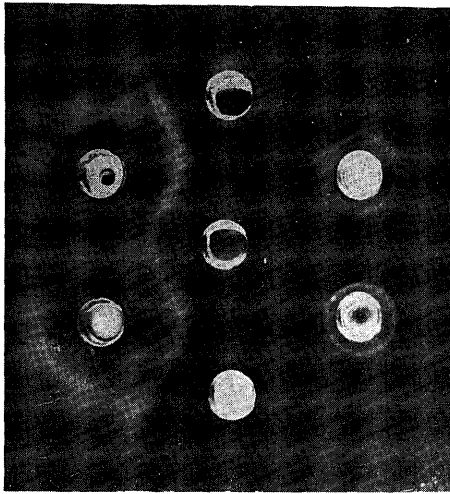
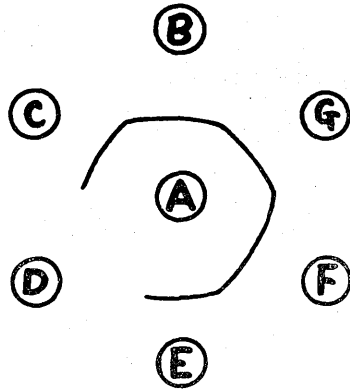


図 9



A: Abs. Anti-Os. Sa-Serum
 B: Osteogenic sarcoma
 C: Osteogenic sarcoma
 D: Osteogenic sarcoma
 E: Osteogenic sarcoma
 F: Osteogenic sarcoma
 G: Osteogenic sarcoma

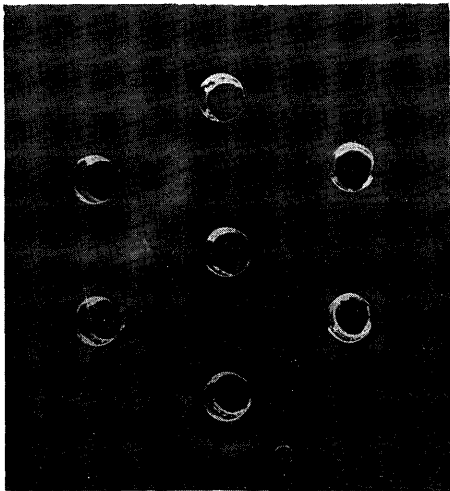
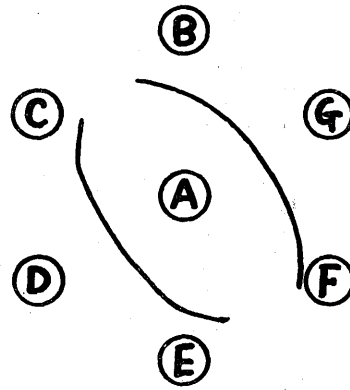


図 10



A: Abs. Anti-Os. Sa-Serum
 B: Osteogenic sarcoma
 C: Sarcoma cutis
 D: Osteomyelitis
 E: Osteogenic sarcoma
 F: Osteomyelitis
 G: Osteogenic sarcoma

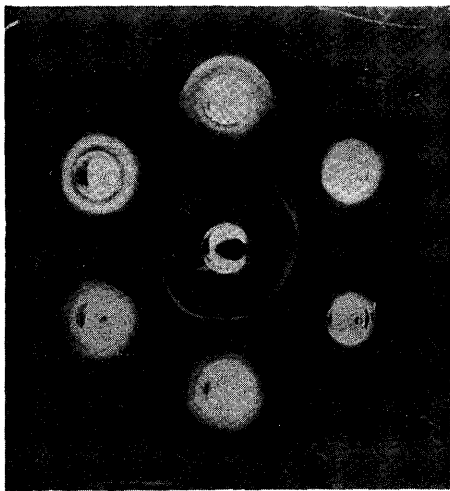
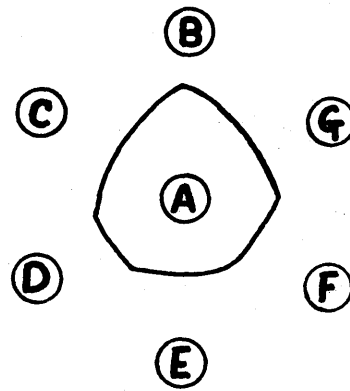
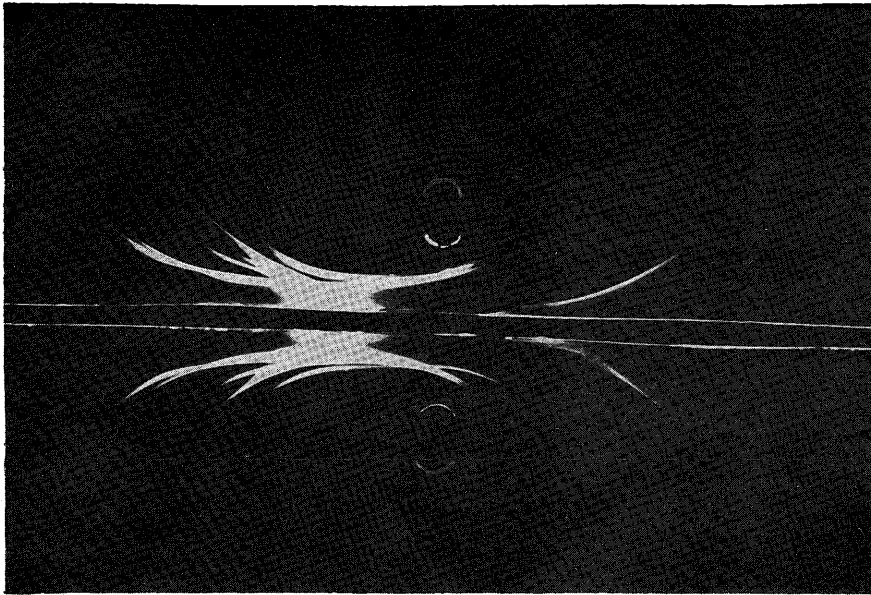


