

# 免疫溶血反応の溶血速度に関する研究

金沢大学医学部細菌学教室(主任 谷教授)

河 原 勳

*Isoo Kawahara*

(昭和29年1月5日受附)

(本稿は昭和23年第21回細菌学会で発せり)

## 緒 言

溶血作用の量的観測は古くより行われていた。Arrhenius は Ammonia の溶血を次の式に当てはめ  $Qt=k$  ( $Q$  = 用いた溶血剤の量  $t$  = 溶血を或る程度進行するに要する時間) 更に2~3の溶血剤を用い単分子反応と結論したが、彼の得た曲線は不正確の点で批判されているもの一方において Ehrlich と他方 Arrhenius 及び Madsen のこの問題についての論争は臨床医学に多くのものを教えている。その後多くの溶血剤が実験に供され化学的溶血剤は近年 Ponder<sup>1)</sup> 一派によつて広範囲な実験が行われているが、溶血素に関しては「単純な溶血作用の性質が知られない間に複雑な溶血素の実験から確実な結果を得ることの期待は意味のないことである」と極言している。かくの如き理由から免疫溶血反応は Manwaring<sup>2)</sup> の詳細な実験があるにも拘わらず得られた結論は軽微である。しかしこれらは単に溶血作用の終末点を観測している丈

で溶血速度を取上げていない。僅かに清川<sup>3)</sup> が速度についての論文を出しているが、これは(卅)(卅)(+)で表現されているのみで完全な量的計測ではない。竹中、光田<sup>4)</sup> は温度溶血作用曲線によりこの作用を仮性単分子反応と仮定して活性化エネルギーを求めている。この研究の性質上低温度にして反応を一時中止させ溶血量を測定しており動的な観測ではない。溶血の量的観測<sup>5)</sup> は顕微鏡で観察しこれを写真に記録する法、反応を一時中止させて求める時間に浮遊せる細胞を計算するか、遊離せるヘモグロビンを比色計にて計る法及び溶血現象の随伴現象を測定する間接法等があるが、動的に測定出来る可能性ある法はこの中一部に限られる。余は手製の比濁計を用い溶血速度を動的に観測し終末点の観測と異なつた意義を得られるものと考え実験した。

## 実 験 方 法

1. 溶血素 山羊血液を脱繊維し、食塩水にて3回洗滌した後50%浮游液となし1.0cc 宛隔日3回家兔耳静脈内に注射、最後の注射より数え任意の日数を置いて心臓穿刺採血して得た血清を55°.30分不活化し溶血単位を計りその日の中に使用する。

2. 血球浮游液 山羊血球浮游液を上記の方法で作る5%となし、これを予め比濁計で計測しておき、この実験全部に比濁計で測つた血球濃度を使用した。

3. 補体 採血後24時間の新鮮海蜃血清(補体)を用いた。溶血度は37°の水浴中に入れ30分毎に比濁計により連続計測を行う。

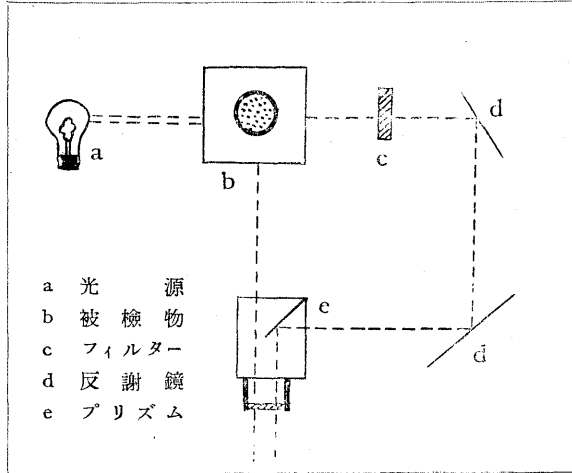
4. 各要素の使用容量

免疫溶血反応：5%血球浮游液4cc、溶血素0.5cc、補体0.5cc。

サポニン及び胆汁酸溶血反応：5%血球浮游液4.5cc、試薬(必要量に生理的食塩水にて薄める)0.5cc。

5. 比濁計 第1図の如き物を作り透明且つ凹凸なき試験管を使用し予め比濁計により同一の値を示す試験管のみを選択し、且つ観測する方向を一定させるために試験管に印をつける。

