

Fibrinogen 及び Fibrin の血清学的研究 II

昭和35年1月14日 受付

信州大学医学部生化学教室 (指導: 藤村紫郎教授)

相野田 啓

Serological Studies on the Fibrinogen and Fibrin
The 2ed Report

Hajime Ainoda

Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Shinshu University
(Director: Prof. S. Fujimura)

緒 言

Fibrinogen に関する血清学的研究は Bordet 及び Gengou 以来多くの研究者により行われている。両氏は馬 Fibrinogen を用いて研究を行い、Fibrinogen は臓器特異性を有することを唱え (1902), Bauer 及び Engel 両氏は牛及び豚 Fibrinogen を Heuber の方法で精製したものにつき実験を行つて、Fibrinogen は種属特異性を有すると論じている (1912)。又 Hekton 及びその共同研究者達は Molean 氏法に従い 20% 硫酸 Ammonium による沈澱を反覆して Fibrinogen を精製しその血清学的研究を行い、Fibrinogen には臓器特異性並びに軽度の種属特異性を認めたと報告している (1920)。本教室に於て桜井氏 (1958) は牛、馬及び豚 Fibrinogen を Laki 氏法により精製したものについて実験を行い、何れも著明な臓器特異性を有することを認めた。

著者は本研究に於て各種動物の Fibrinogen の精製せるものについてその臓器特異性の有無を確かめんとし、更に Fibrinogen と Fibrin との血清学的特異性の異同を知ろうとして実験を行つた。

Fibrinogen と Fibrin との化学的構造上の差異については種々の研究がなされているが、未だ完全に究明されたとは言えない。Mihalyi (1950) は尿素溶液中に於て Fibrin と Fibrinogen との電気泳動を行い、両移動度に相異のあることを認め、等電点が Fibrinogen は pH 5.5, Fibrin は pH 5.6 なる事を知り、両者の電気移動度の差異は少なくとも一部分はそれ等の等電点の差に依るものと報告している。

Fibrin は水に不溶解なる為その血清学的性質を検することは困難であるが、著者は Fibrin が尿素溶液に溶解することを知り、この血清学的性質並びに Fibrinogen との血清学的関係を検索した。

実験の部

(A) Fibrinogen の調整

Laki 氏法により牛、馬及び豚血漿より調製したが、Fibrinogen は動物の種属により僅少宛その化学的性質を異にするので動物に従つて調製法にも多少の変更を加えた。

(1) 牛及び豚 Fibrinogen の調製

牛或は豚のクエン酸血漿を豫め 3°C に冷却し、この 500cc 対して -3°C に冷却した 53.3% の Ethyl alcohol を少量宛攪拌しつつ滴加して行く。20分乃至30分間放置の後、遠心沈澱により沈澱を分離する。之を Fraction I とする。Frac. I を 100cc の $\frac{1}{10}$ mol 磷酸緩衝液 (pH 6.4) 中に溶解し、更に蒸留水を加えて 200cc に稀釈し氷室中に一夜放置する。この間に少量の沈澱が発生するが、之は濾過により除く。透明濾液にその $\frac{1}{3}$ 量の飽和硫酸 Ammonium 溶液を攪拌しつつ加え、発生する白色沈澱を遠心沈澱により分離する。これを 0.3mol KCl 溶液 120cc 中に溶解し、水酸化 Ammonium を滴下してその反応を pH 7.4 とする。この溶液に再び $\frac{1}{3}$ 量の飽和硫酸 Ammonium 溶液を加え、生ずる沈澱を集めて同様に 120cc の 0.3mol KCl に溶解し pH 7.4 とし、0.3mol KCl 溶解 2000cc 中にて Collodium 膜を用いて氷室中にて 3 日間透析を行う。この間時々 KCl 溶液を更新する。最後に Collodium 膜内に透明な Fibrinogen の溶液を得る。

(2) 馬 Fibrinogen

溶解度を異にする為、調製法に変化を加えた。馬クエン酸血漿より上記と同様にして得た Frac. I は牛、豚の場合に比し濃い黄色を帯びている。之を 200cc の $\frac{1}{10}$ mol 磷酸緩衝液 (pH 6.8) に溶解し、氷室内に一夜放置する。沈澱を除いた透明上清液に $\frac{1}{4}$ 量の飽和硫酸 Ammonium 溶液を加え、生ずる沈澱を 120cc の 0.3mol KCl 溶液に pH 7.4 に於て溶解する。硫酸 Ammonium により沈澱を更に一回反覆し、0.3mol KCl 中に於て溶解したものを牛、豚 Fibrinogen の場合と同様に透析する。これによつて透明な馬 Fibrinogen 溶液が得られる。

