

ワッセルマン反応判定に対する分光化学的研究

特にワッセルマン試験全溶液を以てする

光電比色計による判定法の意義

千葉大学医学部皮膚泌尿器科学教室(主任 竹内勝教授)

野 原 宏

HIROSHI NOHARA

(昭和 32 年 11 月 8 日受付)

目 次

緒 言	ロ) 赤血球浮遊液の吸光度曲線
I) 資料並びに実験方法	IV) 特にその実験式について
II) 実験成績	V) 定量試験の意義
i) ワッセルマン反応判定溶液中に於ける 浮遊赤血球濃度	VI) ワッセルマン反応溶液の吸光度測定とそ の意義
ii) ワッセルマン反応判定液の吸光度	VII) 緒方定性反応に対する応用
III) 所謂ワッセルマン吸光曲線について	VIII) 考 案
特にその成因に就て	IX) 結 論
イ) 溶血液の吸光度曲線	文 献

緒 言

1906 年 Wassermann が創案した補体結合反応は所謂ワッセルマン反応として Kolmer, Browning, 独乙国定法等幾多の改良法を生み、以来約 40 年間最も信頼に富む梅毒の補助診断として用いられたものである。

一方抗原本質の絶えざる探究は遂にカルデオライピン抗原の発見としてその優れた感度は、旧リポイド抗原を遙に凌ぐものがあり、各術式はこぞつて新抗原を取入れ、此処に益々その鋭敏性を競うに至つた。

然し乍ら、之等のリポイド抗原ワッセルマン反応は鋭敏性に於て明らかに劣るものとは云え、その特異性に関し、或は血清治癒の指南役として、或は又血清治癒評価の変らざる一基準として、梅毒治療に専念する臨床家にとつては最も信頼するに足る旧友と云う可きであろう。

晩期梅毒患者が今日の梅毒治療の主要対象であり、又その治療評価が凡て血清反応に基いて決定されることは論を俟たないが、今若しその治療を今日の凝集、沈降反応のみを以て評価せんとするならば、経過観察の大なる努力に拘らず其の成績は甚だ否定的なもので、恐らくは何等有効なる治験を決定し得ないことは想像に難くない。精選された多数の晩期梅毒患者の遠隔成績を基にした松尾⁽⁹⁾の研究はカルデオライピン抗原凝集、沈降反応を数年の経過に消失せしめることは有効な療法に拘らず至難であると報じているが、一方斯る患者の治療後のワッセルマン抗体価の推移に最も忠実なるものは尚お旧リポイド抗原に依つたワッセルマン反応であることを特に注目している。即ち治療評価の妥当性より見れば、緒方ワッセルマン定量法を初め

各種の定量反応を以てワッセルマン抗体の充分なる追及が望まれると共に、旧来のワッセルマン反応にも亦新たな意義を賦与したものと云えるであろう。

従来リポイド抗原を以てしてはワッセルマン定量試験は不適当なものとされ専ら定性的判定がなされるが、一面に於て定性反応の成績はカルデオライビン緒方ワッセルマン定量法（松尾⁽⁹⁾）、緒方凝集定量法（占部⁽¹⁹⁾）の定量抗体価と対応するものとされる。この事實はワッセルマン反応の陽性度の強さとワッセルマン抗体量、惹いては客観的規準に基いて測定されたワッセルマン試験液内に於ける溶血現象とワッセルマン抗体の連関と云うことに当然帰結され得る問題であろう。

此処に余がワッセルマン反応判定に対する分光学的研究を企図したのも又上述の意味に於てである。

近時、血清学領域に於ける光電比色法の応用には著しきものがあり、補体量と赤血球の溶血の關係に就ては Waksman⁽²⁰⁾, Wadsworth⁽²¹⁾, Muschel⁽¹⁰⁾, Osler⁽¹¹⁾, 吉田, 小川, 遠藤, 植田⁽¹⁸⁾, 中村⁽¹²⁾等により溶血度の測定が光電比色計によつて行われ、惹いては補体結合反応に与る各因子も詳細に検索されんとしている。即ちこのことは溶血液はよく分光学的方則に順応し正確なる溶血濃度の検定が可能なることを示すと共に、光電比色計の技術の改善が大なる貢献をなしたものと考えられる。

Desmoulière, Vernes⁽²⁾, 等はワッセルマン試験液中の溶血を分光学的に測定せんとした第一人者であり、共にワッセルマン上清液に就て之を規定濃度溶血液と比色検定し、溶血度の客観的記載を試みている。然し乍ら此等の方法は共に被検液の遠心沈澱、上清液の肉眼的比色、毎回の規準溶液の作製等の煩雜な操作に禍されて真の臨床的成果とは認められなかつたものである。昭和 27 年竹内教授、石田⁽¹⁷⁾によつて試みられた方法はワッセルマン反応試験全溶液をそのまま比色検定せんとするものであり従来記載される如何なる溶血度判定法と異なるが、溶血液並びに血球浮遊液の二つの因子からなるワッセルマン試験液の吸光度が、尚お従来の肉眼的判定成績と極めて良き対応を示したことを立証している。この事實は多数の検査材料を擁する血清検査室に於て最も簡便な方法として奨用されると共に、光電比色計の使用は従来経験技術者の肉眼にのみたよつたワッセルマン判定に容易に客観性を与えるものとして、その意義は極めて大なりと考えられる。

余はワッセルマン反応試験全溶液比色判定法の妥当性に興味を持ち、此処に多数の被検材料に基き分光学的検索を試み、補体結合反応の判定法に聊か理論的な考察を加え得た。

I) 本実験の資料並びに実験方法

本実験に用いた検査資料は総て最近千葉大学皮泌科血清検査室で行つたブラウニング・ワッセルマン一変法の成績を基にせるものである。その術式の概要は第 1 表に示した如く、溶血系に緬羊血球を使用し、更に試験術式に特に留意せる点は溶血系に加えられた感作緬羊赤血球浮遊液が常に一定の規定濃度を保つ点にあつた。即ち冷蔵せる脱線維緬羊赤血球

粥より用時数度洗滌遠心沈澱して作製せる 3% 感作緬羊赤血球浮遊液を特に吟味した。慣例上吾々は之を 100 cc 大試験管にて調製するが、先ず密検振盪せる該液を Thoma-Zeiss 計算板にて赤血球算定を行い、次にその濃度補正を行つた。その濃度補正法は理論的赤血球浮遊数 P 、被検液の赤血球数 f とすれば次式 $\frac{f-P}{P} \times (\text{全溶液量})$ を以て追加さる可き稀釈液量が算定され得る。即ち余の規定濃度と定め

第1表 ワッセルマン反応術式

	主 試 験		血清対照
	(1)	(2)	
0.85% 食 塩 水	0.3	0.3	0.8
血 清 (被 検)	0.2	0.2	0.2
抗 原 稀 釈 液	0.5	0.5	—
補 体 血 清 2 単 位	0.5	0.5	0.5
37°C 孵卵器中 1 時間			
3% 感作緬羊赤球*	1.0	1.0	1.0
37°C 孵卵器中 2 時間			
判 定			

* その調整法は本文参照。

たのは 750,000/cc 又全溶液量 100 cc であり 3%, 緬羊血球浮遊液は実測上 984,000 ~ 765,000/cc の赤血球を含むからその稀釈量は通常約 23~2 cc である。尚お稀釈液は 0.08% 溶血素加生理的食塩水を用いた。補正規定溶液作製後は更に之を中試験に分注し、平等濃度の血球配分に励めた。尚お斯様な手技によつて分注されたワッセルマン本試験内の赤血球は理論的に 300,000/cc であるが、約 50 回の抽出試験より得られた実測赤血球数は ($m \pm 3\sigma$) 384,500 ~ 233,200/cc である。

