

# Formalin の抗体変性に就て

岡山大学医学部衛生学教室 (指導: 緒方益雄教授)

専攻生 大塚 信夫

〔昭和 32 年 3 月 12 日受稿〕

## 緒 言

蛋白抗原をその抗原性を失わしむることなく長期に亙り保存することについては既に多数の業績があり、教室に於ても特殊の化学薬品を用いずしかも抗原性を損することなく蛋白を保存する方法を報告<sup>1)</sup>しているが、それと共に、得たる抗血清をその抗体価を変えることなく保存することについても種々の報告が見られる。即ちグリセリン、石炭酸、ヤトレン等々の薬品を用いて抗血清の保存を試みているが、いずれの方法にも共通していることは、無菌を目標としそのために何か化学薬品の添加を行つていることである。従つてこの抗血清を用いて血清学的反応を行う時にその薬品の作用を考慮に入れると共に、薬品そのものが抗体を破壊しないものであることを要するのは論を俟たない。Formalin もまた抗原保存と同時に抗血清保存に用いられんとした薬品の一つであるが、その抗体に及ぼす影響は余りに強く、その濃度、作用時の温度、作用時間の長短等によつて多少の変化はあるにしても<sup>2)</sup>、抗体を殆んど破壊するため抗血清保存の目的には適しないとされている<sup>2)3)</sup>。

私は先に抗原に Formalin を作用せしめてその血清学的反応への影響と共に蛋白の物理化学的性質の変化をも検討し、その結果 Formalin の蛋白に対する作用については、濃度の差により甚しい違いのあることを見出したのであるが、抗体に対しても果して抗原の場合と同じく濃度による差が認められるかどうかを検するため一連の実験を行つた。即ち従来 Formalin に対して最も抵抗弱く 1% 6 時間の作用で消失するという沈降素<sup>3)</sup>を用

い Uhlenbuth 氏沈降反応 (以下 U 氏法と略す) 及び緒方氏抗体稀釈沈降反応<sup>4)</sup> 更に抗原感作赤血球凝集反応<sup>5)</sup> により血清学的反応に及ぼす影響を見ると共に、電気泳動法により Formalin を加えた抗体の変性の状況を検討してみた。

## 実験方法及び材料

免疫方法及び血清学的反応の手技は教室慣行の方法に従つた。抗原は正常人血清とし、これを家兎に注射して得た抗血清を用いて、以下の一連の実験を行つたものである。なお Formalin は日本薬局方 Formalin (37%) を使用、生理的食塩水を以て各濃度に稀釈した。

### 1) U 氏法及び緒方氏稀釈法

抗血清に各種濃度 Formalin を等量混合、作用を一定ならしむるため孵卵器中に 37°C 24 時間保存したものを用いて、U 氏法及び緒方氏稀釈法を実施した。なお Formalin の代りに生理的食塩水を等量混合したものを対照とした。

### 2) 抗原感作赤血球凝集反応

抗原感作赤血球凝集反応の手技は概ね進藤の記載<sup>5)</sup>に従つた。即ち感作原としては正常人血清 (A B 型) を非働化することなく生理的食塩水で 25~50 倍に稀釈したものを用い、赤血球は Alsever 変法液に採血した緬羊血球を使用した。感作方法は感作原 1 cc に対し洗滌緬羊血球 0.1 cc の割合で混和、37°C 温浴中で 2 時間感作後生理的食塩水で 3 回遠沈洗滌、M/100 磷酸緩衝化生理的食塩水 (pH 6.8~7.0) で 0.5% 浮游液とした。凝集反応は同じく M/100 磷酸緩衝化生理的食

塩水で倍数稀釈した抗人家兎血清に、上記0.5%感作血球を等量に加え、37°C 温浴中2時間更に氷室に一夜静置後、管底像によらず透過光線により凝集像を検査判定した。なお家兎血清の緬羊血球に対する正常凝集素(20~40倍以下)は特別に吸収除去せず、正常凝集素の影響が少いと思われる40倍以上の血清稀釈について試験した。