(B) Fibrinogen の純度測定

Thrombin を用いて Laki 氏法により Fibrinogen の凝固性を測定し、非凝固物質の量より Fibrinogen の純度を表わした。Fibrinogen を 0.3mol KCl 溶液に溶解したもの 1.0cc に対して 4.0cc の 0.1mol KCl 溶液を添加し振盪する。これに 0.1cc の磷酸緩衝液 (0.5mol KH_2PO_4 溶液 3 に対し 0.5mol Na_2HPO_4 1 を混合する) を加え、0.1cc の Thrombin (25 単位を含む) を加える。1 時間室温に放置する。こゝに生じた Fibrin を除去し、上清液について Beckman 光電比色計を用い、280m μ に対してその吸光度 (Es) を測定する。又同時に 1.0cc の Fibrinogen の 0.3mol KCl 溶液に 19.0cc の 0.1mol KCl を加えたものにつき同様に吸光度 (Ef) を測定する。対称実験として 0.5cc の 0.1mol KCl と 0.1cc の磷酸緩衝液との混合液につき同様にして吸光度 (Ec) を測定する。

次の式によつて Fibrinogen 溶液中の Thrombin による凝固性物質の量を表わす。

$$A\% = \frac{(Es - Ec) D_1}{Ef D_2} \times 100$$

(100 - A) = 凝固物質の% (Fibrinogen の純度)
D₁ 及び D₂ は Fibrinogen 溶液の稀積度で、こゝでは夫々 5.2 及び 20.0 である。

(C) Fibrinogen 溶液の濃度の測定

Fibrinogen 溶液に Thrombin を加えて不溶解性の Fibrin とし、これを水で十分に洗滌し、濾紙にはさんで十分に水分を除き、40°C 低圧下で重量不変にまで完全乾燥し、粉末とする。この一定量を取り Micro-Kjeldahl 法によりその含窒素量を測定し、これに 5.9 を乗じたものを Fibrinogen 量とする。これから溶液中の Fibrinogen の濃度を計算することが出来る。

本実験に使用した牛、豚及び馬の Fibrinogen の純度は次の表に示す。

	20倍稀積 Fibrinogen 液の Extinction Ef	5.2倍稀積 非凝固性物質 の Extinction Es	5.2倍稀積 Thrombin 液 の Extinction Ec	純度
牛	0.460	0.080	0.018	96.5%
豚	0.263	0.121	0.040	92.0%
馬	0.211	0.090	0.028	92.9%

(D) 抗 Fibrinogen 血清の調製

免疫には常に成熟家兎を使用した。上記の 0.3mol KCl の Fibrinogen 溶液に Alumina cream を 1% の

濃度に加え Fibrinogen を吸着せしめ、これを遠心沈澱により集め、生理的食塩水に 1% の割合に懸濁し、この 3cc を 4 週間隔日に家兎の背部筋肉内に注射する。最後の注射より 7 日目に心臓穿刺により試験採血を行い、血清反応の結果陽性のものを全採血して保存実験に供した。

血清反応は沈降反応に依つた。抗血清は Arabiagum の 2% 溶液を以て 2 倍に稀積したものを用いる。

一列の試験管に 0.5cc の上記抗血清を容れ、これに生理的食塩水で、2⁰, 2¹, 2², 2³, 2⁴, 2⁵………等と稀積した Fibrinogen 溶液を少量宛上量し、37°C に 2 時間保温し、一定の時間毎に沈澱生成の有無を検した。

以下の表に於ては著明な沈澱の生成が 15 分後に認められたものを (卅), 30 分後に認めるものを (卅), 60 分後に認めたものを (+), 120 分後に認めるものを (±) と表わし、2 時間後に於ても全く沈澱の発しないものを (-) で表わした。その結果は次表に示す。(第 1 表)。

即ち、牛、豚及び馬 Fibrinogen は抗原性を有すると同時に著明な臓器特異性があることが確かめられる。

次に Fibrinogen の臓器特異性がその夾雑物によるのではないかを知るために次の実験を行つた。

(a) 各動物の Fibrinogen 溶液に同量の食塩飽和溶液を加え、10 分間室温に放置した後遠心沈澱によつて上清と沈澱とに分離し、沈澱は半飽和食塩水にて 3 回洗滌した後、上清と等量の生理的食塩水に溶解し、抗 Fibrinogen 血清に対し上清液及び沈澱水溶液を抗原として沈降反応を行つた。