本実験に使用されたワッセルマン反応件数は 2,591 件であり、これを肉眼的判定別並びに検査実施の季節別に大別すれば次の如くである (第2表)。

第2表 本研究の資料

判 定 別	冬 期 (10~4月)	夏 期 (5~9月)	計
強 陽 性	212	396	608
中 等 度 陽 性	163	257	420
弱 陽 性	136	362	498
疑 陽 性	81	231	312
陰 性	427	326	753
計	1,019	1,572	2,591

尚お冬季、夏季例の成績には、主に資料の分布上の差に依つて生じたと思われる二、三の相違点が細部に認められるが、ワッセルマン判定液の吸光度、特に血球浮遊或は溶血液の吸光度に関しては本質的相違を認め得なかつた。従つて本論文に於ては季節的変動なる一項を設けず、両者を一括して論じた。

血球算定： 被検ワッセルマン判定溶液を充分に振盪したる後 Thoma-Zeiss 計算板を使用して浮遊

赤血球の算定を行つた。即ち該溶液を赤血球用メンデュールの 0.5 目盛まで吸い、直ちに 0.85% 生理的食塩水を 101 目盛まで吸い、慣用赤血球算定法に準じ算定せるものである。

比色法： 肉眼判定及び血球算定を経たワッセルマン溶液を可及的速かに比色検定を行つた。比色法はその操作の簡便性と確実性を重んじ、従来の Duboscq, klett, pulfrich の肉眼的比色法を避け、日立製 Epo-A 型光電比色計 (単一式) を用いた。又使用硝子フィルターは次の 4 種類である。

	最適波長	波長巾
赤フィルター	660 m μ 内外	640~700
橙フィルター	610 m μ 内外	580~650
緑フィルター	530 m μ 内外	500~570
青フィルター	420 m μ 内外	400~465

その操作の概略を述べれば、先ず附属液槽の一方に Blank (盲検) 溶液として蒸留水を入れ、フィルター枠にフィルターを挿入後電流計の指針が 100 分目盛の 100% の位置に来る様に光源光量又は光電流調整器を調節する。次いで電流計指針の動きが安定するのを待つて被検溶液の入つた液槽 (Cuvette) を光路に持つて来てその時の電流計の指針の読み、即ち透過率を読みとる。尚お本実験に使用せる液槽は総て厚さ 3.5 mm のものであり、被検液注入後約 1 分間静置したる後に比色検定せるもので、その透過率は 2 ~ 3 回操作を反復した読みの平均を以つて示した。

以上一つの被検ワッセルマン試験溶液に関しては、その肉眼判定、浮遊赤血球数、各フィルターに依る光電比色計の読み (透過率及び吸光度) が記載され、又或る場合には更にワッセルマン反応の沈澱上清液について、その透過率、吸光度が記載された。

II) 実験成績

i) ワッセルマン反応判定溶液中に於ける赤血球濃度

先に余は本実験に用いた所謂 3% 緬羊赤血球浮遊液が規定濃度 750,000/cc になる如く補正調整されたものであり、又実際にワッセルマン試験管内に加えられた実測赤血球数は 384,500 ~ 233,200 ($m \pm 3\sigma$) の範囲内にあつたと記したが本章では専らワッセルマン判定溶液内の赤血球濃度を問題として見よう。

第 3, 4 表はワッセルマン反応の肉眼的判定と浮遊赤血球濃度の分布を冬季、夏季実験例に大別表示したものであるが、先ずワッセルマン判定溶液中に含まれる赤血球浮遊数、換言すれば溶血を免がれた

第3表 ワッセルマン判定と浮遊赤血球濃度(冬季)

ワッセルマン判定	被検数	浮遊赤血球濃度/cc		溶血度の平均(%)
		平均値	標準偏差	
陰性	427	5,120	2,500	98.29
疑陽性	81	13,900	7,320	95.37
弱陽性	136	28,370	13,550	90.54
中等度陽性	163	73,820	27,120	95.40
強陽性	212	259,300	36,300	13.57
計	1019			

第4表 ワッセルマン判定と浮遊赤血球数(夏季)

ワッセルマン判定	被検例	浮遊赤血球濃度/cc		溶血度の平均(%)
		平均値	標準偏差	
陰性	326	4,510	3,470	98.5
疑陽性	231	13,930	5,710	95.46
弱陽性	262	35,360	12,140	88.21
中等度陽性	257	89,370	36,300	70.21
強陽性	396	270,760	40,650	9.75
計	1,572			

残留赤血数は両実験群共、その肉眼的判定からすれば冬季、夏季大体相似たものと結論される。

又ワッセルマン試験管内に注加された緬羊赤血球数は概略一定と見做されるから、その規定濃度300,000/ccを以つて各平均浮遊赤血球数を除せばその数値は推定平均溶血度と考えられるものであり、その数値を%を以つて、“平均溶血度”として表中併記した。然してこの推定溶血度の季節的の異りは既述の如く両者の資料上に於ける分布の異りを示すものと考えられる。但し此処にワッセルマン反応の肉眼的判定と溶血度が当然考察の対照とされるが、その問題は後章に於て一括論ずることとする。

ii) ワッセルマン反応判定液の吸光度

ワッセルマン反応判定溶液の吸光度とその肉眼判定の関係について見ると、ワッセルマン反応溶液の吸光度は使用フィルターの波長によつて著しく異なるが、總ての場合に、完全溶血を起した陰性反応溶液に於て吸光度は低く、陽性度

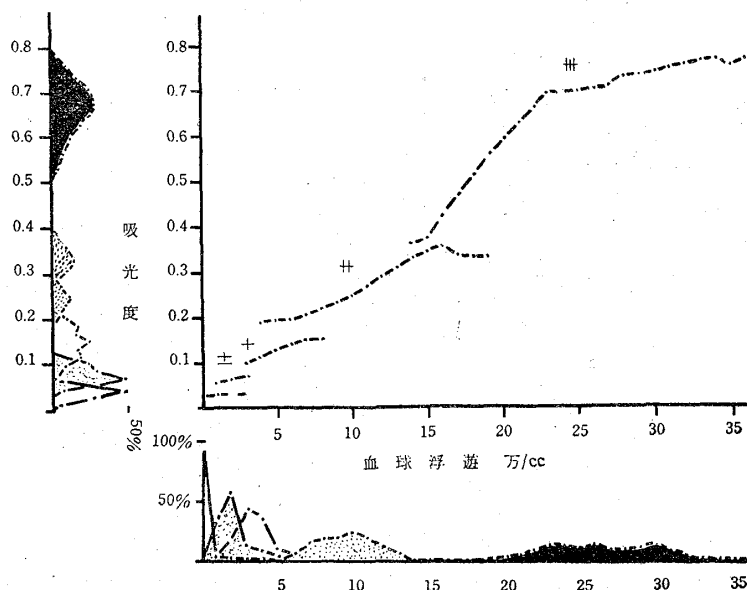
の高まりと共に吸光度は漸次増大し、強陽性反応に於て最も大となる関係がある。今此処に各フィルターの吸光度の極大、極小の値並びにその差、換言すればワッセルマン反応の吸光度の可動域を陰性反応の平均吸光度、強陽性反応の平均吸光度並びに両者の差を以つて示せば第5表の如くである。尚お此等の関係を光電比色計の実際の読みである透過度を以つて示せば其の関係全く逆であつて、透過度は反応増強と共に減衰する。

