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	低温科學. 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

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

Hiroshi AKIMOTO and Tadato OGAWA 1954 Concentration of Serum by Freezing and Thawing. *Low Temperature Science, Ser. B, 11.*
(With English résumé p. 60)

凍結融解による血清の濃縮*

秋元　博　小川忠人

(低溫科學研究所　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。從つてこの目的の爲にこれまでにも化學的，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輕に實施出來，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 Bujid[1] (1897) は，ヂ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，水樣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 Hata[2] (1909) は補体，オプソニン，凝集素，鹽類等について同樣の實驗を行い，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 Cook[3] (1897), Rossi[4] (1905), Ito[5] (1912) も同樣の實驗を行い，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 Lottermoser[6] (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 Brumi[8] (1909), Gutbier u. Flury[9] (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。

然し上述の樣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

* 北海道大學低溫科學研究所業績　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，血清の濃縮狀態を觀察し，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：

(イ) 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。

(ロ) 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內徑10 mmの小試驗管に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驗管を浸し，緩慢凍結には−30°Cの低溫室內に試驗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溫度まで達した時に，今度は加溫の速度をそれぞれ變えて融解した。即ち急速融解は+30°Cの恒溫水浴中に浸け，緩慢融解は室溫（+10°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：血清の狀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溫度の變化を記錄すると共に，特に低溫室並びに室溫での緩慢凍結，融解について試驗管內にみられる氷結の進行狀況と血清成分の濃縮狀態，更に融解の狀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本の試驗管にとり，上，中，下の3層に分け，その各々について次の樣に血清成分を測定した。

(イ) 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。

(ロ) クロール量：Mohrの方法に從い測定した。

(ハ) 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。

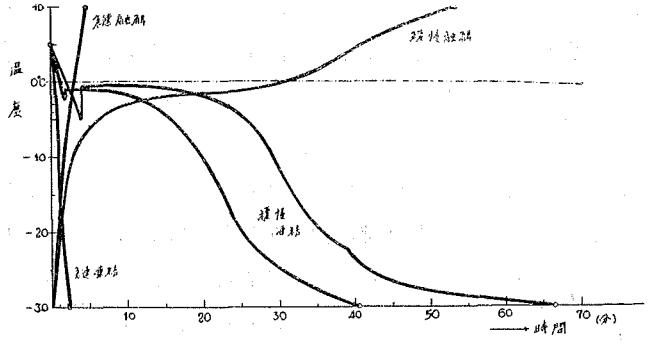
(ニ) 以上の外に各層に於ける血清蛋白分屑の濃縮狀態を知る爲にTiseliusの裝置による電氣泳動圖を求めた。

實驗成績

I. 凍結融解の過程に於ける血清の溫度變化

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：溫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，從つて凍結速度（+5°Cから−5°Cまでの間で毎分當り



第 1 圖　凍 結 融 解 曲 線
(徑 10 mm の試驗管に 3 cc の血清を入れた時)

降下する溫度を示す。以下各條件とも同樣) は 12.7 °C/分 である。

(2) 急速融解 (+30°C の溫湯に浸す) の場合：　加溫と同時に略々直線的に溫度は上昇し，−3〜−0.5°C 附近でやや遲くなり −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溫度上昇率。以下同樣) は 6.6°C/分 である。

(3) 緩慢凍結 (−30°C の低溫室內で空氣冷却) 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，この狀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，溫度は −0.5〜−1.0°C 迄上昇した後に暫時その附近に停滯する。氷生成が進むにつれて溫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 附近に於て僅かに溫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 (室溫に放置) の場合：　溫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狀態の肉眼的觀察

(1) 急速凍結：　ブラインの冷却で血清溫度が −1°C 前後に達すると，初め血清の上面及び試驗管に接する側面，下面に僅かの氷の結晶が出來たと思うと，それ等は急速に內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：　加溫すると同時に先ず管壁に接する面が一樣に融け始め，圓柱狀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，僅かの刺戟でも過冷却は破れ，血清表面の管壁に接する部分に最初の氷結晶が出來，同時に溫度も −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狀に延びて行き，次で同樣の氷結晶が下面に，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內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。その側面は周圍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。

かかる凍結の狀況は色素液を凍結させるとよく觀察される。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圍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從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，周圍に行くに從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狀態になる。この氷が周圍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樣子がよく判る。

