

抗原抗体分離に関する研究

I 特に温熱を要因とする分離様式に就いて*

長崎大学風土病研究所
(病理部第一主任 登倉 登教授)
(病理部第二主任 高橋庄四郎助教授)

田 中 義 信
た なか よし のぶ

Studies on the Dissociation of the Antigen-Antibody Complex. I. Method of the antibody separation in principle based on heat treatment of the antigen-antibody complex. Yoshinobu TANAKA, Immunological Division (Director: Ass. Prof. Shōshirō TAKAHASHI), Pathological Department (Director: Prof. Noboru TOKURA), Research Institute of Endemics, Nagasaki University.

緒 言

抗原抗体の特異的結合体より、何等かの処置によつて抗体のみを分離せむとする特異的方法に関する研究は、免疫血清に於ける他種血清蛋白より抗体含有グロブリンを分別する非特異的方法と共に、其の機転の解明乃至抗体の本態に関する研究の必然的な要求として抗原抗体反応発見以来追究されてきた分野である。即ち HAHN U. TROMSDORF¹⁾(1900)に拠る *Vibrio cholerae*・*B. typhi* に於ける苛性ソーダ・硝酸適用の糞集素分離に関する研究を嚆矢として、爾後多種にわたる菌種・血清について抗体分離に関する各様の研究が進められているのである。而して茲に是れ等諸法を処置別・材料別に系統化してみると化学的方法・物理学的方法及び併用法の3者に類別可能である。HEIDERBERGER一派²⁾(1936)³⁾(1938)の高濃度NaCl溶液による分離法に始まつて Ba(OH)₂・BaCl₂・NaOH・アルコール・エーテル・アンチホルミン・Ca(OH)₂等が用いられている化学的方法は、例えば NaOH 等の比較的過激な化学剤供試の場合は勿論、蛋白化学的に最も穏和な処理方法の一つである NaCl による解離に際してすらも、精製に基づく抗体の性状変化は避け得ないものとされているに拘らず、兎もあれ抗体の精製に画期的成果を挙げ、今日免疫化学の分野に重要な貢献を齎していることは周知の処であ

る。他方物理学的方法に関する既往の研究としては温熱・振盪・溶媒等を要因とする報告が認められるが、本領域に関する研究は大略此の範囲に止まるもので化学的研究の域には達し得てないのである。茲に物理学の領域に於ける先人業報の跡を尋ねれば先ず、HUNTOON & ETRIS⁴⁾(1921)が諸種化学剤による分離法と共に *Shig. flexneri* の馬免疫血清に就いて 55°C 30 M加温蒸溜水分離法を試みた報告が認められる。亦是れとは別系統の研究として、抗体種別に由来する抗体の耐熱性差を利用して、不要抗体を破壊除去する報告も認められる。例えば萩本⁵⁾(1938)の報告は本系統に所属するものであり、其の基盤を成すものとして FELIX & OLITZKIE⁶⁾(1929)の業報が留意される。茲に上記の加温溜水法系統の抗原抗体分離法に関する研究を求めてみると、例えば三輪⁷⁾(1922)は HUNTOON の方法による分離抗体液の性状・加温の意義・NaCl の影響等に関して稍詳細に述べているが本系統の分離法を無効とする松井⁸⁾の業報等も認められるのである。

著者は物理学的方法を合目的とする向後に於ける自験の性格と後述される理由の下に、先ず温熱・溜水に拠る抗原抗体分離法としての HUNTOON・三輪等の方法を追試したのであるが、其の間に於いて本法の可用性・効率増進条件の探求と共に其の適用範囲を検証し、更に進めて爾余の物理学的方法に基づく多少の実績をも収め得たので以下其の概要を記述する次第で

* 長崎大学風土病研究所業績315号

ある。

実験術式

A 供試資料

1. 供試菌株

S. paratyphi A 1015 (以下P.Aと略称)が供試されている。本菌株は集落内色⁹⁾(1952)に基づいてS属としてA・B・C・Dの各分型株に分類されるが、本実験に供試されるのはそのD型菌株である。

2. 供試血清

本実験に主として供試される血清はP.A-OH血清である。該血清はP.A-C型菌の生菌免疫家兔血清で、その免疫要項を言えば0.125→0.4→1→2→4→4→5→10→20mg/2.5kg各量が夫々1週間毎に静注、総量46.525mgに及ぶ型式が採用され、56°C30M非働化処置・0.01%量Merthiolate添加処置後氷室に保存されたものである。次に、実験9(第11表)供試のP.A運動陰性菌免疫家兔血清とは、P.A1015の陈旧ブイヨン培養より獲られた運動陰性菌(安住氏¹⁰⁾(1932)並びに戸田氏¹¹⁾(1939)染色法にて鞭毛陰性の生菌免疫血清(6回免疫・総菌量36.6mg)で、P.A(有鞭毛菌)の100°C30M加熱反応元に対して12800×の抗体価を示すものである。

3. 供試培地

菌株の保存並びに凝集反応元の培養には1.5%肉汁寒天斜面培地、集落性状観察の為に1.5%エールリツヒ肉エキス寒天平板培地(0.2mm厚)、吸収菌大量培養には3%肉エキス平板培地が供試されているが、何れもpH7.3~7.4に調整されている。

B 実験方法

1. 抗体(凝集素)分離術式(第1図参照)

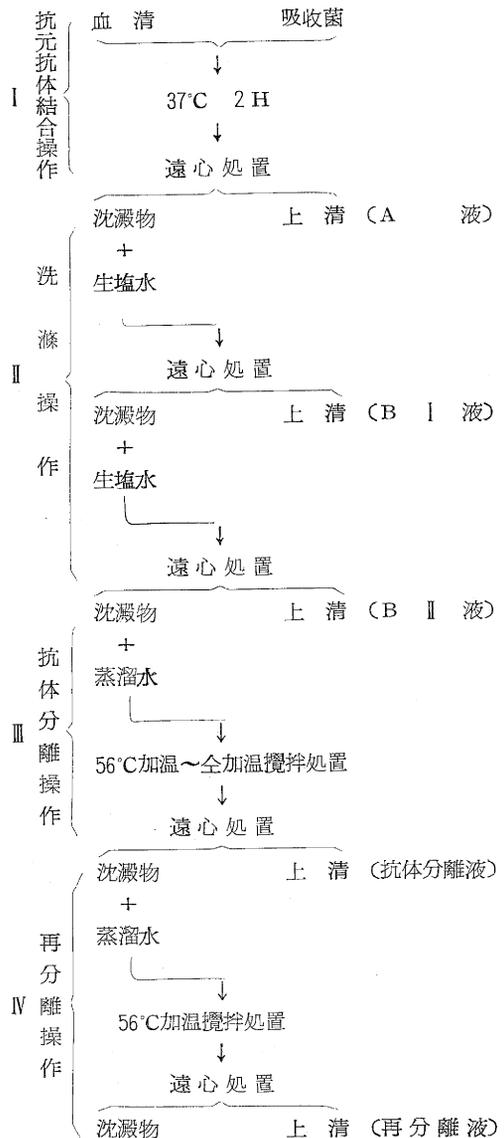
術式の基盤を成すものは三輪氏法であるが細部に入れば氏の方法と著者法の間には相当顕著な差異が認められる(実験2参照)。而して後記される理由のもとに下記するような改案が執られている。術式は大別して4段階に分かれる。即ち抗原抗体結合操作・洗滌操作・抗体分離操作・再分離操作である。

