

## 85.

612.017.12-612.III.7

## 抗血小板血清ニ關スル研究

(第1編)

## 抗血小板血清ノ凝集反應ニ就テ

岡山醫科大學衛生學教室(主任緒方教授)

清水光治

〔昭和16年7月8日受稿〕

## 第1章 緒論

凝集反應ハ Gruber 及ビ Durham (1896) ガ細菌免疫血清中ニ於ケル凝集素ヲ研究セシニ其ノ端ヲ發セシモノニシテ爾來 Widal ノ重要ナル業績ヲ初トシテ細菌凝集反應ニ關スル研究業績ハ實ニ枚擧ニ遑アラズ。然レドモ組織細胞特ニ血小板ニ依ル凝集反應ヲ試ミタル者ハ比較的寡キニ屬スルヲ以テ余ハ茲ニ抗家兎血小板海猿血清ノ家兎血小板ノ白血球及ビ赤白血球ニ對スル凝集反應ヲ試ミントスルモノナリ。

抑々免疫學的刺激ガ生體ニ連續的ニ加ヘラルル時ハ之ニ拮抗シテ抗体ヲ増強スルモノナルモ而モ自カラ一定ノ限界アリ、即チ刺激一定度ヲ越ユルヤ假令之ガ連續スル場合ト雖モ抗体ノ產生ハ必ズシモ無限ニ増大スルモノニアラズシテ一度高度ニ達シタル後再ビ徐々ニ降下スルヲ常トスルモノナル事實ハ多數ノ學者ノ報告スル所ナリ、又之ガ誘因ニ就テノ多クノ研究中 Kraus u. Eisenberg, Walker, Pfeiffer u. Friedberger 等ノ唱導スル抗々體説ハ其ノ最モ著明ナルモノニシテ、山林、加藤及ビ鈴木氏等モ同様ノ報告ヲナセリ。余ハ家兎血小板ヲ以テ海猿ヲ免疫シ抗血小板免疫血清ヲ製造スルニ當リ諸種ノ實驗ヲ行ヒタルニ、頻回ノ抗原注射ハ必ズシモ高度ノ免疫ヲ得ルニ役立タザ

ルコト他ノ一般免疫ノ場合ト同様ナルコトヲ知レルト共ニ2, 3ノ知見ヲ得タルヲ以テ茲ニ其ノ成績ヲ報告セントスルモノナリ。

## 第2章 實驗材料及ビ實驗方法

## 1. 家兎血小板採取法

4% 枸橼酸曹達生理的食鹽水ヲ豫定採血量ノ $\frac{1}{2}$ 量入レタル滅菌容器ニ家兎頸動脈ヨリ採取セル血液ヲ收受シ充分混和後一夜氷室ニ放置シタル後遠心分離(最初1—4分間ハ1000—2500回廻轉次デ4—10分間ハ3000回廻轉)スル時ハ赤白血球及ビ白血球ハ下部ニ、血小板ハ上部ニ白濁ノ上清トナリテ殘存ス。コノ白濁上清部ノ上部 $\frac{3}{4}$ ヲ「ミクロビベット」ニテ吸ヒ探リ再ビ3000回30分間遠心沈澱スルトキハ上清ハ透明トナリ管底ニ白キ沈澱ヲ生ズルヲ見ル。コノ上清ヲ捨テ生理的食鹽水5ccヲ加ヘ「パラフィン」ヲ塗布セル硝子棒ニテ混和セル後一器ニ集メ更ニ3500回15—20分間遠心沈澱スルトキハ管底ニ純血小板ノ沈澱ヲ生ズ。上清ヲ捨テ前回ト全ク同様ナル方法ヲ以テ目盛り沈澱管ニ移シ更ニ3500回20分間遠心沈澱シコノ沈澱セル純血小板ヲ生理的食鹽水ヲ以テ2%浮游液トシ免疫ニ使用セリ。尙ホ此採取セル沈澱ガ純ナル血小板ナルコトハ塗抹標本ノ染色ニヨリテ確證セリ。

