

免疫動物諸臓器抗体の抽出法に就て

第一編

血球凝集反応並に溶血反応

岡山大学医学部衛生学教室 (主任 緒方教授)

平 松 哲 夫

(本論文の要旨は昭和24年11月岡山医学会第461回例会に於て発表せり)

[昭和28年11月17日受稿]

目 次

第1章 緒論並に文献	第2節 種々なる抽出液に於ける冷却抽出抗体量の比較
第2章 実験材料並に実験方法	第3節 冷却時間と抽出抗体量
第1節 免 疫	第4節 冷却回数と抽出抗体量
第2節 臓器乳剤製法	第5節 冷却法及加温法による抽出蛋白質量の比較 (Mikro Kjeldahl による測定)
第3節 抗体抽出法	第4章 結 論
第4節 反応検査方法	文 献
第1項 血球凝集反応	
第2項 溶血反応	
第3章 実験及び成績	
第1節 加温法と冷却法との比較	

第1章 緒論並に文献

免疫抗体が動物体の何処で形成されるかと言ふ問題は免疫学の当初より重大なる課題となつて居た。此の研究の為に各種臓器内の免疫体を証明する必要を生じ臓器から免疫体を抽出する方法が種々研究され数多の業績が世に発表されて来た。然しながら其の多くは臓器内免疫体の証明の手段として研究されたもので、抽出法自身の研究としてなされたものは数多くない。即ち1893年 Pfeiffer u. Marx¹⁾ は「コレラ」菌を以て免疫せる家兎を放血致死せしめた後、其の臓器の一定量を採り硝子末又は滅菌砂と共に一定量の肉汁を和し磨碎し一夜氷室に静置した後遠心沈澱して上清中に免疫体を証明した。此の方法と大同小異なる方法で各種臓器内の免疫体を証明したものに Wassermann²⁾, Widal u. Sicard³⁾, Achard u. Bensaude⁴⁾, Emden⁵⁾, Fodor u.

Rigler⁶⁾, Castellani⁷⁾, Jatta⁸⁾, Sick⁹⁾ 等がある。

やゝ趣を変へた方法としては次の諸氏の方法がある。即ち Emmerich¹⁰⁾ は免疫家兎の臓器を細截した後300~400気圧を加へて圧搾し其の圧搾汁を24時間氷室に静置し「シヤンペラン」濾過器で濾過している。亦 Mallannah¹¹⁾, Heim¹²⁾ 等は臓器を一旦乾燥粉末とし、其より再び抽出液を加へて免疫体を抽出した。又 Weil u. Braum¹³⁾ 及び Jules Freund¹⁴⁾ は組織に血液の混在を防ぐ為に37~42°Cの生理的食塩水或は Lock 氏液を以て体内灌流を行つて居る。

以上述べた諸氏は抽出液として肉汁、生理的食塩水、蒸溜水、アルコール、グリセリン等を使用して居る。

当教室に於ては岡崎¹⁵⁾氏が此等種々なる抽

出法を詳細実験し比較研究した結果浸出液として生理的食塩水を使用し、臓器乳剤を 56°C 2 時間加温後氷室に 24 時間静置したる上清に於て免疫体抽出量の最大なるを確認して居る。亦永田氏¹⁶⁾は浸出液として、20%に葡萄糖を添加した Tyrode 氏液を使用して更に多量の免疫体を抽出する事に成功した。

余は組織細胞が氷結融解により強く破壊される事実から氷結融解により免疫体が臓器細胞から遊出せしめ得る事に想達し緒方教授御指導の下に免疫体抽出の実験を行ひ聊か興味ある新しい成績を得たので茲に報告す。