### 3) 濾紙電気泳動法並びに濾紙電気泳動分層定量法

Grassmanの水平法を改良した小林式電気泳動装置<sup>6)7)</sup>を使用、濾紙は東洋濾紙 No. 51を用い、緩衝液はペロナールソーダ、醋酸ソーダ、醋酸緩衝液、pH 8.5、イオン強度0.045のものを使用0.3 mA/cmの電流で泳動を行った。なお材料は生理的食塩水に一夜透析し Formalin を除いたものを使用した。

泳動後の濾紙を乾燥、Bromphenol-Blue染色液にて染色後、2%醋酸にて蛋白と結合し

ない色素を除去したものを流動パラフィンにより半透明とし、夏目製作所製光電光度計Ⅲ型により直接法<sup>6)7)</sup>で吸光度を測定し、その値をグラフ用紙に描いた後、各成分相当部の面積をプランメーターにて求め各分層の百分率を算出した。

## 実験成績

### 1) Formalin 混合抗人家兎血清によるU氏法及び緒方氏稀釈法に就て

正常人血清で免疫して得たU氏法沈降素価50000、稀釈法結合帯100、沈降素価500の抗人家兎血清を用い、これに各種濃度 Formalin を等量混合、孵卵器中に37°C 24時間保存したものについてU氏法及び稀釈法を行った。なお Formalin の代わりに生理的食塩水を等量混合したものを対照とした。

U氏法の結果は第一表に示す如く、Formalin 濃度の高い部分即ち10~0.1%に於て

第一表 U 氏 沈 降 反 応

F. 濃度 (%)	抗原稀釈							
	2500	5000	10000	25000	50000	100000	250000	
対 照	+++	+++	++	+	+	-	-	
10	-	-	-	-	-	-	-	
1	-	-	-	-	-	-	-	
0.1	-	-	-	-	-	-	-	
0.01	+++	+++	++	+	+	+	-	
0.001	+++	+++	++	+	+	+	-	
0.0001	+++	+++	++	+	+	+	-	

(F. = Formalin)

は反応は完全に抑制されている。更に稀釈法を試みるべく1% Formalin 混合部分に於て、抗原稀釈10~250を実施してみたが、これも全く反応が認められず抗体は完全に破壊されたものと考えられる。これに反し0.01%以下の低濃度の部分に於ては、対照と殆んど変わらないか、或はむしろ稍々反応増強を示している。これは第二表に示す稀釈法に於ける結果についても同様であつて、対照に比し反応減弱の傾向は認められない。即ち抗原に Formalin を作用せしめた場合と同じく、抗血清

第二表 緒方氏稀釈法

抗原稀釈	抗体稀釈	抗体稀釈			
		250	500	1000	2500
25	C	+++	++	+	-
	F	+++	++	+	-
50	C	+++	++	+	-
	F	+++	++	+	-
100	C	+++	++	+	-
	F	+++	++	+	±
250	C	+++	++	+	-
	F	+++	++	+	-

(C = 対照, F. = 0.001% Formalin 混合)

に対する Formalin の作用についてもその濃度如何が大きなる影響を有するものと考えられる。

2) Formalin 混合抗人家兔血清の感作血球凝集反応に就て

感作原には正常人血清を用い、先ず綿羊血

球に対する感作条件について一連の予備実験を行つた。その結果は第三表に示す如くである。即ち人血清を56°C温浴中に30分間非働化した場合には、之を各濃度に稀釈して血球に加えてもいずれも溶血乃至凝集を起すことはないが、この血球を以て検した凝集価はす

第三表 感作血球凝集反応の感作条件の検討

人血清 稀釈倍数	非働化 (56°C 30分)	感作結果		凝 集 価							
		溶血	凝集	40	80	160	320	640	1280	2560	食塩水
10	非働化 生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		卍	+	-	-	-	-	-	-	-	-
25	非働化 生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		卍	-	+	+	+	+	+	+	+	-
50	非働化 生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
100	非働化 生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		±	-	+	+	+	+	+	+	-	-
250	非働化 生	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(生=非働化の処置を加えない人血清)

べて40以下であり、血球が感作されたとは考えられない。次に非働化しない抗原を用いて血球の感作を行うと、抗原の10倍稀釈では殆んど溶血し、残つた血球は凝集して凝集価の測定不能である。更に抗原稀釈25~50倍になると一部溶血を見るが残存血球は抗人血清による被凝集性を獲得し、その凝集価は1280までとなる。それ以上の抗原稀釈では、もはや感作血球の溶血は見られないが、それと共に凝集価も低下し250倍では殆んど凝集反応を示さない。この反応に用いた抗血清は稀釈法結合帯100、沈降素価500のものであつたが、以上の結果よりして感作抗原濃度と稀釈法結合帯との間に関連性は見られなかつた。なお非働化せる人血清に海狸補体を添加して血球感作を試みたが凝集反応は起らなかつた。

