

レプトスピラの沈降反応に関する研究

第1報*

長崎大学風土病研究所臨床部 (指導:横田名誉教授
主任:吉田助教授)

長崎大学風土病研究所病理部 (主任:登倉教授)

西 田 公 一
にし だ きみ かず

本論文の要旨は、第33回日本伝染病学会総会・昭和34年4月6日、1959、東京において発表した。

Experimental Studies on the Precipitin Reaction of *Leptospirae*. Report I. Kimikazu NISHIDA. Clinical Department I, Research Institute of Endemics, Nagasaki University (Director: Ass. Prof. Shizuma YOSHIDA; Leaders: Prof. emer. Soichirō YOKOTA and Prof. Noboru TOKURA).

緒 言

レプトスピラ病の免疫血清反応としては、凝集反応、Pfeiffer 溶菌現象、補体結合反応及び Rieckenberg 反応等が知られているが、今日一般に実用的に用いられているのは凝集反応であり、それには大庭 (1921)、Schüffner & Mochtar (1927) による顕微鏡判定法もあり、沼田 (1938)、北岡等 (1951) の肉眼的判定法もある。

Leptospira の沈降反応に就いては若干の文献が散見されるに過ぎない。Hindle (1934) とその協力者は無害の水レプトスピラ (*Leptospira biflexa*) の一株から抽出した特異性抗原を以つて沈降反応に成功したと云い、また、土屋 (1950) は *Leptospira icterohaemorrhagiae* を用いて沈降反応を行つているが、現在一般に利用される状況には至つていない。それはレプトスピラの沈降反応に興味と関心が持たれなかつたことを物語るものではなくて、従来得られた成績が実用に供するに足らなかつたか、生物学的にレプトスピラ自体の沈降原性が弱いのか、いづれにせよ、検討の余地は残されていると考えられる。我国のように本病或いは類似の疾患の多発する地域に於いては、沈降反応のように比較的操作简单な方法によつてレプトスピラ病の診断乃至分類が実施されることは、実際面から要望されるばかりでなく、学問的にも有意義であると考えられるので、この意図を以つて実験をすゝめ

た。

まづ、自家融解、加熱抽出、自家融解及び加熱抽出の併用、並びに、電気溶菌によつて作製した抗原の効果を実験によつて比較検討し、最優秀と認められた抗原を以つて異種レプトスピラに対する特異性を確かめ、かつ、抗原物質の理化学的性状と活性因子に就いて多少の観察を加えた。また、異種免疫血清間の吸収試験を行い、Schüffner-Mochtar 反応による凝集反応と沈降反応との関係を追求めた。

第1章 レプトスピラの抗原物質の抽出方法とその性状

実験材料並びに実験方法

菌株: 当教室保存の *Leptospira autumnalis* (Lep. A).

培地並びに培養法: 10% 山羊血清添加の Korthof 培地に 37°C/48 時間の無菌試験を行つて使用した。Korthof 培地に加える血清は、56°C/60分加温、9000 r. p. m./45分間遠心上清のみを用い、可及的固形成分の混入を避けた。培養法としては、300cc のコルベンに200cc の培地を分注し、それに増殖最盛期にあるレプトスピラ培養液5ccを加え、27°C/7~10日間培養し、それを抗原抽出及び家兎免疫ワクチンの作製に供した。

免疫方法並びに抗血清: 發育最盛期のレプトスピラ培養を滅菌濾紙を以つて濾過して粗大顆粒を除いた後、9000 r. p. m./45分間遠心して得られた沈渣を生理食塩水 (pH 7.0) を以つて3回洗滌し、1.0mg/ccの生

理食塩水浮游液を作製し、0.2%の割合にホルマリンを加えてワクチンとして氷室に保存し、それを2.0kg内外の白色健常家兎（沈降反応及びS-M反応陰性）の耳静脈より0.5, 1.0, 1.5, 2.0cc/pro kgと漸次増量して3日毎に4回注射し、或程度凝集価が上昇したことを確めて、最後の注射より2週間目に全採血し、その血清を56°C/30分の加熱によつて非働化して後0.5%の割合に石炭酸を加えて氷室に保存し、適時実験に供した。