第 I 図



これによつて得られた曲線も手製の比濁計を用いたため溶血を起して血球が少なくなつた部分においては多少の不正確さを免がれず従つて得られたすべての表は上の部を除外して直線的部分で溶血速度の表現を行うようにした。即ち 溶血速度係数を次の如く定義した。

第 II, III, IV 図の如き溶血度：時間曲線より中間の直線的な部分と横軸とのなす角度を取り類似の環境で一番早い速度の角度を基準となしその比を次の如く取る。

$$H = \frac{\alpha'}{\alpha}$$

$\alpha$  = 一番早い速度 (角度)

$\alpha'$  = 与えられた条件の時の速度 (角度)

H = 溶血速度係数

実験及び結果

1. 化学溶血剤と免疫溶血素の比較

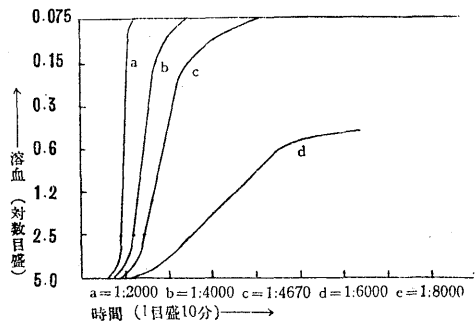
志賀<sup>6)</sup>はサポニン及び胆汁酸は表面張力を小にする結果蛋白質溶液の部分連続相となつて溶血を起し、免疫性溶血の際には赤血球が原形を維持したまま膨脹することなく溶血が起り、且つ色々の抗体は同一のものであるということ

より想像して膜の蛋白質が網状に凝固するためであると爲し、両者における作用上の差を指摘しているが、余は溶血速度上の差を見るため上記実験方法により得た溶血速度曲線を第II, III, IV に示した。即ち有機溶血剤としてサポニン (第II図) 及び胆汁酸を (第III図) 他方免疫溶血素 (第IV図) (補体を一定として溶血素の量を加減する) を用いて得られた速度曲線を次の三つの点から比較することが出来る。

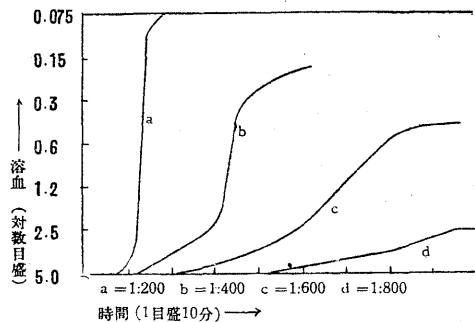
第 I は溶血曲線の形の差異でサポニンの場合は著明な S 字状の形を取り、且つ直線の部分長く胆汁酸の場合は同じく S 字状を採るが、直線の部分が非常に短く、濃度薄き場合緩やかな溶血を示し最大溶血速度に達する迄には相当の時間を要する。

免疫溶血の場合は二つの直線の部分よりなり、而もその第 2 直線の部分が非常

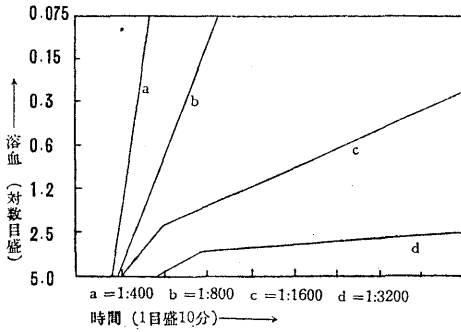
第 II 図 (サポニン)



第 III 図 (胆汁酸)



第 IV 図 (溶血素)



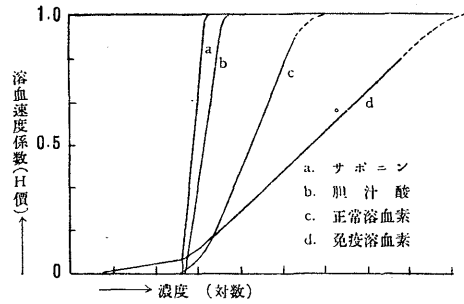
に長い。従つて第 IV 図についていえば最初の30分の間に主反応は進行を終了し、後緩い速さとなつて溶血を営み最初の30分の間に起る溶血量が14時間を経た後の溶血量と比較しても試験管 1 ~ 2 本程度の差である。