第2章 実験材料並に実験方法

第1節 免 疫

1) 免疫動物として体重 2000~2500g の健康なる成熟家兎を選び免疫原としては新鮮なる山羊血球、鶏血球並に海狸腎乳剤を使用した。

2) 山羊血球並に鶏血球は三回以上食塩水を以て洗滌後 10%に稀釈したものを一回量 5cc 宛 4 日間隔を以て耳静脈に数回注射した。

3) 海狸腎は細切し10倍量の食塩水を加へて乳鉢で磨砕し、軽く遠心沈澱後其の上清を 10cc 宛 4 日間隔で腹腔内に 3 回注射した。

第二節 臓器乳剤製法

1) 免疫家兎は最後の注射から 7 日後頸動脈より放血致死せしめた。

2) 放血の終了直前予め 37°C に加温せる生理的食塩水を「カニューレ」を通じて反対側頸静脈より注入して体内の血液を可及的流出せしめた。

生理的食塩水の体内灌流は頸動脈より最早血液の流出せざるに至る迄行つた。

3) 開腹して取出したる所要臓器は更に水道水流水下に 8~16 時間洗滌したる後生理的食塩水で洗滌し、濾紙の間に挟んで充分水分を取除き、胎児圧搾器に装し碎滅し更に乳鉢で充分磨砕して半流動体の臓器乳剤を得た。

第三節 抗体抽出法

1) 上記の如くして製した臓器乳剤 0.5g を採り種々なる浸出液 4.5cc を加へてよく混

じた後氷結或は加温した後一夜氷室に放置し翌朝強力遠心沈澱して其の上清を 10 倍稀釈液として実験に供した。

2) 抽出液としては生理的食塩水其他種々なるものを使用した各々 0.5%の割に石炭酸を混入した。

3) 加温の為には重盪煎を使用した。氷結せしめる為には食塩と氷片により約 -15°C に冷却した。氷結後の上清は強力遠心するも透明にならない事があるが其の場合、Seitz の濾過器を使用すれば溶血反応並に血球凝集反応には不都合のない迄に透明にする事が出来るが Seitz の濾過器を使用すると抽出抗体量が多少減少するのはやむを得ない。亦 56°C 15 分加熱すれば透明な上清を得られるので此の実験では非働化の意味を含めて総て抽出液は 56°C 15 分間加温後実験に供した。

第4節 反応検査方法

第一項 血球凝集反応

血球凝集反応を検するには臓器抽出液又は血清の遞減的稀釈液を入れた各試験管に 5% 血球浮遊液を 2 滴宛滴加し 37°C の孵卵器に 2 時間静置後更に氷室に移し翌朝成績を判定し血球全体が一つの塊となり試験管底に沈降せるものを(卍)、液の中に中等度の大きさの血球の塊が浮遊せるものを(卅)、肉眼的に見別けのつく迄凝集せるものを(十)、肉眼的には分りにくい凝集鏡で拡大して見れば明らかに見別のつくものを(±)、陰性のものを(-)とせり。

第二項 溶血反応

溶血反応を検するには先づ補体価を測定し臓器抽出液又は血清の遞減的稀釈液、2.5% 血球浮遊液及び 2 単位の補体を各等量混和したる後 37°C の孵卵器に 2 時間放置後氷室に移し翌朝成績を判定した。成績の記入には完全溶血を(卍)、強度溶血を(卅)、中等度溶血を(卅)、弱溶血を(十)、完全溶血阻止を(-)とした。

第3章 実験及び成績

第1節 加温法と冷却法との比較

前述の如く先輩岡崎氏は臓器乳剤を 56°C 2 時間加温後氷室に24時間静置したる後分離した浸出液に於て抗体量が最大である事を実験して居る。それ故岡崎氏加温抽出法と余の冷却抽出法とを同一材料を使用して各臓器に就て実験し次の如き成績を得た。

第1表 山羊血球免疫家兎に於ける抗体抽出法の比較

血清溶血素価 6,400 抽出液 0.85% 生理的食塩水

抽出法	抽出液稀釈度		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	血清溶血素に 対する百分率
	臓器別	臓									
56°C 2 時間 加温	肺	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	5.0 %
	心	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	2.5 %
	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	2.5 %
	脾	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	1.25%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	2.5 %
-15°C 1 時間 冷却	肺	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	5.0 %
	心	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	5.0 %
	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	10.0 %
	脾	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	5.0 %
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+