第5表 陰性並びに強陽性反応の平均吸光度、吸光度、透過度の可動域

フィルター	波長(mμ)	陰性反応の平均吸光度	強陽性反応の平均吸光度	吸光度の可動域	透過度の可動域
赤色フィルター	660	0.004	0.703	0.699	69.42
橙色	610	0.161	0.861	0.706	53.56
緑色	530	0.535	1.277	0.742	24.63
青色	420	0.538	1.256	0.718	27.00

扱て、更に判定各群間の吸光度の分布、並びに血球分布を明示するために、赤色フィルターに例をとつてその分布曲線を描き併せて両者の関係を示せば第1図の如くである。即ち吾人が日常ワッセルマン反応に与える肉眼判定は溶血度の一基準と本論文上見做した血球浮遊の分布からすれば極めて広い領域に属し、特に強陽性反応は甚だ広い領域を占有する。一方光電比色計を用いた吸光度の分布も又同様であつて可動域の約半分を強陽性反応が占め、陽性反応以下は極めて狭い範囲内に錯綜して存在するこ

第1図 吸光度、血球浮遊の分布、並びに両者の相関関係



とが知られる。又第1図上のグラフはワッセルマン判定各群に就て各血球浮遊数に対応した吸光度の平均を連結せるグラフで、統計図形的には各血球浮遊数に対する吸光度の回帰曲線と呼ばれる可きものである。即ち次の事実が結論出来る。

1) 肉眼的判定別に見て同一の判定群に於ては比較的一定な吸光係数を有する。

2) 同一の判定群内では血球数が或る値を超すと吸光度は之に伴わず、吸光係数は不定となり却つて負となる傾向がある。

3) 肉眼的判定群の分布は血球数よりすれば入り組み、吸光度よりすれば分離する傾向が大きい。このことはワッセルマン反応の肉眼的判定が血球数算定より吸光度に関し妥当性は大きなりと考えられる。

4) 今若しワッセルマン反応の肉眼的判定を度外視して、ワッセルマン判定液中の血球浮遊数とその吸光度のみに注目すれば、両者に一つの連続した相関性を想定出来る。

余はワッセルマン反応判定溶液に含まれる血球浮遊数のその吸光度に対する回帰曲線(直線)をワッセルマン反応の吸光度曲線(直線)と名付けた。即ち此のワッセルマン反応の吸光度曲線はワッセルマン反応判定全溶液比色法の成立の前提をなし、又判定の一基準をなすものである。

III) 所謂ワッセルマン吸光曲線、 特にその成因に就て

今茲にワッセルマン反応をその判定と云う事項のみに就て見るならば、その本態は特定の血清稀釈溶媒中に於ける緬羊赤血球の浮遊並びにその溶血と云う割切つた現象と見做すことが出来る。又このことはワッセルマン反応の判定が実はワッセルマン試験に溶血系として加えられた緬羊赤血球の溶血度、或は破壊度の判定であるとも換言され得る。さて斯様なワッセルマン反応の試験溶液を光電比色計の吸光度によつて直接捕え、その判定に資せんとするのが本研究の第一の目的であるが、余は差当つて特にその分光学的意義、或は既述の如きワッセルマン吸光曲線の成因に就て聊か考案を加えた。

即ち上記の如きワッセルマン反応の判定が緬羊赤血球の溶血度の判定であるとする考え方に従つて、今、溶血系として加えられた緬羊赤血球数をC、溶血赤血球をh、残留赤血球数をtとすればワッセルマン試験管内で起る溶血現象は端的に $C = h + t$ なる関係が何れの場合にも成立し得る。又各溶血度 $h_1, h_2, h_3, \dots, h_i$ に対応した残留赤血球数を夫々

$$\begin{aligned} t_1, t_2, t_3, \dots, t_i \text{ とすれば更に } & C_1 = h_1 + t_1 \\ & C_2 = h_2 + t_2 \\ & C_3 = h_3 + t_3 \\ & \vdots \\ & C_i = h_i + t_i \end{aligned}$$

であつて、既述の様に本実験の仮定として $C_1 = C_2 = C_3, \dots, C_i$ なる関係が成立する。さて此の様なワッセルマン試験管内現象が吸光度としては如何様に再現されるかを考えれば、明らかにそれはh系列に対応した吸光度(H-Factor)及び残留浮遊赤血球tに対応した吸光度(T-Factor)の協合によつて与えられたものであることが分る。

即ち $h_1, h_2, h_3, \dots, h_i$ に対応した吸光度を $H_1, H_2, H_3, \dots, H_i$ とし又 $t_1, t_2, t_3, \dots, t_i$ に対応した吸光度を $T_1, T_2, T_3, \dots, T_i$ とすれば、

$$\begin{aligned} E_1 &= H_1 + T_1 \\ E_2 &= H_2 + T_2 \\ E_3 &= H_3 + T_3 \\ &\vdots \\ E_i &= H_i + T_i \end{aligned}$$

なる関係が存在している、但し完全に $E = H + T$ なる関係が成立し得るか否かは甚だ疑問である。即ちワッセルマン溶液の吸光曲線は溶血(H-Factor)及び血球浮遊(T-Factor)の二つの分光学的性状の異なる物質の吸光度の重畳によつて得られると考えらる事が出来る。

以下に於て余は各因子に就て更にワッセルマン吸光曲線の成因に就て述べて見よう。

i) 溶血液の吸光曲線

溶血液に就ては既に Kortuem⁽⁴⁾, Parker⁽¹³⁾, Blum⁽¹⁾, Rappaport⁽¹⁴⁾等の分光化学的研究を見ることが出来る。即ち彼等は溶血液の吸光度、換言すればヘモグロビンの吸光度は濃度と比例し、Beer法則に良く適合するものとして、更に此の点に立脚して分光化学的赤血球算定法を創案している。それは被検血液を各種のHb誘導體として spectrophotometrie により測定し赤血球数を推定せんとするものである。

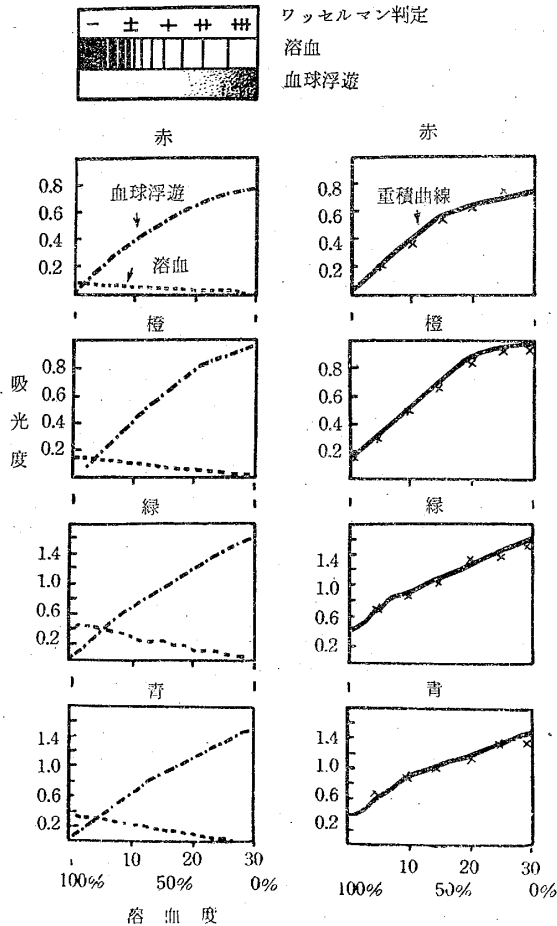
又最近杉本⁽¹⁵⁾は血尿の血液濃度の計測に、血球成分をヘム濃度に換算し、monogramより被検血尿の血球濃度を推定している。