結果は第 2, 3 表の通りである。

(b) 各動物の Fibrinogen 溶液にその 1/3 量の飽和硫酸 Ammonium 溶液を加えて室温に 1 時間放置、上清液と沈澱とに遠心濾別し、各々を Collodium 膜にて別々に透析し、内容に NH₄ 及び SO₄ の存在を認めなくなつた後、蒸留水を以て各々元の Fibrinogen 溶液と等量とし、食塩を 0.9% の割合に溶解する。抗 Fibrinogen 血清に対しこの上清液及び沈澱物溶液を夫々抗原として沈降反応を行う。結果は第 4, 5 表に示す。

表 3, 4, 5, 6 に示す如く抗 Fibrinogen 血清は Fibrinogen をその溶液より食塩の 1/2 飽和或は硫酸 Ammonium の 1/4 飽和で沈澱せしめたものとは同種抗血清のみならず、亦異種動物 Fibrinogen に対する抗血清とも血清反応を示し、臓器特異性を示すが、又同時に上記条件では沈澱しない物質に対しても僅かな

第3表 沈降反応
血清: 抗 Fibrinogen 血清
抗原: Fibrinogen 液の半飽和食塩の上清

家兎 番号	抗原	試験管 内抗原	抗原稀釈度							
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷ 2 ⁸
12	牛	牛	卅	卅	卅	-	-	-	-	-
15	牛	牛	卅	卅	-	-	-	-	-	-
6	豚	牛	卅	卅	-	-	-	-	-	-
7	豚	牛	卅	卅	+	-	-	-	-	-
3	馬	牛	卅	-	-	-	-	-	-	-
13	馬	牛	卅	卅	-	-	-	-	-	-
12	牛	豚	卅	卅	卅	-	-	-	-	-
15	牛	豚	卅	卅	卅	+	-	-	-	-
6	豚	豚	卅	卅	卅	+	-	-	-	-
7	豚	豚	卅	卅	+	-	-	-	-	-
3	馬	豚	卅	卅	-	-	-	-	-	-
13	馬	豚	卅	卅	卅	-	-	-	-	-
12	牛	馬	卅	+	-	-	-	-	-	-
15	牛	馬	卅	卅	+	-	-	-	-	-
6	豚	馬	卅	+	-	-	-	-	-	-
7	豚	馬	卅	卅	-	-	-	-	-	-
3	馬	馬	卅	卅	+	-	-	-	-	-
13	馬	馬	卅	卅	+	-	-	-	-	-

第4表 沈降反応
血清: 抗 Fibrinogen 血清
抗原: Fibrinogen 溶液の (NH₄)₂ SO₄
1/4 飽和による沈澱物

家兎 番号	注射用抗原 Fibrinogen	試験管 内抗原	抗原稀釈度							
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷ 2 ⁸
12	牛	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
15	牛	牛	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
6	豚	牛	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
7	豚	牛	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
3	馬	牛	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
13	馬	牛	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-
12	牛	豚	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-
15	牛	豚	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-
6	豚	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-
7	豚	豚	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
3	馬	豚	卅	卅	±	-	-	-	-	-
13	馬	豚	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
12	牛	馬	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
15	牛	馬	卅	卅	卅	±	-	-	-	-
6	豚	馬	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-
7	豚	馬	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
3	馬	馬	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
13	馬	馬	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-

第5表
血清: 抗 Fibrinogen 血清
抗原: Fibrinogen 溶液の (NH₄)₂ SO₄
1/4 飽和による上清液

家兎 番号	注射用 抗原	試験管 内抗原	抗原稀釈度					
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴ 2 ⁵	
12	牛	牛	卅	卅	+	-	-	-
15	牛	牛	卅	卅	-	-	-	-
6	豚	牛	卅	卅	-	-	-	-
7	豚	牛	卅	卅	-	-	-	-
3	馬	牛	卅	卅	+	-	-	-
13	馬	豚	卅	卅	+	-	-	-
12	牛	豚	卅	卅	-	-	-	-
15	牛	豚	+	+	-	-	-	-
6	豚	豚	卅	±	-	-	-	-
7	豚	豚	卅	卅	-	-	-	-
3	馬	豚	卅	卅	-	-	-	-
13	馬	豚	卅	卅	-	-	-	-
12	牛	馬	卅	卅	-	-	-	-
15	牛	馬	卅	卅	-	-	-	-
6	豚	馬	卅	卅	-	-	-	-
7	豚	馬	卅	卅	-	-	-	-
3	馬	馬	卅	卅	-	-	-	-
13	馬	馬	卅	卅	-	-	-	-

