



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	凍結融解による血清の濃縮
Author(s)	秋元, 博; 小川, 忠人
Citation	低温科学. 生物篇, 11, 47-60
Issue Date	1954-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/17564
Type	departmental bulletin paper
File Information	11_p47-60.pdf



凍結融解による血清の濃縮*

秋元 博 小川 忠人

(低温科學研究所 醫學部門)

(昭和28年1月受理)

緒 言

血清中の抗体或いは種々の蛋白劃分を濃縮することは、夫等の成分の分離精製と相俟つて免疫學上の檢索の上からも、また實際の治療への應用の點からも重要なことである。従つてこの目的の爲にこれまでも化學的、物理的、或いは生物學的ないろいろの方法が試みられた。

特に物理學的方法の中では、氷結法が少量でも極めて手軽に實施出來、しかも性質を變えること少なく、また保存にも便利な方法としてその有利性を認められている。例えば Bujid¹⁾ (1897) は、デフテリー並びに破傷風の抗毒素血清を凍結融解し、抗毒素を多量に含む下層部と、水様性で殆んど抗毒素を含まない上層部とに分離し、下層部の抗毒素量は原血清に比べて2.5~3.0倍濃厚となり、然も長期保存に都合のよいことを述べた。其の後 Hata²⁾ (1909) は補体、オプソニン、凝集素、鹽類等について同様の實驗を行い、對照原血清に比べて上記諸成分が3~5倍に濃縮されることを述べた。他にも Coolidge and Cook³⁾ (1897), Rossi⁴⁾ (1905), Ito⁵⁾ (1912) も同様の實驗を行い、氷結法により血清成分が濃縮されることを認めている。

かかる濃縮の現象は廣く膠質液、溶液にも見られることで、種々の有機並びに無機膠質を用いて之を物理化學的立場から檢索した實驗的研究も少なくない。即ち Lottermoser⁶⁾ (1908) は珪酸酸化鐵の Hydrosol を用いて分散相の沈澱を認め、Bobertrag 等⁷⁾ (1908) はタンニン、ヘモグロビン、澱粉、燐蛋白を凍結融解し、ヘモグロビン以外はかなり著明に沈澱することを認めた。他に Brumi⁸⁾ (1909), Gutbier u. Flury⁹⁾ (1908) の報告もあげられる。

なおかかる沈澱或いは濃縮現象がみられるにも拘わらず、氷結法では分散媒中の分散相自体の變性が餘りみられないという利點も與つて、牛乳成分の純粹分離¹⁰⁾、血清フィブリノーゲンの精製¹¹⁾、ペニシリン製造^{12), 13)} 等に廣く用いられている。

然し上述の様な現象を認めた諸家も、凍結融解の條件、或いは濃縮の機構等については充分

* 北海道大學低温科學研究所業績 第242號

本實驗の要旨は昭和26年3月、日本細菌學會北海道支部大會に於て發表した。

な吟味も、また適切な解釋も與えてはいない。

私共は今回、血清の濃縮状態を觀察し、濃縮のための有効な條件を求め、併せて濃縮機構を追求したのでその成績を述べる。

實 驗 方 法

(1) 使用血清：

(a) *S. typhi* H. 901 株の加熱死菌免疫家兎血清で凝集價 3200 倍及び 6400 倍を示すもの。

(b) 正常馬血清

(2) 凍結方法： 上記の血清を豫め目盛りを附した内徑 10 mm の小試験管に 3 cc 宛分注し、之を急速或いは緩慢に凍結した。即ち急速凍結には -30°C のブラインに直接試験管を浸し、緩慢凍結には -30°C の低温室内に試験管を吊下げて空氣冷却を行つた。

(3) 融解方法： 冷却された血清が所定の温度まで達した時に、今度は加温の速度をそれぞれ變えて融解した。即ち急速融解は $+30^{\circ}\text{C}$ の恒温水浴中に浸け、緩慢融解は室温 ($+10^{\circ}\text{C}$ 前後) に放置して融解した。

(4) 凍結並びに融解過程の觀察： 血清の状態變化を觀察する爲に銅コンスタンタン熱電對を用いて凍結及び融解過程の血清温度の變化を記録すると共に、特に低温室並びに室温での緩慢凍結、融解について試験管内にみられる氷結の進行状況と血清成分の濃縮状態、更に融解の状況等を肉眼的に詳細に觀察した。

(5) 凍結融解後の諸成分の定量： 凍結融解の處置を終つた血清は、ピペットを用いて層を亂さぬように可及的靜かに 1 cc 宛 3 本の試験管にとり、上、中、下の 3 層に分け、その各々について次の様に血清成分を測定した。

