

生理的食鹽水「メヂウム」ニ於ケル 抗體分離ニ關スル研究

岡山醫科大學衛生學教室(主任緒方教授)

講師 須之内 權三

内容目次

緒言	第2節 抗體ノ温熱ニ對スル抵抗
第1章 實驗材料	第3節 抗體ノ分離
第2章 實驗竝ニ其ノ成績	第1項 沈降素ノ分離
第1節 反應検査方法	第2項 細菌凝集素ノ分離
第1項 沈降反應検査法	第3項 血球凝集素ノ分離
第2項 細菌凝集反應検査法	第4項 溶血素ノ分離
第3項 溶血反應検査法	第3章 結論
第4項 血球凝集反應検査法	文獻

緒言

抗體ヲ純粹ノ状態ニ於テ免疫血清中ヨリ分離抽出シ得バ實地應用上ニ得ル所ノ便益甚大ナルベク又抗體夫レ自身ノ理化學的討究上ニモ著シキ利點ヲ得ルニ至ルガ爲メ 往古ヨリ抗體ノ分離ニ關シテハ幾多ノ研究業績ノ發表セラレ居ルヲ見ル即チ先ヅ最初ハ免疫血清ヲバ蛋白沈降劑ヲ以テ處置シ免疫血清中ニ含有セラレ居ル抗體ヲ血清「グロブリン」ト共ニ沈降セシメ 抗體ヲバ濃縮セラレタル状態ニ於テ抽出セシメント試ミタリ即チ1897年 Wiedel u. Siourd¹⁾ ハ細菌凝集素血清ヲ硫酸「アンモン」ニテ處置シタルニ多量ノ凝集素ガ硫酸「アンモン」ニ依リテ沈降セラレタル血清「グロブリン」中ニ存在セル事ヲ發見セリ又其後 Winterberg²⁾ ハ前記兩氏ノ實驗ヲ追試セシニ等シキ成績結果ヲ得タリト更ニ又 Piok³⁾ 及ビ Gibson⁴⁾ ノ兩氏ハ抗腸「チブス」菌免疫血清ヲ硫酸「アンモン」ニテ處置セシニ抗腸「チブス」菌凝集素ハ主トシテ「プソイドグロブリン」ト共ニ沈降スル事ヲ認メタリ斯クノ如ク 蛋白沈降劑ヲ以テ免疫血清ヲ處置スル時ハ原免疫血清ニ比シ其ノ蛋白含有量少ク而モ濃縮サレタル免疫體ヲ得ル事可能ナリト雖モ尙ホ吾人ノ理想トスル純粹ノ状態ニ於ケル抗體ニアラザル事ハ勿論ナリ此所ニ於テカ 更ニ研究ノ歩ヲ進メ 抗體ヲ一旦之ニ適合セル抗原ト結合セシメ遠心分離法ニ依リ血清蛋白ト分離シ 然後ニ諸種ノ操作ニ依リ再ビ抗體ヲ抗原ヨリ解離セシメントスルノ法ガ企圖セラレタリ即チ Landsteiner⁵⁾ 及ビ Landsteiner u. Jagic⁶⁾ ハ血球凝集素ヲ以テ感作セラレタル感作血球ヲ生理的食鹽水中ニ浮遊セシムル時ハ一定量ノ血球凝集素ガ再ビ感作血球ヨリ解離シ食鹽水「メヂウム」中ニ遊離シ來ルヲ認メキ又 Hahn u. Trommsdorf⁷⁾ ハ細菌凝集素ヲ以テ感作セラレタル菌體ヲN/100「ナトロンラウゲ」ニテ處置スル時ハ再ビ細菌凝集素ノ菌體ヨリ解離シ來ルヲ見タリ又 Israel Weinstein⁸⁾ ハ腸「チブス」菌ノ浸出液ト抗腸「チブス」菌免疫血清トノ混和ニ依リテ形成セラレタル沈降物ヨリ抗腸「チブ

ス」菌凝集素ヲ分離スル事ヲ得タリ更ニ又 Bail u. Tsuda⁹⁾ 及ビ Spriet¹⁰⁾ ハ感作菌ヲ生理的食鹽水中ニ浮游セシメ之ニ 40°C—42°C ノ熱ヲ加フル事ニ依リ感作菌體ヨリ再ビ抗體ノ食鹽水「メヂウム」中ニ解離シ來ルヲ認メキ又 Michaelis¹¹⁾ ハ沈降素ト沈降原トノ混和ニ依リテ形成セラレタル沈降物ヨリ沈降素ヲ分離セント試ミタリシガ分離「メヂウム」中ニハ沈降素ヲ證明セズシテ却ツテ沈降原ヲ證明セリト云ヘリ。