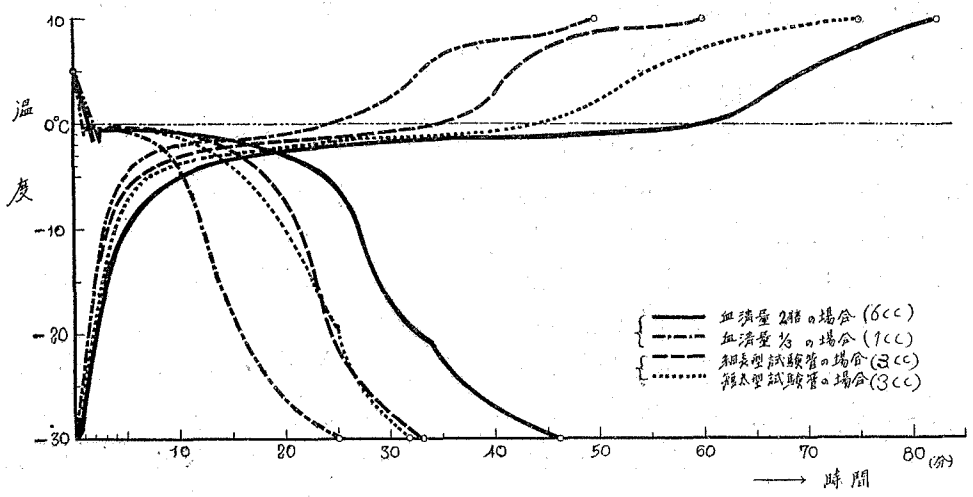
III.　種々な條件で凍結，融解させた時の血液成分の濃縮狀態

(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從つて濃縮され，その程度は凍結融解共に緩慢な場合が最も强く，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 の試驗管の他に 8.5 mm と 16.0 mm の細及び太試驗管を用い，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變えた場合の血清濃縮狀態

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　( ) 內は對照血清の各成分量に對する百分率

第 2 表　容器の形状による血清濃縮状態

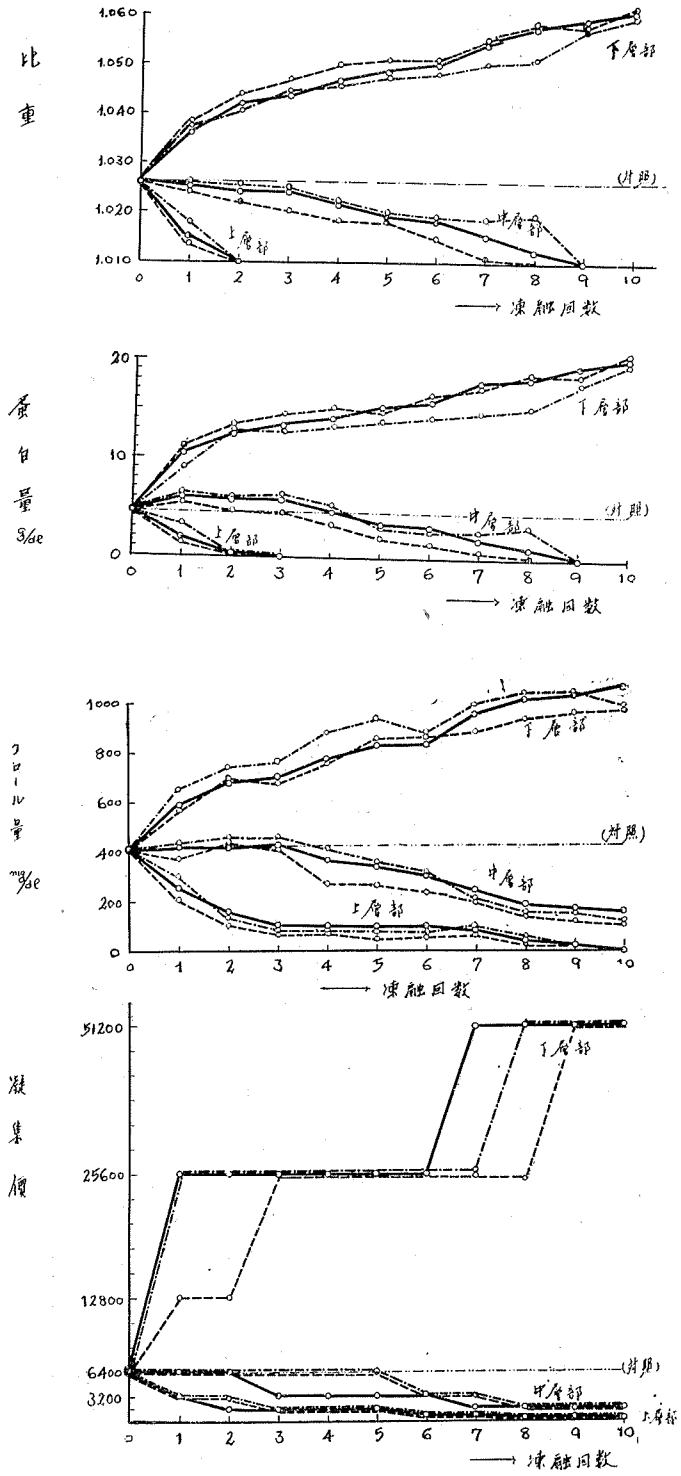
實驗例	檢査事項	對照血清	試驗管 細長試驗管 (內徑 8.5 mm) 血清の層 上	中	下	普通試驗管 (內徑 10 mm) 上	中	下	短太試驗管 (內徑 16.0mm) 上	中	下
實驗 1	比重	1.0255	1.0150	1.0245	1.0370	1.0150	1.0260	1.0360	1.0200	1.0230	1.0325
	蛋白量	6.2 g/dl	2.1 (34)	5.8 (93)	10.6 (167)	2.0 (34)	6.4 (106)	10.2 (163)	4.1 (66)	6.0 (97)	8.9 (143)
	鹽素量	414.2±7.3mg	242.0 (58)	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　( ) 內は對照血清の各成分量に對する百分率