抗原抗体結合操作：先ず50×OH血清1容に対して菌液3容を加え、37°C2H保温により抗原・抗体を充分に結合せしめる。猶此の際必要吸収菌量の算定は $M = \frac{C \cdot T}{4 \cdot F}$ (M=吸収菌量(mg)・C=血清量(cc)・T=終末価・F=稀釈培数)なる計算式に拠るが、その1単位量は供試抗体に対する略対応量であることが予備実験によつて証明されている。次いでこの血清と菌液との混合液を4000R.P.M.80M遠心処置して上清と沈澱菌塊に分別する。此の際前者はA液と仮称され

る。A液は、未結合性抗体包容の有無を検する為毎回凝集反応検査に供せられる。

洗滌操作：上記沈澱菌塊に血清菌液混合液量の4倍量に相当する0.85%食塩水(以下生塩水と略記)が添加され、駒込ピペットを以つて充分攪拌・平等菌浮游液化後、4000R.P.M.80M遠心分離される。是れは第1次洗滌操作で、此の際の上清はB I、更に同一条件下に施行される第2次洗滌操作に際しての上清はB IIと略記される。本洗滌操作は不要な各種血清組成並びに過剰抗体の可及的除去が企図されてのことである。全実験例を通じてA液の反応価は200×~(±)。

第1図 抗体分離操作術式



B1・II液は通常800×陰性(当報では800×以内の所見決定は不能)である。

抗体分離操作: 当術式に供される溶媒は蒸留水である。血清菌液混合液量と等量が供せられた場合は、其の抗体分離液は200×稀釈血清に相当、4倍量・8倍量が供使された場合は夫々800×・1600×稀釈血清に相当する理である。次いで充分に平等浮游液化された抗体結合菌液は、恒温浴槽内で原則として56°C30M加温処理が施される。加温時間の変更・ピペット操作の有無等種々の実験の条件の附加される例もあるが要に臨んで詳述される。次に加温処置終了の叙上菌液は遠心分離処理に移管されるが、此の際56°C保温の為試作の特殊恒温器が考案供試されている。即ち本函は熱源・温度調節器・扇風器・遠心沈澱機を内蔵するもので、遠心機の蓋と排塵孔を全開放の状態に遠心処置を施せば、分離液の温度は56°Cに保温可能であることが予備実験的に確認されている。

再分離操作: 叙上の処置に拠る抗体分離処置終了後の沈澱菌塊に更に分離操作を施せば、その再分離液の抗体価測定に拠つて、上記抗体分離効果の優劣判定が可能なる理である。即ち此の意味で再分離操作には其の効果に関する術式の吟味が特に必要であるが、予備実験的に1600×稀釈・ピペット操作300回・56°C30M法で充分であることが確認されたので、全実験例を通して再分離術式としては本法が採用されている。

2. 凝集反応術式及び判定基準

凝集反応は0.5cc法、即ち血清或いは分離液0.5ccに対して菌液1mg/cc1gtt滴加法が採られている。猶此の際溶媒として蒸留水が供せられているので、分離液は15% NaCl液を以つて0.85% NaCl液となる

如く調整の上で、凝集反応に供せられている。観察は37°C2H限・R.T.24H限所見のみならず後者に続く氷室内保存48H限所見も併記されている。予備実験に際して24H限所見よりも48H限所見が稀釈度1管ほど高価に判定されたものも数例あり、且つ殆どの例に於いて塊形成には明らかな顕化所見が認められたので、本実験に於いても48H限所見を併記することにした次第である。然し乍ら凝塊の48H限顕化所見は通例のH-a因子血清内凝集反応に就いても時に認められることであれば、48H限所見は一応参考に供するに留めることを附記しておく。凝集塊性状の表現にF・f・K・k等を使用しているが、F・fはH反応様雲架状凝塊でFは多量、fは少量である。K・kはO反応様顆粒状微細凝塊でKとkは量的差違の表現である。塊形成度は卅〜士(±)を以つて表現されるが(±)はルーベに拠つて辛うじて陽性と認め得る態の微細凝塊である。

実験成績

実験1 供試血清の凝集素価(第1表参照)

供試血清の抗体価決定は、吸収菌量の算定・抗体分離効果の比較、従つて亦分離術式の選択資料として不可欠のことである。特に後述に明かなように本報の術式の性格上可及的高価な血清が本報実験には必要である。

茲に本報各種実験供試のP.A-OH血清の凝集素価は第1表に示される通りである。本所見よりすればH抗体分離に関しては好菌の資料となり得るが、O抗体の分離については抗体価低く不適である。本報術式に於ける稀釈度との関係よりして少なくともその分離効

第1表 供試OH血清の凝集素価(実験1)

血清	反応元処置	稀釈倍数 観察時間	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	対照	塊性状	
P.A-OH	生菌	37°C 2H	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	(±)	-	
		R.T. 24H	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	Fk
血清	100°C 30M 加熱菌	37°C 2H	+	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		R.T. 24H	卅	卅	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	K

[註] 1. 供試血清は56°C30M非働性化処置P.A-OH血清である。
2. 反応元はP.A 1015のD型菌である。

果の判定に困難が予想されるのである。

実験2 三輪氏準法の追試成績(第2表参照)