余は基準ワッセルマン溶血吸光曲線を得るために、先ず完全溶血を起した陰性ワッセルマン溶液(300,000/cc 緬羊赤血球の完全溶血液を意味す)を基準溶液として、更に之の基準溶液の0~100%蒸

溜水稀釈系列を作製し、分光化学的検索を試みた。

即ちその実測平均値は第2図上に plott して示したが、各フィルター共溶血濃度とその吸光度は良く Beer 法則に従うものと考えられた。

第2図 血球浮遊並びに溶血曲線
及びその重積曲線



尚お実測せられた最大吸光度は赤色フィルター 0.04, 橙色フィルター 0.135, 緑色フィルター 0.425, 青色フィルター 0.395 で緑色フィルター (波長 530 $m\mu$) の部に最大吸収帯が認められた。文献上ヘモグロビンの吸収帯は黒田, 三代⁽⁷⁾ 540 $m\mu$, 甲斐⁽⁶⁾ 420 $m\mu$, 杉本⁽¹⁵⁾ は 541 $m\mu$ 及び 576 $m\mu$ の 2 箇所吸収極大点を認めている。即ち余の成績と一致するものであり、長波長フィルターに於てはその溶血因子の影響は極めて小なることが考えられる。

ii) 赤血球浮遊液の吸光曲線

元来比色法, 比濁法により検定され得る物質, 換言すれば吸収スペクトルに依る分光化学的研究の対象となるものは検定液がイオン又は分子状に分散した真性溶液か金属ゾルや蛋白質の如くコロイド溶液に就て行われるもので、ましてその際僅微の混濁の

存在も許されていない。斯様な比色法の見解からするならば明らかに肉眼的混濁を示し、且つ粗大な粒子からなる赤血球浮遊液を分光化学的研究の対象とすることは誠に異例とすべきである。其処には溶液本来の吸光性を阻害する散光の影響が当然考えられ、又その溶液自体の性状から見てもその均斉性, 赤血球粒子間の癒合, 流動性, 或は時間的経過による沈澱, 溶媒の性状, 赤血球粒子の形態的变化等真正溶液とは比較にならない多数の不安定な因子を含むものである。

然し上記の難点に拘らず、或る特定の溶媒中に於ける赤血球浮遊液の吸光曲線が分光学的興味の対象とされ黒田, 三代, 甲斐⁽⁷⁾⁽⁸⁾, 吉田⁽¹⁸⁾等により広範な規模の下に詳細な検索が加えられている。

余はワッセルマン反応試験液の吸光度測定の意義を更に明らかにするために、此処に予備実験として緬羊赤血球浮遊液の分光学的検索を試みた。その実験方法は基準赤血球浮遊液としてワッセルマン本試験に用いた基準血球浮遊液 (750,000/cc を含む) の 1.2% 食塩水溶液を用い、更に生理的食塩水を稀釈溶媒として 90 ~ 10% の稀釈系列を作り夫々の吸光度を測定した。

その実測平均値は独立なる 20 回の実験により測定されたもので、各フィルターの実測値を第6表, 第2図に示した。即ち第2図上血球浮遊曲線は Beer 法則に従わない上方、凸型の曲線をなすものと考えられる。尚お黒田, 三代は赤血球浮遊曲線として之を僅に上方凸型の曲線と記載しているが、本曲線の成因に就ては勿論 Beer の法則に当嵌らず、又 Lord Rayleigh の原理も亦粒子直径が 100 $\mu\mu$ 程度以下のコロイド粒子の場合で問題外とせる可きである。

尚お赤血球浮遊液の吸収帯はヘモグロビンに於ける如く顕著なものではない、黒田, 三代⁽⁷⁾によれば 560 $m\mu$, 甲斐の記載によればヘモグロビン吸収帯と同様に 420 $m\mu$ とされる。このことは換言すれば赤血球浮遊液に於てはその粒子の浮遊による混濁が透過光を遮断するのみならず、又その血球の色調が一つの吸光度に影響する因子となり得ることを示している。

さて斯様にして描かれた二つの分光化学的性状を異にする曲線の重積曲線を仮りにワッセルマン吸光曲線の理論的曲線と名付ければ、この曲線は H 及び T-Factor に関し $E = H + T$ なる関係を充分に充し得るものである。余は第2図上に之のワッセルマ

ン理論的吸光曲線と実際のワッセルマン反応によつて求められた実測値との関係を明らかにした。即ちその曲線の両端に於て理論的吸光曲線の隔りは大である。この事実はワッセルマン吸光曲線が既述の如く溶血並びに血球浮遊の吸光度の総和を以て簡単に現わすことの出来ないことを意味する。然し乍らワッセルマン吸光曲線がH及びTのFactorによつて成立つこと並びにその主要部分がT-Factor, 即ち血球浮遊因子に依つて決定されることは極めて明瞭であろう。

第6表 綿羊赤血球浮遊液の吸光度

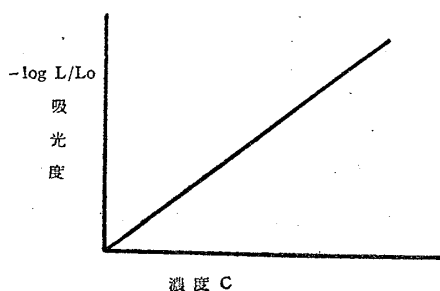
稀釈 系列	実測赤血球数	赤	橙	緑	青
1	293,200 ± 34,200	.745	.920	1.305	1.293
0.9	263,500	.699	.854	1.222	1.177
0.8	219,500	.638	.783	1.125	1.037
0.7	179,500	.577	.699	1.010	.975
0.6	164,500	.523	.638	.903	.812
0.5	141,500	.432	.538	.745	.654
0.4	115,500	.357	.444	.638	.597
0.3	97,500	.292	.337	.487	.471
0.2	70,500	.208	.252	.352	.324
0.1	30,500	.092	.114	.174	.168

(但し 20 回の独立なる実検により得られた実測値の平均を以て示した。)

IV) ワッセルマン反応の吸光曲線, 特にその実験式について

比色法, 比濁法の原理は二つの分光学的原理, 即ち Lambert-Beer の法則に基いて行われるものである。即ち Lambert の法則とは溶液の吸光度 ($-\log L/L_0$ 厚さ h なる液層に入る前の光量 L_0 , 之の層を通過して出て来る光量 L) は被検液の液層の厚さに正比例することを示し, 又 Beer の法則とは液層の厚さを一定にすれば吸光度はその物質の濃度 C に比例することを示す。従つて Beer 法則に依れば或る物質の吸光度とその濃度 C の函数は直線式で現

第3図 Beer の法則



わされる。

扱て, 余はワッセルマン吸光曲線の成因に就て, それがより分光化学的法則に忠実なる溶血液因子と分光化学的原則から外れた血球浮遊因子の重に依つて形成されたものとした。即ち斯様な複雑な曲線の曲線式如何を問うことに曲線式自体の意義を見出せるや否やは甚だ疑問であるが, 敢て此処に実測観案値に基いてワッセルマン吸光曲線式を算出した。

先ず第一に余はワッセルマン吸光曲線が Beer の法則に当嵌ると仮定してその直線式を最小二乗法に基いて次の如く決定した。

$$\text{赤色フィルター } y = 0.489 + 0.026 x$$

$$\text{橙色フィルター } y = 0.633 + 0.027 x$$

$$\text{緑色フィルター } y = 1.034 + 0.032 x$$

$$\text{青色フィルター } y = 1.029 + 0.030 x$$

(y は x に対応した吸光度 ($-\log L/L_0$))

を示し, x は残留赤血球数 15 万を 0 とし,

1 万毎に与えた単位である。)