(a) 蛋白含有量： 硫酸銅法により比重を測定し、總蛋白量を算出した。

(b) クロール量： Mohr の方法に従い測定した。

(c) 抗体量： *S. typhi* H. 901 株を抗原として凝集反應を行い、凝集價を以て示した。

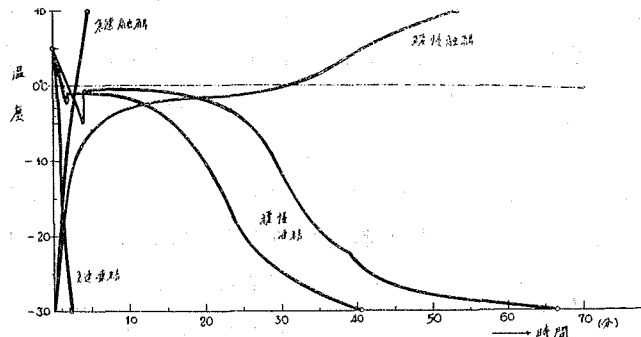
(d) 以上の外に各層に於ける血清蛋白分層の濃縮状態を知る爲に Tiselius の装置による電気泳動圖を求めた。

實 驗 成 績

I. 凍結融解の過程に於ける血清の温度變化

上述のような條件で急速及び緩慢に凍結又は融解させた場合の凍結、融解曲線を求めると、第 1 圖に示すようになる。

(1) 急速凍結 (-30°C のブラインに浸す) の場合： 温度は略々直線的に下降し、 -30°C に達する迄に要する時間は 2.0~2.5 分、従つて凍結速度 ($+5^{\circ}\text{C}$ から -5°C までの間で毎分當り



第1圖 凍結融解曲線
(徑10mmの試験管に3ccの血清を入れた時)

降下する温度を示す。以下各条件とも同様)は12.7°C/分である。

(2) 急速融解 (+30°Cの温湯に浸す) の場合: 加温と同時に略々直線的に温度は上昇し、-3~-0.5°C附近でやや遅くなり-30°Cより+5°Cに達する迄に要する時間は3.5~4.0分、融解速度(-5°Cから+5°Cまでの間に於ける毎分當りの温度上昇率。以下同様)は6.6°C/分である。

(3) 緩慢凍結 (-30°Cの低温室内で空気冷却) の場合: 血清の多くは過冷却を起し、-5°C、時にはそれ以下にも達することがあるが、この状態は振動其の他僅かの外因で直ちに破れ、氷生成が始まると同時に、温度は-0.5~-1.0°C迄上昇した後に暫時その附近に停滞する。氷生成が進むにつれて温度は其の後漸次下降するが、凍結が緩やかに進行した場合には、-20.0~-22.0°C附近に於て僅かに温度曲線の屈曲が認められることがある。 -30°Cまで達するのに30~60分を要し、凍結速度は0.54°C/分であつた。

(4) 緩慢融解 (室温に放置) の場合: 温度は始めは急に上昇するが、-5°C附近に達すると漸次緩やかとなり、氷が全部融け終ると再び上昇を始める。氷が完全に融解する迄には50~70分を要し、融解速度は0.26°C/分であつた。

II. 血清の凍結並びに融解状態の肉眼的観察

(1) 急速凍結: ブラインの冷却で血清温度が-1°C前後に達すると、初め血清の上面及び試験管に接する側面、下面に僅かの氷の結晶が出来たと思うと、それ等は急速に内面に向つて延びて行き、血清全体は忽ち不透明な氷晶となる。

(2) 急速融解: 加温すると同時に先ず管壁に接する面が一様に融け始め、圓柱状の氷が既に融けた液中に浮び上つて來、それが漸次小さくなつて遂には全部が融けてしまう。

(3) 緩慢凍結: 血清が徐々に冷却して-2~-5°C附近に達すると、僅かの刺激でも過冷却は破れ、血清表面の管壁に接する部分に最初の氷結晶が出来、同時に温度も-0.5~-1.0°Cに上昇する。この氷結晶は次第に中心部に向い樹葉状に延びて行き、次で同様の氷結晶が下面に、更に側面にも生じて來る。是等の結晶が相交錯しながら次第に内部に向つて延びると、一

方濃厚になつた血清は漸次中心部に寄せ集められ、三角錐形となつて行く。その側面は周囲の氷質と明らかに境されるが、下面の境界はやや不明瞭である。この三角錐の部分は次第に小さくなつて行き -20°C 附近に達する頃には全体が氷質となつてしまう。

かかる凍結の状況は色素液を凍結させるとよく観察される。即ち稀釋したメチレン青水溶液を急速に凍結すると、全体は瞬時に一様の紫色を呈する氷質となるに反し、緩慢凍結の場合には周囲に先ず透明な氷質を生じ、それが内部に向つて成長するに従い着色液は漸次濃厚な色調を呈しながら中心部に集められ、遂に全体が氷結すると前述の三角錐の底部に相當する部分が最も濃く、周囲に行くに従い漸次うすい紫色を呈する氷質となつている。

(4) 緩慢融解： 上面、側面及び下面から殆んど同時に徐々に融解し始めるが、下面からの融解が最も速かで既に融けた液の中に氷の部分が浮いた状態になる。この氷が周囲の液に融け込んで行くが、中央部の濃厚な部分は融解と共に底の方に流れ落ちる様子がよく判る。