血清溶血素に對する百分率は完全溶血をなせる稀釈度により計算す

第2表 Forssmann 氏 抗体に於ける実験

血清溶血素価 12,800 抽出液 0.85% 生理的食塩水

抽出法	浸出液稀釈度		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	血清に 對する 百分率
	臓器別	臓												
56°C 2 時間 加温	肺	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	2.5%
	心	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5 %
	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5 %
	脾	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	2.5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	5 %
-15°C 1 時間 氷結	肺	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5 %
	心	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5 %
	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	10 %
	脾	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5 %
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-	10 %

血清に對する百分率は完全溶血せる稀釈度により計算す

第3表 鶏血球免疫家兎に於ける抽出法の比較

血清の血球凝集素価 3,200 抽出液 0.85% 生理的食塩水

抽出法	浸出液稀釈度		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	血清に對する 百分率
	臓器別	臓										
56°C 2 時間 加温	肺	臓	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	10 %
	心	臓	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	10 %
	肝	臓	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	5 %
	脾	臓	卅	卅	卅	卅	+	+	-	-	-	20 %
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	+	+	-	-	-	10 %

-15°C 1時間 冷却	肺	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	20%
	心	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	10%
	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	20%
	脾	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-	10%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	10%

第1～第3表を通覧するに冷却法は加温法に優るとも劣らざるよい成績を示して居る。

第2節 種々なる抽出液に於ける

冷却抽出抗体量の比較

臓器抗体の抽出はそれに使用される抽出液の種類により抽出抗体量に多少がある。余は冷却抽出法に於て下記8種類の抽出液を使用して同一材料から抗体抽出を試みた。即ち

1) 生理的食塩水

2) 10倍等張食塩水

3) 10%蔗糖溶液

4) 5.1%葡萄糖溶液

5) 20%葡萄糖溶液

6) Tyrode 氏液 (CaCl₂ 欠)

7) Tyrode 氏液 (CaCl₂ 欠)+20%葡萄糖

8) 20%葡萄糖溶液+0.1% NaHCO₃

以上8種の溶液を使用して実験した結果は第4表の如きものである。

第4表 種々なる抽出液による鶏血球免疫家兎肝臓並に腎臓越幾斯中の血球凝集素量比較 血清凝集素価 6,400

抽出液	浸出液稀釈度		臓器別								血清に対する百分率		
	臓	臓	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560			
生理的食塩水	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
10倍等張食塩水	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-	20%	
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	10%	
10%蔗糖溶液	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
5.1%葡萄糖溶液	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
20%葡萄糖溶液	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
Tyrode 氏液 (CaCl ₂ 欠)	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	10%	
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	10%	
Tyrode 氏液 (CaCl ₂ 欠) + 20% 葡萄糖	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	20%	
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	20%	
20% 葡萄糖溶液 + 0.1% NaHCO ₃	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	10%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-	20%

即ち10倍等張食塩水, Tyrode 氏液 (CaCl₂ 欠) + 20% 葡萄糖, 20% 葡萄糖溶液 + 0.1% NaHCO₃ に於て他の抽出液に於けるより多量の抗体を抽出し得ている。

第3節 冷却時間と抽出抗体量

冷却法に於て氷結の時間の長短が抽出抗体

量に影響のある事が考へられる。文献によると冷却に際しては細胞間にある水分が先づ氷結し次いで細胞内部に及ぶのであつて氷結の程度により細胞の破壊の程度が異なるのである。故に氷結時間の長短と抽出抗体量の関係をみる為にした実験成績は第5表に示す通り

である。

第5表 冷却時間と抽出抗体量。山羊血球免疫家兎肝並に腎に於ける実験
血清溶血素価 6,400 抽出液 0.85%生理的食塩水

冷却時間	浸出液稀釈度		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	血清に対する百分率
	臓器別											
15分	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	2.5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	2.5%
30分	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	5%
1時間	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	10%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	10%
2時間	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	10%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	10%
4時間	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	10%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	10%
24時間	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	5%

即ち氷結時間が15分～1時間と長くなるに従ひ抽出抗体量も増加して居る。1～4時間では最高価を示し、24時間後ではむしろ減少して居る。此の事は余の実験した-15°Cの冷却では細胞内部迄充分氷結するのに1時間前後を要すると考へて良いかと思ふ。