沈降反応術式並びに判定法：沈降反応は重層法により、抗血清は1.2%アラビヤゴム加生理食塩水溶液（pH 7.0）を以つて2倍進進稀釈し、それに生理食塩水（pH 7.0）を以つて同様に稀釈した抗原液を静かに重層して、37°C/2時間後の成績を以つて最終値として判定し、抗原価及び抗体価を組合せて反応の場を觀察した。兩液の境界面に生ずる沈降物の性状並びに有無によつて、強陽性（+++）、中等度陽性（++）、弱陽性（+）、疑陽性（±）として記録し、陰性は余白のまゝにした。

実験 I. 沈降原抽出方法の比較検討

まづ、Lep. A を実験に供し、最優秀な沈降原を得る方法を探求した。發育最盛期にあるレプトスピラ培養を滅菌濾紙で濾過し、9000r.p.m./45分間遠心して集菌、それを生理食塩水を以つて3回洗滌して秤量、20mg/ccの滅菌水浮游液を作製、氷室に保存し、適時次に述べるような理化学的操作を施して抗原の抽出を試みた。

1. 自家融解抗原

金田（1943）は、各 pH 緩衝液を以つて処置したレプトスピラ浮游液を強力に遠心し、その上清を抗原として、それによる当該免疫血清の補体結合反応を行い、菌体の崩壊によつて抗原の媒液へ移行することを報告しているが、等電点では抗原の遊離が一番弱かつたという。なお、レプトスピラによる補体結合反応に就いては、Randall（1948）は超音波を以つて処理された培養から抗原を証明し、また、Ezell, Hoag, Warrner Yager and Gochenour（1952）等は、Stuart 培地に於ける 37°C/10~14 日の培養に 1:10000 の割合に Marthiolate を加えて強力に遠心した上清を用いて優秀な成績を挙げ得ることを力説している。このように、現在レプトスピラの種別又は型別に用いられている補体結合反応の抗原物質も菌体の自家融解又は機械的破壊によつて得られることが知られているし、また、化学的操作によつて抗原性に變動を來すことを避けるためには自然のままの状況で抗原を取り出すことが

望ましいと考えられる。

まづ、著者の実験に於いては、前記 20mg/cc のレプトスピラ滅菌水浮游液から自家融解によつて沈降原を得ることを意図した。すなわち、それを 37°C の恒温器及び氷室に 1 日交互に時々振盪混和しながら反覆放置し、1 週間後に検鏡すると、レプトスピラの破壊が認められるので、9000r.p.m./45 分間遠心の上清を分離して自家融解抗原とし、0.5%に石炭酸を加えて氷室に保存し、0.9%に食塩を加え、pH 7.0 に修正して実験に供した。

2. 加熱抗原

坂（1922）は、半凝固寒天培地に於けるレプトスピラ培養を加熱し、その遠心上清を用い、補体結合反応に或る程度見るべき成績を得たと報告している。この実験に於いては、加熱抽出法の良否を觀察するのであるから、自家融解による物質の混入を避けるために、可及的新鮮（調整後24時間以内）なレプトスピラ浮游液を用い、それに56°C/60分、100°C/60分、120°C/30分の加熱を施して沈降原の抽出を図つた。

対照試験に非加熱の上清を用いた。また、この機会に於いて、上屋（1950）の方法に倣い、レプトスピラ浮游液に苛性ソーダを 0.5%の割合に添加し、強アルカリ性として菌体を破壊した後、前述同様に加熱操作を施して抗原の抽出を試みた。なお、土屋の觀察によれば、黒屋（1942）が発疹チフス抗原を抽出した方法に倣い、レプトスピラ浮游液を pH 5.0 に於いて 100°C/30分加熱し、更に、それを pH 3.5 に於いて 100°C/2時間加熱しても、レプトスピラ沈降原は抽出されなかつたと言うし、また、陳（1940）もレプトスピラは抗酸性抗原を保有せずと報告しているが、試みに、レプトスピラ浮游液の加熱処置に先立つて、それを醋酸を以つて pH 5.0 とし、前記同様に抗原の抽出を行つた。この強アルカリ性及び酸性菌液は、それぞれ、100°C/60分、56°C/60分、並びに、56°C/120分の加熱の後、9000r.p.m./45分間遠心して上清を分離、0.5%に石炭酸を加え、氷室に保存し、随時、0.9%に食塩を加えて等張とし、pH 7.0 に修正して実験に供した。この方法によつて抗原が得られるとしても、それは加熱処置によつて抽出されたのではなくて、むしろ、酸又はアルカリによつて抽出されたものであろうが、便宜上此処に記載した。