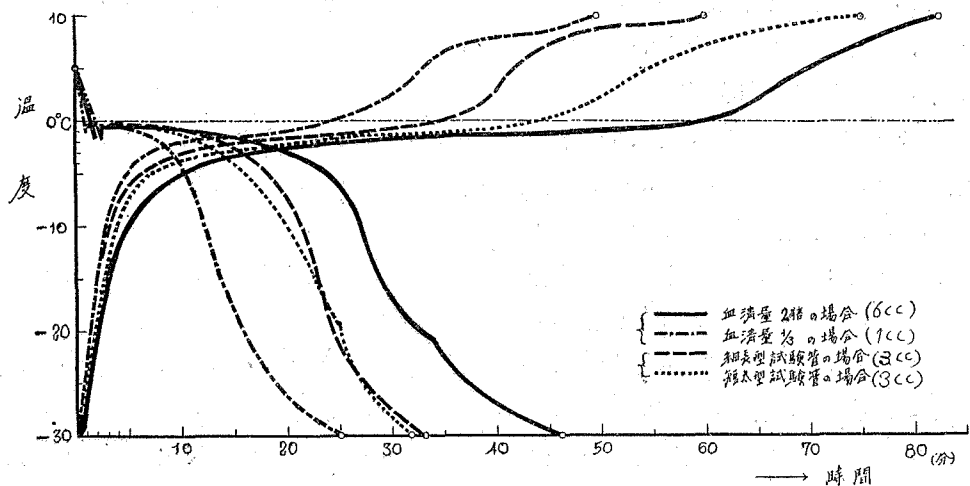
III. 種々な條件で凍結、融解させた時の血液成分の濃縮状態

(1) 凍結及び融解の速度を緩急適宜に組み合わせ、第1表に示すような3種の條件にして各管の上、中、下、3層について夫々の蛋白量、クロール量及び抗体量を測定した。それによると第1表に示すように上層より下層に向うに従つて濃縮され、その程度は凍結融解共に緩慢な場合が最も強く、之に次いで緩慢凍結—急速融解、急速凍結—緩慢融解の順になる。

要するに凍結、融解共に緩慢なことが最も有効な濃縮條件と考えられるので以下の實驗は此の條件で行うことにした。

(2) 種々の形の容器を用いた場合

内徑 10 mm の試験管の他に 8.5 mm と 16.0 mm の細及び太試験管を用い、それらに 3 cc 宛血清を入れると、(直徑) 對 (液の高さ) は夫々 10.0/35.0, 8.5/47.5 及び 16.0/15.0 となる。この3種の容器に入れた血清を緩慢凍結—緩慢融解すると、その場合の血清の溫度變化は第2圖の



第2圖 凍結融解曲線 (種々の容量、容器を用いた場合)

第 1 表 凍結並びに融解速度を変えた場合の血清濃縮状態

實驗例	檢査事項	凍 結 條 件									
		對 照 血 清	急速凍結, 緩慢融解			緩慢凍結, 急速融解			緩慢凍結, 緩慢融解		
		血 清 の 層									
			上	中	下	上	中	下	上	中	下
實驗 1	比 重	1.0205	1.0160	1.0200	1.0260	1.0150	1.0205	1.0265	1.0130	1.0185	1.0305
	蛋 白 量	4.3 g/dl	2.50 (58)	4.10 (95)	6.60 (153)	2.10 (49)	4.30(100)	6.85 (157)	1.30 (31)	3.45 (80)	8.10 (188)
	鹽 素 量	330.8±6mg/dl	250.0 (75)	342.0 (102)	411.0 (122)	242.0 (73)	330.0 (100)	439.0 (133)	217.0 (66)	310.0 (94)	496.0 (150)
	凝 集 價	3200	3200 (100)	3200 (100)	12800 (400)	3200 (100)	3200 (100)	12800 (400)	3200 (100)	6400 (200)	12800 (400)
實驗 2	比 重	1.0205	1.015	1.0200	1.0260	1.0140	1.0205	1.0278	1.0125	1.0190	1.0295
	蛋 白 量	4.3 g/dl	2.10 (49)	4.10 (95)	6.60 (153)	1.70 (67)	4.30 (100)	7.10 (165)	1.15 (27)	3.65 (85)	7.75 (180)
	鹽 素 量	330.8±6mg/dl	231.0 (69)	331.0 (99)	416.0 (123)	220.0 (67)	333.0 (100)	452.0 (137)	205.0 (63)	310.0 (94)	472.0 (143)
	凝 集 價	3200	3200 (100)	3200 (100)	12800 (400)	3200 (100)	3200 (100)	12800 (400)	3200 (100)	6400 (200)	12800 (400)
實驗 3	比 重	1.0205	1.0150	1.0195	1.0270	1.0140	1.0205	1.0275	1.0125	1.0200	1.0290
	蛋 白 量	4.3 g/dl	2.10 (49)	3.90 (91)	6.85 (157)	1.70 (67)	4.30 (100)	6.90 (158)	1.15 (27)	4.10 (95)	7.50 (174)
	鹽 素 量	330.8±6mg/dl	230.0 (68)	318.0 (95)	436.0 (130)	214.0 (65)	354.0 (107)	432.0 (130)	212.0 (64)	321.0 (97)	464.0 (140)
	凝 集 價	3200	3200 (100)	3200 (100)	12800 (400)	1600 (50)	3200 (100)	12800 (400)	1600 (50)	3200 (100)	12800 (400)
平均	蛋 白 量	(100)	(52)	(93)	(154)	(61)	(100)	(160)	(28)	(86)	(180)
	鹽 素 量	(100)	(70)	(95)	(125)	(68)	(102)	(133)	(64)	(95)	(144)
	凝 集 價	(100)	(100)	(100)	(400)	(83)	(100)	(400)	(83)	(166)	(400)