三輪氏術式に就いて考慮さるべきことは、吸収菌に *S. typhi* の60°C30M加熱菌及び生菌(但し抗 *Typhi* 200×血清内に於ける37°C48H培養菌)が供試されていること、反応元が此の何れとも明示されていないこと、血清として馬免疫血清(50000×)及び家兎免疫血清(20000×)が供試されているが所謂O・H所屬に就いては明記されていないこと、且つ吸収菌量が極端に少量であること(200×血清3ccに対して0.36mg;但し是れは誤植かと推定される)、更に無記載の故に確言不能ではあるが分離抗体液に就いての凝集所見よりすれば氏の術式に拠る場合猶残存する抗体が推定されること等である。茲に三輪氏法の追試が試みられたの

であるが、記載不充分的故などもあつて“三輪氏原法”は追試不能であると共に本報には亦不要である。従つて追試と云つてもその術式は自ら異なるわけで、特に吸収元が寒天培地上37°C22H培養の常態生菌である点、並びに其の菌量が計算量に従つて大量である点等は明らかに三輪氏法とは異なる要素である。然し乍ら同氏法に於ける菌量は実験的に不充分であり常態生菌吸収元に拠る抗体吸着効果が同氏法に劣るとは考え難いので、既述実験術式に従つて著者に拠つて実施された三輪氏法に準ずる術式を以下“三輪氏準法”或いは著者の“原法”と呼ぶことにする。

斯くて得られた抗体分離液の内容は第2表に示される如くである。抗体の分離効果は不充分で、再分離液の凝集価を併考する時一部抗体の分離に過ぎないこと

第2表 三輪氏準法追試成績(実験2)

抗体 分離 液	反 応 元 処 置	稀 釈 観 察 時 間	稀 釈 倍 数										対 照	塊 性 状	
			200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400			
200×稀釈 ・ 56°C30M ・ ピペット操作 (-)	生 菌	37°C 2H	±	±	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	fk
		R.T. 24H	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-		
R.T. 48H	≡	≡	≡	≡	≡	+	+	-	-	-	-	-			
再 分 離 液	生 菌	37°C 2H				+	+	±	±	(±)	-	-	-	f	
		R.T. 24H				≡	≡	≡	≡	+	+	±	-		
R.T. 48H					≡	≡	≡	≡	≡	≡	≡	+	-		
再 分 離 液	100°C 30M 加 熱 菌	37°C 2H				-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 24H				-	-	-	-	-	-	-	-		
R.T. 48H					-	-	-	-	-	-	-	-			

- 【註】 1. 三輪氏法に於ける抗体分離液の倍数稀釈列は、200×より始められる。加温操作は56°C30Mでピペットによる攪拌処置は施されていない。
 2. 再分離液は1600×になっている。且つ56°C30M加温処置の間ピペット操作が施行されている(第3表以下も同じ)。
 3. 56°C30M処置に続く遠心分離操作は恒温筒(56°C)内で実施されている。別に指示なき場合は第3表以下同様である。
 4. 反応元はP.A 1015 属D型菌(D96%・C4%)である。
 5. 塊性状については本文(凝集反応術式の項)参照。

が明らかである。又凝集塊の性状がfk~fである点や、加熱処置元所見が陰性である点より考察する時、分離抗体をH属とする想定は一応許される処である。

実験3 加温前処置の意義に関する実験(第3表参照)

実験2よりして、三輪氏法に於ける抗体分離効果は猶不十分なことが実証されたので、是れに対する改案を意図して茲に加温処理強化術式が採られた次第である。強化の型式としては、温度を昂める場合と加温時間を延長する方法が先ず考えられる。此の際前者は暫く措き後者に是れを求めることにしたのであるが、抗体の56°Cに於ける長時間暴露を避け56°C30M処置に先行する50°C2H加温を前処置とする分離術式が採られている。

本術式に於ける所産は第3表掲示の通りであるが、是れを第2表所見と対比してみると2H限・24H限夫々の間では全く差は認められない。唯再分離液の48H

限凝塊所見を判定の基準とする場合に加温前処置例が僅かに優つているかの如き所見であるが、茲では未だ特筆すべき資料ではあり得ない。

実験4 稀釈の意義に関する実験(第4表参照)

溶解・浸出等に際して効果増進の一法として採用される溶媒の増量は抗体分離に際しても試みられて宜い処である。三輪氏準法に於いては、溶媒1ccに就き菌量140mgという可成り高濃度の菌液の故の抗体分離難が一応考えられるので、溶媒の液量を準法の4倍・8倍に増量し、溶媒1ccに就き前者は34mg、後者は17mgとなる如くした場合の分離効果を検討してみたのが本実験所産である。

本所見は次の如くに要約される。

(1) 800×稀釈抗体分離液(単に以下稀釈液と略称する)について云えば、準法(200×稀釈液)に比し最終価については1管の差に於いて、凝集塊形成に就いては+~+程度の差を以つて分離効果に優位が認め

第3表 加温前処置の意義に関する実験(実験3)

抗体分離液	反応元処置	稀釈倍数 観察時間	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	対照	塊性状	
200×稀釈 ・ 50°C2H ↓ 56°C30M ・ ピベット操作 (-)	生菌	37°C 2H	±	±	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	fk	
		R.T. 24H	+	+	+	+	+	±	±	-	-	-	-		
		R.T. 48H	##	##	##	##	+	+	±	-	-	-	-		
	100°C 30M 加熱菌	37°C 2H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
		R.T. 24H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
		R.T. 48H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-
再分離液	生菌	37°C 2H				+	+	±	(±)	(±)	-	-	-	f	
		R.T. 24H				##	##	##	##	+	+	±	-		
	R.T. 48H				##	##	##	##	+	+	±	-			
	100°C 30M 加熱菌	37°C 2H				-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 24H				-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 48H				-	-	-	-	-	-	-	-		

[註] 1. 供試抗体液は三輪氏準法に前処置として50°C2H加温操作の附加された分離法に基づくもので、本法に於ける爾余の操作はすべて第2表[註1]の記載に拠るものである。
2. 反応元・再分離液については第2表[註]2・4参照。

第4表 稀釈の意義に関する実験(実験4)