3. 自家融解加熱抗原

前記レプトスピラ浮游液を前述したように 37°C の恒温器と 5°C の氷室に 1 日交互に 1 週間入れて自家融解を困つた後、更に、それぞれ、56°C/60分、100°C/

60分及び 120°C/30分の加熱を施し、9000r.p.m./45分間遠心上清を分離し、0.5%の割合に石炭酸を加えて氷室に保存し、用に臨み、0.9%の割合に食塩を加え、pH 7.0 に修正して実験に供した。この場合、対照実験として、自家融解液に加熱処置を施さない遠心上清を用いた。

4. 電気溶菌抗原

電気溶菌による諸種細菌の抗原物質の抽出は、Yen & Kurotchkin (1935) の報告から独立して村尾・森本 (1935) のチフス菌等に観察があり、爾來、その応用の範囲は次第に拡大されつゝある。中山 (1944) は結核菌体の電溶濾液及び電溶沈渣にて結核菌の抗原性を追求し、吉田 (1952) は電気溶菌によつて癩組織からレプロミン様抗原の採取に成功し、また、伊与田 (1954) は *Candida albicans* の電気溶菌による抗原物質に就いて観察している。

著者は、これら諸家の報告に鑑み、電気溶菌によつてレプトスピラの沈降原の抽出を初めて試みた。

電気溶菌装置は、風土病研究所臨牀部第一研究室に於いて考案したものであつて、電灯線より通電し、100Volt の交流を整流・変圧し、0.1Amp~3Ampの範囲に電流の強さを調節し得るようになってゐる。電極は直径 10mm・長さ 10cm の2本の白金線に接続し、この白金線を電導子として固定した硝子筒 (50cc容積) 内に平行にして挿入して管底に達せしめる。Volt, Amp 及び通電時間の組合わせが問題であるが、伊与田 (1954) によれば、18種類の電溶抗原による補体結合反応、沈降反応及び皮膚反応の成績に於いて、30 Volt, 0.7~1.4Amp の通電を 80°C 以下で 20~25分間行つて得たものが特異的力価が最も高いことが知られ、大体、肉眼的には均等白濁液が雲絮状の沈降状態を経て消失透明化した時期が至適通電量としている。著者は、この報告に準拠して、30Volt, 0.7~1.2Amp, 白金線間隔 1.5cm として実験を行うこととした。実験には作製後24時間以内の 20mg/cc のレプトスピラ

生理食塩水浮游液を用い、前記の硝子筒に 20cc を入れて、冷却出来るように氷片を入れた大きなビーカーに固定して通電を行つた。

通電すると、電極の周囲に細かい泡が立ち、温度が上昇するので、1分毎に通電を休止して過熱を避けた。時間の経過と共に、懸濁液は透明度を増加しつゝ軽度白濁し、次いで、白雲絮状の浮游物が漸次生成されて均等な濁濁を失い始め、この雲絮状の浮游物は間もなく姿を消し、均等な淡い濁濁を呈するが、それが次第に水様透明に近くなり、15分間後に鏡検すると、レプトスピラの形体は殆ど認められないので、9000 r.p.m./45分間遠心して上清を分離し、セロハンに包んで 48時間水道水で透析を行つて電溶抗原とし、0.5%の割合に石炭酸を加えて氷室に保存し、用に臨み、0.9%の割合に食塩を加え、pH 7.0 に修正して実験に供した。

実験成績

1) 自家融解抗原による成績 (第1表)

レプトスピラの自家融解抗原による沈降反応は、抗原価16:抗体価32を示し、比較的明確な成績が得られたと思われる。

第1表

抗原 \ 抗体	2	4	8	16	32
2	++	+	+	+	
4	++	+	+	+	
8	++	+	+		
16	+	+	+		
32	+	+			
64					

2) 加熱抗原による成績 (第2表及び第3表)

レプトスピラ加熱抗原による成績は、前記自家融解

第2表 加熱抗原による成績

抽出法	120°C/30分				
抗原 \ 抗体	2	4	8	16	32
2	+	±			
4	+				
8					
16					
32					

抽出法	56°C/60分				
抗原 \ 抗体	2	4	8	16	32
2	+	+			
4	+	+			
8	+				
16					
32					

抽出法		100°C/60分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+			
4	+					
8						
16						
32						

抽出法		未加熱(対照)				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+			
4	+	±				
8						
16						
32						