以上列記セシ各研究者ノ感作抗原ヨリノ抗體分離ハ其ノ分離方法ニ尙ホ遺憾ノ點アリシニツキ其ノ分離成績ハ満足ノ域ニ達セザリシガ 1918 年小酒井氏¹²⁾ ガ分離「メヂウム」トシテ 10% ノ蔗糖溶液ヲ使用シ溶血素ヲ以テ感作セシ感作血球ヨリ感作ニ使用セシ溶血素ノ殆ド全量ヲ分離シ得テ此所ニ抗體分離上一大進歩ヲ來セリ即チ古畑氏¹³⁾ ノ血球凝集素ノ分離、緒方教授¹⁴⁾ ノ抗大腸菌凝集素ノ分離等ノ研究業績相ヒ踵イデ發表セララルニ至レリ又三輪¹⁵⁾ 及ビ Hunton¹⁶⁾ ノ兩氏ハ小酒井氏ノ蔗糖溶液「メヂウム」ヨリ暗示ヲ得テ分離「メヂウム」トシテ蒸餾水ヲ用ユル事ニ着想シ之ニ又良結果ヲ納メ得タリ又我が教室ノ景山氏¹⁷⁾ ハ小酒井氏法ヲ用ヒテ「フォルスマン」氏抗體ノ分離ヲ試ミテ成功セリ次デ最近ニ至リ余¹⁸⁾ 及ビ白玖氏¹⁹⁾ ハ分離「メヂウム」トシテ蒸餾水ヲ用ヒ血清沈降素竝ニ細菌沈降素ヲ分離スル事ヲ得タリ。

吾人ハ以上ノ抗體分離ノ研究結果ニ依リ感作抗原ヨリノ抗體分離ニ際シテハ分離「メヂウム」トシテ 10% 蔗糖溶液又ハ單ニ蒸餾水等ノ如ク鹽類ヲ含有セザル「メヂウム」ガ最適ナルヲ知ル之蓋シ一般ニ周知セラレ居ルガ如ク鹽類ハ抗體抗原間ノ生物學的反應ニ必要訣グベカラザルモノナルヲ以テ無鹽ノ「メヂウム」ハ一旦完成セシ抗體抗原ノ結合ヲシテ再ビ解離セシメントスル作用ヲ有スレバナリ次ニ尙ホ感作抗原ヨリノ抗體分離ニ際シテ「メヂウム」以外ニ溫熱モ亦重大ナル意義ヲ有スルモノナリト思惟ス勿論此熱ノ抗體分離度ニ及ボス影響ニツキテハ各研究者ニ依リ其ノ成績必ズシモ一致セズ即チ Pietro Rondoni 氏ノ如キハ「アルカリ」ニ依ル抗體分離ニ際シテハ 0°C—37°C 迄ハ其ノ分離度ニ差異ヲ認メズトナシ之ニ反シテ Landsteiner²⁰⁾ 及ビ小酒井氏²¹⁾ ノ如キハ抗體分離度ハ分離「メヂウム」ノ加溫度ニ正比例スルモノナリト云ヘリ又緒方教授²²⁾ ハ N/100 ニナルガ如ク「ナトロンラウゲ」ヲ添加セシ 10% 蔗糖液ヲ分離「メヂウム」トシテ大腸菌凝集素ノ分離ヲセラレシニ其ノ分離度ハ 37°C—55°C ノ間ニ於テ著明ナル差異ヲ認メズ 42°C—45°C ガ最適ナリト云ヘリ又古畑氏²³⁾ モ血球凝集素ノ分離ニ際シ溫度ノ抗體分離度ニ及ボス影響ヲ檢シタルニ緒方教授ト同様ナル結果ヲ得タリト云ヘリ余ハ最近蒸餾水「メヂウム」ニ於ケル沈降素ノ分離ニ當リ 53°C 迄ハ分離度ハ加溫度ト正比例シテ上昇シ 55°C 以上ニ加熱スル時ハ却ツテ分離度ノ減退スルヲ見タリ一般ニ抗體抗原ノ結合ニ都合良キ溫度ハ 37°C 前後ニシテ 45°C ニ至レバ已ニ其ノ結合ヲ抑制セントスル傾向アリ而シテ此抑制制度ハ溫ノ上昇ト共ニ強クナルモノナリ從テ感作抗原ヨリノ抗體分離度モ又分離「メヂウム」ノ加溫度ト共ニ増強スベキ事想像シ得ベキナリ然ルニ上記ノ如ク加溫ノ分離度ニ及ボス影響ニ就キテ各研究者ノ成績一致セズ余ハ此一致セザル理由トシテ次ノ如ク思考ス即チ加溫ト共ニ抗體ノ分離度モ亦増大シ得ルモ無鹽ノ「メヂウム」又ハ酸「アルカリ」性ノ「メヂウム」ニ於テハ「メヂウム」其ノモノガ已ニ感作