抗体 分離液	反応元 処置	稀釈 観察時間	稀釈倍数										対 照	塊 性状		
			200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400				
800×稀釈 ・ 56°C30M ・ ピペット操作 (-)	生菌	37°C 2 H			(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	fk
		R.T.24H			+	+	+	+	+	(±)	-	-	-	-		
	R.T.48H			≡	≡	≡	≡	+	±	-	-	-	-			
	100°C 30M 加熱菌	37°C 2 H			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T.24H			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	R.T.48H			-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
再 分 離 液	生菌	37°C 2 H				+	±	±	(±)	-	-	-	-	-	f	
		R.T.24H				≡	≡	≡	+	+	+	(±)	-			
	R.T.48H				≡	≡	≡	≡	≡	+	+	±	-			
	100°C 30M 加熱菌	37°C 2 H				-	-	-	-	-	-	-	-	-		
R.T.24H					-	-	-	-	-	-	-	-	-			
R.T.48H				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
1600×稀釈 ・ 56°C30M ・ ピペット操作 (-)	生菌	37°C 2 H				+	+	±	(±)	-	-	-	-	-	F	
		R.T.24H				≡	≡	≡	+	±	±	-	-			
	R.T.48H				≡	≡	≡	≡	≡	+	±	±	-			
	100°C 30M 加熱菌	37°C 2 H				-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T.24H				-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	R.T.48H				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
再 分 離 液	生菌	37°C 2 H				+	±	(±)	-	-	-	-	-	-	f	
		R.T.24H				≡	≡	+	+	±	±	-	-			
	R.T.48H				≡	≡	≡	+	+	±	±	-	-			
	100°C 30M 加熱菌	37°C 2 H				-	-	-	-	-	-	-	-	-		
R.T.24H					-	-	-	-	-	-	-	-	-			
R.T.48H				-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			

〔註〕 1. 稀釈度が 800×(或いは 1600×)より始まる例は蒸溜水流量 = 200倍稀釈血清量 × 4 (或いは × 8) たらしめたもので、溶媒と菌量との関係は約 34 (或いは 17) mg/cc である(三輪氏準法では夫々 200×血清量・約 140mg/cc である)。

2. 反応元・再分離液については第2表〔註〕2・4参照。

られる。亦再分離液に就いて云えば、準法に比して1管ほど低価であり凝塊形成度も稍々劣っている。換言すれば第1次分離効果が良好であつた為再分離処置に於ける所見の低下となつたことが明示されたことになる。即ち 800×稀釈液は準法に比して稍優れていることが認められるのである。

(2) 1600×稀釈液について云えば、分離液の抗体価は2管上昇し、凝塊形成度も++→≡と顕化している。亦再分離液については1管低下、≡→≡の弱화가認められる。更に800×稀釈液との間にも可成りの差が認められているのである。即ち、抗体分離効果に及

ぼす高度稀釈の意義は明らかに促進的である。

実験5 攪拌の意義に関する実験(第5・6表参照)

抗体分離に際しての機械的攪拌操作の意義検討が企図され、実験5 A・5 Bが実施されたことになる。茲に攪拌の方法としては種々の方法が考えられるが、其の術式の簡易な点に於いて、又一応効果的である点に於いて、駒込ピペットに拠る攪拌操作が供試された次第である。即ち200×・800×・1600×各稀釈液に就いて、56°C30M加温処置の間10M毎にピペット操作100回計300回が施された結果は第5表に示される如くで

第5表 攪拌の意義に関する実験〔I〕(実験5A)

抗体分離液	反応元処置	稀釈倍数 観察時間	稀釈倍数										対照	塊性状	
			200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400			
200×稀釈 56°C30M ピペット操作 (+)加熱菌	生菌	37°C 2H	+	±	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	fk
		R.T. 24H	++	++	+	+	+	±	±	-	-	-	-		
		R.T. 48H	##	##	##	##	##	+	+	-	-	-	-		
	再分離液	生菌	37°C 2H				+	+	±	(±)	-	-	-	-	f
		R.T. 24H				##	##	##	##	+	±	(±)	-		
		R.T. 48H				##	##	##	##	##	+	±	-		
800×稀釈 56°C30M ピペット操作 (+)加熱菌	生菌	37°C 2H			##	+	+	±	-	-	-	-	-	f(k)	
		R.T. 24H			##	+	+	±	(±)	-	-	-	-		
		R.T. 48H			##	##	##	##	+	±	-	-	-		
	再分離液	生菌	37°C 2H				±	(±)	-	-	-	-	-	f	
		R.T. 24H				##	##	##	##	+	±	-	-		
		R.T. 48H				##	##	##	##	##	+	-	-		
1600×稀釈 56°C30M ピペット操作 (+)加熱菌	生菌	37°C 2H				##	+	±	(±)	-	-	-	-	F(k)	
		R.T. 24H				##	##	##	##	##	+	(±)	-		
		R.T. 48H				##	##	##	##	##	##	+	±		
	再分離液	生菌	37°C 2H				±	(±)	-	-	-	-	-	f	
		R.T. 24H				+	±	(±)	-	-	-	-			
		R.T. 48H				##	##	+	±	-	-	-			

〔註〕 1. 200×・800×・1600×各稀釈液分離に際して56°C30M 加温処置の間10M 毎にピペット攪拌100回の施行された実験例。
 2. 反応元・再分離液については第2表〔註〕2・4参照。
 3. 総べての実験区分に就いて加熱反応元が供試されているが、全時限所見陰性の故にR.T.48H 限所見のみ記載。

ある。是れ等の結果を非攪拌例と比較すると(第4表参照)次の如くに要約される。

(1) 200×稀釈液に就いて云えば、抗体分離液についても再分離液に就いてもピペット操作の効果は全く認められない。

(2) 800×も同様で再分離液に於ける反応価に僅差が認められる様であるが、要するに攪拌の意義を強調するに足る所見差は確言不能である。

(3) 然るに1600×稀釈液についての所見を総合してみると、抗体分離液・再分離液共に抗体価・凝塊所見の何れより観ても夫々著明な差異を示して攪拌の意義が顕現されているのである。茲に稀釈倍数が高くなる程攪拌の効果は著しく顕化されたことになるが、

O抗体分離に関しては是れを以つてしても不可能であることが留意される。

更に攪拌の程度を強化した場合の効果を検討されている。上記ピペット攪拌処置が300回であるのに対して、10M毎200回宛計600回ピペット操作の加えられる場合の吟味で、其の所見は第6表の如くである。即ち、分離液・再分離液の何れに就いても両処置間に差異は全く認められず、300回法で充分であることが示されている。因みに本実験と同一操作である第5表の1600×稀釈・ピペット300回法に比して抗体分離・再分離液共に抗体価が夫々1管・2管宛低価という点に解説を附してみる。此の原因としては第6表の実験に供試された反応元にその因を求めることが出来