第3表 加熱抗原による成績

抽出法		100°C/60分 アルカリ性				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	±			
4	+					
8						
16						
32						

抽出法		100°C/60分 酸性				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	±			
4	+					
8						
16						
32						

抽出法		56°C/60分 アルカリ性				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+			
4	+	+				
8						
16						
32						

抽出法		56°C/60分 酸性				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+			
4	+	+				
8	+					
16						
32						

抽出法		56°C/120分 アルカリ性				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+			
4	+	+				
8						
16						
32						

抽出法		56°C/120分 酸性				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+			
4	+	+				
8	+					
16						
32						

抗原によるそれに遙かに劣り、56°C/60分加温抗原に於いて抗原価4：抗体価8で最高を示すに過ぎず、未加熱、100°C/60分、120°C/30分の順に力価の低下の傾向が見られた。(第2表)

また、レプトスピラ溜水浮游液をアルカリ並びに酸を以て処理した後に、加熱抽出した抗原に就いても

格別優れた成績は得られなかつた(第3表)。

3) 自家融解加熱抗原による成績(第4表)

56°C/60分の加温の自家融解抗原が抗原価16、抗体価32と言う最高値を示し、それによつて稍々広い反応の場が得られたが、100°C/60分、120°C/30分の順に作用温度の高まるに従つて力価は低下して、沈降原の

第 4 表

抽出法		120°C/30分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+		
4		+	+			
8		+				
16						
32						
64						

抽出法		56°C/60分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		++	+	+	+	
4		++	+	+	+	
8		++	+	+	+	
16		+	+	+	+	
32		+	+	+		
64						

抽出法		100°C/60分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+		
4		+	+	+		
8		+	+	+		
16		+				
32						
64						

抽出法		未加熱(対照)				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		++	+	+	+	
4		++	+	+	+	
8		++	+	+		
16		+	+	+		
32		+	+			
64						

或る部分が加熱によつて失われることが推察された。

4) 電気溶菌抗原による成績 (第 5 表)

第 5 表 電気溶菌抗原の成績

抽出法		120°C/30分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+				
4		±				
8						
16						
32						
64						

抗原価 2 : 抗体価 2 で抗原性は殆ど無いに等しい。

以上の成績を通覧すると、56°C/60分加温の自家融解抗原が最優秀な沈降原と思われるが、この方法に関する限り、このあたりがレプトスピラの沈降原性の限界ではないかと推察された。

実験 II. 抗原抽出に適當な菌量の検討

レプトスピラ抗原の抽出に際し、如何程の菌濃度が必要であつて充分であるかを検討するために、20mg/cc 浮游液を順次稀釈して、15mg/cc. 10mg/cc. 5mg/cc. 2.5mg/cc 及び 1.25mg/cc の溜水浮游液を作り、それ等を 37°C の恒温器及び 5°C の氷室に 1 日交互に 1 週間反覆放置して自家融解を図り、更に、

第 6 表

抽出法		20mg/cc				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		++	+	+	+	
4		++	+	+	+	
8		++	+	+	+	
16		+	+	+	+	
32		+	+	+		

抽出法		15mg/cc				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		++	+	+	+	
4		++	+	+	+	
8		++	+	+	+	
16		+	+	+	+	
32		+	+	+		

菌 量		10mg/cc				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	+	
16	+	+	+	+	+	
32	+	+	+	+	+	

菌 量		5 mg/cc				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+	+		
4	+	+	+			
8	+	+	+			
16	+	+	+			
32	+	+				

菌 量		2.5mg/cc				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+	+		
4	+	+	+			
8	+	+	+			
16	+	+				
32	+	+				

菌 量		1.25mg/cc				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+			
4	+	+				
8	+					
16						
32						

56°C/60 分の加温を施して抗原の抽出を行い、それ等の沈降反応の成績を比較した（第6表）。

10mg/cc 以上の濃度に於いては抗原価 16：抗体価 32であつて殆ど同様の成績であるが、5mg/cc 以下の濃度に於いては力価の低下が著明であり、10mg/ccがレプトスピラ抗原抽出に経済的な有効濃度と考えられた。

実験Ⅲ. レプトスピラ抗原物質の溜水抽出と生理食塩水抽出の比較

レプトスピラ抗原の抽出に際して、媒体として溜水と生理食塩水のいずれが適当であるかが問題になるので、10mg/ccの溜水並びに生理食塩水浮游液を作製し、前述の方法によつて、56°C/60分加温の自家融解抗原の抽出を行い、それらの沈降反応の成績を比較した