2. 抗血小板血清ノ製法

上述ノ方法ニヨリ採取セル2%家兎血小板浮游液ノ2ccヲ1回注射量トシ、健康海兎ノ腹壁皮下ニ3日目毎ニ連續5回ノ免疫注射ヲ行ヒ、最後ノ注射ヨリ9日目は全採血ヲ行ヒテ血清ヲ分離シ、56°C 30分間加熱シテ非働性血清トナシ冷暗所ニ貯ヘ用ニ臨ミ使用スルコトトセリ。

3. 凝集反應試驗法

血小板ガ著シク不安定ニシテ容易ニ理化學的作  
用ノ影響ヲ受クルモノナルコトハ周知ノ事實ナル  
モ凝集反應試驗ハ習熟スルニツレ極メテ明確ナル  
成績ヲ得ルモノナリ、即チ遞降的ニ稀釋セル抗家  
兎血小板海兎血清0.5ccニ2%家兎血小板浮游液  
2滴宛ヲ滴下シ混和後37°Cノ孵卵器ニ納メ時間的

ニ觀察セリ。而シテ血小板全ク全集シテ管底ニ沈  
澱シ血清ノ澄明トナレルモノヲ(卅)、管底ニ著明  
ノ凝集沈澱ヲ生ズルモ血清極メテ僅ニ濁濁セルモ  
ノヲ(卅)、沈澱ノ凝集セルヲ明瞭ニ認ムルモ血清  
稍々濁濁状態ニアルモノヲ(+), 沈澱ノ不確實ナ  
ルモノヲ(±)ニテ示セリ。

第3章 抗血小板血清ノ凝集反應

第1節 抗血小板血清及ビ正常血清ノ血小  
板ニ對スル凝集反應

1. 抗血小板血清ノ血小板ニ對スル凝集反應

Bordet u. Wassermann 等ノ諸學者ノ研究ニ  
ヨリ、血球凝集素ハ免疫ニヨリテ其ノ量ヲ増シ且  
其ノ特異性ヲ有スルコトヲ證明セラレタルハ周知

第1表 抗家兎血小板海兎血清ノ家兎血小板ニ對スル凝集反應

血清別	稀釋倍數 觀察時間	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	K
		No. 17	1 st 2 3 4 5 6	卅 卅 卅 卅 卅 卅	卅 卅 卅 卅 卅 卅	卄 卄 卄 卄 卄 卄	十 十 十 十 十 十	十 十 十 十 十 十	± ± ± ± ± ±	— ± ± ± ± ±	— — — — — —
No. 18	1 st 2 3 4 5 6	卅 卅 卅 卅 卅 卅	卅 卅 卅 卅 卅 卅	卄 卄 卄 卄 卄 卄	十 十 十 十 十 十	十 十 十 十 十 十	— ± ± 十 十 十	— — — — ± ±	— — — — — —	— — — — — —	— — — — — —
No. 21	1 st 2 3 4 5 6	十 十 十 十 卄 卅	十 十 十 十 卄 卅	十 十 十 十 十 十	十 十 十 十 十 十	十 十 十 十 十 十	十 十 十 十 十 十	十 十 十 十 十 十	± ± ± ± ± ±	— — — — — —	— — — — — —
No. 22	1 st 2 3 4 5 6	卅 卅 卅 卅 卅 卅	卅 卅 卅 卅 卅 卅	卄 卄 卄 卄 卄 卄	十 十 十 十 十 十	十 十 十 十 十 十	± ± 十 十 十 十	± ± ± ± ± ±	— — — — ± ±	— — — — — —	— — — — — —