第6表 攪拌の意義に関する実験〔Ⅱ〕(実験5B)

抗体 分離 液	反 応 元 処 置	稀 釈 倍 数	稀 積 倍 数										対 照	塊 性 状	
			200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400			
ピペット操作 300回法 (1600×稀釈)	生 菌	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				卍	卍	+	(±)	(±)	-	-	-	-	F
	再 分 離 液	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	
ピペット操作 600回法 (1600×稀釈)	生 菌	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				卍	+	+	(±)	-	-	-	-	-	F
	再 分 離 液	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	

- 〔註〕 1. 供試抗体分離液は何れも 1600× 稀釈液であるが、次の2種に分別される。即ち 56°C30M 加温に際して 10M 毎に反覆されるピペット操作が毎回 100 回宛計 300 回を算するものと、200 回宛 600 回に及ぶものである。
2. 再分離液調製に際して、ピペット操作は叙上 300 回法に準じている。
3. 第1次分離後の沈澱物は、他の総べての実験に於けると異なつて、4°C 下一夜放置後再分離操作が施されたものである。
4. 反応元は P.A 1015 の D 型菌 (D91%・C5%・SR4%) である。その 100°C30M 加熱菌元所見は全例陰性につき記載省略。

る。即ち本反応元は、生塩水内自発凝集試験に於いて、陰性の域内には存在するが、詳細に観察する時は“(±)に近い陰性”とも表現可能な所見で、反応元として理想的ではあり得ないものである。更に是れを集落内色像によつて観察すると、外観は正円・平滑でS型菌の如くであるが、内部構成線は著しく乱れて所謂S様R型菌に類する集落が約4%に含まれているのである。是れが凝集価低下の1因ではないかと考えられるのであるが、第6・8・9表の成績判定に当つて留意されねばならないことを附記しておく。

実験6 加温時間の意義に関する実験(第7表参照)

既述の実験2~5の成績の範囲では1600×稀釈・56

°C30M・ピペット300回法が最も効果的な術式となる理であるが、56°C加温時間に関して若し可能ならば時間の短縮が企図されてもよいわけである。一般に温度上昇に伴う時間の短縮が考えられるが、本項下では採らないことにする。又加温時間の延長に拠つて分離効果の上昇が認められるとすれば既往術式の改変さるべきは至当のことである。実験3に於いて50°C2H加温前処置が抗体分離に関して無効であることが立証されたが、作用温度の低下に伴う時間の延長も此処では採らないことにする。第7表は56°C加温を15・20・25・30・35・40Mの各段階に分つて、その分離効果が観察されたものである。

第7表所見を要約すると次の様になる。茲に当実験

第7表 加温時間の意義に関する実験(実験6)

抗体 分離液	反応 元処置	稀積 倍数 観察 時間	200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400	対 照	塊 性状
15M 加温法	生 菌	37°C 2H				+	+	±	(±)	-	-	-	-	F
		R.T. 24H				+	+	+	+	±	(±)	-	-	
		R.T. 48H				+	+	+	+	+	±	(±)	-	
20M 加温法	生 菌	37°C 2H				+	+	+	(±)	-	-	-	-	F
		R.T. 24H				+	+	+	+	±	(±)	-	-	
		R.T. 48H				+	+	+	+	+	+	±	-	
25M 加温法	生 菌	37°C 2H				+	+	+	(±)	-	-	-	-	F
		R.T. 24H				+	+	+	+	+	±	-	-	
		R.T. 48H				+	+	+	+	+	+	+	±	
30M 加温法	生 菌	37°C 2H				+	+	+	(±)	-	-	-	-	F
		R.T. 24H				+	+	+	+	+	±	(±)	-	
		R.T. 48H				+	+	+	+	+	+	+	±	
35M 加温法	生 菌	37°C 2H				+	+	+	(±)	-	-	-	-	F
		R.T. 24H				+	+	+	+	+	±	(±)	-	
		R.T. 48H				+	+	+	+	+	+	+	±	
40M 加温法	生 菌	37°C 2H				+	+	+	(±)	-	-	-	-	F
		R.T. 24H				+	+	+	+	+	±	(±)	-	
		R.T. 48H				+	+	+	+	+	+	+	±	

- 〔註〕 1. 供試抗体分離液は 1600×稀積・ピペット操作 300回法について、56°C加温時間が夫々 15M・20M・25M・30M・35M・40Mとされた場合の各種分離液である。
 2. 反応元は P.A 1015 属D型 (D98%・C 2%) で、生菌元のみならず 100°C30M加熱元も供試されたが全例陰性につき記載省略。
 3. 再分離処置は実施されていない。

に於いては再分離液に就いての検討が省略されているので、抗体分離液の凝集価を基準として観察されるわけであるが、30~40Mの実験群が僅か乍ら優位の所見を示すものと解し得るのである。即ち著者が56°C加温時間を30Mに一定した所以である。

実験7 分割分離法の意義に関する実験(第8

表参照)

既述の実験よりして1600×稀積法の分離効果が最高であることが判定されたが、更なる分離効果増進の一方法として次の術式が試みられた訳である。即ち1600×稀積液調製に於ける全所要液量を2等分し、各分液を以つて各別に実施される分割分離法である。

第8表 分割分離法の意義に関する実験(実験7)

抗体分離液	反応元処置	稀釈倍数	観察時間										対照	塊性状	
			200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400			
第1次分離液	生菌	37°C			+	±	(±)	-	-	-	-	-	-	-	f(k)
		2H													
		R.T.			+	±	(±)	-	-	-	-	-	-	-	
第2次分離液	生菌	37°C			+	±	(±)	(±)	-	-	-	-	-	F	
		2H													
		R.T.			+	±	(±)	(±)	-	-	-	-	-		
同上混合液	生菌	37°C			+	+	±	(±)	-	-	-	-	-	F	
		2H													
		R.T.			+	±	(±)	(±)	-	-	-	-	-		
再分離液	生菌	37°C			-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		2H													
		R.T.			-	-	-	-	-	-	-	-	-		

- [註] 1. 第1・2次分離液とは分離用蒸溜水(1600×稀釈液相当量)が2等分され其の各々に抛つて夫々第1・2次的に獲られた抗体液である。
 2. 混合液とは第1・2次液の等量混和液である。
 3. 再分離液とは第2次沈澱菌よりの分離処置液。
 4. 叙上各液分離は56°C30M・ピペット操作300回法に拠る。
 5. 反応元に就いては第6表[註]4.参照。