抗原ヲシテ分離「メヂウム」中ニ溶解移行セシメントスル傾向アリ而シテ尙ホ之ヲ加温スル時ハ加温度ト共ニ抗原ノ溶解移行ヲ益々促進セシメ以テ折角分離シ得タル抗體モ分離「メヂウム」中ニ溶存スル抗原ノ爲メニ分離操作終結後生理的ニナルガ如ク結晶食鹽添加ニ際シ結合相殺セラレテ其ノ結果ハ低温分離ノ場合ト等シキ結果ヲ示スカ又ハ相殺セラレシ抗體量多大ナリシ場合ニハ却ツテ低温分離ノ方が良成績ヲ示スガ如キ場合アルモノナリ之ニ反シテ抗原ノ分離「メヂウム」中ニ溶解移行スル事困難ナルガ如キ溶液ヲ分離「メヂウム」トシテ使用スル時ハ其ノ分離度ハ加温度ノ上昇ト共ニ増大スルモノナリ而シテ抗原ノ溶解移行ヲ困難ナラシムルガ如キ「メヂウム」トシテ生理的食鹽水ノ如キハ其ノ1例ナリ余ハ本研究ニ於テ分離「メヂウム」トシテ生理的食鹽水ヲ使用シ高低各種ノ温度ヲ作用セシメ各温度ニ於ケル抗體分離度ヲ相ヒ比較シ併セテ從來稱用セラレタル無鹽「メヂウム」ヲ以テスル分離法トノ間ニ於ケル優劣ニツキ論及セリ。

第1章 實驗材料

免疫動物トシテ體重 2.000 g—2.500 g ノ成熟家兎ヲ使用シ免疫原トシテハ牛血清、大腸菌、山羊血球、鶏血球ヲ以テシ抗原注射ハ總テ耳靜脈ニ於テ爲セリ。

牛血清ハ1回量 0.5 cc ヲ以テシ3—4日ノ間隔ニテ數回乃至十數回免疫シ最後ノ免疫ヨリ約7日目ニ採血シ緒方教授ノ稀釋沈降反應ニ依ル稀釋沈降價 1:500 以上ノモノヲ得テ之ヲ實驗ニ供セリ。

大腸菌ハ18時間培養ノモノ1斜面ヲ 10 cc ノ生理的食鹽水ニ浮游セシメ 60°C ノ重湯煎中ニテ2時間殺菌シ4—5日ノ間隔ヲ以テ第1回ハ 1 cc 第2回ハ 2 cc 第3回ハ 3 cc ト云フ如ク順次増量シツツ數回以上免疫シ最後ノ免疫ヨリ約7日目ニ採血シ「アグルチノスコープ」ヲ以テ觀察シクル凝集價 1:20,000 以上ノモノヲ得テ實驗ニ供セリ。

山羊血球ハ其ノ 10% 生理的食鹽水浮游液ヲ作り 2 cc 3 cc 5 cc ト順次増量シツツ4日ノ間隔ヲ置キテ數回以上免疫シ最後ノ免疫ヨリ約7日目ニ採血シ一般方式ノ如クシテ溶血價ヲ測定シ其ノ溶血價 0.001 以上ノモノヲ得テ之ヲ實驗ニ供セリ。

鶏血球ハ山羊血球ノ場合ト同方法ニテ免疫シ其ノ血球凝集價 1:400 以上ノモノヲ得テ之ヲ實驗ニ供セリ。

次ニ感作セシムベキ抗原トシテ沈降素ノ場合ニハ液狀血清ヨリハ粉末血清ノ方が分離ニ好都合ナルニ依リ血清粉末ヲ作りテ之ヲ使用セリ溶血素並ニ血球凝集素ノ場合ニハ血球ハ已ニ 65°C ニテハ著シク溶血現象ヲ發來スルニ依リ血球基質ヲ使用セリ血球基質ハ次ノ如クシテ作レリ即チ洗滌血球液ヲ 10 倍容量ノ蒸餾水ヲ以テ溶血セシメ然後ニ生理的食鹽水ヲ以テ數回遠心洗滌ス然ル時ハ稍々灰白色ヲ帶ビタル基質ヲ得ベシ。

第2章 實驗竝ニ其ノ成績

第1節 反應検査方法

第1項 沈降反應検査法

輪環法ニハ Uhlenhuth 氏ノ原法ト 1927 年緒方教授ノ發表セラレタル稀釋沈降反應法ノ2法アリ余ハ本

實驗ニ於テ沈降素ノ結合並ニ分離ノ關係ハ總テ緒方教授²⁴⁾ノ稀釋沈降反應法ニ依レリ今同教授ノ稀釋沈降反應法ヲ略述スレバ次ノ如シ即チ沈降素血清ヲ10%海猿血清又ハ2%「アラビヤゴム」溶液等ヲ以テ順次稀釋シ行ク時ハ遂ニ或ル特定濃度ノ抗原トノミ反應ヲ呈シ夫レ以外ノ濃度ノ抗原トハ反應セザルニ至ル此場合ニ其ノ特定濃度ノ抗原ヲ稱シテ結合帶ト名ヅケ此結合帶ト反應シ得ル免疫血清ノ最高稀釋度ヲ稀釋沈降價ト稱ス結合並ニ分離度ハ此稀釋沈降價ノ高低ヲ以テ評價セリ沈降反應觀測時間ハ2時間ヲ以テ限度トナシ白色輪環ヲ形成セシモノヲ(+)トナシ然ラザルモノヲ(-)トセリ。