（第7表）。

第7表に示すように、生理食塩水抽出に比して溜水抽出の方に力価が高く認められたので、溜水抽出液に0.9%の食塩を加え、pH 7.0に修正して実験に供すると言ふ既述諸実験に用いた方法に誤りのなかつたことが知られた。

実験Ⅳ. レプトスピラ抽出物質の理化学的性状

- 1) 一般性状：淡黄、透明、弱アリカリ性（Toyô pH paper による）。
- 2) 保存性：0.5%の割合に石炭酸を加えて冷暗所に保存すれば、3ヶ月にてはその沈降原性の力価に減弱が見られない。
- 3) 温熱による影響：10mg/cc 溜水浮游液の自家融解を待つて56°C/60分の加熱によつて得られた抽出

第7表 溜水抽出と生食水抽出の比較

抽出液		溜 水				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+	+	+	+
4	+	+	+	+	+	
8	+	+	+	+	+	
16	+	+	+	+	+	
32	+	+	+	+	+	
64						

抽出液		生 食 水				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
	2	+	+	+		
4	+	+	+			
8	+	+	+			
16	+	+	+			
32	+	+				
64						

第 8 表 温熱の影響

処置		未加熱 (対照)				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+	+	
4		+	+	+	+	
8		+	+	+	+	
16		+	+	+	+	
32		+	+	+	+	
64						

処置		56°C/120分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+		
4		+	+	+		
8		+	+	+		
16		+	+	+		
32		+	+			
64						

処置		56°C/60分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+	+	
4		+	+	+	+	
8		+	+	+	+	
16		+	+	+	+	
32		+	+	+		
64						

処置		100°C/60分				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+		
4		+	+	+		
8		+	+	+		
16		+	+			
32		+				
64						

液に更に 56°C/60分, 56°C/120分並びに 100°C/60分の処置を施し, それ等抗原抽出液の沈降価の温熱による影響を観察した (第 8 表)。

すなわち, 56°C/60 分の加温を重ねても格別の影響は認められなかつたが, 50°C/120分並びに 100°C/60 分の処置を施すと, 有効因子の稍々減弱することが判明した。

4) 透析性: 抗原抽出液 10cc をセロハンに包み, 流水で 48時間透析, 前後の力価を比較した (第 9 表)。

すなわち, 前表に示したように, 沈降原に透析の影響の見られないことを知った。透析した場合は, 食塩を 0.9%に戻し, pH 7.0 に再修正して用いた。

5) レプトスピラ抽出物質の毒性試験: 試験管内累代培養のために毒力の低下している菌株の抽出物質を

以つて毒性試験をすることは適当でないが, 本液を幼弱マウス (15g) 3 匹の腹腔内に 1.0cc づつ注射して, その生死を観察したが, 注射マウスは総べて生存し, 短日時に斃死せしむるような毒性は認められなかつた。

6) レプトスピラ抽出物質の蛋白割合と含水炭素割合の分別と化学的性状: 今日のところ, 抗原となり得る物質を単一の形で取出すことは出来ないことであるが, 一応次の方法で分別を試みた。

既述レプトスピラ抽出液 (V液) に 20%三塩化醋酸を加えて pH 2.0 に至らしめ, 暫時静置, 其処に生ずる沈澱を遠心して分離する。それを溜水に浮かべて, n/10-NaOHでpH 5.8 として溶解, 濾別して不溶部を除き, 再度三塩化醋酸を添加し, pH 2.8 で沈降せ

第 9 表

透析		無				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+	+	
4		+	+	+	+	
8		+	+	+	+	
16		+	+	+	+	
32		+	+	+	+	
64						

透析		有				
抗体	抗原	2	4	8	16	32
2		+	+	+	+	
4		+	+	+	+	
8		+	+	+	+	
16		+	+	+	+	
32		+	+	+	+	
64						

しめる。かゝる沈降・溶解の操作を数回繰返し、最後の沈降物を $n/10$ -NaOH で pH 8.0 とした原量（分別時）の溜水に溶解したものを蛋白劃分 (E-F) とした。