結果は次の様に判定される。供試反応元に異常が認められるので(第6表記述参照)第8表所見を反応元を異にする第5表の結果と直接に比較することは妥当を欠く訳であるが、分割法に於ける再分離液(正確には第3次分離液)が48H限に於いてすら1600×陰性を示すことは、仮令反応元の被凝集性が低い傾向を示すにしても、第5表に認められた12800×+の結果とは顕差として、分割法の意義の強調されてよい所見である。更に詳細に検討すれば、

(1) 第1次分離液は800×稀釈・ピペット操作300回法に抛つた場合に該当するわけで、是れを第5表記載の800×稀釈攪拌300回法液と比較してみると、反応価のみならず塊形成度に就いても大同小異で、この程度の差は当実験供試反応元にその因を求めることも許される態のものである。

(2) 第2次分離液も同じく800×稀釈液であるが、前者に比して24H・48H限所見共に明らかに高価を示している。是れの原因として、考察的には各種の場合が考えられるのであるが現在の処解説の資料を持っていない。唯茲には抗原を中核とする場合の抗体層の位置的関係に基づく離脱性の難易、或いは亦第1次、第2次分離過程の間に発現する抗原抗体の結合状態の変化等は特に留意されてよい様に考えられることゝ、仮に是れ等に抗体離脱の難易性が関係するものとすれば既往に試みられた分離温度・時間・攪拌等の各処置は更に範圍を拡大して検討さるべき必要が認められることを附記しておきたい(続報参照)。

(3) 第1・2次分離液混合液の示す抗体価と第2次分離液のそれとの間には著差は認められないが、第1次分離液との差異は比較的著明である。両分離液混合

第9表 後処置に於ける保温の意義に関する実験(実験8A)

抗体分離液	反応元処置	稀釈倍数	観察時間											対照	塊性状
			200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400			
室温(30°C)下 遠心処置	生菌	37°C 2H				卍	卍	+	±	-	-	-	-	-	-
		R.T. 24H				卍	卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	F
	R.T. 48H				卍	卍	卍	卍	+	±	-	-	-	-	-
	再分離液	37°C 2H				(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	生菌	R.T. 24H				+	±	-	-	-	-	-	-	-	-
	生菌	R.T. 48H				+	+	(±)	-	-	-	-	-	-	-
保温(56°C)下 遠心処置	生菌	37°C 2H				卍	卍	+	(±)	(±)	-	-	-	-	-
		R.T. 24H				卍	卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	F
	再分離液	37°C 2H				(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	生菌	R.T. 24H				±	±	-	-	-	-	-	-	-	-

- [註] 1. 後処置とは菌細胞よりの抗体分離を目的とする56°C30M処置に於ける全操作過程が意味されている。第10表に就いても同様。
 2. 加温(56°C)処置に続く室温(30°C)下遠心操作例に於ける終了時液温として35°Cが示されている。
 3. 各分離操作は1600×・56°C30M・ピペット操作300回法に拠る。
 4. 反応元に就いては第6表[註]4参照。

に際して低価な第1液値に近接することなく、高価な第2液値の保持されることは、第2次分離に際して脱離した抗体量が第1次分離液内抗体量に遙かに優つている一つの証左とも考え得る処である。而して茲に第2次液・混合液各所見を対比する時痕跡的乍ら後者の前者に優る如き点が認められないではないが、反応型式が凝集反応のことであれば特別な原因の故にとは考察し難い。茲に混合液の示す所見を2回分割法に於ける分離効果の基準として、是れを反応元を共通する第6表(実験5B)の非分割法に於ける効果と比較してみると51200×(±)度所見が±度と顕化し、亦再分離液に於ける24H限3200×±度所見が1600×-と低下している事実よりして、軽度乍ら分割分離の意義が認められる訳である。因みに48H限所見を参考にすると第6表所見には102400×(±)の反応が認められて叙上考察と相容れないものがある。然し乍ら48H限所見の意義は未だ検討の余地が多分に残されているので此処

には本所見に基づく判定は採らないことにする。

実験8 後処置に於ける保温の意義に関する実験(第9・10表参照)

既述の如く、抗体分離術式に於ける加温の意義が重要な因子であることは夙に先人によつて認められている処である。従つて既に抗原より離脱した抗体が温度の低下に伴つて再結合を起すことは、仮令mediumが蒸溜水であつても支障はないので、斯る条件の因子の除去さるべきことは当然のことである。加温処置後の遠心分離過程に於ける液温の低下防止の為著者によつて既述の如き保温装置が考案された理由は此処に存する。然し乍ら遠心分離に際しての菌体(抗原)の沈降は比較的急速で、抗原抗体結合可能な温度域迄の低下を待たずして大部分の菌体が沈降排除される場合を考えると、後処置に際しての保温は爾く厳密を要しないとも考えられる。此の間の消息を窺知する為次の如き実験が試みられたことになる。

第10表 後処置に於ける保温の意義に関する実験(実験8B)

		稀釈 倍数	観察時間										対 照	塊 性状	
抗体 分離 液	反応元 処置		200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400			
低温下 遠心処置	生菌	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	-	F
	再分離液	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	f
高速 遠心処置	生菌	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	-	F
	再分離液	37°C 2H R.T. 24H R.T. 48H				±	(±)	-	-	-	-	-	-	-	f
保温下 遠心処置	生菌	37°C 2H R.T. 24H				卍	卍	+	±	(±)	-	-	(±)	-	F(k)
	再分離液	37°C 2H R.T. 24H				±	(±)	-	-	-	-	-	-	-	f

- 〔註〕 1. 低温下遠心処置とは、4°C(±2°C)に保持された冷却遠心沈澱機に56°C30M処置試料を装置直ちに4000R.P.M.80M遠心処置の施される場合で、遠心終了時の液温は9°Cであつた。
2. 高速遠心処置とは、上記の条件下で10000R.P.M.30M遠心操作の施されたもので、液温は12°Cであつた。
3. 保温下遠心処置(4000R.P.M.80M)とは、恒温函内に於いて遠心操作の施された場合で第2~8表に於けると全く同条件である(第2表〔註〕3参照)。
4. 反応元・再分離液については第2表〔註〕2・4参照。100°C30M加熱菌元については全例陰性なる故記載を略する。

第11表 O抗体分離に関する実験(実験9)