第2項 細菌凝集反應検査法

18時間寒天培養ノ大腸菌3「ノルマルエーゼ」ヲ採リ之ヲ10ccノ生理的食鹽水中ニ浮游セシメ60°Cノ重湯煎中ニテ2時間殺菌シ該菌液ノ4滴宛ヲ免疫血清ノ遞降的稀釋液ヲ盛レル試験管ニ滴加シ37°Cノ孵卵器中ニ入レ居ル事2時間ノ後取り出シ翌朝迄室温ニ放置シ然ル後「アグルチノスコープ」ヲ以テ檢シ良ク對照ト比較シ以テ其ノ成績ヲ判定セリ。

第3項 溶血反應検査法

溶血價ハ使用スル補量ニ依リ著シク差異ヲ生ズルニ依リ毎實驗共ニ補體價ノ2倍量ヲ使用セリ其ノ他ハ一般方式ノ如ク施行シ完全溶血ヲ(+)トナシ然ラザルモノヲ(-)トセリ。

第4項 血球凝集反應検査法

血球凝集反應ノ場合ニ多量ノ血球ヲ使用スル時ハ反應ノ發現不鮮明トナルニ付キ余ハ血球凝集素血清ノ遞降的稀釋液ヲ盛レル各試験管ニ5%ノ鶏血球浮游液2滴宛ヲ滴加シ37°Cノ孵卵器ニ入レ居ル事2時間ノ後ニ取り出シ翌朝迄放置シ反應ヲ檢スル事トセリ輕ク振盪シテ尙ホ肉眼ニテ明カニ見得ル血球凝塊ノアルモノヲ(+)トナシ然ラザルモノヲ(-)トセリ。

第2節 抗體ノ溫熱ニ對スル抵抗

本研究ニ於ケル抗體ノ分離ニ際シテハ主トシテ溫度ノ變化ニ據リシヲ以テ抗體ノ熱ニ對スル抵抗ヲ檢査シ分離時ニ作用セシメ得ベキ熱ノ限度ヲ定メ抗體ヲ損傷セザル範圍ノ最高ノ溫度ヲ求メタリ。

從來ノ文獻ニ徴スルニ抗體ノ熱ニ對スル抵抗ハ免疫血清ヲ賦與セシ動物ノ種類ニヨリ又ハ同種類ノ動物ヨリ得タル抗體ト雖モ免疫元ノ異同ニ依リ各々差異アルモノナリ岩井氏²⁵⁾ノ溶血素血球凝集素等ニ於ケル實驗結果ニ依レバ63°C—65°C20分間加温スル事ニ依リ抗體ハ侵害セラレ始ムト又緒方教授²⁶⁾ハ第2回衛生學微生物學寄生蟲學聯合學會ニ於テ沈降素ハ75°C30分間加熱スル事ニ依リ侵害セラレ始メ85°C30分間加熱スル事ニ依リ全ク抗體ノ能力ヲ消失スルモノナリト述ベラレタリ余ハ余ノ本實驗ニ於テ使用セントスル諸種抗體ニ就キ次ノ如キ方法ニ依リ熱ニ對スル抵抗力ヲ檢セリ即チ先ヅ各種免疫血清ヲ蒸餾水ヲ以テ10倍ニ稀釋シ重湯煎中ニテ30分間宛各程度ノ温ヲ作用セシメ操作完結後直チニ取り出シ冷水ヲ以テ冷却シ生理的ニナル如ク結晶食鹽ヲ加へ然ル後ニ抗體價ヲ測定シ以シ各抗體ノ熱ニ對スル抵抗力ヲ査定セリ其ノ成績ハ次表ニ示セルガ如シ沈降素ノ場合ニハ已ニ緒方教授ガ發表セシ如ク酵素「アルカリ」酸熱等ノ作用ヲ受クルモ其ノ結合帶ハ常ニ安定ニシテ移動セザルヲ以テ沈降素量ノ測定ニハ常ニ終始一貫セル結合帶ヲ以テセリ。

第 1 表 沈降素ノ熱ニ對スル抵抗

抗體稀釋度 加 温 度	20	40	80	160	320	640	1,280
加 温 前	+	+	+	+	+	+	-
55°C	+	+	+	+	+	+	-
65°C	+	+	+	+	+	+	-
75°C	+	+	+	+	-	-	-
85°C	-	-	-	-	-	-	-

備考 抗體稀釋度ハ結合帶ヲ以テ測定シタルモノナリ. 結合帶 1:500

第 2 表 細菌凝集素ノ熱ニ對スル抵抗

抗體稀釋度 加 温 度	100	200	400	800	1,000	2,000	4,000	8,000	10,000	20,000	40,000	80,000
加 温 前	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
55°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
65°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
75°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
85°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第 3 表 血球凝集素ノ熱ニ對スル抵抗