一方、V液に三塩化醋酸を加えて E-F を沈降せしめた最初の遠心上清を水道水で24時間透析し、それを酸性樹脂 (Anberleite IR-120) で濾過し、減圧蒸留して乾燥せしめたものを原量（分別時）の溜水に溶解したものを含水炭素劃分 (K-F) とした。E-F, K-F の兩劃分溶液は、0.5%の割合に石炭酸を加えて氷室に保存し、用に臨み、0.9%の割合に食塩を加え、pH 7.0 に修正して実験に供した。

V液、E-F 並びに K-F の一般化学的性状は次に示す如くである (10表)。

E-F 及び K-F 兩劃分共に Molisch 反応が陽性に出ているので、厳密に言えば、純粹に分別されるに至らないで、protein-polysaccharide complex の状態を出ないのであるが、各劃分の主体を占めるのはどちらかであるかによつて、E-F 及び K-F は区別されてよいと考えられる。

E-F 及び K-F による沈降反応の成績に就いては第2報に於いて述べるであろう。

小 括

1) *Leptospira autumnalis* の 10mg/cc の溜水浮游液を 37°C の恒温器と 5°C の氷室に1日交互に1週間反覆放置して、自家融解の起こつた後、それに 56°C/60 分の加温を施し、その 9000r.p.m./45 分間遠心上清を分離し、0.5%の割合に石炭酸を加えて氷室に保存し、用に臨み、0.9%の割合に食塩を加え、pH 7.0 に修正して、それによる同株免疫家兎血清の沈降反応に於いて、抗原価 16:抗体価 32 という最高値が得られた。

2) レプトスピラ抽出物質は、0.5%の割合に石炭酸を加えて氷室に保存すれば、少くとも3ヶ月間は沈降原の力価に影響を認めなかつた。

3) 56°C/60 分加温の自家融解のレプトスピラ抽出

第10表 抽出液の化学的性状

反 応	劃 分		
	V 液	E-F	K-F
biuret	+	+	-
xanthoprotein	+	+	-
ninhydrin	+	+	-
Millon	+	+	-
Hopkins-Cole	+	+	-
Sakaguchi	+	+	-
lead sulfide	-	-	-
sulfosalicylic acid	+	+	-
Molisch	+	+	+
Bial	+	-	+
Fehling	-	-	-
Benedict	-	-	-
Haines	-	-	-
Nylander	-	-	-
iodine	-	-	-
phloroglucin	-	-	-

液は、更に 56°C/60 分間加温を重ねても、格別の影響を認めないが、56°C/120 分及び 100°C/60 分間の処置を施すと、幾分沈降原力価の低下が認められた。

4) この抽出液の沈降原の力価は、流水中で48時間透析しても、格別の影響は見られなかつた。

5) この抽出物質の 1.0cc はマウスを殺し得る毒性を示さなかつた。

6) この抽出液の化学的性状を検討した。

なお、第2報に於いて、レプトスピラ抽出物質の蛋白劃分及び含水炭素劃分による沈降反応の比較及びレプトスピラ沈降反応の特異性などに就いて述べるであろう。

(擧筆するに当たり、終始御懇切な御指導と御校閲を賜つた登倉教授、横田名誉教授並びに吉田助教授に心からの謝意を表するものである。)

参 考 文 献

(後 掲)

Summary

To begin with, it was demonstrated that among several antigens extracted from *Leptospira autumnalis* one which was prepared by heating leptospira cells following autolysis of them contained a agent to show the highest titre in the precipitin reaction to the antileptospiral rabbit serum. *Leptospira* cells, being suspended in

sterile distilled water at the rate of 20mg/cc, were kept at 37°C and at 5°C on alternate days throughout one week, then they were heated at 56°C for 60 minutes, and finally the whole suspension was centrifuged to obtain its supernatant fluid. Phenol at 0.5% and NaCl at 0.9% were added to it. This translucent fluid, V-Solution for short, showed a positive reaction, attaining to a titre 16 : 32 of precipitinogen and precipitin in general, to the immune serum from rabbits four times intraperitoneally injected with it. The V-Solution could be conserved in the refrigerator without suffering any fall in the precipitinogen titre, and sustained no loss by cellophane dialysis in running water for 48 hours, but it to some degree diminished in the precipitinogenicity by further heating it at 56°C for 120 minutes or at 100°C for 60 minutes. It was found, on the other hand, that the V-Solution had no lethal effect upon mice intraperitoneally injected with 1.0cc of it.

Results of the precipitin reaction of protein and polysaccharide fractions liberated from the V-Solution, including observations on serological specificity of leptospira types in this respect, will be described in the next report. (Author)