第4節 冷却回数と抽出抗体量

第6表 冷却回数と抽出抗体量。Forssmann氏抗体に於ける実験
血清溶血素価 12,800 抽出液 0.85%生理的食塩水

冷却回数	浸出液稀釈度		1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1280	1:2560	1:5120	1:10240	1:20480	血清に対する百分率
	臓器別													
1	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	2.5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	2.5%
2	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5%
3	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	5%
4	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	10%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	10%
5	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	10%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	10%
6	肝	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	5%
	腎	臓	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	5%

氷結融解といふ細胞の機械的破壊作用は之を繰返すことにより益々強くなることが考へられ、従つて抽出抗体量にも影響のあることが考へられる。冷却15分後56°C水浴3分を1回として冷却を繰返し抽出抗体量を比較し第6表に示す如き成績を得た。

即ち1～4回と回数を増加するに従ひ抽出抗体量は増加して居るが5回以後は最早増加して居ない。

第5節 冷却法及び加温法による抽出蛋白量の比較

冷却法と加温法に依り抽出した各臓器の蛋白量を Mikro Kjeldahl により測定したが其の成績は第7表に示す如く各臓器共各々冷却

第7表 抽出メヂウム 生理的食塩水

抽出法	臓器	蛋白量(g/dl)	血清比(%)
56°C 2時間 加温	肺 臓	1.205	18.99
	心 臓	1.157	18.23
	肝 臓	1.766	27.82
	腎 臓	1.424	22.43
-15°C 1時間 冷却	肺 臓	1.346	21.20
	心 臓	1.795	28.28
	肝 臓	/	/
	腎 臓	1.748	27.54
	血 清	6.347	100.0

法に依る時の方が抽出蛋白量が多い。

第4章 結 論

以上の各実験成績から食塩と氷との寒剤に依つて臓器を冷却氷結し融解する抽出法は

1) 臓器蛋白並に臓器抗体抽出量に於て加温法に優るとも劣らない良い抽出法である。

2) 冷却法による臓器抗体抽出量は抽出液としては10倍等張食塩水, 20%葡萄糖加Tyrode氏液, 0.1% NaHCO₃加20%葡萄糖溶液が優秀である。

3) 冷却時間は1時間が適當で其以上長時間に互るも抽出抗体量は増加しない。

4) 冷却回数は4回に於て抽出抗体量最大となり, 其以上は回数を増加しても抽出抗体量は増加しない。

摺筆するに當りて終始御懇篤なる御指導並に御校閲の勞を辱ふせし恩師緒方教授に対し謹て感謝の意を表す。

文 献

- 1) Pfeiffer u. Marx, Deutsch. med. Wochenschr. 1898 u. 1901, sowie Zeitschr. f. Hyg., Bd. 27, S. 272, 1898
- 2) Wassermann, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 18, S. 235, 1894
- 3) Widal u. Sicard, Ann. de Pinst., T. II, P. 33, 1897
- 4) Achard u. Bensaude, Arch. de med. exper., 1896, P. 748
- 5) Emden, Handbuch von Kolle-Wassermann, II. Aufl., Bd. 2, P. 236
- 6) Foder u. Rigler, Centralbl. f. Bakt., Bd. 23, P. 960
- 7) Castellani, Ebenda, Bd. 37, P. 381, 1901.
- 8) Jatta, Zeitschr. f. Hyg., Bd. 33, P. 185,
- 9) Sick, Deutsch. Arch. f. kl. Med., Bd. 80, 1904
- 10) Emmerich, Handbuch von Kolle-Wassermann II Anfl., Bd 2, P. 236
- 11) Mallannah, Centralbl. f. Bakt., I. Abt., Bd. 42, P. 567, 1906
- 12) Heim, Handbuch von Kolle-Wassermann II Aufl., Bd. 2, P. 236
- 13) Weil u Braun, Biochem. Zeitschr., Bd 17, P. 337, 1909
- 14) Jules Freund, Journ. of Immunol., Vol. 14, P. 102, 1927
- 15) 岡崎 岡医雜, 第43年, 7号, 1931 (昭和6年7月)
- 16) 永田 岡医雜 55卷, 前編.