抗体 又は 血清	稀 釈 倍 数	反 應 元	稀 釈 倍 数										対 照	塊 性 状	
			200	400	800	1600	3200	6400	12800	25600	51200	102400			
O 因 子 血 清	生 菌	37°C 2H	+	±	(±)	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	K(f)
		R.T. 24H	卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 48H	卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	-	-	-		
	100°C・30M 加熱菌	37°C 2H	(±)	(±)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	K
		R.T. 24H	卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 48H	卍	卍	+	±	(±)	-	-	-	-	-	-		
分 離 液 (吸 收 菌 II 生 菌)	生 菌	37°C 2H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		R.T. 24H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 48H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	100°C・30M 加熱菌	37°C 2H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		R.T. 24H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 48H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
分 離 液 (吸 收 菌 II 加 熱 菌)	生 菌	37°C 2H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		R.T. 24H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 48H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	100°C・30M 加熱菌	37°C 2H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		R.T. 24H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		R.T. 48H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		

- [註] 1. O因子血清は P.A 1015 の陳旧ブイヨン培養より得られた運動陰性菌の生菌免疫血清より *S. oslo* 生菌を吸収元として調製されたものである。
 2. 被検抗体液として第1図に於ける吸収菌が夫々生菌・100°C 2.5H 加熱菌である場合の2種の分離液が検討されている。
 3. 分離操作は 200×・56°C30M・ピペット処置の型式によつた。但し此の場合O因子血清のO抗体価が低いので、200×血清を得る場合と雖も血清液量と菌量の比は 4 mg/cc で、第4表例に比すれば極めて稀薄な菌液として加温・ピペット操作が施されていることになる。
 4. 反応元に就いては第6表 [註] 4 参照。

第9表は室温(30°C)に於いて通例の如く遠心処置の施された場合で遠心終了直後の液温は35°C, 分離液の凝集価所見は保温遠心処置の場合に殆ど全く一致しているのである。更に第10表は冬期に於ける室温と液温の低下を想定して行われた所産である。即ち約4°C(±2°C)に保持された冷却遠心機に56°C30M処置試料を装置, 直ちに4000R.P.M.80M遠心処置が施された場合の遠心終了時液温を検すると9°Cで, 第9表の場合に比して低温であつたに拘らず其の分離効果は保温下遠心処置と殆ど異なる処はないのである。更に上記低温条件下に採られた10000R.P.M.30Mという高速遠心処置に際しても処置終了時液温は12°Cであるに拘らず叙上同様の結果が得られたのである。斯くて後処置に於ける56°C保温は必ずしも抗体分離に関する必須条件ではないとも考えられるのである。然し乍ら叙上所見は56°C30M処置後直ちに遠心操作に附せられた場合のことで, 是れ等両操作移行の間に温度下降の機会が予想可能な場合の如き保温装置の意義が毫も軽視されてならないことは自明のことである。

実験9 O抗体分離に関する実験(第11表参照)

既述の実験成績表に明らかな様に, 各分離抗体液に対する加熱元反応はすべて陰性に終つている。即ち既述の操作術式は, O抗体分離に関する限り適当でないと想定されるのである。然し乍ら他面に於いては供試O H血清のO抗体価が元来低価である為, 既述術式の性格上分離効果の判定が不能の場合も一考されねばならない処である。斯くてO抗体高価の血清が他に求められねばならないのであるが, 不幸にしてP.Aの生菌或いは加熱菌による免疫家兎血清のO抗体価は何れも800~1600×程度で供試血清として不適なもののみである。たゞ偶々P.A-D型(D76%・C24%)の加熱菌元に対して12800×+の凝集価を示すものとしてP.A運動陰性菌に抱える生菌免疫家兎血清が獲られていたので, 本実験に是れが供試された次第である。但し本血清はS. osloの生菌元に対しても51200×(±)度の凝集価を示すのでOslo生菌に抱つて吸収されたものがO因子血清として供試されている。然るにOslo生菌に抱つて因子血清化された該O血清はP.A加熱菌元に対して3200×(±)程度を示したにすぎない。このように結果する原因としては高橋¹²⁾(1957)のLQ元等との関係が考慮されねばならないが此処では深く解れないことにする。

兎もあれ叙上処置に由来するO因子血清に就いて適用された分離術式は200×稀釈・ピペット操作300回法であるが, 所産を要約すると次の様になる。即ちこの

200×なる稀釈度は既往のH抗体分離に際しての結果例えば実験2・3等の所産を基準にして評価すれば, 抗体分離を目しての稀釈度としては低度のように思われるのである。然し乍ら, O抗体価が低価である為, 是れが吸収に要する菌量は僅量であり, 其の液量に対する比率は4mg/CCに過ぎない。H抗体分離に於ける1600×のそれが17mg/CCであるのに比すれば, 更に稀薄な菌液であるが故に, H・O各抗体の脱離機転に差異なきものとすれば, O抗体の分離効果は相当高度なものであつて宜い道理である。然るに第11表に示される如くO抗体吸収菌として生菌・加熱死菌の何れが供試された場合も共にO抗体の脱離は証明されていないのである。即ち既述の抗体分離術式はO抗体分離に関して不適であることが確認されたことになる。O抗体に関する分離術式は別途に攻究するべきものとして, 本報では先ずH抗体分離に関する各種検索が企図された次第である。

考 按

抗元抗体結合体よりする抗体の分離に関する研究はHAHN U. TROMSDORF以降数多の先人によつて企図された処である。その分離術式は是れを要約すると化学的方法・物理的方法及び併用方法に類別されることは既述の通りである。化学的方法・併用方法としては高濃度塩溶液・Ba(OH)₂・BaCl₂等による抗体分離の系統があり, 物理的方法としては温熱処置を主体とする分離の系統が認められる。是れ等各分野に於ける諸術式の意義・優劣は目的に応じて評価するべきで, 著者の場合は其の術式の性格として分離効果の完全・確実性も爾ること乍ら, 簡易・迅速・微量適用性が先ず要求される關係上, 物理学的手段が選定されたことになる。翻つて所謂抗元分析と叙上抗体分離の關係を考察すると, 前者に於ける重要な研究手段としての位置を占める所謂吸収試験との間に密接な關係が認められる訳である。即ち吸収試験に於いては吸収元として所謂 minus variant を必要とするのに対して, 叙上の抗体分離術式にあつては逆に plus variant を必須とする別はあつても, 共に抗体の分析化・因子化が目的とされる点に差異はないのである。従つて吸収試験に際して仮に minus variant を欠除する場合は, 是れに該当する吸収元作製の為各様の考案が必要となつてくる。例えば倉田¹³⁾(1954)¹⁴⁾(1955)¹⁵⁾(1955)のP.A属L.Vi・Z・O₂各抗体分離術式に観られる如き是れである。更に著者¹⁶⁾(1959)のFF, 高橋¹²⁾(1957)のLQ等に至つては是れが汎在性抗元の故に minus variant の入手が困難であるのみでなく,