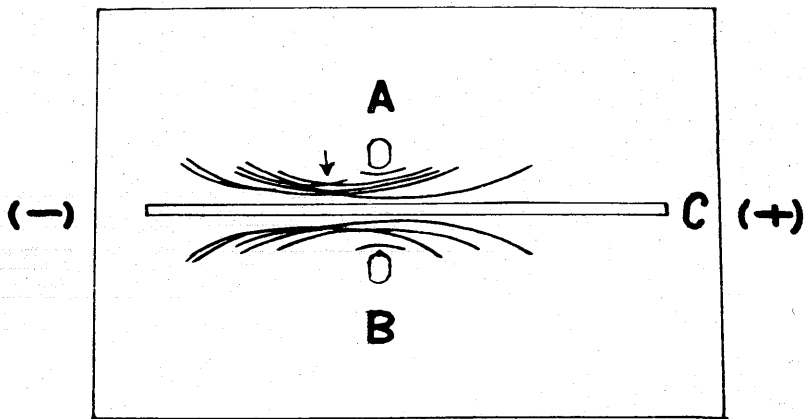
図 11



A: Abs. Anti-Os. Sa-Serum
 B: Osteogenic sarcoma
 C: Lymphsarcoma
 D: Spondylitis tuberculosa
 E: Lymphsarcoma
 F: Osteogenic sarcoma
 G: Caries of rib