註 () 内は対照血清の各成分量に対する百分率

第 2 表 容器の形状による血清濃縮状態

實驗例	檢査事項	試 験 管									
		對 照 血 清	細長試驗管 (内徑 8.5 mm)			普通試驗管 (内徑 10 mm)			短太試驗管 (内徑 16.0mm)		
		血 清 の 層									
			上	中	下	上	中	下	上	中	下
實驗 1	比 重	1.0255	1.0150	1.0245	1.0370	1.0150	1.0260	1.0360	1.0200	1.0230	1.0325
	蛋 白 量	6.2 g/dl	2.1 (34)	5.8 (93)	10.6 (167)	2.0 (34)	6.4 (106)	10.2 (163)	4.1 (66)	6.0 (97)	8.9 (143)
	鹽 素 量	414.2±7.3mg	242.0 (58)	382.0 (92)	595.0 (144)	250.0 (60)	410.0 (99)	595.0 (144)	343.0 (83)	406.0 (98)	494.0 (119)
	凝 集 價	6400	3200 (50)	6400 (100)	25600 (400)	3200 (50)	6400 (100)	25600 (400)	6400 (100)	12800 (200)	25600 (400)
實驗 2	比 重	1.0255	1.0155	1.0245	1.0370	1.0160	1.0265	1.0340	1.0180	1.0260	1.0325
	蛋 白 量	6.2 g/dl	2.3 (37)	5.8 (93)	10.6 (167)	2.5 (40)	6.6 (113)	9.5 (158)	3.3 (52)	6.4 (106)	8.9 (143)
	鹽 素 量	414.2±7.3mg	250.0 (60)	373.0 (90)	593.0 (144)	270.0 (65)	404.0 (98)	570.0 (138)	301.0 (73)	412.0 (99)	505.0 (122)
	凝 集 價	6400	3200 (50)	6400 (100)	25600 (400)	6400 (100)	12800 (200)	12800 (200)	3200 (52)	12800 (200)	12800 (200)
實驗 3	比 重	1.0255	1.0140	1.0260	1.0370	1.0160	1.0250	1.0350	1.0180	1.0250	1.0330
	蛋 白 量	6.2 g/dl	1.7 (27)	6.4 (106)	10.6 (167)	2.5 (40)	6.0 (97)	9.9 (158)	3.3 (52)	6.0 (97)	9.1 (147)
	鹽 素 量	414.2±7.3mg	235.0 (57)	427.0 (106)	582.0 (141)	276.0 (67)	404.0 (98)	560.0 (135)	301.0 (73)	402.0 (97)	530.0 (128)
	凝 集 價	6400	6400 (100)	6400 (100)	25600 (400)	6400 (100)	12800 (200)	25600 (400)	6400 (100)	6400 (100)	6400 (100)
平均	蛋 白 量	(100)	(32)	(97)	(167)	(38)	(105)	(158)	(56)	(100)	(144)
	鹽 素 量	(100)	(58)	(96)	(143)	(64)	(98)	(139)	(76)	(98)	(123)
	凝 集 價	(100)	(66)	(100)	(400)	(83)	(163)	(333)	(83)	(168)	(233)