第 2 は潜伏期の問題で三者共に一定の潜伏期の後に溶血が始まり、その長さは大体薬剤濃度と函数関係にあるが、如何に濃度が上昇しても一定の長さより短縮しない。これに対し無機溶血剤 (HCl, NaOH 等) は薬剤投入と同時に溶血を起すのが見られる。patzschke & Janda<sup>7)</sup> は 5% 血球浮游液 0.5cc に対し 1% 胆汁酸液を 0.1~1.0cc と 0.1cc の差にて加え 0.7cc は不溶、0.8cc は一部溶血、1.0cc は完全溶血を爲し胆汁酸の溶けはじめは 20~30 分後に始まり、低濃度では 1 時間後に始まると記載しているが、余の結果によれば第 III 図の如く濃い所を用いれば 7 分、濃度低き所は 45 分の潜伏期を取る。同様にサポニンにおいては 6 分より 15 分の間で免疫溶血素においては 8 分より 20 分の間を取る。

第 3 は図中の a, b, c, d の稀釈量で「溶血剤の濃度を高めても速度そのものに著明な変化を与えない最小量」(第 II 図 c, 第 III 図 b, 第 IV 図 a) から「溶血を殆んど起し得なくなる迄の最大量」(第 II 図 e, 第 III 図 d, 第 IV 図 d) 迄を比較すればサポニン, 胆汁酸においては幅が狭いが、免疫溶血素は相当広い範囲に亘る。即ち前記方法により算出した H (溶血速度系数) を縦軸に、薬品の対数濃度を横軸にとると第 V

図の形を取る。

第 V 図

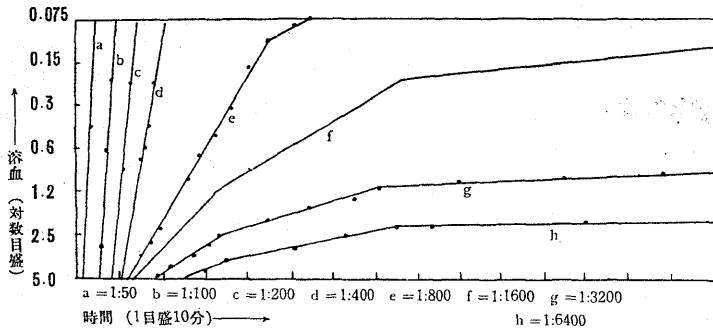


この場合サポニン (第 V 図 a) 胆汁酸 (第 V 図 b) は略々同一の傾斜を示すが、免疫溶血素の場合は c (正常溶血素) から d (免疫溶血素) 迄の間にあり一定していない。他の薬剤については一定している所より見てかなりの複雑性を認めないわけにはいけない。即ち同じ溶血能力のある濃度を定めた場合サポニン, 胆汁酸においてその濃度を倍量に薄めると溶血能力が全然なくなる場合免疫溶血素を同様に薄めると 8 ~ 32 倍の稀釈にてもなお溶血能力を保持する。更に「溶血剤の濃度を高めても速度そのものに著明な変化を与えない最小量」から「溶血を殆んど起し得なくなる迄の最大量」迄の幅が広く且つ第 V 図 c, d の如き溶血素自身には色々の幅がある以上決して完全溶血を起す血清稀釈度だけでは溶血の能力を表現することは出来ない。従つて第 V 図の 0.5 の所の稀釈度と且つ傾斜で表現すべく少なくとも 0.5 の所で血清稀釈を表わさねば不正確を免がれない。