ノ事實ナルヲ以テ、抗家兎血小板海溟血清ノ家兎血小板ニ對スル凝集反應ヲ試ミ其ノ凝集素價ト凝集反應成績判定時間ヲ檢セントシ遞降的ニ稀釋セル抗家兎血小板海溟血清 0.5 cc = 2% 家兎血小板浮游液 2 滴宛ヲ加ヘ孵卵器 (37°C) = 納メテ觀察セリ。其ノ成績ハ第 1 表ニ示サガ如ク、No. 21, No. 22, No. 17 及ビ No. 18 ノ 4 免疫血清 (3 日目毎ノ注射 5 回ニ及ベルモノ) = 於ケル凝集反應ノ觀察時間ハ直ニ判定ヲ下ス場合ハ孵卵器ニ納メテヨリ 5 時間ヲ適當トスルモノニシテ、5 時間ニ於テハ No. 21 及ビ No. 22 ノ免疫血清ハ 640 倍、No. 17 及ビ No. 18 ノ免疫血清ハ 320 倍ノ凝集價ヲ示セリ。而シテ余ハ本實驗ニ於テ凝集反應ヲ 12 時間ニ及ビテ觀察セルモ 6 時間以後ニ於テハ何等コノ成績ト變化ナカリシヲ以テ第 1 表ニハ 6 時間以後ノ成績ヲ省略セリ。

2. 健康海溟血清ノ家兎血小板ニ對スル凝集反應

遞降的ニ稀釋セル海溟血清 (No. 3, 9, 20 及ビ 13) ノ家兎血小板ニ對スル凝集反應ヲ檢シタルニ孵卵器ニ納ムルコト 5 時間ニ及ブモ何等明確ナル凝集反應ハ出現セザリキ、更ニ永キニ互リ孵卵器ニ放置スル時ハ非特異性凝集反應出現シ、沈渣ハ雲絮狀ノ凝塊ニシテ一見シテ眞ノ凝集反應ナラザルコトヲ認メタリ。本實驗ニ於テ余ハ 24 時間ニ互リテ觀察セルモ第 2 表ニハ 6 時間迄ノ成績ヲ記セリ。

第 2 表 對照試驗トシテ健康海溟血清ノ家兎血小板ニ對スル凝集反應

血清別	稀釋 倍数 觀察時間	稀釋 倍数							
		10	20	40	80	160	320	640	K
No. 3	1st	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	±	±	—	—	—	—
	3	—	—	±	±	±	—	—	—
	4	—	—	+	+	±	—	—	—
	5	—	—	+	+	+	—	—	—
	6	—	—	+	+	+	—	—	—

血清別	稀釋 倍数 觀察時間	稀釋 倍数							
		10	20	40	80	160	320	640	K
No. 9	1st	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	+	—	—	—	—
	3	—	—	—	+	—	—	—	—
	4	—	—	—	+	—	—	—	—
	5	—	—	—	+	±	—	—	—
	6	—	—	—	+	±	—	—	—
No. 20	1st	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	±	+	—	—	—
	3	—	±	+	+	+	±	—	—
	4	±	±	+	+	+	±	—	—
	5	±	±	+	+	+	±	—	—
	6	±	+	+	+	+	±	—	—
No. 13	1st	—	—	—	—	—	—	—	—
	2	—	—	—	—	±	—	—	—
	3	—	±	—	—	+	±	—	—
	4	—	±	+	+	+	±	—	—
	5	—	±	+	+	+	±	—	—
	6	—	±	+	+	+	±	—	—

± 卅 ± ノ符號ヲ以テ表示セルガ眞ノ凝集反應ニ非ズ

第 2 節 抗家兎血小板海溟血清ノ家兎赤血球及ビ白血球ニ對スル凝集反應

1. 抗家兎血小板海溟血清ノ家兎赤血球ニ對スル凝集反應

洗滌家兎赤血球ヲ生理的食鹽水ヲ以テ 1% ノ浮游液トシ、其ノ 3 滴宛ヲ遞降的ニ稀釋セル抗家兎血小板海溟血清 0.5 cc = 滴下セシメ凝集反應ノ有無ヲ檢シタルニ、第 3 表ニ示サガ如ク其ノ程度低キモ明確ナル副凝集反應ヲ示セリ。抗血小板血清ト赤血球トノ間ニ副凝集反應存在スルヤ否ヤハ判明セザルモ Bedson ハ著明ナル副反應アリトシ、Rosenthal u. Falkenheim 等ハ副反應ヲ認メザルカ存在シテモ痕跡アリトシ、松井氏ハ副反應存ストセリ。余ノ實驗ハ松井氏ノ成績ニ一致セリ。