以上の結果より人血清による感作の成立は人血清中の非耐熱性補体成分の吸着によるものではないかと考えられるが、一応凝集反応を呈した25, 50, 100倍稀釈の非働化しない

人血清を用いて血球を感作した後、各種濃度 Formalin を等量混合 37°C 24時間作用せしめた抗人家兔血清との凝集反応を検した。その結果は第四表 a) b) c) の如くで、感作抗原の濃度の低下に伴い凝集反応は弱く結果判定は困難となるが、何れにも共通して Formalin 0.1%迄の高濃度の部分では凝集反応は全く見られず、逆に0.01%以下の低濃度の部分に於ては対照と殆んど同じ凝集価を示し、沈降反応の結果と同じである。

3) 濾紙電気泳動法による Formalin 混合抗人家兔血清の検討

沈降反応及び凝集反応の結果より Formalin 作用の代表的な濃度即ち1%, 0.001%の Formalin を等量混合、孵卵器中に 37°C 24時間保存した抗人家兔血清を用い、Formalin を除くため生理的食塩水に一夜透析して濾紙電気泳動を行つた。なお Formalin の代りに生理的食塩水を等量混合したものを対照とした。

第四表 感作血球凝集反応による Formalin 混合血清の検討

## a) 生人血清25倍稀釈にて感作

F.濃度(%)	抗体稀釈							
	40	80	160	320	640	1280	2560	食塩水
1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.01	+	+	+	+	+	+	-	-
0.001	+	+	+	+	+	+	±	-
0.0001	+	+	+	+	+	+	-	-
無処理対照	+	+	+	+	+	±	-	-
食塩水対照	+	+	+	+	+	+	-	-

(F. = Formalin)

## b) 生人血清50倍稀釈にて感作

F.濃度(%)	抗体稀釈							
	40	80	160	320	640	1280	2560	食塩水
1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.01	+	+	+	+	+	+	-	-
0.001	+	+	+	+	+	+	-	-
0.0001	+	+	+	+	+	+	-	-
無処理対照	+	+	+	+	+	-	-	-
食塩水対照	+	+	+	+	+	+	-	-

(F. = Formalin)

## c) 生人血清100倍稀釈にて感作

F.濃度(%)	抗体稀釈							
	40	80	160	320	640	1280	2560	食塩水
1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
0.01	+	+	+	+	±	-	-	-
0.001	+	+	+	+	±	-	-	-
0.0001	+	+	+	+	±	-	-	-
無処理対照	+	+	+	+	-	-	-	-
食塩水対照	+	+	+	+	±	-	-	-

(F. = Formalin)

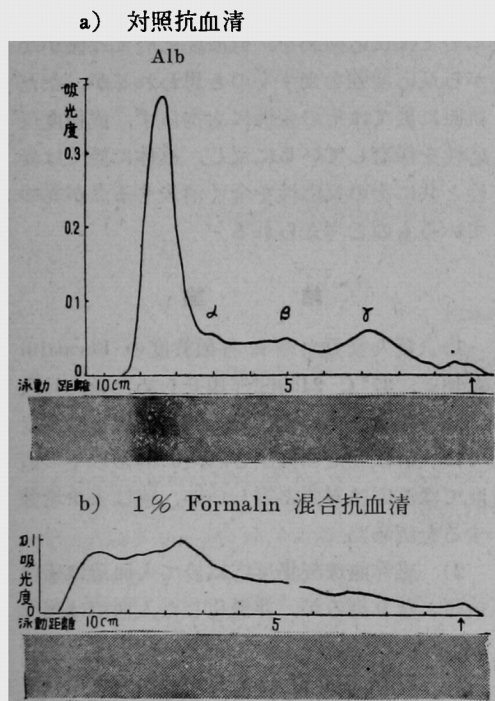
その結果は第一図 a) b) c) に、又その電気泳動組成は第五表に示される。この図に於て縦軸は吸光度を、横軸は泳動距離を示す。