抗體稀釋度 加 温 度	20	40	80	100	200	400	800	1,000
加温前(非動性)	+	+	+	+	+	+	+	-
65°C	+	+	+	+	+	+	+	-
75°C	+	+	+	+	+	-	-	-
85°C	-	-	-	-	-	-	-	-

第 4 表 溶血素ノ熱ニ對スル抵抗

抗體稀釋度 加 温 度	50	100	200	400	800	1,000	2,000
加温前(非動性)	+	+	+	+	+	+	-
65°C	+	+	+	+	+	-	-
75°C	+	+	+	-	-	-	-
85°C	-	-	-	-	-	-	-

以上各表ノ成績結果ヲ通覽スルニ各抗體共ニ65°C 30分間ノ加熱ニヨリテモ殆ド侵害セラレズ75°C 30分間ノ加熱ニヨリ稍々強ク侵害セラレ85°C 30分間ノ加熱ニヨリテハ殆ド完全ニ抗

體的能力ノ消失セラルルヲ知ル本實驗成績ノ結果ニ依リ抗體分離時ニ作用セシメ得ベキ熱度ノ最高ハ65°Cタルベキヲ知レリ。

第3節 抗體ノ分離

第1項 沈降素ノ分離

緒方教授ノ稀釋沈降反應法ニ依リテ測定シタル稀釋沈降價1:610ヲ有スル抗牛血清沈降素血清4.0ccヲ取り之ニ0.004gノ血清粉末ヲ加ヘ良ク振盪混和セシメ37°Cノ孵卵器内ニ入レ置ク事2時間ノ後取り出シ強力ナル遠心沈澱器ニ依リテ上清ト沈降物トニ區別シ該沈降物ヲ生理的食鹽水ヲ以テ數回遠心洗滌シ免疫血清ノ殘存ヲ無カラシメ次ニ斯ノ如ク純粹トナサレタル沈降物ヲ最初結合時ニ使用シタル免疫血清量ト等シキ量ノ生理的食鹽水中ニ浮遊セシメ各種溫度ノ重湯煎中ニ入時々振盪シ30分ノ後取り出シ直チニ強力遠心器ニ依リテ上清ト沈澱トニ區別ス此上清ハ即チ分離液ニシテ分離セラレタル沈降素ヲ含有ス今各溫度ニ依リ分離沈降素量ヲ素示スレバ次ノ如シ。

第5表 各溫度ニ於ケル沈降素ノ分離度比較

抗體稀釋度 分離溫度	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	分離度
45°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/192
55°C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1/48
65°C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1/12
75°C	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	1/96
原免疫血清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	/
結合上清	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	/

備考 抗體稀釋度ハ結合帶ヲ以テ測定シタルモノナリ。

結合帶1:500 結合度7.6/10

第5表ノ成績ニ依リ分離「メヂウム」トシテ生理的食鹽水ヲ使用スル時ハ65°Cニ於テ分離セシ場合ガ其ノ分離度最モ良好ナルヲ知ル次ニ余ハ以前余²⁷⁾ガ發表セシ蒸餾水「メヂウム」ニ於ケル53°Cヲ以テスル分離法ト生理的食鹽水「メヂウム」ニ於ケル65°Cヲ以テスル分離法トノ間ニ於テ其ノ分離度ニ優劣ノ差アルヤ否ヤヲ檢セシニ次表ニ示セルガ如ク兩者間ニ大差ナキヲ見タリ。

第6表 生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ト蒸餾水「メヂウム」53°C分離法トノ間ニ於ケル分離度比較

抗體稀釋度 沈降素別	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1,024	分離度
鹽分離沈降素	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1/24
餾分離沈降素	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	1/24
原沈降素血清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	/
結合上清	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	/

備考 抗體稀釋度ハ結合帶ヲ以テ測定シタルモノナリ。

結合帶 1:1,000 結合度 3/4

鹽分離沈降素=生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニテ分離シタル沈降素ナリ。

鹽分離沈降素=蒸餾水「メヂウム」53°C分離法ニテ分離シタル沈降素ナリ。

次ニ分離液中ニハ結合時ニ使用セシ抗原ノ僅少量ガ溶解移行シ居ルヲ常トス而シテ余ハ生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル分離液ト蒸餾水「メヂウム」53°C分離法ニ依ル分離液トノ間ニ於テ溶解移行セシ抗原量ヲ比較セシニ第7表ニ示セルガ如ク生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ルモノノ方ガ抗原含有量少キヲ見タリ。

第7表 生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル分離液中ノ抗原量ト蒸餾水「メヂウム」53°C分離法ニ依ル分離液中ノ抗原量トノ比較

沈 降 素 別	稀 釋 沈 降 價	抗 原 含 有 量
鹽 分 離 沈 降 素	1 : 16	1 : 5,000
蒸 餾 分 離 沈 降 素	1 : 16	1 : 2,500