から血清反応を示す。

故に抗 Fibrinogen 血清と Fibrinogen 溶液との血清反応に於ける Fibrinogen 中に含まれる爽雑物の影響を除くため抗血清について此等の爽雑物を用いて吸収試験を行った。

吸収試験実施

抗 Fibrinogen 血清に Fibrinogen 溶液の 1/2 NaCl 飽和或は 1/4 (NH₄)₂ SO₄ 飽和にて沈澱しない部分を 1:2, 1:3, 1:5 の割合に加えて1時間, 37°C に放置した後、遠心沈澱によつて沈澱を除去し、上清について Fibrinogen の 1/2 NaCl 飽和又は 1/4 (NH₄)₂ SO₄ 飽和にて沈澱したものを抗原として沈降反応を試みた。その結果は表 6, 7 表に示す。

以上の表に示す如く抗 Fibrinogen 血清を Fibrinogen 溶液中の 1/2 NaCl 又は 1/4 (NH₄)₂ SO₄ 飽和で沈澱しない部分 (Fibrinogen 中の爽雑物) で吸収試験を行つても尚且つ Fibrinogen と血清反応を呈することから Fibrinogen の抗原性、特に臓器特異性は不純物によるものではなく、Fibrinogen 自身にあることが察せられる。

この事実を確かめるため更に次の実験を行った。

抗 Fibrinogen 血清を Fibrinogen に Thrombin

第6表 沈 降 反 応

抗血清: 抗 Fibrinogen 血清
 吸収物質: Fibrinogen 溶液の 1/2 NaCl 飽和上清
 抗原: 同上沈澱

家兎血清	注射用抗原 Fibrinogen	吸 収 物 質	対 比	試験管内抗原	抗 元 稀 釈 度																
					20	21	22	23	24	25	26	27	28								
12	牛	牛 Fibrinogen 1/2 NaCl 上清	1:2	牛 Fibrinogen 1/2 NaCl 沈澱	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
15	牛	〃	1:2	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
12	牛	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
15	牛	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6	豚	豚 同 上	1:2	豚 同 上	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7	豚	〃	1:2	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6	豚	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7	豚	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
3	馬	馬 同 上	1:2	馬 同 上	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
13	馬	〃	1:2	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
3	馬	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
13	馬	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

第7表 沈 降 反 応

抗血清: 抗 Fibrinogen 血清
 吸収物質: Fibrinogen 1/4 (NH₄)₂ SO₄ 飽和上清
 抗原: 同上沈澱

家兎番号	注射用抗原 Fibrinogen	吸 収 物 質	対 比	試験管内抗原	抗 元 稀 釈 度																
					20	21	22	23	24	25	26	27	28								
12	牛	牛 Fibrinogen 1/4 (NH ₄) ₂ SO ₄ 上清	1:2	牛 Fibrinogen 1/4 (NH ₄) ₂ SO ₄ 沈澱	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
15	牛	〃	1:2	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
12	牛	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
15	牛	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6	豚	豚 同 上	1:2	豚 同 上	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7	豚	〃	1:2	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
6	豚	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
7	豚	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
3	馬	馬 同 上	1:2	馬 同 上	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
13	馬	〃	1:2	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
3	馬	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅
13	馬	〃	1:5	〃	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅

を作用せしめた時の凝固しない上清部分 (Fibrinogen 夾雑物) を以て吸収試験を行い、次の如き結果が得られる。(第8表)

即ち抗 Fibrinogen 血清を Fibrinogen 溶液から Thrombin の作用で凝固する部分 (Fibrinogen) を除去した夾雑物で吸収してもなお各種属 Fibrinogen と共通に反応する抗体を残している。

Fibrinogen の血清学的相異

周知の如く Fibrinogen は Thrombin によつて凝固して水不溶性の Fibrin となり血液凝固の原因となる。Fibrinogen と Fibrin との化学的相異は多くの研究者により種々の方面より実験せられ、論ぜられている。本実験に於ては Fibrinogen と Fibrin との血清学的な相異を血清反応並びに化学的分析によつて究明