2. 抗家兎血小板海溟血清ノ家兎白血球ニ對スル凝集反應

白血球ニ對スル凝集反應ヲ試ムルニ當リ最モ大

ナル障礙ハ白血球ノ各種ヲ採取シ得ザルコト食鹽水溶液中ニ於ケル白血球浮游液極メテ不安定ニシテ容易ニ特發性凝集反應Spontane Agglutinationヲ起スコトナリ。

白血球ハ從來行ハルル方法ニヨリ家兎ノ腹腔ヨリ採取セル白血球ヲ最初4% 枸橼酸曹達生理的食鹽水ヲ以テ洗滌シタル後生理的食鹽水ヲ以テ2%ノ白血球浮游液ヲ作り、其ノ3滴宛ヲ遞降的ニ稀釋セル免疫血清0.5ccニ滴下シ、孵卵器ニ納ムルコト2時間及ビ5時間ニシテ凝集反應ノ出現ヲ檢シタルニ沈澱ハ雲絮狀ノ凝塊ヲ作り判然タル凝集反應ヲ示サザリキ。コレ恐ラクハ白血球ハ時間ヲ經ルニツレ互ニ粘着シ非特異性ノ凝集ヲ惹起セルニ起因スルモノナラン。

余ハ更ニ黒川氏ニ倣ヒ1% 枸橼酸曹達加生理的食鹽水ヲ使用シテ實驗セルモ、非特異性ノ凝集ハ抑制スルヲ得ザリキ。文獻ニ徵スルニ諸家ノ業績ノ多クハ抗血小板血清ハ白血球ヲ凝集セザルコトヲ報ズルモノニシテ、余ノ成績モ亦之等ニ一致スル所ナリ。

第3表 抗家兎血小板海狼血清ノ家兎赤血球及ビ白血球ニ對スル凝集反應

血球別	血清別 觀察時間	No. 2	No. 4	No. 7	No. 10	No. 19
		血小板	2時間 1: 80	1: 80	1: 20	1: 40
	5時間	1: 640	1: 640	1: 640	1: 320	1: 320
赤血球	2時間	1: 24	1: 8	1: 2	1: 4	1: 2
	5時間	1: 128	1: 64	1: 8	1: 64	1: 64
白血球	2時間	—	—	—	—	—
	5時間	—	—	—	—	—

注意 對照トシテ健康家兎血清ヲ10倍ヨリ80倍迄稀釋シ之ニ血小板、赤血球及ビ白血球浮游液ヲ滴下シ凝集反應ヲ試ミタルニ總テ陰性ナリ

### 第4章 凝集價高キ血清採取方法

#### 第1節 免疫注射ニ必要ナル注射量、注射間隔及ビ注射回数

凝集價高キ抗血小板血清ヲ採取セントシ、1、注射量 2、注射間隔 3、注射回数ニ就テ實驗セリ。免疫ハ4月ヨリ6月ノ間ニ行ヒ、動物ハ體重500—700gノ健康海狼ヲ選ビ、免疫元ハ2%ノ家兎血小板浮游液ノ新鮮ニシテ冷暗所ニ貯ヘタルモノヲ使用セリ。

コノ免疫ニ當リテハ頻回ノ血小板注入ト採血トヲ交互ニ行フ關係ヨリ斃死スルモノ極メテ多ク幸ニシテ目的達成マデ殘存セル海狼（No. 1—11及ビ19）ニ就テ觀察セリ。而シテ第4表ニ示サガ如ク海狼No. 1, No. 4, No. 7及ビNo. 10ハ何レモ血小板浮游液ノ1回注射量ハ1ccニシテ、注射間隔ハNo. 1ハ毎日、No. 4ハ3日目毎、No. 7ハ7日目毎、No. 10ハ10日目毎ニ注射ヲ行ヒタルモノナリ。