第 3 表　血清量を變えた場合の濃縮狀態

實驗例	檢査事項	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　( ) 內は對照血清成分に對する百分率



第 3 圖 凍結融解を反覆した時の血清濃縮狀態

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條件を等しくしても，用いる容器の形狀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

同一形狀の試驗管で血清量を6cc，3cc，1cc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

同一條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從つて次第に濃縮度を增して來るが，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.　血清の濃縮機轉の檢討

以上の實驗でわかるように，血清を試驗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來るが，更に次の如き實驗を行つて檢討した。

(1)　到達溫度による差異（第4表）

同一速度で種々の溫度まで冷却した血清の濃縮狀態をみると，－1～－3℃に達しても過冷却狀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℃°に達したものでも既に多少の濃縮が認められる。以下－10℃，－30℃と到達溫度の低い程濃縮率が增大する。

(2)　凍結のみによる影響（第5表）

同樣の條件で－30℃まで冷却した血清を，低溫室内で凍結したまま上，中，下の3層に切

第4表　到達溫度と血清濃縮狀態（比重のみを示す）

溫度		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℃	1.0275	1.0275	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280	1.0280
	－3℃	1.0270	1.0280	1,0300	1.0280	1.0280	1.0280	1.0275	1.0290	1.0280
凍結	－3℃	1.0240	1.0250	1.0335	1.0255	1,0260	1.0330	1.0240	1.0260	1.0330
	－10℃	—	—	—	1.0170	1.0275	1.0440	1.0160	1.0275	1.0440
	－30℃	—	—	—	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狀態 (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驗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±5.5 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±6.2 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屑の濃縮

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劃分を比較してみた。

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 裝置による

第 7 表　正常馬血清蛋白分屑の濃縮狀態

電氣泳動圖に於ける面積 (mm^2) を示す

實驗例	處理條件		蛋白分屑				
			アルブミン	グロブリン			A/G
				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

電氣泳動圖を求めた（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 グロブリンの增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。

これは血清の凍結狀況を觀察してもわかるように，急速に凍結させたのでは水の分離が充分に行われない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うことと，各層分離に難易のあることなどに基づくものであろう。

凍結融解の回數を重ねれば濃縮度の增すことは當然想像されるところであるが，回數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。從つて實際に凍結融解法を應用する際には徒らに回數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數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い知ることが出來るが，更に凍結と融解との兩過程を別々に吟味してみて，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狀態が變化し，水の分離が一層はつきりするためであろう。

なお電氣泳動圖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いる。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。

Lottermoser[5]，Bobertrag[6] 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，凍結によつて脫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狀態に復歸することからも，殆んど肉眼的に判定できるほ

どの化學的な性狀變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 の變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，即ち周圍からの冷却で先ず容器の周邊部に生じた氷結晶が漸次成長して行くにあた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，到達溫度は低いほど，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，また凍結融解の回數を重ねるに從つて，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，及び特に電氣泳動法について御援助を賜わ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 Rossischen Kolloid-Trennungsverfahrens zur Konzentrierung der wirksamen Substanzen im Serum. Zentbl. f. Bakt., Orig, **48**. 203.
3) Coolidge, E. & Cooke. 1897 The effect of freezing upon the antidiphtherieserum. 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 des 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) 豐田健一 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驗. 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關する研究. 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 seum 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.