

〈2〉 梅毒患者血清のセフアデックスG-200ゲル  
濾過による分画とCF抗体の関係について

札幌市衛生試験所(所長 立野 太刀雄)

佐藤 敏雄 田口 武  
佐藤 勇次 山下 悟

梅毒という病気に関する限り、診断の主体は血清学的検査におかれているが、現在のところ、いずれの検査法においても以下の2点については、問題は未解決のまゝである。

その1つは、生物学的偽陽性反応(BFP)の問題であり、他の1つは、治療の判定基準をどこに求めればよいかという問題である。前者については、特異的検査法である梅毒蛍光抗体法(FTA)、梅毒血球凝集反応(TPHA)等の出現により極めて高率に判別することが可能となったが、後者については、いまのところ信頼できる検査法或は、判定基準はまったく示されていない。

一方、近年になって免疫グロブリン(Ig)に関する研究は著しく進展をみせ、産生機序、構造、物理化学的性状、生物学的活性等が次第に明確になってきつゝあり、すでに一部の研究者の間で、これらの分析技術を梅毒検査の中に導入して、時期の経過をIgの質的变化のかたちでとらえることに成功している。<sup>1)2)3)</sup>

以上の意味から、われわれのところでも、Crudeな血清材料による従来からの検査法のみには依存するだけでは、前述の問題の解決は得られないと考え、各種のIgに対して、それぞれの活性を調査する目的で分域電気泳動法、ゲル濾過法、イオン交換クロマトグラフィー等により血清を処理し、得られた個々の分画に対し、抗原との関係を調査している。今回は、そのなかでカルジオライピン(CL)緒方法に準じて

検査を実施したものの一部について簡単に報告する。

材料及び方法

1) 血清について

CL3法及び、TP3法(RPCF、FTA、TPHA)の3法)共に陽性の血清13例、CL3法中緒方法のみ陰性であり、TP3法共に陽性のもの1例、(以上、いずれも2期以降の患者血清)CL3法中緒方法のみ陽性で、TP3法共に陰性の成績を示し臨床所見と総合してBFPと診断されたもの1例、陰性の対照として健康者の血清5例、合計20例について以下の試験に供した。

2) ゲル濾過法

a. カラム・クロマトグラフ管は硝英製作所製の26.4×450mmの下行式のものを使用し、あらかじめ十分に膨化させておいたファルマシア社製のセフアデックスG200を、安定した状態でゲル高が380~400mmになるようにつとめて使用した。

b. 試料の展開・血清材料は透析をおこなわず、各々の12mlをCaイオン $8 \times 10^{-5}$ モル、Mgイオン $3 \times 10^{-4}$ モルの割合を含む0.2M食塩水により、LKB製のマイクロポンプを使用して10.6ml/時の速さで流出させた。

c. 試料の回収：回収は東洋科学社製の自記式紫外部吸光装置付のフラクションコレク

- ターにより3.0g / tubeに分けて採取した。
- 3) 梅毒反応に供した分面の選定について

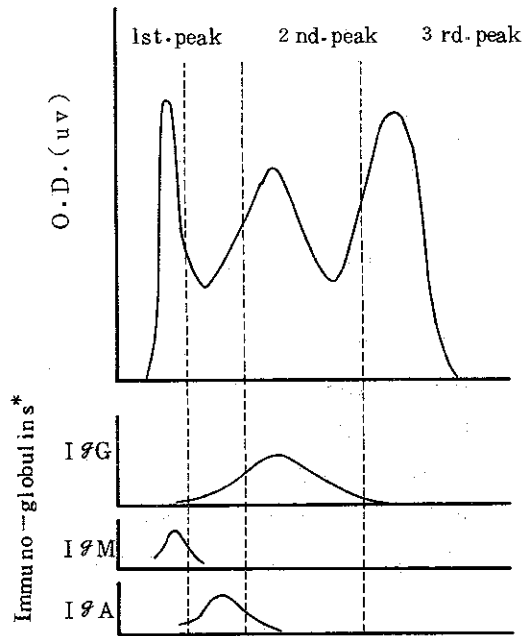
予め実施しておいた予備試験の結果から、セファデックスG 200ゲル濾過による分面と各Igの分布関係については、図-1に示すとおりであり、この実験では特に個々の分面に対するIg量の測定はおこなわず、第1峰及び、第2峰共にピークを含む2本ずつ合計4本をとり出してFolin法により蛋白濃度を測定したうえで、梅毒反応検査を実施した。