第 8 表 沈 降 反 応

抗血清: 抗 Fibrinogen 血清
 吸取物質: Fibrinogen の Thrombin による不凝固性部分
 抗 元: Fibrinogen

家兎 番号	注射用 抗 元	吸 取 物 質	対 比	試 験 管 内 抗 元	抗 元 稀 釈 度										
					2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹	
12	牛	牛 Fibrinogen Thrombin 非固部分	1:5	牛 Fib.	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	
15	牛		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	
6	豚		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-	
7	豚		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-	
3	馬		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-	
13	馬		卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-	
12	牛		豚 同 上	〃	豚 同 上	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
15	牛			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
6	豚			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
7	豚			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-
3	馬			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-
13	馬			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
12	牛			馬 同 上	〃	馬 同 上	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-
15	牛	卅			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-
6	豚	卅			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
7	豚	卅			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
3	馬	卅			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-
13	馬	卅			卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-	-

しようと試みた。

各種動物の Fibrinogen 溶液に Thrombin を加えて凝固せしめ、これを生理的食塩水並びに蒸留水で数回宛洗滌したものを Fibrin として使用した。

Thrombin は牛血漿より特田製薬会社に於て精製したものを実験に供した。

精製した牛、馬及び豚 Fibrinogen に Thrombin を作用して凝固せしめ、これを遠心沈澱によつて不凝固性物質並びに Thrombin 溶液を除去し、なお生理的食塩水を以て数回洗滌して洗滌液に Biuret 反応を認めなくなるまでに至らしめる。

かくして得た Fibrin を 20% 尿素溶液に加えて 1 時間振盪し、その濾液について次の検査を行った。

- Biuret 反応 陽性
- Sulfosalicyl 酸反応 沈澱
- Trichlor 醋酸反応 沈澱
- Millon 反応 沈澱
- Hopkins-Cole 反応 陽性
- 硫化鉛反応 陽性
- Xanthoprotein 反応 陽性
- N-端在 Amino 酸 tyrosin

即ち Fibrin が或程度 20% 尿素溶液に溶解している

第 9 表 沈 降 反 応

血清: 抗 Fibrinogen 血清
 抗元: Fibrin の 20% 尿素溶液

家兎 番号	注射用抗元	抗 元	抗 元 稀 釈			
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³
12	牛 Fibrinogen	牛 Fibrin	-	-	-	-
15	牛 〃	〃	-	-	-	-
6	豚 〃	〃	-	-	-	-
7	豚 〃	〃	-	-	-	-
3	馬 〃	〃	-	-	-	-
13	馬 〃	〃	-	-	-	-
12	牛 〃	豚 Fibrin	-	-	-	-
15	牛 〃	〃	-	-	-	-
6	豚 〃	〃	-	-	-	-
7	豚 〃	〃	-	-	-	-
3	馬 〃	〃	-	-	-	-
12	馬 〃	〃	-	-	-	-
15	牛 〃	馬 Fibrin	-	-	-	-
15	牛 〃	〃	-	-	-	-
6	豚 〃	〃	-	-	-	-
7	豚 〃	〃	-	-	-	-
3	馬 〃	〃	-	-	-	-
13	馬 〃	〃	-	-	-	-

第11表 沈 降 反 応
抗元: Fibrin の 20%尿素溶液
血清: 抗 Fibrin 血清

家兎番号	注射用抗元	試験管内抗元	抗元稀釈度											
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸			
21	牛 Fibrin	牛 Fibrin	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-
22	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	豚 Fibrin	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	"	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	"	"	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	馬 Fibrin	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	"	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	"	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	牛 Fibrin	豚 Fibrin	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	"	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	"	"	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	豚 Fibrin	"	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	"	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	"	"	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-
31	馬 Fibrin	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	馬 Fibrin	馬 Fibrin	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	"	"	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-
23	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	豚 Fibrin	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	馬 Fibrin	"	卅	卅	卅	+	-	-	-	-	-	-	-	-
32	"	"	卅	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	"	"	卅	卅	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第12表 沈 降 反 応
抗元: Fibrinogen
血清: 抗 Fibrin 血清