備考 鹽分離沈降素=生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル沈降素

蒸餾分離沈降素=蒸餾水「メヂウム」53°C分離法ニ依ル沈降素

第2項 細菌凝集素ノ分離

大腸菌18時間培養ノモノ5寒天斜面ヲ白金耳ニテ丁寧ニ採リ之ヲ生理的食鹽水中ニ平等ニ浮遊セシメ60°Cノ重湯煎中ニテ2時間殺菌シ然後生理的食鹽水ニテ3回遠心洗滌ス如ク洗滌セラレタル菌ヲ凝集價1:25,600ヲ有スル免疫血清5ccト良ク混和シ37°Cノ孵卵器内ニ入ルル事2時間ノ後取り出シ強力ナル遠心器ニ依リ上清ト沈澱物トニ區分シ該沈澱物ヲ生理的食鹽水ヲ以テ數回遠心洗滌シ以テ免疫血清ノ殘存ヲ無カラシムス如ク純粹ニサレタル沈澱物ヲ最初結合時ニ使用シタル免疫血清ト等シキ量ノ生理的食鹽水中ニ浮遊セシメ各種溫度ノ重湯煎中ニ入レ時々振盪シ30分間ノ後ニ取り出シ直チニ強力ナル遠心器ニ依リ上清ト沈澱物トニ區別ス該上清液ハ即チ分離液ニシテ分離サレタル凝集素ヲ含有ス今各溫度ニ於ケル分離凝集素量ヲ表示スレバ如シ。

第8表 各溫度ニ於ケル細菌凝集素ノ分離度比較

抗體稀釋度 分離溫度	100	200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800	25,600	51,200	分離度
45°C	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1/380
55°C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1/88
65°C	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	1/22
75°C	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	1/88
原免疫血清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	/
結合上清	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	/

備考 結合度 8.8/10

第8表ノ成績ニ於テモ亦65°Cノ場合ノ分離度ガ最モ優秀ナリ。

次ニ10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法、蒸餾水「メヂウム」53°C分離法及ビ生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法トノ間ニ於テ各分離度ニ優劣ノ差アルヤ否ヤヲ檢セシニ次表ニ示セルガ如ク各分離法ノ間ニ大差ナカリキ其ノ成績ハ次表ノ如シ。

第9表 10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法、蒸餾水「メヂウム」53°C分離法及ビ生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル各分離度比較

抗体稀釋度 凝集素別	100	200	400	800	1,600	3,200	6,400	12,800	25,600	51,200	分離度
糖分離凝集素	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1/8
鹽分離凝集素	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1/8
原凝集素血清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	1/16
結合上清	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	✓

備考 結合度 5/10

糖分離凝集素=10%蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法ニ依ル分離凝集素。

鹽分離凝集素=蒸餾水「メヂウム」53°C分離法ニ依ル分離凝集素。

鹽分離凝集素=生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル分離凝集素。

第3項 血球凝集素ノ分離

第1章記載ノ如キ方法ニ依リ鶏血球液2ccヨリ血球基質ヲ作り凝集價1:800ヲ有スル抗鶏血球凝集素血清4ccト混和シ37°Cノ孵卵器内ニ入レ良ク凝集素トノ結合ヲ計ランガ爲メ時々振盪シ2時間ノ後取り出シ直チニ強力ナル遠心器ニ依リ上清ト沈降物トニ區別ス此沈降物ハ即チ血球凝集素ヲ以テ感作セラレタル血球基質ナリ次デ此沈降物ヲ生理的食鹽水ヲ以テ數回遠心洗滌シ以テ免疫血清ノ殘存セルモノヲ除去ス斯ノ如クシテ洗滌シ純粹トナサレタル沈降物即チ感作血球基質ヲバ結合時ニ使用シタル免疫血清量ト等シキ量ノ生理的食鹽水中ニ浮游セシメ各種溫度ノ重湯煎中ニ入レ時々振盪シ30分間ノ後ニ取り出シ直チニ強力ナル遠心器ニ依リ上清ト沈降物トニ分ツ該上清液ハ即チ分離液ニシテ分離サレタ血球凝集素ヲ含有ス今各溫度ニ於ケル分離血球凝集素ヲ表示スレバ次ノ如シ。

第10表 各溫度ニ於ケル血球凝集素ノ分離度比較

抗体稀釋度 分離溫度	50	100	200	400	800	1,000	分離度
45°C	-	-	-	-	-	-	0
55°C	+	-	-	-	-	-	1/14
65°C	+	+	-	-	-	-	1/7
75°C	-	-	-	-	-	-	0
原免疫血清	+	+	+	+	+	-	✓
結合上清	+	+	-	-	-	-	✓

備考 結合度 7/8

第10表ノ成績ニ於テモ亦65°Cノ場合ノ分離度ガ最モ良好ナリ。

次ニ10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法、蒸餾水「メヂウム」53°C分離法及ビ生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法トノ間ニ於テ各分離度ニ就キ差異アルヤ否ヤヲ檢シタルニ大差無キヲ見タリ即チ其ノ成績結果ハ次表ニ示スガ如シ。

第11表 10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法、蒸餾水「メヂウム」53°C分離法及ビ生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル各分離度比較