なお各試験管と自記吸光曲線、Folin法による吸光度との関係については、図-2に示したとおりである。

- 4) 梅毒反応

3)により得られた材料を原液として2倍階段希釈をおこない、抗原は住友化学製の緒方法抗原を80倍に希釈し、厚生省検査指針に準じて反応をおこなった。

(図-1) セファデックスG-200ゲル濾過によるヒト血清分面とIg分布



\* 定量はImmuno Plate Testkit-Hylandによる。

### 実験成績

- 1) ゲル濾過に対する検討

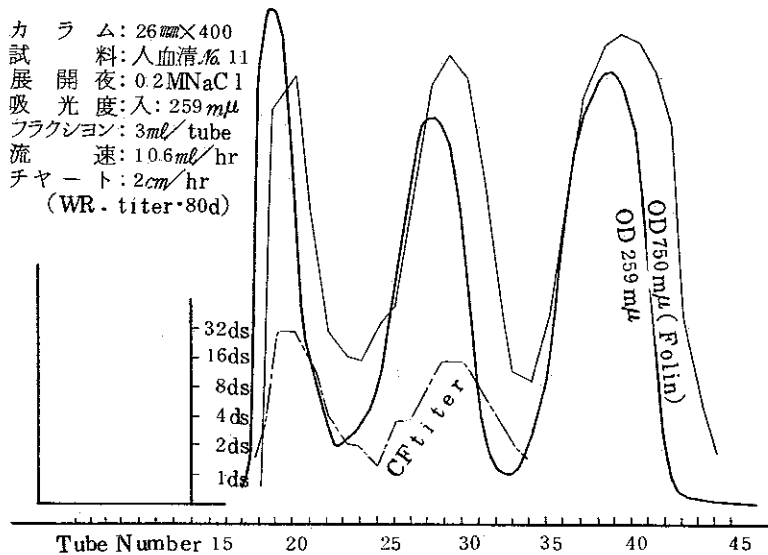
ゲル濾過は2本のカラムを交互に使用して

各10例ずつの検

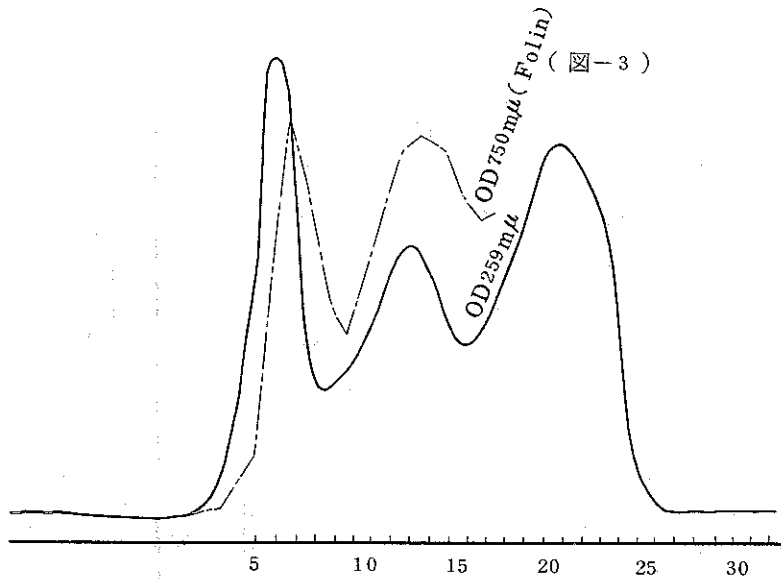
体を処理したが、このうち1本のカラムについては良好な分離成績が得られたが(図-2)、他の1本については、再度にわたりゲルをつめかえたにもかかわらず分離は不良であった。(図-3)。この原因について、本実験終了後に種々

カラム: 26mm×400  
試料: 人血清 No. 11  
展開液: 0.2M NaCl  
吸光度: 入: 259 mμ  
フラクション: 3ml / tube  
流速: 10.6 ml / hr  
チャート: 2cm / hr  
(WR. titer: 80d)

(図-2)



の検討を加えた結果、ゲル表面を保護しているナイロネットのたるみに原因することが確認された。表-1に示した実験成績は不良なカラムによる実験例であり、表-2の実験成績は良好なカラムによる実験例である。ゲル濾過の再現性については、