又海狼No. 2, No. 5, No. 8及ビNo. 11ハ何レモ血小板浮游液ノ1回注射量ハ2ccニシテ、注射間隔ハNo. 2ハ毎日、No. 5ハ3日目毎、No. 8ハ7日目毎、No. 11ハ10日目毎ニ注射ヲ行ヒタルモノナリ。

更ニ海狼No. 3, No. 6, No. 9及ビNo. 19ハ何レモ血小板浮游液ノ1回注射量ハ4ccニシテ、注射間隔ハNo. 3ハ毎日、No. 6ハ3日目毎、No. 9ハ7日目毎、No. 19ハ10日目毎ニ行ヒタルモノナリ。其ノ成績ヲ觀察スルニ1回注射量2ccノ場合ハ良好ナル成績ヲ示スモ、4ccヲ越スル時ハ體重大ナル海狼モ注射ニ耐ヘズシテ斃死スルヲ見ル。又注射間隔ハ2—6日ヲ、注射回数ハ5—6回ヲ適度トシ、頻回ノ注射ハ必ズシモ凝集價ヲ高ムルコトヲ得ズ。而シテ凝集素ノ産生度ハ1, 2及ビ3回目頃迄ハ微弱ナルモ4回及ビ5回ニ至レバ急激ニ増大スルモノナリ。



## 第2節 凝集價降下状態

海狼 No. 2, 4, 7, 10 及び 19 ヲリ得タル免疫血清＝就テ日數ノ經過ト共ニ凝集價ノ降下状態ヲ檢シタルニ第4表ニ示スガ如ク免疫血清採取時ノ凝集價 320—640 倍ノモノモ既ニ 10 日ヲ經過スル時ハ低下シ始メ、1 箇月ヲ經過スレバ凝集價著シク低下シテ殆ド抗血小板血清トシテノ價値ナキヲ知レリ。

## 第5章 結論

余ハ抗家兎血小板海狼血清ノ凝集反應＝關スル實驗ヲナシ次ノ如キ結論ヲ得タリ。

1. 健康海狼血清ハ 10 倍ニ稀釋セル場合ニ於テモ家兎血小板ヲ凝集セズ。
2. 抗家兎血小板海狼血清ノ家兎血小板ニ對スル凝集反應ノ成績ヲ判定スルニハ孵卵器ニ納メテヨリ 5 時間ヲ適當トス。
3. 抗家兎血小板海狼血清ハ家兎血小板ニ對シ

明確ナル凝集反應ヲ示シ家兎赤血球ニ對シテハ副凝集反應ヲ示セルモ白血球ニ對シテハ示サザリキ。

4. 凝集價高キ抗家兎血小板海狼血清ヲ採取スルニハ 1 回ノ免疫注射量ハ 2% ノ血小板浮游液 2 cc ヲ、注射間隔ハ 2—6 日ヲ、注射回数ハ 5—6 回ヲ適當トス。
5. 免疫血清ヲ得ルニ當リ凝集素ノ產生ハ免疫注射 1—3 回ニ於テハ微弱ナルモ 4—5 回目ヨリハ急激ニ増大ス。
6. 免疫血清中ノ凝集素ハ極メテ早く消失スルモノニシテ 640 倍ノ凝集價ヲ有スル血清ニテモ 10 日ヨリ減少シ始メ 1 箇月ヲ經過スレバ凝集素殆ド消失スルモノナリ。