又同様にワッセルマン吸光曲線が拋物線型を示したものとて曲線式を求むれば,

$$\text{赤色フィルター } y = 0.538 + 0.026 x - 0.00062 x^2$$

$$\text{橙色 } y = 0.637 + 0.027 x - 0.00006 x^2$$

$$\text{緑色 } y = 1.109 + 0.0298 x - 0.00057 x^2$$

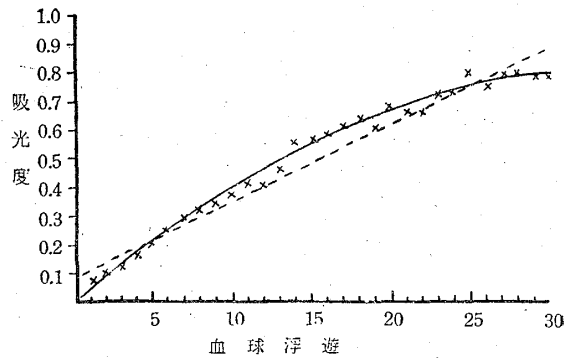
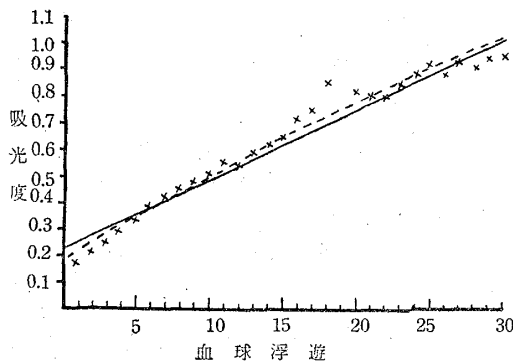
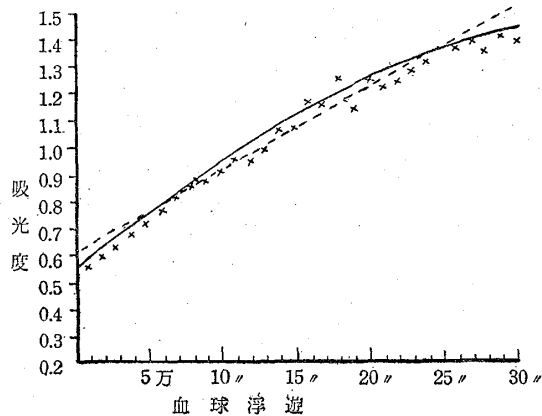
$$\text{青色 } y = 1.029 + 0.0323 x - 0.00006 x^2$$

である。之等の実験式は夫々実測平均値と共に第 4 ~ 7 図上に図示したが, 赤, 緑フィルターのワッセルマン吸光曲線は拋物線に, 又青, 橙フィルター・ワッセルマン吸光曲線は寧ろ直線式によつて現わされると考えられる。然してその曲線式の真の取捨選択は尚お Fisher の分散分析によつて行われる可きであろう。即ち所与の二次式 $a + bx - cx^2$ の x, x^2 の係数 b, c に対する真実なる値を β, γ とすれば,

第7表 分散分析表

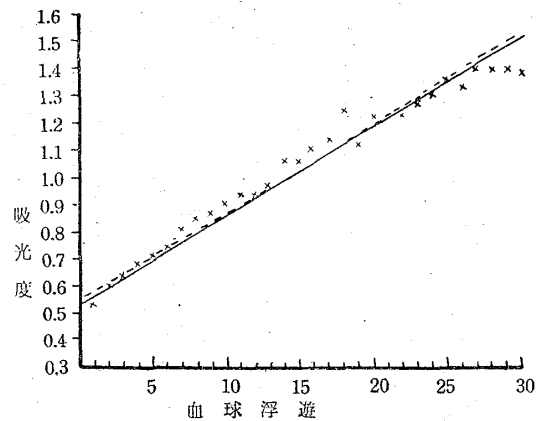
フィルター	要因	分散比
赤色フィルター	一次回帰	876
	二次 "	31.5
橙色フィルター	一次回帰	660.8
	二次 "	0.2
緑色フィルター	一次回帰	184.4
	二次 "	0.04
青色フィルター	一次回帰	11243
	二次 "	263.9

(煩雑を避けて分散比以外の項を省略した)

第4図 赤色フィルターに依る
ワッセルマン反応吸光曲線第5図 橙色フィルターに依る
ワッセルマン反応吸光曲線第6図 緑色フィルターに依る
ワッセルマン反応吸光曲線

$\beta = 0, \gamma = 0$ なる帰無仮説に基いて次の如く分散分折が行われる。

即ち表中二次回帰係数の分散比は赤及び緑色フィルターの場合は橙、青フィルターの分散比に比べて極めて大である。Fisher に依れば分散比 10 以下の場合 $\beta = 0, \gamma = 0$ の仮説は否定出来ないから、橙、青色フィルターの二次回帰分散比から先ず此等のワッセルマン吸光曲線は直線と見做すのが妥当であろう。然し橙、青色フィルターのワッセルマン吸

第7図 青色フィルターに依る
ワッセルマン反応吸光曲線

光曲線が直線式をなし一応 Beer 法則に当嵌るものとしても其の裏付けとなる理論的解答は既述の如く甚だ難解である。黒田、三代、甲斐⁽⁸⁾等の氷結法或は超音波照射による赤血球破壊実験は、特定濃度の赤血球浮遊液の特定波長 (420 m μ) 下に於ける吸光度は破壊度に応じほぼ直線型に図示記載し、又或る波長に於ては陥入を示す曲線を以て図示している。

余は本章に於てワッセルマン吸光曲線が拋物線、或は直線式として実験式を求めたが、実測測定値との間に尚お幾分の無理が認められる。此の点に関しては更に定量抗体とワッセルマン反応の吸光度の関係に於て検討し直すことにしよう。

V) ワッセルマン反応吸光曲線と

ワッセルマン定量試験の意義

近時本邦に於てもカルヂオライピン抗原を用いた緒方ワッセルマン定量法を初め各種の定量反応が広く行われている。即ち、その原理は抗体減量或は抗体稀釈法に基いて最大溶血阻止の程度を決定せんとするものである。

余は旧ワッセルマン反応に於て抗体減量がワッセルマン反応試験管内の溶血現象に如何なる影響を及ぼし、又吸光度に如何なる対応を示すかを改めて此処に検索の対象とした。

本実験の定量反応術式は第8表の如く患者血清 0.2 cc を基準血清量として、漸次血清減量し基準血清の 10 ~ 90% 食塩水稀釈血清についてワッセルマン反応を行えるものである。尚お本実験に用いた患者血清は総て強陽性血液にして且つワッセルマン判定液の透過度が 25 ~ 15 の限界内にある 15 例の血清を用いた。

之等の血清稀釈系列に対応した試験管番号を 1 ~

第8表 本実験に用いた定量ワッセルマン反応術式

試験管番号	0.2 cc 中の血清量	抗原 (cc)	補体 2 単位 (cc)	3% 感作 緬赤血球
1	0.2	0.5	0.5	1.0 cc
2	0.18	0.5	0.5	"
3	0.16	0.5	0.5	"
4	0.14	0.5	0.5	"
5	0.12	0.5	0.5	"
6	0.1	0.5	0.5	"
7	0.08	0.5	0.5	"
8	0.06	0.5	0.5	"
9	0.04	0.5	0.5	"
10	0.02	0.5	0.5	"