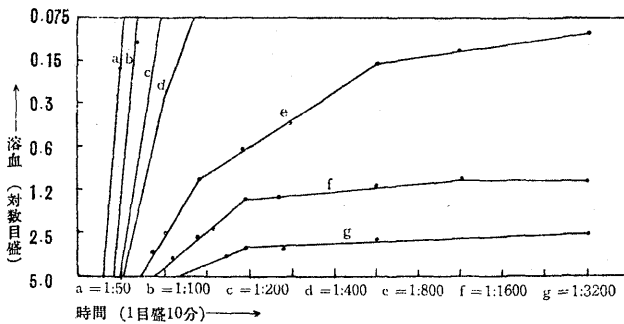
## 2. 補体と溶血素の量比による速度の影響

以上の如く免疫溶血は他の有機溶血剤に比して溶血形式が異なるが、更に異なる点は二つの物質即ち補体及び溶血素の共同作用を必要とすることである。従つて補体の量を加減する場合の溶血速度の変化を追求する必要がある。第 VI 図より第 XI 図迄は補体の増減によつて (補体の稀釈度第 VI 図 2.5 倍, 第 VII 図 5 倍, 第 VIII 図 10 倍, 第 IX 図 20 倍, 第 X 図 40 倍, 第 XI 図 80 倍) 得られた曲線であり、a より g 迄の記

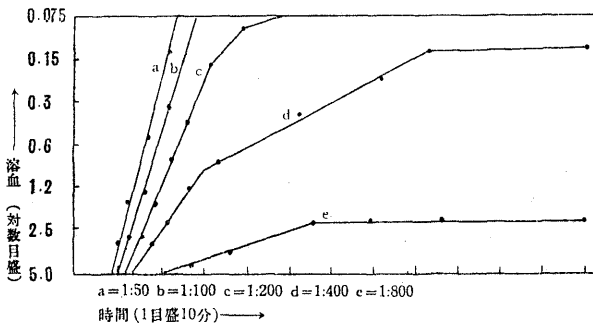
第 VI 図 (補体 1 : 2.5 稀釈)



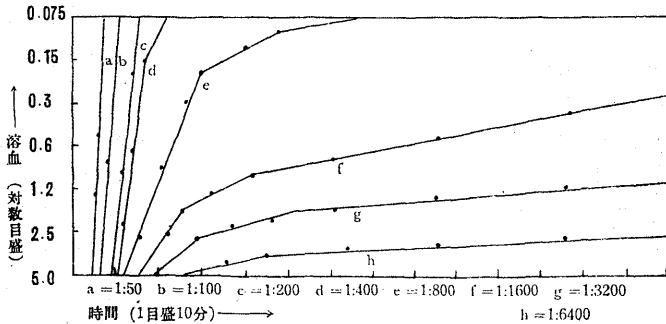
第 VII 図 (補体 1 : 5 稀釈)



第 VIII 図 (補体 1 : 10 稀釈)



第 IX 図 (補体 1 : 20 稀釈)

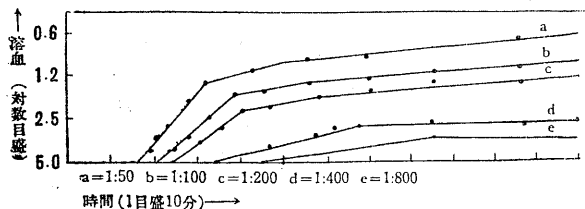


号は夫々溶血素の稀釈倍数 50, 100, 200, 400, 800, 1600, 3200, 6400 倍を示す。

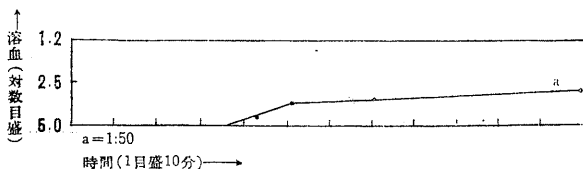
即ち補体量40倍稀釈 (第 X 図) と80倍稀釈 (第 XI 図) との間の差及び 2.5 倍稀釈 (第 VI 図), 5 倍稀釈 (第 VII 図), 10倍稀釈 (第 VIII 図) の間の差は殆んどなくなり肉眼的に区別し得ない程度である。

緒方によれば補体と溶血素との間に相補性がある。即ち一方の量が少ない時に他の量を多くすることによつて同程度の溶血を起し得るが、何れか一方が全然ない場合は溶血を起し得ないといっている。これは Seelich<sup>9)</sup> (1936)が行つた実験の示す如く補体と溶血素の間の量的関係は双曲線となつており、直線的でない所より考え当然といひ得る。しかし Seelich の実験はその終末点の溶血量を基準としているが、溶血速度より見て同じ結果を得るであろうか。余は上記実験数値を図表に表現し得られた数値より溶血量と溶血速度とは両者共に双曲線を爲すことを確めた (第 XII 図), これによると a は溶血速度が 25% に落ちた時の補体及び溶血素の関係で、a' は溶血量 25% の場合を示し以下同様に b は溶血速度 50%, b' 曲線は溶血量 50%, C は