家兎番号	注射用抗元	試験管内抗元	抗元稀釈度											
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸			
21	牛 Fibrin	牛 Fibrinogen	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	"	"	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	"	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	豚 Fibrin	豚 Fibrinogen	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	"	"	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	"	"	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	馬 Fibrin	馬 Fibrinogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32	"	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33	"	"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第13表 沈 降 反 応
血清: 抗 Fibrinogen 血清
抗元: Fibrin (in 20% urea)

家兎番号	注射用抗元	抗元	抗元稀釈度											
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵						
12	牛 Fibrinogen	牛 Fibrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	牛 "	牛 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	豚 "	豚 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	豚 "	豚 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	馬 "	馬 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	馬 "	馬 "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

集め、生理的食塩水に溶解し、0°Cに冷却しつゝ稀 HCl を加えて pH 5.5 に調節する。生ずる白色沈澱を遠心沈澱によつて集め、NaOH で pH 7.2 に調節した。少量の生理的食塩水に溶解し不溶物を濾別する。かくして Plasmin の溶液を得る。

Fibrin 懸濁液に同量の Plasmin 溶液を加え、37°C で1時間放置し全体が均等な溶液となつた後、60°C、20分間加温して Plasmin の活性を消失せしめたものを抗元として抗 Fibrinogen 血清と沈澱反応を行うその結果は第14表の通りである。

即ち Fibrin に Plasmin を作用せしめて可溶性にしたものは抗 Fibrinogen 血清とは血清反応を起さない。

又抗 Fibrinogen 血清に対する Fibrin + Plasmin による吸収試験を行うと次の様な結果が得られた。(第15第)

即ち Fibrin に Plasmin を作用せしめて可溶性にしたものは抗 Fibrinogen 血清と血清反応を示さないのみならず、又抗 Fibrinogen 血清と Fibrinogen との反応を阻止する作用も有しない。

即ち尿素溶液は抗 Fibrinogen 血清と Fibrinogen との反応を阻止することなく、従つて抗 Fibrinogen 血清と Fibrin との反応の起らないのは Fibrin の溶液たる尿素の影響によるものではないことを知る。

Fibrinogen 及び Fibrin の N 端在 Amino 酸の比較

牛、馬及び豚 Fibrinogen 及び Fibrin について Sanger の方法により N-末端 Amino 酸の測定比較した。

Fibrinogen の水溶液又は Fibrin の20%尿素溶液に溶解したもの5mlに0.5gのNaHCO₃を加え、10mlの5% Fluorodinitrobenzene (FDNB) ether 溶液を加え、2時間暗室に放置した後、生ずる沈澱を遠心沈澱にて集め、水、Alcohol 及び Ether にて次ぎ次

第14表

沈 降 反 応
 抗血清: 抗 Fibrinogen 血清
 抗 元: Plasmin を作用した Fibrin

家 兎 番 号	注 射 用 抗 元	試 験 管 内 抗 元	抗 元 稀 釈 度											
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸			
12	牛 Fibrinogen	牛 Fibrin + Plasmin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	牛 "	" + "	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	豚 "	" + "	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	豚 "	" + "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	馬 "	" + "	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	馬 "	" + "	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	牛 "	" + "	±	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	牛 "	豚 Fibrin + "	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	豚 "	" + "	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	豚 "	" + "	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	馬 "	" + "	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	馬 "	" + "	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	牛 "	馬 Fibrin + "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	豚 "	" + "	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	豚 "	" + "	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	豚 "	" + "	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	馬 "	" + "	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	馬 "	" + "	+	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

第15表

吸 取 試 験

抗血清: 抗 Fibrinogen 血清 吸収物質: Fibrin + Plasmin
 抗 元: Fibrinogen の NaCl 1/2 飽和沈澱

家 兎 番 号	注 射 用 抗 元	吸 取 物 質	対 比	試 験 管 内 抗 元	抗 元 稀 釈 度									
					2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹
12	牛	牛 Fibrin + Plasmin	1 : 5	牛 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-	-
15	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-	-
6	豚	"	"	豚 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
7	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	+	-
3	馬	"	"	馬 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-
13	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	±	-
12	牛	豚 Fibrin + Plasmin	1 : 5	牛 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-
15	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	±	-	-
6	豚	"	"	豚 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
7	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
3	馬	"	"	馬 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
13	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-	-
12	牛	馬 Fibrin + Plasmin	"	牛 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
15	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	-
6	豚	"	"	豚 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
7	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-	-
3	馬	"	"	馬 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-	-
13	"	"	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	±	±	-