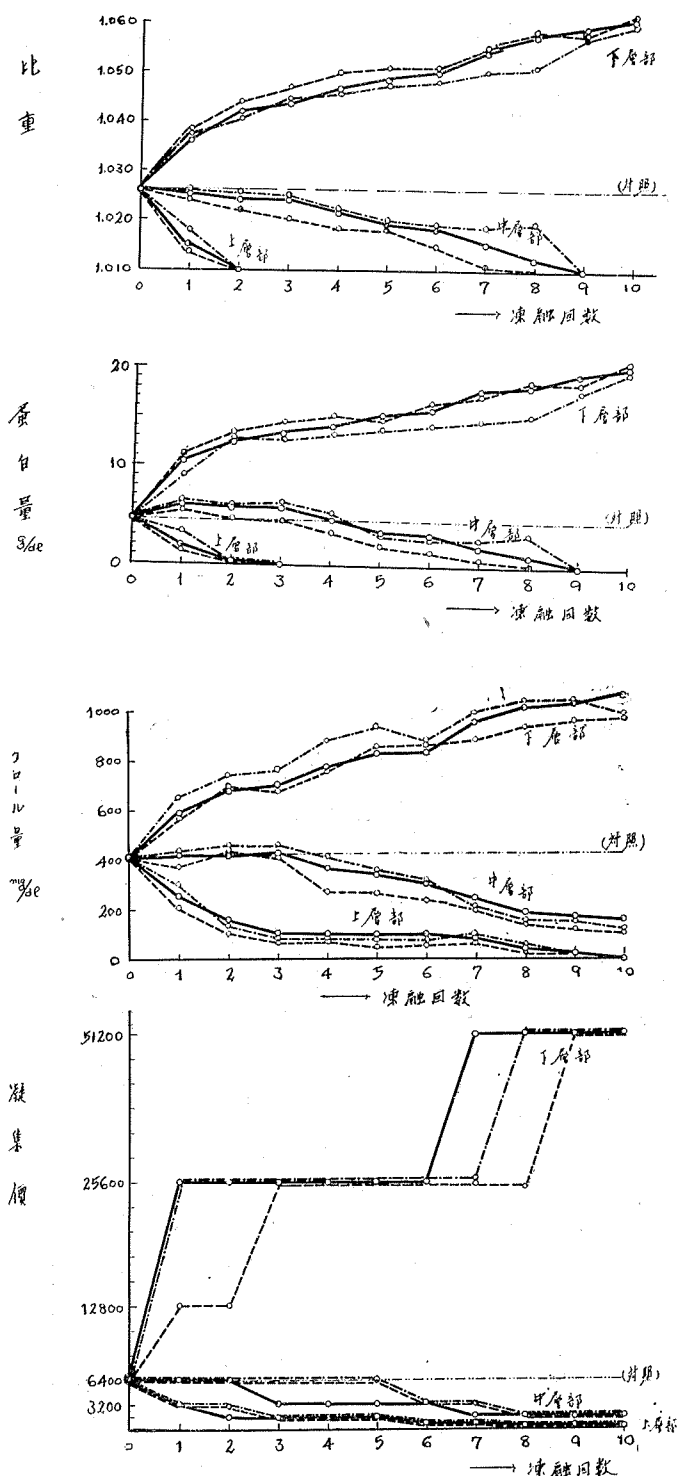
註 () 内は対照血清の各成分量に対する百分率

第 3 表 血流量を變えた場合の濃縮状態

實驗例	検査事項	血 清 量									
		對 照	6 cc			3 cc			1 cc		
			血 清 の 層			上	中	下	上	中	下
			上	中	下						
實驗 1	比 重	1.0255	1.0110	1.0245	1.0410	1.0150	1.0255	1.0350	1.0200	1.0260	1.0305
	蛋 白 量	6.2 g/dl	0.5 (8)	5.8 (93)	12.2 (197)	2.1 (34)	6.2 (100)	9.9 (158)	4.1 (66)	6.4 (106)	8.1 (130)
	鹽 素 量	414.9±3.7mg	192.0 (46)	382.0 (92)	660.0 (159)	256.0 (60)	412.0 (99)	542.0 (130)	343.0 (83)	432.0 (108)	502.0 (122)
	凝 集 價	6400	6400 (100)	12800 (200)	25600 (400)	6400 (100)	12800 (200)	25600 (400)	—	—	—
實驗 2	比 重	1.0255	1.0120	1.0250	1.0400	1.0140	1.0260	1.0360	1.0200	1.0258	1.0305
	蛋 白 量	6.2 g/dl	0.9 (15)	6.0 (97)	11.8 (190)	1.7 (27)	6.4 (106)	10.3 (167)	4.1 (66)	6.3 (105)	8.1 (130)
	鹽 素 量	414.9±3.7mg	204.0 (49)	402.0 (97)	642.0 (155)	228.0 (55)	425.0 (104)	595.0 (144)	337.0 (81)	436.0 (109)	486.0 (117)
	凝 集 價	6400	6400 (100)	12800 (200)	25600 (400)	6400 (100)	12800 (200)	12800 (200)	—	—	—
實驗 3	比 重	1.0255	1.0120	1.0245	1.0400	1.0160	1.0255	1.0350	1.0200	1.0260	1.0305
	蛋 白 量	6.2 g/dl	0.9 (15)	5.8 (93)	11.8 (190)	2.5 (46)	6.2 (100)	9.9 (158)	4.1 (66)	6.4 (106)	8.3 (134)
	鹽 素 量	414.9±3.7mg	204.0 (49)	391.0 (94)	642.0 (155)	278.0 (65)	406.0 (98)	540.0 (130)	338.0 (81)	432.0 (108)	492.0 (119)
	凝 集 價	6400	6400 (100)	12800 (200)	25600 (400)	6400 (100)	12800 (200)	25600 (400)	—	—	—
平均	蛋 白 量	(100)	(12)	(94)	(192)	(35)	(102)	(161)	(66)	(105)	(131)
	鹽 素 量	(100)	(48)	(94)	(157)	(60)	(100)	(134)	(81)	(108)	(119)
	凝 集 價	(100)	(100)	(200)	(400)	(100)	(200)	(333)	—	—	—