この結果より見るに、対照に於ては Albumin は 58.3%,  $\alpha$ -Globulin は 9.3%,  $\beta$ -Globulin は 14.4%,  $\gamma$ -Globulin は 18.0% を示しているが、1% Formalin を作用せしめると Albumin 相当分層は 23.5% と減少し、 $\alpha$ -Globulin 相当分層は 46.1%,  $\beta$ -Globulin

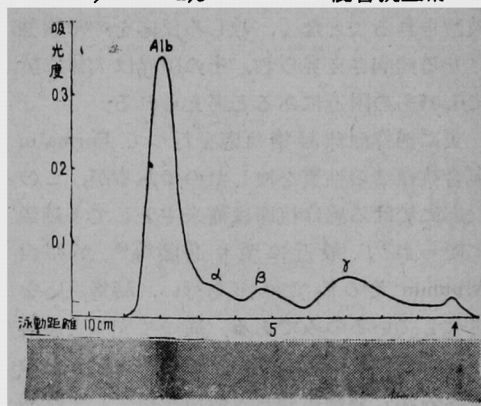
相当分層は 19.6% と増加、 $\gamma$ -Globulin 相当分層は 10.8% を示して明らかに変性部分の出現が認められ、先に緒方、望月<sup>8)</sup> が海狼血清を加熱した際、 $\alpha$ -Globulin 相当の易動度を有する C 成分を認めているのと略々相似た結果を示している。

然るに 0.001% Formalin を作用せしめた場合には、Albumin 相当分層は 59.0%,  $\alpha$ -Globulin 相当分層は 9.1%,  $\beta$ -Globulin 相当

第一図 Formalin 混合抗人家兔血清  
清濾紙電気泳動図



c) 0.001% Formalin 混合抗血清



分層は11.9%を示し、 $\gamma$ -Globulin 相当分層は20.0%とやや増加しているが、それぞれ対照に比し殆んど変化が認められない。以上沈降反応に於て1% Formalin の場合は完全に反応が抑制され、0.001% Formalin では対照と殆んど反応が変わらないか、或は多少増強している事実とよく符合する。

第五表 抗人家兔血清及び Formalin 混合抗人家兔血清の  
濾紙電気泳動法による成分組成

試料	電気泳動組成 (%)			
	Albumin	$\alpha$ -Globulin	$\beta$ -Globulin	$\gamma$ -Globulin
対照抗人家兔血清	58.3	9.3	14.4	18.0
1% Formalin 混合抗人家兔血清	○	△	+	×
0.001% Formalin 混合抗人家兔血清	59.0	9.1	11.9	20.0

○ 対照抗人家兔血清 Albumin より少し速い易動度を有する成分。 Albumin が変性成分かは不明。  
 △  $\alpha$ -Globulin と殆ど等しい易動度を有する変性成分。  
 +  $\beta$ -Globulin 相当分層。  
 ×  $\gamma$ -Globulin 相当分層。  
 +, ×分層は何れも明確に分離せず漸次移行する。

総括及び考按

Formalin による抗体変性に就ては従来既に報告されている所であるが、いずれも Formalin により抗体は破壊され、その作用は認められなくなるとしている。その中でも特に沈降素は最も Formalin に対する抵抗が

弱いとされているが<sup>3)</sup>、私は先に蛋白抗原に Formalin を加えて一連の実験を行つた結果よりして、敢えて各種濃度の Formalin を抗血清に作用せしめ、その結果を検してみた。

U氏法及び稀釈法に於て Formalin の作用はその濃度により明らかに区別せられ、高濃度の部分に於ては抗体は全く破壊されてその

作用を失うが、低濃度の部分に於ては抗体は破壊されることなく、むしろ反応をやや増強させる傾向さえ見られ、その限界は大体に於て0.01%の附近にあると考えられる。

更に感作血球凝集反応を行つて Formalin 混合抗血清の性質を検したのであるが、この反応に於ける感作抗原は従来主として多糖類に限られ<sup>9)</sup>、最近に至り進藤等<sup>10)</sup>が卵白 Albumin その他で感作を行い、凝集反応を実施しているのみである。従つて先ず人血清が血球感作抗原となり得るや否やを検したのであるが、非働化せる人血清を以てしては感作は不能であり、操作を加えないままの人血清で可及的高濃度の部分に於て感作し得ることを認めた。この結果人血清を抗原とした場合の血球感作の成立は、人血清中の非耐熱性成分の吸着によるものではないかと考えられる。次いで以上の成績を応用して、人血清で感作した血球を用い、各種濃度の Formalin を加えた抗血清の凝集反応を検したのであるがその結果は全く沈降反応に於けるものと同じであつた。