条件を一定にとゞのえれば、極めて良好な結果が得られることがわかった。

2) 梅毒反応に対する検討

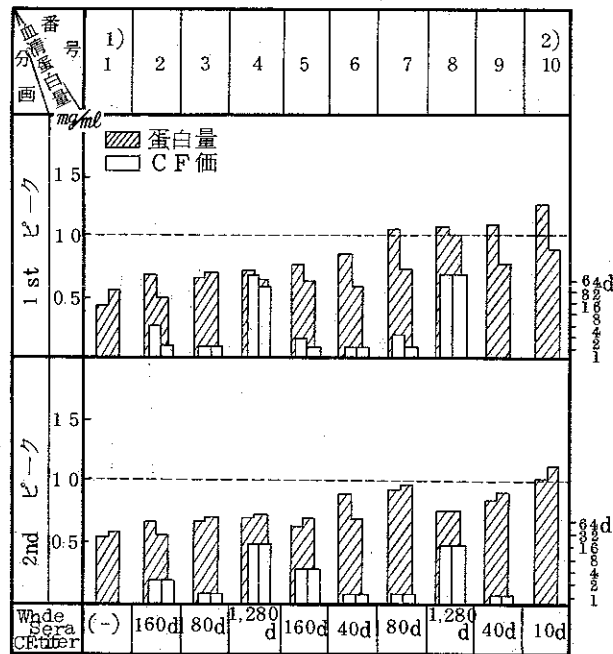
a) 蛋白量とCF価 (CL

緒方法による) との関係

表-1及び、表-2に示した如く、原血清のCF価とゲル濾過後の各試料の示したCF価との間に比例関係が認められた。また、表-1及び表-2の成績にみられる如く、分離性がよく、従って高濃度で分画を回収できた良好なカラムによるものの方が、CF価についても、高い価を示した。

陰性の対照5例(表-2のNo 1.6~2.0)は、いずれも陰性の成績であった。

表-1 各分面の蛋白量とCF価

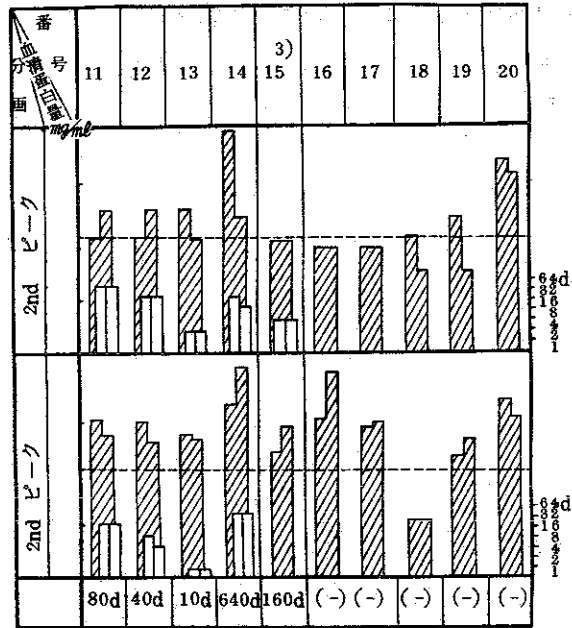


1) S. A. のみ (f)  
2) 10d で反応最弱

b) BFP血清の抗体について

1例についておこなったBFP血清(No.15)に対するCL反応の結果は、rMを含む第1峰にのみ反応がみとめられ、rGを多量に含む第2峰では全く反応を示さなかった。また、同一カラムにより処理した4例の陽性血清(表-2のNo.11~14)と比較して、低いCF価を示した。

表-2 各分画の蛋白量とCF価



3) BFP

総括的結辭

われわれは、免疫反応に関与する諸成分のうち、特に抗体の多様性の問題を重視し、経過に伴う質的变化をとらえるために種々の実験を計画し、すでに実施している。今回は、セフアデックスG-200ゲル濾過法によるI $\phi$ レベルでの反応を如何なる形で日常検査の中に導入すればよいかについて検討するための予備的実験をおこなった。その結果、1.2mlという少量の血清についても、CF反応に関する限り、十分な分析が可能であるという結論が得られた。しかしながら、この方法の欠点として、ゲル濾過に原因する再現性の問題及び、CF反応に関与するI $\phi$ がrG、rMに限られていることがあげられる。前者については、カラムに対する技術的な熟練により、かなり高い再現性が得られ更に、I $\phi$ 量を測定して、一定濃度に調整したうえで、50%溶血法により補体の消費量から、抗体の力価を正確に計算することが可能である

うと考える。後者の問題については、ゲル濾過によって得られる試料中のI $\phi$ 濃度から推定して、rAに関する分析は極めて困難であることが予想される。

1例のBFP血清についての実験結果からは、先に発表した、バレイショ澱粉による分域電気泳動の成績と一致する成績が得られ、前回と同様にrG成分に抗体活性を欠いていることが証明された。

現在、われわれは、感染初期の患者数例を対象として、治療の経過と2、3の抗原に対する抗体成分の変動についての実験を計画中であり、結果がまとまり次第別稿に報告の予定である。

文 献

- 1) 矢野 武ほか(1969). TPHA 文献集 (富士臓器)、29-33
- 2) 角水圭一(1969). 日細誌、24、28-36

3) Alfrede J. Julian, et al.(1969)

J. Immunol.、102、1250-1259

4) 佐藤敏雄、ほか(1967):札幌市公衆衛

生業績集、42年度、224-229