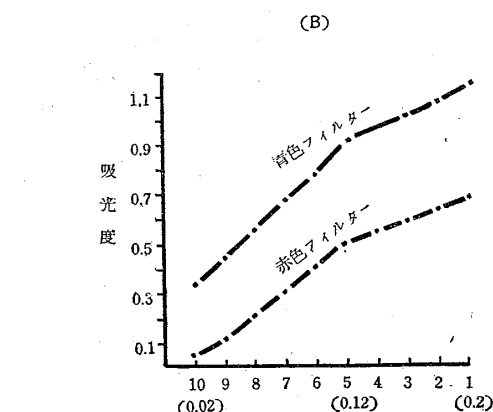
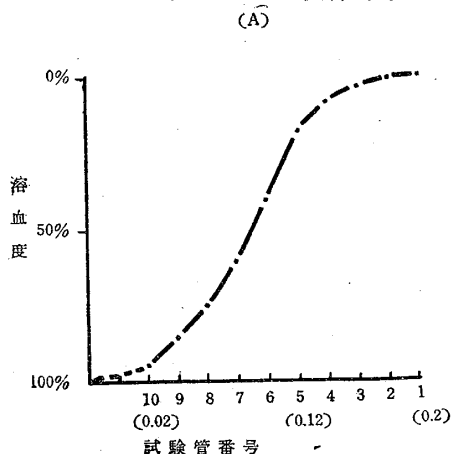
第9表 定量反応と吸光度及び赤血球浮遊数の関係

試験管番号	抗体量	吸光度		赤血球浮遊数
		赤フィルター	青フィルター	
1	0.2	0.635	1.11	214,800
2	0.18	0.599	1.01	192,600
3	0.16	0.562	0.971	177,700
4	0.14	0.538	0.950	167,800
5	0.12	0.506	0.910	146,200
6	0.1	0.402	0.801	104,400
7	0.08	0.276	0.666	85,000
8	0.06	0.187	0.559	63,200
9	0.04	0.081	0.454	28,500
10	0.02	0.046	0.337	12,300

10 とすれば各試験管の吸光度並びに浮遊赤血球数の平均は第9表に与えられる。

又その実測値を図表上に描記すれば第8図の如く抗体減量に応じワッセルマン試験管内の溶血度はS型曲線として示される。

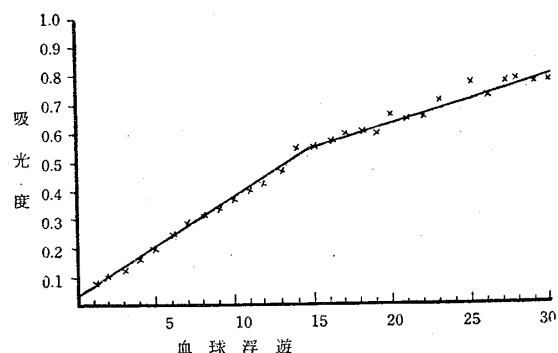
第8図 抗体減量法下に於ける溶血度の推移(A)並びに吸光度に対する関係(B)



即ちその曲線は恰も Von Krough⁽²²⁾の感作血球の溶血量と補体量を対応せしめたS型曲線に類似し、Waksman⁽²⁰⁾、吉田⁽¹⁸⁾等の云う如き正規分布曲線の積分型曲線に酷似する。

一方此の関係をワッセルマン溶液の吸光度を以て示せば第8図(B)の如く1:1.75 稀釈に於いて折れ曲つた二つの吸光曲線を想定することが出来る。換言すれば之の事実は抗体減量下に於いてその溶血度に最も大なる影響を与える1:2乃至1:1.75 稀釈倍領域に於いてワッセルマン反応の吸光度はその方向を変換することを意味し、又ワッセルマン曲線が実はその部分に於いてその吸光係数を異にした二つの吸光直線によつて形造られたものであることをも想像させる。今その見解に従つて赤色フィルターワッセルマン吸光直線を改めて図示すれば第9図の如くである。尚おその直線はX(血球浮遊1万毎の単位)が1~15の間に於いては $Y = 0.0342 + 0.0331 X$ 、又Xが15以上の場合は $Y = 0.296 + 0.0156 X$ を以て示される。即ち前者の吸光係数は後者の約倍なることが知られる。換言すれば赤色フィルターを用いた場合ワッセルマン溶液の吸光度は血球浮遊1~15万1ccに於いてその解折力が優れていることを意味する。

第9図 赤色フィルターのワッセルマン吸光直線



VI) ワッセルマン反応溶液の

吸光度測定とその意義

余は先にワッセルマン反応の分光学的意義に就いて述べたが、此処にその様な溶光度が肉眼的判定にどのような対応を示し又容観性賦与に対し如何なる意義を示すかを検討しよう。

既述の如くワッセルマン反応吸光曲線は溶血、血球浮遊の二つの分光学的性状を異にする因子の平衡関係に於いて成立することを述べ、更にこの両者が共に最大吸収帯を緑色フィルター領域に有することを記した。即ちこの事実は分光化学的にワッセルマン吸光度の解析が緑色フィルターに於いて最も有利であり、長波長の赤橙フィルターに於いて最も不利なることを意味する。然し乍ら本実験の結論からしてその関係は全く反対であつて長波長フィルター即ち赤色フィルターを用いた場合が最も優れた成績を示した。

この関係を示すために光電比色計の実際上の読みである透過度により再びワッセルマン試験管内で生起している溶血と血球浮遊の両者の関係を示して見よう (第 10 図)。

即ち第 10 図は各フィルター使用時のワッセルマン透過度曲線で実際の光電比色計の読みを実線で示し、之に対応した溶血と血球浮遊因子を透過度を以つて現わしたものである。先ずここに溶血因子のみに就いて見れば、ヘモグロビンの最大吸収帯である $560\text{ m}\mu \sim 420\text{ m}\mu$ 即ち緑、青色フィルター領域で増大し、反対に長波長の橙、赤フィルターに於いて極度に減少する。

一方血球浮遊因子のみを問題として見ると第 10 図上各フィルターに於て相似たものと見られるが、特に血球浮遊の最高、最低濃度に於ける透光度の差 (第 6 表参照) を注目すれば溶血因子と同様に短波

長フィルターに於いて最も大なる影響を与えるものである。即ち黒田、三代、甲斐等の実証の如く赤血球浮遊液の吸光度は $560 \sim 420\text{ m}\mu$ に於いて最も大なりとする記載に一致する事実である。

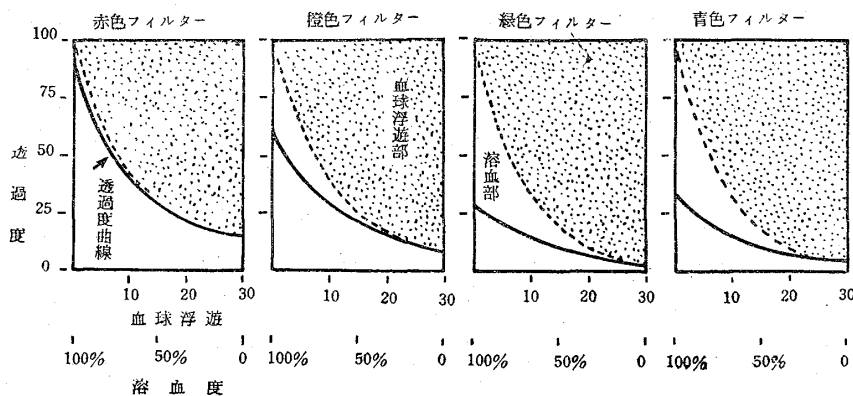
さて最後に之等の二つの因子の平衡関係に規定されるワッセルマン反応の透過曲線に見ると透過度の可動域 (第 5 表上平均透過域として示した) は赤色フィルターに於いて最も可動域は広い、又逆に緑、青フィルターに於いて最も狭いことが分る。即ち photometrie の原則より赤色フィルターに依るワッセルマン反応の判定解析力が優れたものであることが此等透過度曲線より推定出来る。