註 () 内は對照血清成分に對する百分率

凍結融解による血清の濃縮



第3圖 凍結融解を反覆した時の血清濃縮状態

ようになり、濃縮の割合は第2表の如く、血清量及び凍結融解条件を等しくしても、用いる容器の形状が異なれば夫々違つて來ることが判つた。即ち同一液量では細い管に入れた方が濃縮され易い。

(3) 量を變えた場合

同一形状の試験管で血清量を6 cc, 3 cc, 1 cc と量を變えて凍結させた場合には第3表に示すように、量の多い程濃縮され易い。

(4) 凍結融解を反覆した場合

同一条件で凍結融解を反覆すると第3圖に示すように回を重ねるに従つて次第に濃縮度を増して來るが、その程度は成分によつて必ずしも平行しない。例えば下層部の蛋白量は凍結融解を3回繰返した後では原血清の約2倍となり、8回目には約3倍となる。また血清クロール量は6~7回で約2倍量、10回目で約2.5倍量となる。一方抗体量は1回で既に4倍量に(1例を除き)、7~8回目で實に8倍に達した。

IV. 血清の濃縮機轉の検討

以上の實驗でわかるように、血清を試験管に入れて靜置した儘凍結融解を行うと、上層から下層に向い順次に血清成分が濃厚となる現象がみられ、その濃縮機構は肉眼的觀察からも大体窺うことが出来るが、更に次の如き實驗を行つて検討した。

(1) 到達温度による差異 (第4表)

同一速度で種々の温度まで冷却した血清の濃縮状態をみると、 $-1 \sim -3^{\circ}\text{C}$ に達しても過冷却状態にあつて凍結の起らぬ限りは濃縮は起らないが、一旦過冷却が破れて氷生成が始まつたものでは、同じ -3°C に達したものでも既に多少の濃縮が認められる。以下 -10°C 、 -30°C と到達温度の低い程濃縮率が増大する。

(2) 凍結のみによる影響 (第5表)

同様の条件で -30°C まで冷却した血清を、低温室内で凍結したまま上、中、下の3層に切

第4表 到達温度と血清濃縮状態 (比重のみを示す)

温 度		實 驗 例								
		實 驗 1			實 驗 2			實 驗 3		
		血 清 の 層								
		上	中	下	上	中	下	上	中	下
對 照		1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280
凍結せず	－ 1°C	1.0275	1.0275	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280
	－ 3°C	1.0270	1.0280	1.0300	1.0280	1.0280	1.0280	1.0275	1.0290	1.0280
凍 結	－ 3°C	1.0240	1.0250	1.0335	1.0255	1.0260	1.0330	1.0240	1.0260	1.0330
	－10°C	—	—	—	1.0170	1.0275	1.0440	1.0160	1.0275	1.0440
	－30°C	—	—	—	1.0150	1.0260	1.0440	1.0140	1.0240	1.0460

第 5 表 凍結のみによる血清濃縮状態 (比重のみを示す)

實 驗 例			處 理 條 件					
			急 速 凍 結			緩 慢 凍 結		
			血 清			の 層		
			上	中	下	上	中	下
無 處 理 對 照			1.0250	1.0250	1.0250	1.0250	1.0250	1.0250
凍結後切斷	實驗	1	1.0250	1.0245	1.0260	1.0215	1.0245	1.0285
		2	1.0250	1.0250	1.0260	1.0219	1.0250	1.0295
		3	1.0249	1.0250	1.0255	1.0220	1.0240	1.0290
凍 結 融 解			1.0190	1.0275	1.0285	1.015	1.0240	1.0370

斷し、その各々を別々の試験管に分けて融解したものについて蛋白量 (比重値を以て示す) を比較すると、急速凍結では殆んど濃縮を認めないが、緩慢凍結では下層部に既に著しい濃縮が認められる。しかしその程度は凍結融解の兩處置を行つたものに比べると少ない。

之等のことから、血清の濃縮は凍結と融解の兩段階に於て夫々起るものと考えられる。

(3) 血清各成分の凍結融解による影響 (第 6 表)

以上の如き血清の比重、クロール量及び凝集價が凍結融解によつて影響されるかどうかを確かめるため、融解後 3 層に分けることなく、その儘振盪混和した全血清について、之等を測定してみた。その結果は凍結融解の條件を變えても -30°C までの凍結ではその全成分に變動は

第 6 表 凍結融解による成分の影響

(1) 凍結融解した場合

處 理 條 件	血 清 成 分		
	比 重	クロール含量	凝 集 價
無 處 理 對 照	1.0225	$360 \pm 5.5 \text{ mg/dl}$	1 : 3200
急速凍結—緩慢融解	1.0225	361	1 : 3200
緩慢凍結—急速融解	1.0225	354	1 : 3200
緩慢凍結—緩慢融解	1.0225	356	1 : 3200