第16表 沈降反応 (対称実験)
血清: 抗 Fibrinogen 血清
抗原: Fibrinogen (in 20% urea)

家兎 番号	抗 元	抗 元	抗 元 稀 釈 度													
			2 ⁰	2 ¹	2 ²	2 ³	2 ⁴	2 ⁵	2 ⁶	2 ⁷	2 ⁸	2 ⁹				
12	牛 Fibrinogen	牛 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
15	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
6	豚 Fibrinogen	豚 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	-	-
7	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
3	馬 Fibrinogen	馬 Fibrinogen	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-
13	"	"	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	卅	+	-

ぎに洗滌し乾燥する。かくして得た Dinitrophenyl 蛋白質に 10ml の 6N HCl を加えて 40 時間加熱水解し、遊離 DNP-Amino 酸を Paper-chromatography に より定性する。

その結果次の端在 Amino 酸の存在を知った。

	Fibrinogen	Fibrin
Bovine	Tyrosine	Tyrosine 及び Glycine
Horse	Tyrosine	Tyrosine 及び Glycine
Hog	Tyrosine	Tyrosine 及び Glycine

即ち Fibrinogen 分子内では N-末端 Amino 酸は Tyrosine のみであるが、Fibrin に変化するとこれに遊離 Glycine amino 基が加わることを知る。

結 論

著者は Fibrinogen の血清学的性質を検すると共に Fibrinogen と Fibrin との血清学的差異を知るため本実験を行い次の結論を得た。

1) 牛、馬及び豚精製 Fibrinogen で家兎を免疫して強力な抗血清を得た。抗 Fibrinogen 血清は免疫に用いた動物の Fibrinogen と反応するのみならず、尚又他種属の動物の Fibrinogen とも著明に血清反応を呈する。

2) 抗 Fibrinogen 血清は Fibrinogen 溶液の食塩半飽和又は硫酸 Ammonium 1/4 飽和による上清液とは反応せず、又それ等による沈澱の部分とは著明に血清反応を呈する。

3) 抗 Fibrinogen 血清は Fibrinogen 溶液の Thrombin による非凝固部分とは全く反応しない。

4) 吸収試験に於ても抗 Fibrinogen 血清は Fibrinogen 溶液の NaCl 1/2 飽和、硫酸 Ammonium 1/4 飽和による沈澱のみによつて完全に吸収される。

以上の事実より Fibrinogen は臓器特異性を有し、之は Fibrinogen 中の夾雑物によるものでないことを知る。

5) Fibrin を 20% 尿素溶液に溶解し、これを以て家兎を免疫して抗血清を得た。抗 Fibrin 血清は免疫に用いた種属の Fibrin のみならず他種属の Fibrin ともよく反応する。即ち Fibrin にも臓器特異性が認められる。

6) 抗 Fibrin 血清は Fibrinogen とは血清反応を呈しない。又抗 Fibrinogen 血清は Fibrin と血清反応を呈しない。

7) Fibrinogen 及び Fibrin の N-末端 Amino 酸を Sanger 法により測定した。その結果 Fibrinogen は牛、馬及び豚のものはいずれも Tyrosine を有する。Fibrin には Glycine 及び Tyrosine を有する。

以上の事実より、Fibrin は臓器特異性を有するが、Fibrin と Fibrinogen とは血清学的特異性を特異にし、又化学構造上の相異も認められる。

この稿を終るに臨み、御指導御校閲を賜つた藤村紫郎教授、並びに御協力下さつた化学教室の櫻井武彦講師、及び諸先生に深甚な謝意を表します。

参 考 文 献

①Laki, K.: Arch. Biochem. Biophys., 32, 317, (1951) ②Gengou, O.: Ann. Inst. Pasteur, 16, 734, (1902) ③Bauer, J., and Engel, St.: Biochem. Z.: 12, 399, (1912) ④Hektoen, L., Welker, W. H.: J. A. M. A., 434, (1925) ⑤T. Hara: J. Biochem.: 43, 263, (1956) ⑥M. Oana: Med. J. Shinshu Univ. 4, (1959) ⑦Y. Yokozawa: Ibid., 1, (1956) ⑧Y. Yokozawa: Ibid., 2, (1957) ⑨F. Sanger: Biochem. J., 39, 507, (1945) ⑩F. Sanger: Ibid., 45, 563 (1949)