終リニ臨ミ終始御懇篤ナル御指導ト御校閲ヲ賜リタル恩師緒方教授ニ衷心感謝ノ意ヲ表ス。

## 文

- 1) 吉田彦一, 日本微生物學會雜誌, 第15卷.
- 2) 大久保雙一, 社會醫學雜誌, 第479號, 昭和3年.
- 3) 松井敏行, 日本微生物學會雜誌, 第17卷下.
- 4) 黒川賢意, 實驗醫學雜誌, 第13卷, 昭和4年.
- 5) 得田廣市, 東北醫學會雜誌, 第8卷, 大正13—14年.
- 6) 濱田一郎, 東京醫學會雜誌, 第39卷, 大正14年.
- 7) 橋本徳治郎, 京都府立醫大雜誌, 第9卷, 昭和8年.
- 8) 山林邦太郎, 日本微生物學會雜誌, 第17卷上.
- 9) 菊地義太郎, 醫學研究, 第8卷, 第12號.
- 10) Landsteiner, Zentralbl. f. Bakt., XXV, S. 546, 1899.
- 11) Landsteiner, Münch. med. Wochschr., Jg. 50, S. 1812, 1903.
- 12) Klin,

## 獻

- Wien. Klin. Wochenschr., Jg. XV, S. 413, 1902. 13) Bedson, Jour. Pathol. a. Bact., P. 24, 469, 1921. 14) Atkin, Zschr. f. Immunitätsf., 1, S. 387. 15) Buchner, Arch. f. Hyg., Bd. X, XVII. 16) Landsteiner, Wien. Klin. Wochenschr., 1897. 17) Kraus, Wien. Klin. Wochenschr., 1899. 18) Scheller, Zentralbl. f. Bakt., XXVI, 1904. 19) Erich Leshcke, Zeitschrift. f. Immunitätsf. u. experi. Therapie, Teil 1: Originale, Bd. XII, 627, 1913. 20) Sacerdotti, Folia serologica, Bd. I, Referate, 457, 1908. 21) Otuka,

*Aus dem Hygienischen Institut der Medizinischen Fakultät Okayama  
(Vorstand: Prof. Dr. M. Ogata)*

## Serologische Studien über das Antiblutplättchenserum.

### (1. Mitteilung)

### Über Agglutinineversuch mit Antiplättchenserum.

Von

Koji Shimizu.

*Eingegangen am 8. Juli 1941.*

Es gibt wenige Arbeiten über Antiplättchenserum, weil aus technischen Gründen die Sammlung des Antigens und die Reaktion zwischen Plättchenantigen und Antikörper sehr schwer ist.

Verfasser immunisiert das Meerschweinchen mit Kaninchenblutplättchen und untersucht die Antikörperbildung durch Agglutinineversuch.

Die Resultate der Untersuchungen mögen hier kurz zusammengefasst werden.

1) Das normale Meerschweinchenserum agglutiniert gegen Kaninchenblutplättchen von 10 facher Verdünnung nicht mehr.

2) Den Meerschweinchen wurden je 2 ccm 2% iger Blutplättchenaufschwemmung in 2-6 tägigen Interval injiziert, im ganzen 5-6 mal, immunisiert.

3) Nach 5 stündiger Aufbewahrung im Brutofen beobachtete Verfasser die Agglutination am deutlichsten.

4) Dieses Antiserum wirkt auf Blutplättchen am stärksten, doch agglutiniert es die roten Blutkörperchen des Kaninchens, aber nicht die weissen.

5) Bei 1-3 maliger Injektion konnte man sehr schwaches Agglutinin beim Versuchstier erzeugen und erst nach 4-5 maliger Immunisierung eine rasche Steigerung des Agglutininwertes beobachten. Doch entspricht dieses Agglutininbildung nicht immer der Injektionszahl und sieht man oft eine Verminderung des Agglutinins nach vielmaliger Injektion.

6) Der höchste Agglutininwert hält sich nur einige Tage, danach beginnt er sich allmählich zu vermindern. Ein Agglutininserum (1:640) zeigt z. B. nach 20 Tagen (1:40) und nach 30 Tagen nicht mehr.

*(Autoreferat)*