☒ 12, a

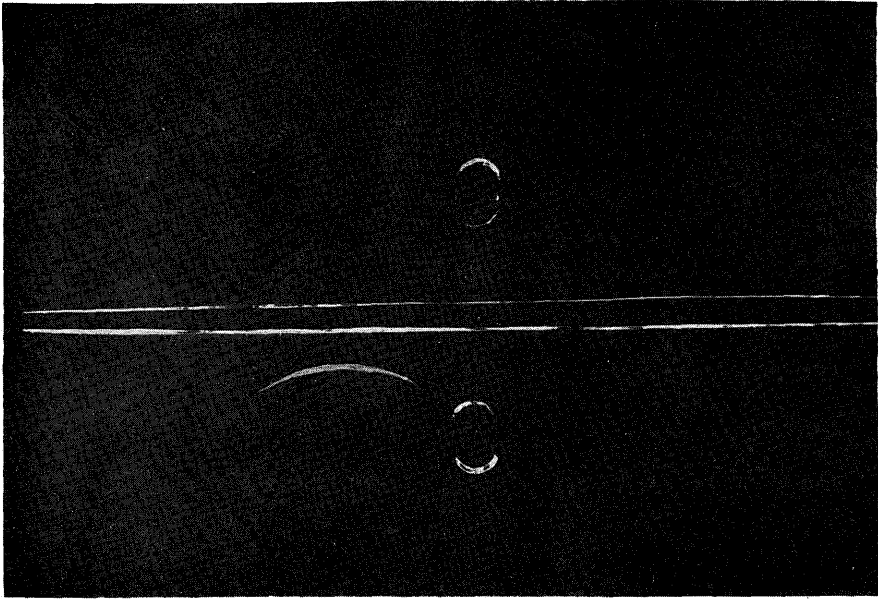


A: Osteogenic sarcoma-serum

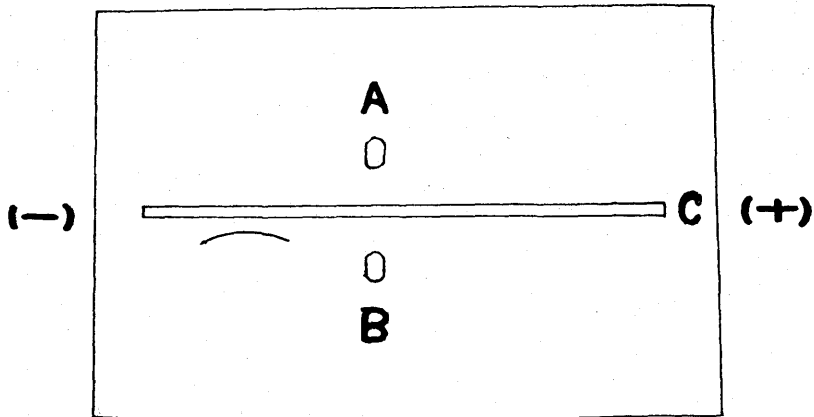
B: Normal human serum

C: Anti-Os. Sa.-serum

☒ 12, b

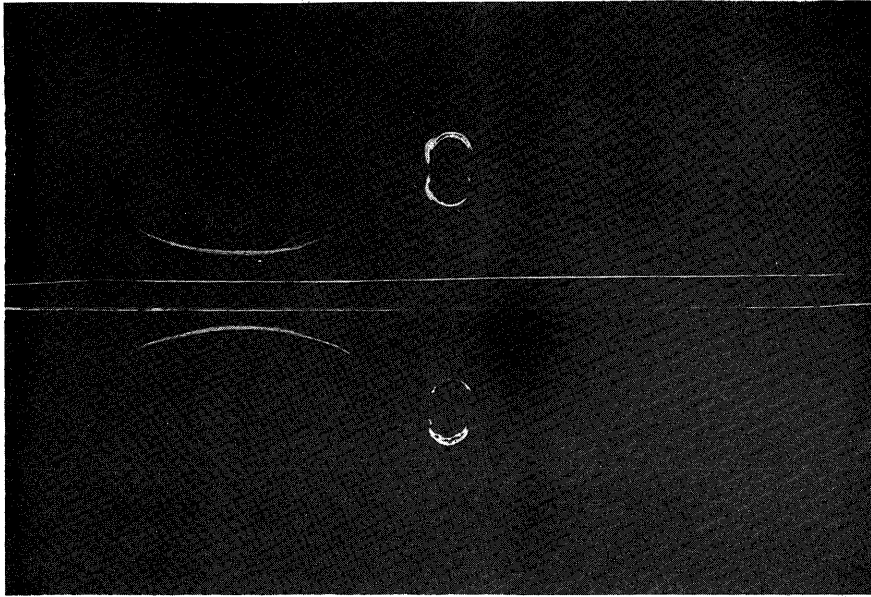


☒ 13, a

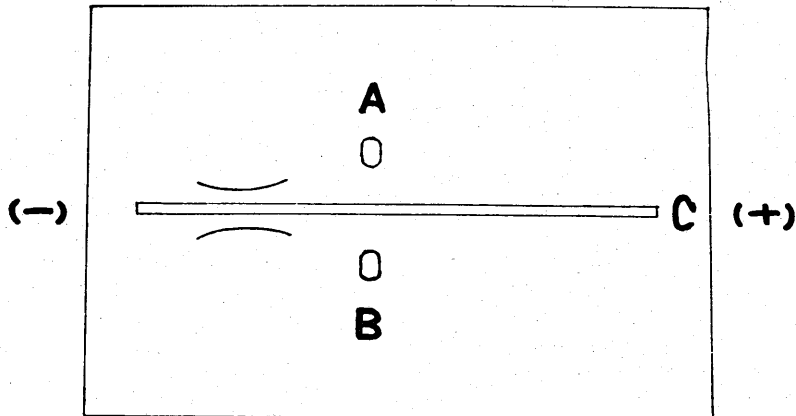


A: Normal human serum
 B: Osteogenic sarcoma-serum
 C: Abs. Anti-Os. Sa.-serum

☒ 13, b



☒ 14, a



A: Osteogenic sarcoma-serum
 B: Osteogenic sarcoma-serum
 C: Abs. Anti-Os. Sa-serum

☒ 14, b