(2) 凍結融解 (共に緩慢) を反覆した場合

凍 融 回 數	血 清 成 分		
	比 重	クロール含量	凝 集 價
對 照	1.0245	$390 \pm 6.2 \text{ mg/dl}$	1 : 6400
1 回	1.0245	398	1 : 6400
3 "	1.0245	388	1 : 6400
5 "	1.0240	387	1 : 6400
8 "	1.0235, 1.0240	390	1 : 6400
10 "	1.0235, 1.0240	396	1 : 6400

みられない。

更に緩慢な凍結融解を反覆したものでは、血清比重は5回目以後若干減少するようにも見られるが、クロール量、凝集價には殆んど變化はみられない。

V. 凍結融解による血清蛋白分層の濃縮

以上の實驗で明らかなように、凍結融解により血清成分は下層に濃縮されるが、濃縮部分の蛋白量と凝集價とは平行しない様な成績を示すので、この點を吟味するために處置後に於ける各層の蛋白割合を比較してみた。

即ち馬血清 45.0 cc を凍結融解し、上、中、下の3層を夫々取り出し、Tiselius 装置による

第7表 正常馬血清蛋白分層の濃縮状態
電気泳動圖に於ける面積 (mm²) を示す

實驗例	處 理 條 件		蛋 白 分 層				A/G
			アルブミン	グ ロ ブ リ ン			
				α	β	γ	
實 驗 1	對 照		55.0 (43.5%)	7.0 (5.8%) {10.4%}	28.0 (23.0%) {41.8%}	32.0 (27.0%) (47.8%)	0.825
	凍結融解 血 清	上層	98.5 (32.1)	59.0 (19.9) {29.3}	74.0 (25.0) {31.9}	68.0 (23.0) {38.8}	0.490
		中層	85.0 (45.7)	12.0 (6.4)	32.0 (17.2)	57.0 (30.7)	0.840
		下層	92.0 (50.9)	12.5 (7.2) {15.3}	28.0 (16.2) {34.3}	41.0 (23.7) {50.4}	1.130
實 驗 2	對 照		159.0 (54.5)	39.0 (11.0) {20.4}	98.0 (28.0) {51.3}	54.0 (15.5) {28.3}	0.84 .
	凍結融解 血 清	上層	202.0 (39.7)	66.0 (13.0) {21.5}	128.5 (25.8) {41.9}	111.5 (22.0) {36.6}	0.60
		中層	121.0 (49.8)	22.5 (9.3)	67.0 (27.6)	32.0 (13.3)	1.00
		下層	193.0 (53.2)	35.0 (9.5) {20.5}	76.0 (21.0) {44.8}	59.0 (16.0) {35.7}	1.13

(註) () は泳動圖での全面積に對する%を示し
{ } はグロブリンだけの%を示す

電気泳動図を求めた(第7表)。

それによると、A/G 比は上層部で 0.49~0.60 であるが、下層部では 1.13 でアルブミンよりもグロブリンが沈降し難いことを示している。

更に各層についてグロブリンの分布をみると、下層部にやや γ グロブリンの増加する場合がみられる。

考 察

凍結融解法は血清其の他の比較的不安定な生物學的材料の濃縮の目的に利用されるが、これを最も有効に實施するためには種々の條件をよく吟味しておかねばならない。それにはいろいろの場合が考えられる。

先ず凍結と融解の速度については、どちらもなるべく緩慢に行つた方がよいことが判つた。

これは血清の凍結状況を觀察してもわかるように、急速に凍結させたものでは水の分離が充分に行われないうことによるものと思われる。更に容器の形狀、液量などについても、それによつて濃縮される割合が多少異なるが、これは凍結或いは融解の速度が違ふことと、各層分離に難易のあることなどに基づくものであろう。

凍結融解の回数を重ねれば濃縮度の増すことは當然想像されるところであるが、回数と濃縮度とは直線的關係ではなく次第に効率は低下し、3 層に分けての測定では 10 回位で殆んど差はなくなる。従つて實際に凍結融解法を應用する際には徒らに回数を重ねる手間を省く爲に幾回位凍結融解を繰返せばよいかという適當な有効回数の判斷を下すことが肝要である。

かかる凍結融解なる物理的現象によつて血清成分が下層に沈降するということの機序については、さきにも述べたように、凍結融解過程の肉眼的觀察でその大体は窺ひ知ることが出来るが、更に凍結と融解との兩過程を別々に吟味してみても、兩過程で夫々濃縮現象の起ることが知られた。同一冷却速度でも到達溫度が低くなる程濃縮されるのは、溫度並びに時間によつて凍結状態が變化し、水の分離が一層はつきりするためであらう。

なお電気泳動図でアルブミンがグロブリンよりも下層に沈降しやすいのは、兩者の分子の形態的な差異、ひいては粘性、溶解度の差によるものであろうか。

また凍結融解の條件が異なつても常に下層に於ける濃縮度は、凝集價>蛋白量>鹽素量の順になつてゐる。かかる差異は何に基づくものかについてはいろいろの理由が想像される。