最後に Formalin 混合抗血清の変性を見るため電気泳動法を行つてみたが、1% Formalin を作用させた抗血清は対照に比して大きな差異を示し、 $\alpha$ 及び $\beta$ -Globulin 相当分屑に変性部分の出現が認められ、血清学的反応に於ける抑制作用とよく一致している。しかるに0.001%の濃度に於ては各分屑の構成は大体に於て対照と変わらず、変性は認められないが、ただ $\gamma$ -Globulin 相当分屑が対照の18.0%に比し20.0%と増加している点の特異であり、或は沈降反応の増強と関係があるか

## 文

- 1) 大岩：岡医誌，2287頁，46年，9号，昭和9年。
- 2) Braun：Zeitschr. für Immunitätsf. u. exp. Therapie., 46; 78, 1933.
- 3) K. Iwanoff：Zeitschr. für Hygiene., 197; 118, 1936.
- 4) 緒方：第一回衛生微生物寄生虫病学連合医学会講演，昭和2年。
- 5) 進藤由二：血清学の新しい見方と考え方，医学

もしれない。

以上 Formalin の抗体に対する作用は、大体に於て抗原に対するそれと同じく、高濃度に於ては反応抑制を、低濃度に於ては僅かながら反応増強を来すものと思われるが、ただ抗原に於てはその変性にも拘らず、或程度反応性を保有しているに反し、抗体に於ては変性と共にその反応性を全く消失する点が異つているものと考えられる。

## 結 論

1) 抗人家兔血清に各種濃度の Formalin を加え、37°C 24時間作用せしめた後、U氏法及び稀釈法で検すると、0.1%以上の濃度では反応は完全に抑制され、0.01%以下の濃度では反応は対照と等しいか、或は多少増強するを認めた。

2) 感作血球凝集反応に於て人血清は感作抗原となり得るが、非働化した人血清は感作能力を失う。

3) Formalin 混合抗人家兔血清を用いて感作血球凝集反応を行う時は、沈降反応の抑制部分では凝集反応も認められないが、沈降反応残存部分に於ては凝集反応も認められ、両者併行した結果を示した。

4) 濾紙電気泳動法にて Formalin 混合抗人家兔血清を検すると、1%の部分では完全に変性が認められるが、0.001%の部分では対照と殆んど変わらず、血清学的反応の結果と一致している。

終りに臨み終始御懇篤なる御指導及び御校閲を賜つた恩師緒方教授に深甚なる謝意を表す。

## 献

- 書院，1956年。
- 6) 森五彦，小林茂三郎：濾紙電気泳動法の実際，南江堂，昭和30年。
- 7) 小林茂三郎：生物物理化学，2巻，1号，1954。
- 8) Masana Ogata and Yoshio Mochizuki: The Acta Medicinæ Okayama, Vol. 10, No. 2, 82, 1956.
- 9) Middlebrock, G., Dubos, R. J.: J. Exp. Med.,

521; 88, 1948.

22, 1952.

10) 進藤宙二, 若倉和美: Jap. J. Exp. Med., 285;

---

## Effects of Formalin on the Activity of Antibodies

By

Nobuo Otsuka

Department of Hygiene, Okayama University Medical School  
(Director: Prof. Dr. M. Ogata)

Effects of formalin on the activity of antibodies were studied by means of precipitin reactions, hemagglutination with sensitized blood cells, and paper electrophoresis.

No precipitin reaction occurred in the area of high concentrations of formalin, while no marked changes in reaction were observed in the area of low concentrations compared to control tests.

Almost same results were noticed in hemagglutination tests with sensitized blood cells as in the case of precipitin tests.

On paper electrophoresis significant changes were noticed where one per-cent formalin was used as experimental reagent, while the same results were observed in 0.001 per-cent formalin as in control tests.

---