第 X 図 (補体 1:40)

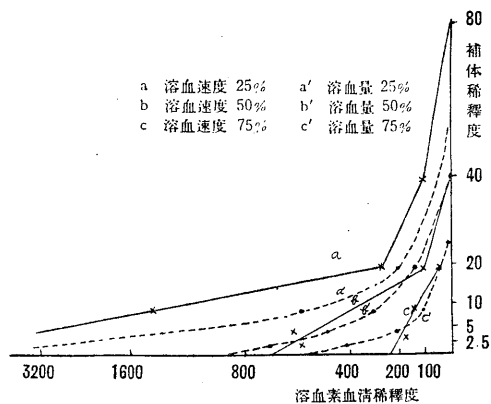


第 XI 図 (補体 1:80)



75%溶血速度, c' は溶血量75%の時の関係曲線で大体類似の双曲線を得るが, 補体の作用力は大体20倍稀釈が限度であるに反し溶血素は1600倍の作用力を有する. 従つて溶血素減量法は補体減量法より細い点の差迄出すことが出来る点敏感といわねばならぬ.

第 XII 図



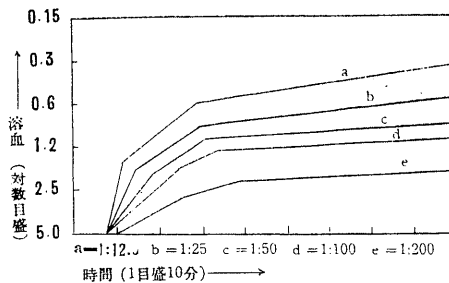
3. 溶血速度と溶血能力の差

清川は補体として豚血清と家兎血清とを用いて溶血能力と溶血速度との間に差があり完全溶血を起すには豚血清補体は3分30秒を要し, 家兎血清補体では13分を要するといつている. 余の実験において甚だしい例は家兎血清補体では45分後漸く溶血が始まり且つ完全溶血を起すに

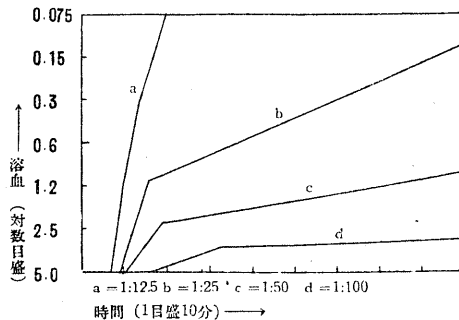
はその後僅か25分であつたのを経験している. 海猿血清補体においては45分の潜伏期において始まる溶血はあつても例外なく完全溶血迄行かない. この事より家兎血清補体は完全溶血を起す故溶血能力の減少とはいえない. この事は同種動物の溶血素を用いてすることは何か同種動物の補体を結合させるに困難な因子が存在するように思われ, 且つ補体の組成の差のみで起る事柄とは考え難い. 更に特殊な例として正常家兎へ50%, 山羊血球浮游液を1.0cc注射し, その後2日目に採血した血清が示す成績によつて溶血速度と

溶血能力との間に大きな差が認められることを示している. (第 XIII 図) 即ち第 XIV 図の正常溶血素と注射後2日目の血清と比較すれば, 血清稀釈度 1:12.5 の場合 (第 XIII, XIV 図の a) に見られる如く正常の場合には完全溶血を起しているに拘わらず第 XIII 図においては完全溶血を起さない, しかし溶血速度は大差ないと

第 XIII 図



第 XIV 図 (補体 1:10)



いう例である。

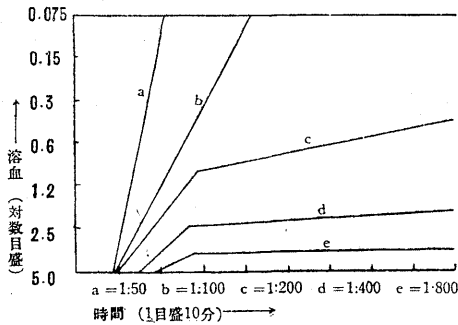
4. 免疫溶血速度曲線と溶血素産生日数との関係

溶血素の産生が日を追つて如何に変化するかは先ず正常溶血素から調べねばならぬ。第XIV図は家兎正常溶血素の山羊血球に対する溶血能力を試験したのである。これに50%の山羊血球浮游液を1.0cc宛3日間隔で3回注射後第1日目(第XVI図)及び第3回目注射の前日(第XV図)の血清について行つた結果を比較した。以