Lottemoser⁵⁾、Bobertrag⁶⁾等は保護膠質液の凍結融解後に分散相の沈澱が認められるのは、凍結によつて脱水が起つて膠質液の濃縮、成分の集積を來すためであると述べている。

一般に膠質粒子が沈澱を生ずるためには、粒子の重量、荷電即ち溶液の pH の變化及び粘性溶解度の變化等によるものが多い。しかもこれらの條件による場合は、多く不可逆的な沈澱を生ずるのである。凍結融解による沈降の場合は、今回の實驗でもみられるように振盪混和することによつて處置前の血清と同一の状態に復歸することからも、殆んど肉眼的に判定できるほ

どの化学的な性状変化は起つていないものと思われる。其の他凍結融解では血清の pH の変化が僅かであるから、蛋白質の酸性沈澱ではないことが、又血清中の鹽類は量的に少ないこと、鹽素量は蛋白量に略々比例して濃縮されること、等から鹽析に基づく沈澱でもないことが想像される。

要するに凍結融解によつて含有成分が下層に濃縮されることは、主として次のような現象、即ち周囲からの冷却で先ず容器の周辺部に生じた氷結晶が漸次成長して行くにあつて次第に水分の分離を伴ない、濃厚な液が中心部の比較的下部に集められ、それが融解時に融解點、或いは比重の差のために下層部に流下することによつて起るものと考えられる。

結 論

血清を濃縮する目的で凍結融解法を利用する場合の効果的な實施方法を吟味した結果、凍結融解の速度は小さいほど、到達温度は低いほど、濃縮度の大きいことを知つた。

更に容器は細く、容量は多いほど、また凍結融解の回数を重ねるに従つて、濃縮度は大きくなることがわかつた。

一方凍結融解によつて血清成分が下層部に沈降する機序については、肉眼的觀察その他の所見から種々考察を試みた。

終りに、熱心な御指導と御校閲を頂いた根井教授、及び特に電気泳動法について御援助を賜つた生理學教室の蓑島教授、中村助教授、吉野學兄の皆さまに、厚く御禮を申し上げます。

文 献

- 1) Bujid. O. 1897 Ueber eine Methode der Konzentrierung des Diphtherie und anderer therapeutischer Sera mittels Ausfrierung. Zentbl. f. Bakt., Orig., 22, 287.
- 2) Hata, S. 1909 Ueber die Anwendbarkeit des Russischen Kolloid-Trennungsvorgangs zur Konzentrierung der wirksamen Substanzen im Serum. Zentbl. f. Bakt., Orig., 48, 203.
- 3) Coolidge, E. & Cooke. 1897 The effect of freezing upon the antiphtherieserum. J. Boston Med. Soc. 2, 166.
- 4) Rossi, F. 1905 Ref. Malys Jahresbericht. (5)による。
- 5) Ito, T. 1912 Ueber die Konzentration der Serumqualitäten durch Gefrieren und über den Einfluss hoher Kältegrade (flüssige Luft) auf die Antikörper. Zschr. f. Immf. 15, 97.
- 6) Lottermoser, A. 1908 Ueber das Ausfrieren von Hydrosolen. Berich. Deutsch. Chem. Gesel. 41, 3976.
- 7) Bobertrag, O., Feist, K. und Fischer, H. W. 1908 Ueber das Ausfrieren von Hydrosolen. Ibid., 41, 3675.
- 8) Brumi, G. 1909 Ueber das Ausfrieren von Gallerten. Ibid. 42, 563.
- 9) Gutbier, A. & Flury, F. 1908 Ueber das Ausfrieren der Hydrosole. Ibid. 41, 4259.
- 10) Palmer, A. H. 1934 The preparation of a crystalline globulin from the albumin fractions of cow's milk. J. Biol. Chem., 104, 359.
- 11) 豊田健一 1950 線維素原の簡單なる調製法について. 日新醫學, 37, 509.
- 12) 齋藤遼他 3 名 1947 ペニシリン培養液の凍結濃縮試験. ペニシリン, 1, 172.
- 13) 芳村次雄・濱田元興 1949 凍結融解によるペニシリンの濃縮に関する研究. 北海道醫誌, 24, 83.
- 14) 吉川春壽 1949 硫酸銅法

Résumé

In order to concentrate the human or animal blood serum, simple technique of freezing and thawing was employed throughout the present experiment.

As the result of examining the optimum conditions of this technique for practical use, it was evidenced that the less the rate of freezing and thawing and the lower the cooling temperature, the more remarkably was the serum concentrated.

Besides, it became evident that some factors, such as the size and shape of container, the volume of sample and the repetition of freezing and thawing, had influences on the concentrating grade of serum.

As to the mechanism of the phenomena that the serum components precipitated at the lower part of the container in the course of freezing and thawing, several inquiries were made from various points of view.