又斯様な赤色フィルター、ワッセルマン透光度曲線の優位性は或は又次の様にも決定出来る。即ちワッセルマン反応の肉眼的判定によつて組分けられた陰性、疑陽性、弱陽性、中等度陽性、強陽性の各群に含まれる資料に就て、透光度の平均並びに標準偏差より変異係数 ($V = \frac{100 \sigma}{\bar{X}}$) を算出すれば V の値は一つの変量群の散布度を示すと共に変量群の質の純粋性を示すものである。さて第 9 表に就て V 値を見れば、赤色フィルター群に於ては総ての場所に極めて優れていることが分る。即ち赤色フィルターによつて透光度を測定すればほぼ確実なワッセルマン判定の領域を決定出来る。

第 9 表 ワッセルマン反応判定各群間の吸光度の変異係数

フィルター	季節	ワッセルマン反応の判定				
		陰性	疑陽性	弱陽性	中等度陽性	強陽性
赤色	冬季	1.9	3.1	9.2	21.8	26.2
	夏季	1.3	1.7	5.6	17.2	20.3
橙色	全季	3.1	4.3	9.5	23.6	30.8
緑色	全季	10.9	9.2	12.8	27.8	40.4
青色	全季	9.1	9.2	12.2	25.7	37.9

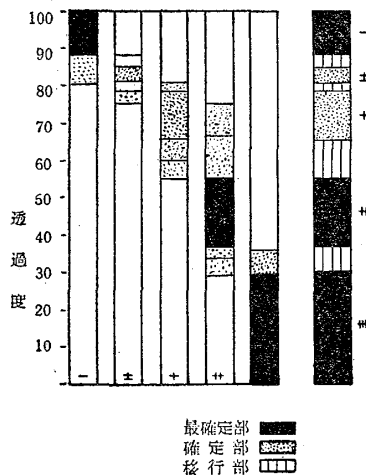
第 10 図 ワッセルマン透光度曲線



即ち余の資料よりワッセルマン反応判定に就て、その透過度が他の判定と重複しない部分を最確定部とし、又重複しても或る判定がその 90% 以上を占められる部分を確定部とし、又その透過度から肉眼判定上、上下何れの判定に属するかを明瞭に決定出来

ない部分を移行部と名付ければ赤色フィルターワッセルマン透過度とその判定の間には第11図の如き関係を認め得る。

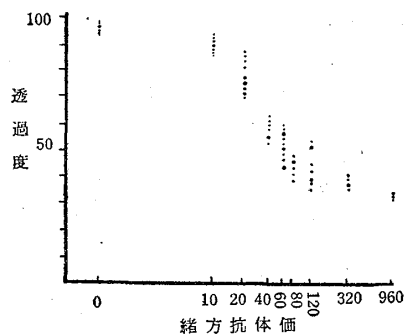
第11図 透過度と肉眼判定



VII) 緒方定性反応に対する応用

余はワッセルマン判定全溶液の透過度或は吸光度測定法の研究に於て更に本法を緒方ワッセルマン反応に使用し所期以上の成績を収め得た。即ち緒方ワッセルマン法に使用される緬羊赤血球浮遊液は2%であり、ワッセルマン試験全溶液(抗原0.25, 抗体0.25, 補体0.25, 感作血球0.25)1.00 ccに対し0.5%の血球浮遊である。又推定血球浮遊数は12,500/ccであり、その吸光曲線は先のワッセルマン吸光曲線の如く二つの屈折せる直線ではなく、ワッセルマン吸光直線より吸光係数の稍々大なる単一の直線として示される。この事実は緒方法ワッセルマンに於ける本判定法が旧ワッセルマンより優れていることを意味する。尚余が50数例の緒方ワッセルマン全溶液の透過度とその定量値に認めた相関性は第12図の如きであつた。その詳細は更に症例を重ね次稿に於て論ずる予定である。

第12図 定性緒方ワッセルマン判定溶液の透過度と定量値との関係



VIII) 考 案

ワッセルマン反応の判定は究局すれば、溶血系に加えた緬羊赤血球の溶血度の判定と考えられるものであり、1919年独乙国定法の定むる判定基準によれば、

判 定 所 見	
強 陽 性	赤血球不溶解、上清液は無色
中等度陽性	血球は殆んど溶解せられず、上清液は多少紅色を呈す
弱 陽 性	血球の約半分溶解したもの、所謂 Grosse Kuppe
疑 ア リ	血球は3/4以上溶解したもの、所謂 Kleine Kuppe
陰 性	血球完全に溶解し液は lackfarbig のもの

であり、Kolle, Kraus は赤血球 $\frac{1}{2}$ 溶解を以て一応ワッセルマン陽性の境界と見做せるものである。教室血清検査室に於ても、その所見を尊重して日常判定を行つて居るが、斯様な溶血度の判定には可成りの熟練を要し、且つ検査実施者の視覚印象の差によつてその判定結果にも屢々隔たりを来すことが注目される。又更に之を細別した如き判定様式例えば米国で用いられる次に掲ぐるが如き判定基準の如きは、果して斯様な溶血度に対する命名が完全にその意義を全うし得るや否や甚だ疑問である。

昭和25年厚生省衛生検査法指針⁽⁵⁾に示された判定法は3, 3', 2, 2', 1, 1', ?, 0の8階級に分けて本試験管の溶血度を記録し、又如何なる程度の溶血度にいずれの記号を用いるかに就ては術者各人が所定の溶血標準液列と比較会得するよう努力が望まれると述べられている。即ちその何の方法に例をとつても判定の確実性に関しては判定者の熟練に待つより外なく、又その客観性に関してはたよる可き何等の根拠がない。

米国の溶血判定基準

o	= none haemolysis	0%
fttr	= faint trace haemolysis	25%
tr	= trace haemolysis	45%
d	= distinct haemolysis	65%
m	= marked haemolysis	80%
vm	= very marked haemolysis	90%
ac	= almost complete haemolysis	96%
jc	= just complete haemolysis	98%
c	= complete haemolysis	100%

厚生省衛生検査基準による判定法

溶血度 (%)	記 載 法	溶血度 (%)	記 載 法
0	0	90	2'
20~40	?	95~96	2
50~70	1'	98~99	3'
80	1	100	3

即ち余の下した肉眼判定を実際の溶血度に就て見れば第3, 4表に示した如くその推定溶血度の平均は

平均溶血度 (%)

陰 性	98.5~98.3%
疑 あり	95.4
弱 陽 性	90.5~88.2
中等度陽性	75.4~70.2
強 陽 性	13.6~ 9.7

であり、余の判定基準を以つてすれば、特に中等度陽性以下の判定総てが溶血度 $\frac{3}{4}$ 以上の部分に属し、独乙国定法の弱陽性或は疑ありの部分に属したものであることが判明する。即ち一般に ortho. dox の判定よりは陽性度は高く評価判定されることを意味している。然し乍ら余の経験からするならば余の採用したワッセルマン反応の判定が、当検査室で同時に実施している数種の血清反応（村田法、緒方ワッセルマン、緒方凝集法、カルヂオライピン、カーン法、並びに各種定量法）から得た綜合成績と矛盾し合うことは極めて少いことを以つても、余の判定が厳に過ぎるとは云えない。寧ろ緒方ワッセルマン或は爾余のカルヂオライピン定性法が鋭敏性を増している今日、旧ワッセルマン法は一層その判定基準を引上げ可きものとする。

さてワッセルマン判定液の血球算定法は直接的な溶血度の推定法であるが、その操作の煩雑性は当底日用に供せらる可きものではない。又先人の既に試みたワッセルマン判定液の上清液の比色法も簡便な方法と云う訳には行かない。