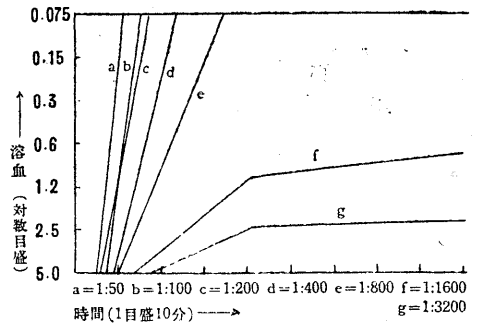
後毎日心臓穿刺により採血し溶血曲線の推移を計測した。

第XVII, XVIII図は夫々第3回注射後3,5日目の推移であり、その間の溶血曲線の変化は單に力価が變つたばかりでなく実験1において述べた如き2個の直線の部分の一方が消失してしまふ。従つて完全に溶血を起すものと然らざるものと短時間の中に明らかに解る。多くの結果より判定すれば5日目から8日目迄が最大能力を發揮する。

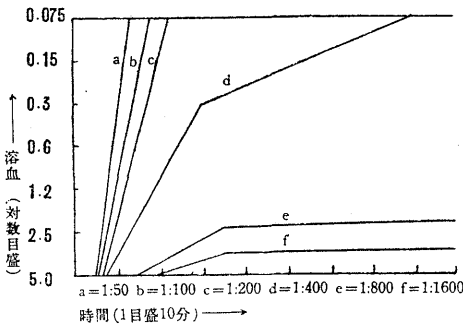
第XV図 (前日)



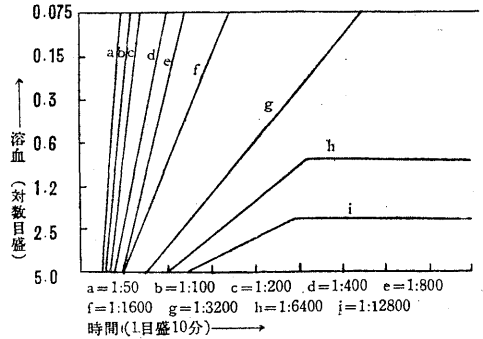
第XVII図 (3日目)



第XVI図 (第1日目)



第XVIII図 (5日目)



結 論

溶血反応の量的觀察は古くより行われ現在も行われている。しかし溶血速度を動的に觀測した報告は少ない。余は手製の比濁計を用い溶血速度を追求し、次の結果を得た。

1. 有機の化学溶血剤と免疫溶血素の間における溶血速度は大なる差がある。即ち結果を図

示するとその図の形、潜伏期稀釈していくその速度と濃度の函数關係と三つの面からの差異を指摘することが出来る。

2. 補体と溶血素の量による速度の變化は補体の稀釈度5~10倍においては肉眼的區別をし難い。

3. 動物の補体によつて速度の形に変化がある。

4. 免疫溶血素は免疫後日時によつて速度の形に変化があり5～8日目の間が最大能力を發

揮する。

終りに臨み終始御指導を賜つた細菌学教室谷教授に感謝します。

## 文

1) **E. ponder** : Erythrocyte and the action of simple hemolysins Oliver and Boyd. Edinburgh and London 1924.

2) **H.**

**monwaring** : J. Inf. Dis. 2, 460 (1905)

3) 清川尚道 : 免疫学会雑誌, 4, 277 (昭18)

4) 竹中繁雄・光田照 : 医学と生物学, 5, 33

## 献

(昭19) 5) **Milatz** : J. M. W. Zbl. Bakter II Aft. 94, (1935)

6) 志賀直 :

生化学各論, 88, 三上社, (1941)

7) **W.**

**patzschke & K. Jauda** : Z. Immun. forschg 28, 368 (1919)

8) **F. Seelich** : Biochem,

Z 287, 9, (1936)