minus variant化の方式すら不明の状態にあるのであるが、斯かる場合に試みらるべき術策として既述の抗元抗体分離法が考えられる訳である。本法に拠る場合も供試結合元の抗元配合によつて必ずしも因子血清が得られる訳ではないが、例えば叙上のFF・LQ等の場合の如きは充分に期待し得る処である。因みに例えばFF原の如く其の出現が偶発的で長期にわたつて消失する抗元の場合の如きは血清自体の化学的分層に其の因子的特異性を求める他はないのであるが、此処では是れに迄は触れないことにする。斯かる見解に立つて抗体分離に関する物理学的術式の基盤となるべきものを先人の業報に求めると、賛否両立する処ではあるが既述の如く、HUNTOON・松井・三輪等に拠つて追究された蒸溜水加温分離法なる術式が留意されるのである。恨むらくは氏等に拠つて報告された陽性成績例を仔細に吟味すると、猶術式に改案の余地が残されているように考えられるのである。即ち物理学的分離因子としては温熱と処置時間に主体が置かれ爾余の因子例えば振盪・攪拌・稀釈等の意義に迄は触れていないこと、抗体分離度が比較的低度であること、抗体分離残渣である沈澱菌凝塊に於ける残留抗体の有無が未検であること、特に分離抗体のO・H型所属が不明であること等は留意を要する点である。著者は先ず是れ等諸因子を考慮しての追試的実績として一定の所産を収め得た訳である。然し乍ら既往の範囲に於ける実績の総合的考察の結果、例えば温度・加熱時間・攪拌度等既検の因子に就いてすら猶広範囲に亘つての再検の必要を窺い得ているのである。更に亦蒸溜水加温法をして先人の場合より効果的ならしめる術式が一応獲られたにしても、末に全抗体分離の域に迄は達し得ていない訳で今後追究を要する処で、是れ等に関する実績は続報に記述の予定である。因みに人工的分離抗体に就いては其の分離量・性状等が当然吟味さるべきであるが本報では特別には是れに触れない。抗体価測定には資料の性格と目的に応じて生体内法 (in vivo) 管内法 (in vitro) が採られるわけであるが、当報では自験の性格上単に叙上判定の基準として凝集反応が採択されているのである。

結 語

S. paratyphi A 1015とその生菌免疫家兎血清を資料として抗元抗体分離法が研究された。血清と菌液が37°C 2 H下で結合され遠心沈澱される。その沈澱は更に0.85% NaCl液を以つて洗滌遠心される(2回)。次いで蒸溜水浮游液化された本沈澱は56°C 30 M処置後56°C保温下に遠心、その上清は抗体液として分別される。更にその沈澱よりの再分離液は残留抗体価測定の資料として供試される。

著者は叙上の方法に更に稀釈・攪拌 (Pipetting)・加温等の物理学的処置を附加することによつて、その分離効果を増進せしめ得ているが要約すると次の様になる。

(1) 蒸溜水と菌量との関係(稀釈度)には重要な意味がある。本実験供試の資料に関する限り140 mg/ccに於いては加温・攪拌の操作は殆ど無意味である(原血清抗体価:分離液抗体価:残留抗体価=102400×:12800×:102400×)。

(2) ピペット操作に拠る攪拌は稀釈度大なる程有効である。即ち此所では供試血清(102400×)に対する菌量を基準にして表現すると、35 mg/ccに於いては軽度(102400×:51200×:未検)17 mg/ccに於いては著明に有効である(102400×:102400×:12800×)。

(3) 最も効果的な方法は17 mg/ccの稀釈度・56°C 30 M加温・ピペット操作300回という型式の場合である(102400×:102400×:12800×)。更に同液量を2等分し分割的に分離する時は再分離液の残留抗体価は1600×陰性である。

(4) 加温処置後の遠心操作を4°C(±2°C)保持冷却遠心機に拠る時は、処置終了時の液温は9~12°Cの低温を示すに拘らず56°C保温遠心法に拠つた場合の分離効果との間に殆ど全く差異を示さない。即ち必ずしも後処置としての56°C保温は是れを必要としない。

(5) O因子血清に就いて生菌及び加熱菌を用いた分離効果は共に陰性である。又(1)~(4)の成績はOH血清に対する生菌の反応価で凝塊の性状は雲架状であり、加熱元に対しては陰性である。即ち本操作ではO抗体は分離され難いと考えられる。

Summary

Although for the purification of antibody some chemical methods are in general employed, in this work a purely physical method was adopted, using *Salmonella paratyphi A* 1015 by its strain name, and corresponding antisera from rabbits immunized with it. After the antigen-antibody complex had developed, at 37°C for 2 hours, it was

centrifuged to obtain the sediment. This was washed in normal saline, which was repeated two times, and then was suspended in distilled water. This suspension of the antigen-antibody complex was heated at 56°C for 30 minutes, and was centrifuged in a box at the same temperature. The supernatant fluid of it was found to contain separated antibodies. Furthermore it was definitely shown that many times repeated pipetting of the suspension was more effective in separating antibodies. But, when the suspension was too much concentrated, for instance at the rate of 140 mg/cc, this treatment was almost of no effect. Thus a suspension of 35 mg/cc could yield a harvest of H-agglutinins to the titre of 1:25600 from the antiserum with a titre of 1:102400, leaving those being hooked by antigenic bacterial cells in the titre of 1:25600. In another suspension of 17 mg/cc, by 300 times pipetting, separated H-agglutinins were obtained to the whole titre from the antiserum with a titre of 1:102400, leaving residual antibodies on bacterial cells as much as 1:6400. By twice treatment of one and the same suspension these residual antibodies were found practically vanished.

By a further observation it was shown that the heat treatment of the centrifuge was not necessarily essential. Because the same result was gained by a refrigeratory centrifuge within the limits of 4°C to 12°C.

The method was successfully applied for separating H-agglutinins from OH-serum by living cells only. But, by this technic, the separation of O-agglutinins seemed so difficult as impossible.

(Author)