抗体稀釋度 凝集素別	25	50	100	200	400	800	1,000	分離度
糖分凝集素	+	+	-	-	-	-	-	1/28
鹽分凝集素	+	-	-	-	-	-	-	1/14
原免疫血清	+	+	+	+	+	+	-	/
結合上清	+	+	+	-	-	-	-	/

備考 結合度 7/8

糖分凝集素=10%蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法ニ依ル分離血球凝集素。

鹽分凝集素=蒸餾水「メヂウム」53°C分離法ニ依ル分離血球凝集素。

原免疫血清=生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル分離血球凝集素。

第4項 溶血素ノ分離

第1章記載ノ如キ方法ニ依リ山羊血球浮遊液5ccヨリ血球基質ヲ作り溶血價1:2,000ヲ有スル抗山羊血球溶血素血清5ccト混和シ前記血球凝集素分離時ニ於ケルト全ク同一方法ニヨリテ溶血素ヲ分離セリ今各溫度ニ於ケル分離溶血素ヲ表示スレバ次ノ如シ。

第12表 各溫度ニ於ケル溶血素ノ分離度比較

抗体稀釋度 分離溫度	50	100	200	400	800	1,000	2,000	4,000	分離度
45°C	+	-	-	-	-	-	-	-	1/24
55°C	+	-	-	-	-	-	-	-	1/24
65°C	+	+	-	-	-	-	-	-	1/12
75°C	-	-	-	-	-	-	-	-	0
原免疫血清	+	+	+	+	+	+	+	-	/
結合上清	+	+	+	+	+	-	-	-	/

備考 結合度 6/10

第12表ノ成績ニ於テモ亦65°Cノ場合ガ分離度最モ良好ナリ。

次ニ感作血球基質ヨリノ溶血素分離ニ際シ10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法、蒸餾水「メヂウム」53°C分離法及ビ生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法トノ間ニ於テ各分離度ニ差異アルヤ否ヤヲ檢シタル

ニ10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法ノ場合ガ他ノ場合ニ比シ少シク優秀ナリキ其ノ成績ハ次表ノ如シ。

第13表 10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」53°C分離法, 蒸餾水「メヂウム」53°C分離法及ヒ生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル各分離度比較

抗體稀釋度 溶血素別	50.	100	200	400	800	1,000	2,000	4,000	分離度
糖分離溶血素	+	+	+	+	+	-	-	-	7/10
餾分離溶血素	+	+	-	-	-	-	-	-	1/12
鹽分離溶血素	+	+	-	-	-	-	-	-	1/12
原免疫血清	+	+	+	+	+	+	+	-	/
結合血清	+	+	+	+	+	-	-	-	/

備考 結合度 6/10

第3章 結 論

以上各實驗成績ノ結果ヲ考按結論スル事次ノ如シ。

- 1) 感作抗原ヨリ抗體ヲ分離スル場合ノ「メヂウム」トシテ生理的食鹽水ヲ使用スル時ハ抗體ノ分離度ハ「メヂウム」ノ加溫度ト共ニ上昇シ65°Cノ場合ガ分離度最モ大ナリ。
- 2) 生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル分離度ハ從來稱用セラレ居ル10%ノ蔗糖溶液「メヂウム」蒸餾水「メヂウム」分離法ニ依ル分離度ト殆ド優劣ナシ。
- 3) 生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ニ依ル分離液ハ他ノ分離法ニ依レル分離液ニ比シ抗原ヲ含ム事少シ分離液中ニ於ケル抗原量ヲ少カラシムル事ハ抗體分離上緊要ナル要件ナリ。
- 4) 生理的食鹽水「メヂウム」65°C分離法ハ他ノ分離法ニ比シ其ノ操作簡便ナリト云フ利點アリ。
- 5) 溶血素血球凝集素ノ分離ニ際シ感作セシムベキ抗原トシテ血球基質ヲ使用スル時ハ血球溶解ニ由來スル分離液ノ著色ヲ防ギ且又等張壓ノ考慮ヲ要セザルノ利點アリ。

撰筆ニ當リテ終始御懇篤ナル御指導竝ニ御校閲ヲ辱フセシ恩師緒方教授ニ對シ謹テ感謝ノ意ヲ表ス。

(4. 6. 6. 受稿)