之の点光電比色計によるワッセルマン判定液の比色法は最も簡便な方法でその成績は充分に信頼に足るものと考えられる。既述の如くワッセルマン判定液の比色法は原理的に異なる二つの分光化学的要因即ち溶血、血球浮遊の因子なることを明らかにし、更にその判定の妥当性から溶血因子の介入の殆んど皆無とされる赤色フィルター使用の測定が最も優れたことを結論した。然し理論的に見て赤色フィルターを用うことはワッセルマン判定の溶血度測定と云う本来の目的には全く不適當であり寧ろ極めて矛盾

した事実である。このことは赤色フィルターがワッセルマン判定溶液から血球浮遊の因子のみを選択的に取り出して間接的に溶血度を捉え得たとなす可きであろうか。余は本実験の成果から寧ろその意見に賛同出来ない。何故ならばワッセルマン試験管内に配分された綿羊赤血球数は細心の注意に拘わらず既述の如く極めて大なる分布域を有するから、如何に正確に判定液内の赤血球数が算定されたとしても到底正確なる溶血度推定は困難である。従つてワッセルマン判定と赤色フィルター吸光度が斯様に良く対応することは先ず考え得られない事とすべきである。

溶血系に加えた赤血球浮遊液の溶血度の測定がワッセルマン反応の判定の基準と見られるが、一面又ワッセルマン反応の本態からすればそれは溶血阻止の現象であるとも規定出来る。

Kolmer⁽²⁾等は溶血阻止の程度に於いてワッセルマン判定はなざる可きであるとしている。即ち彼の記載によれば次の如くである。

溶血阻止の %	判定成績	判定記号
100 強強陽性	卅	4
50 強 陽 性	卅	3
25 陽 性	卅	2
10 弱 陽 性	+	1
5 疑 陽 性	±	0
0 陰 性	—	0

更に彼はワッセルマン判定溶液を次の様にして得た基準液と比色法を試みている。先ず2%血球浮遊液を更に $\frac{1}{6}$ に薄めて基準血球浮遊液とする(1)、一方蒸溜水5に対し2%血球浮遊液1ccを加え溶血せしめたものを溶血液基準液(2)とし更に次の規定で之を混和する。

溶血阻止の程度	100%, 50%, 25%, 10%, 0%
基準血球浮遊液	3 cc, 1.5 cc, 0.75, 0.3 0
基準溶血液	0 1.5 2.25 2.7 3

上記の如くにして得た規定溶液を以つてワッセルマン判定溶液と比色を行うものである。

即ち余の赤色フィルター検定法は尚 Kolmer の云う如き溶血阻止度の判定法と理念的に一致するものである。ただ Kolmer 等の比色法は飽く迄規定溶液との比色であり、用時規定液の調整等實際の手法並びに臨床検査として意義は極めて異なるものである。

最後に余は特に抗体減量法下に於ける溶血度、並びにその吸光度の変化を追求した。先ずその溶血度

の推移に就いて見れば抗体減量に応じ溶血度は直線的に増加するものでなく、S字型の曲線として各稀釈系列に対しその溶血度増加の速度は極めて異なり、並びにその最も急峻な溶血度の勾配部より屈曲部にかけて定性中等度陽性以下の部分が存在していることを知った。一方之に対してワッセルマン判定液の吸光度は各稀釈系列に対し二つの曲折した直線として示され、且つ特に溶血度によつては極めて錯綜した判定部分が、吸光度を以つてすれば吸光係数

の高い直線型配列をなすことを明示した。換言すればこの事実はワッセルマン判定液の吸光度測定が特にその客観性、正確度に於いて赤血球算定法に比して数段と優れたものと云うことが出来る。

尚本法は旧ワッセルマン反応のみならず、カルデオライピン緒方法にも同様に行い得、且つその正確度は旧ワッセルマン反応より一段と優れたものであることが期待される。

IX) 結 論

余は千葉大学皮泌科血清検査室で最近実施したブラウニング、ワッセルマン 2,591 件に対し光電比色計による判定を試み、特に補体結合反応に於ける溶血、並びに肉眼的判定に対する本法の意義を考案した。

1) ワッセルマン全判定液の光電比色計を用いる判定法は赤色フィルターの使用が最も優れ、肉眼的判定の合致率は約 87% である。之に対し短波長はフィルター使用時は僅に 50% 内外の合致を示したに過ぎない。

2) ワッセルマン全判定液の吸光度はその残留赤血球数に対し明らかな相関性を実証し得る。即ち両者の関係をワッセルマン反応の吸光度曲線（直線）と名付ければ、赤色フィルター使用時にはワッセルマン反応の吸光直線は吸光係数の異なる二つの屈折せる直線を以つて示され得る。即ちワッセルマン全溶液の吸光度測定法は分光化学的に云つても可成りの正確度を期待され得る。

3) 本法は他の補体結合反応にも同様に実施することが出来る。特に緒方法に関しては感作血球量が比較的少ない点より更に正確度を充め得る。尚定性緒方ワッセルマン判定液の吸光度は緒方定量法による定量抗体価を充分反映したものと見做すことが出来る。

4) 本判定法は補体結合反応の溶血度よりは寧ろ溶血阻止度の測定に準ずるものであり、実施上ワッセルマン試験管に加えられるべき緬羊赤血球の濃度に余り拘泥する必要はない、寧ろ毎回新鮮緬羊赤血球浮遊液の新調が大切である。

擧筆するに当り恩師竹内教授の御指導御校閲を深謝致します。

文 献

- 1) Blum L. L.: Amer. J. Clin. Path. Tech., 9, 85, 1945.
- 2) Demanche R.: Precis de Technique du serodiagnostic de la Syphilis. 5. ed. G. Doin, 1952, Paris.
- 3) Kolmer et al.: Amer. J. Clin. Path. 11, 402, 1941.
- 4) Kortuem C. M.: Amer. J. Med. Technol. 6, 199, 1940.
- 5) 厚生省編: 衛生検査指針, 昭和25, 協同医書出版社。
- 6) 甲斐: 生化学, 27, 39, 1955.
- 7) 黒田・三代: 医学と生物学, 25, 104, 248, 1952; 26, 67, 148, 1953.
- 8) 黒田・三代・甲斐: 医学と生物学, 32, 205; 33, 76, 136, 1954.
- 9) 松尾雷太: 千葉医学会誌, 33, 654, 1954.
- 10) Muschel L. H. et al.: J. Lab. & Clin.

- Med. **46**, 154, 1955.
- 11) **Osler A. G. et al.:** Amer. J. Syph. **36**, 140, 1952; **36**, 154, 1952.
- 12) 中村・等: 性病, **40**, 121, 1955.
- 13) **Parker G. M. et al.:** Amer. J. Clin. Path. Tech., **8**, 37, 1944.
- 14) **Rappaport F. et al.:** Amer. Clin. Path., **19**, 88, 1944.
- 15) 杉本: 日泌会誌, **47**, 613, 1956; **47**, 644, 1956.
- 16) 斎藤正行: 光電比色計による臨床化学検査, 南山堂。
- 17) 竹内・石田: 千葉医学会誌, **27**, 35, 1951.
- 18) 吉田・小川・植田: 医学と生物学, **27**, 232; **28**, 108, 111, 1953.
- 19) 占部: 皮と泌, **17**, 451, 1950.
- 20) **Waksman B. H.:** J. Immunol., **63**, 409, 1949.
- 21) **Wadsworth A. B.:** J. Immunol., **35**, 105, 1938.
- 22) **Von Krough M.:** J. Infect. Dis., **19**, 452, 1916.
-