文 獻

- 1) Wiedal u. Sicard, Ann. de List, J. 100, 1897, P. 33. 2) Winterberg, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 32, 1899, S. 375. 3) Pick, Beiträge z. chem. physiol u. pathol. 1901, 1, 351. 4) Gibson, journal of Biol. chem., 1906, 1, 161. 5) Landsteiner, W. K. W. 1902, Nr. 40. 6) Landsteiner u. Jagic, Wien-Klin. Woch. 1904, 17. 7) Trommsdorf, Münch. med. Woch. März. 1900, S. 415. 8) Israel Weinstein, journal of Imm. Vol. 3, 1918, 3, 17. 9) Bail u. Tsuda, Zeitschr. f. Imm. 1909, Bd. 1, S. 546. 10) Spaet, Zeitschr. f. Imm. Bd. 7, 1910, S. 712. 11) Michaelis, Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 56, 1905, S. 509. 12) 21) 小酒井, journal of Imm., Vol. III. Nr. 2, 1918, P. 109. 13) 23) 古畑, Japan med. World. No. 6, 1921, P. 1. 14) 22) 緒方, Zeitschr. f. Imm. Bd. 39, 1924, S. 270. 15) 三輪, 衛生學傳染病學雜誌, 第 437 號, 684 頁, 1926. 16) Hunton, journal of Imm., Vol. 6, 1921, No. 2. 17) 景山, 岡山醫學會雜誌, 第 437 號, 684 頁, 1926. 18) 26) 須之内, Arbeiten aus der med. Universität zu Okayama Bd. 1, Heft 1, 1928, S. 1. 19) 白玖, 第 2 回衛生學微生物學寄生蟲學聯合學會講演. 20) Landsteiner, Wien. Klin. Woch., 1902, Nr. 40. 24) 緒方, 第 1 回衛生學微生物學寄生蟲學聯合學會講演. 25) 岩井, 國家醫學會雜誌, 第 428 號, 1922, S. 421. 26) 緒方, 第 2 回衛生學微生物學寄生蟲學聯合學會講演.

Kurze Inhaltsangabe.

Die Temperaturwirkung bei der Isolierung des Immunkörpers im physiologischen Kochsalzmedium.

Von

Gonzo Sunouchi.

Aus dem Hygienischen Institut der med. Universität zu Okayama.

(Vorstand : Prof. Dr. M. Ogata.)

Eingegangen am 6. Juni 1929.

1) Es ist eine interessante Tatsache, dass bei Isolierung des Antikörpers, der mit den Antigenen gebunden worden ist, die Menge des freigewordenen Immunkörpers zu der Temperatur eine innige Beziehung zeigt. Wenn man für die Isolierung nur eine einzige Bedingung benützt, z. B. in der physiologischen Kochsalzlösung die Temperatur erhöht, so geht die Menge des freigewordenen Antikörpers proportional mit der Temperaturhöhe des Mediums, wie von Landsteiner gezeigt, und auch von Prof. Ogata bei Bakterienagglutinin und von mir bei Serumpräzipitin bewiesen wurde.

Wenn man dagegen für die Isolierung des Antikörpers über zwei Faktoren benützt, wie Temperatur und Chemicalien, so fehlt dieser Parallelismus zwischen Temperaturhöhe und Antikörpermenge, und man findet dann nur den für die Isolierung geeigneten Wärmegrad. (nach Furuhata, Ogata und Pietro Rondoni, etc.)

2) Ich habe das Präzipitat im physiologischen Kochsalzmedium eine halbe Stunde lang bei verschiedenem Wärmegrad erhitzt, um die Resistenz des gebundenen Antikörpers zu untersuchen, und dabei das interessante Resultat erhalten, dass das gebundene Präzipitin bei 65°C. nicht vernichtet, sondern eine grosse Menge des Präzipitins wieder im Kochsalzmedium frei wurde. Auf Grund dieser Tatsache habe ich eine neue Isolierungsmethode des Antikörpers aufgestellt, weil bei der Isolierung des Antikörpers im Kochsalzmedium eine hohe Temperatur angewendet werden kann.

Als Vorprobe, habe ich die Resistenz des Antikörpers (Serumpräzipitin, Bakterienagglutinin, Haemoagglutinin und Haemolysin) gegen die Temperaturwirkung festgestellt und gefunden, dass die Antikörper erst bei 75°C. beschädigt werden.

3) Ich habe daher die Antikörper im physiologischen Kochsalzmedium bei 45°C.—75°C. isoliert und die folgenden Resultat erzielt.

a) Für die Isolierung des Antikörpers im physiologischen Kochsalzmedium eignet sich eine Temperatur von 65°C. am besten. Dabei ist die Antikörpermenge gleich wie bei den anderen Isolierungsmethoden, im Zuckermedium oder Wassermedium. (Der Quotient beträgt 1/20).

b) Die Isolierungsflüssigkeit enthält beim Kochsalzmedium weniger Antigene als beim Wassermedium oder Zuckermedium. Diese Tatsache zeigt auch einen grossen Fortschritt für die Isolierung des Immunkörpers, weil wir möglichst reine Antikörper, frei von Eiweiss, zu bekommen suchen.

c) Bei der Isolierung des Hämoagglutinins und Hämolysins, habe ich die Stroma des Blutkörperchens als Antigene benützt, um die Hitzehämolyse zu vermeiden. Nur bei Hämolysin konnte ich nicht die gleichen Resultate wie beim Zuckermedium (von Kosakai) erzielen, doch habe ich bei Hämoagglutiningleiche oder bessere Resultate mit meiner Methode gehabt als beim Zuckermedium, ebenso bei Serumpräzipitin und Bakterienagglutinin.

