

Quercus 及び Castanea 屬樹木の血清學的類縁關係

玄, 信圭
九州大学農學部

香山, 信男
九州大学農學部

<https://doi.org/10.15017/14110>

出版情報 : 九州大学農学部演習林報告. 17, pp.1-87, 1949-06-10. 九州大学農学部附属演習林
バージョン :
権利関係 :

Quercus 及び Castanea 屬樹木の血清學的類縁關係

玄 信 圭

(舊名 香山 信男)

Sinkyu HYUN (Nobuo KŌYAMA): Serodiagnostic Investigation
on the Affinities of Different Species
Genus *Quercus* and Genus *Castanea*

目 次

緒 言	3
研究の歴史	5
I. <i>Quercus</i> 屬に關する研究	10
1. 豫備實驗	10
1) 種子蛋白浸出液の抗原性に關する實驗	10
a. 生理的食鹽水浸出液の蛋白反應	10
b. 生理的食鹽水浸出液内の蛋白含量	12
c. 生理的食鹽水浸出液の免疫原性	12
d. アルカリ液による浸出液の免疫原性	17
2) 種子のタンニン質が抗原性に及ぼす影響	20
a. タンニン質が生體內抗原性に及ぼす影響	22
b. タンニン質が試験管内抗原性に及ぼす影響	26
3) タンニン質除去の化學的處理が抗原性に及ぼす影響	36
a. 化學的タンニン浸出操作を繰返した材料による抗原 の試験管内抗原性	37
b. 化學的操作により純粹に取出した蛋白の試験管内抗 原性	40
4) 發芽處理による <i>Quercus</i> 種子蛋白質の抗原性賦與	44

a.	實驗材料及び注射液調製法	45
b.	免疫法	45
c.	沈降試験	46
5)	發芽處理の種子蛋白の免疫原性に對する意義	48
2.	發芽處理法に依る <i>Quercus</i> 屬樹木の血清學的類縁關係の研究	51
1)	供試樹種	52
2)	免疫原の調製及び免疫法	53
3)	沈降試験	54
a.	抗原液	54
b.	試験法	55
4)	試験結果	56
3.	考察及び結論	59
II.	<i>Castanea</i> 屬に關する研究	66
1.	實驗	66
1)	實驗材料及び其の處理	66
2)	注射用液の調製法	67
3)	免疫法	67
4)	沈降試験用溶液の調製法	68
5)	沈降試験法	69
6)	試験管内飽和吸收法	70
7)	實驗成績	70
a.	無處理血清を以てした沈降反應	70
b.	試験管内飽和吸收血清を以てした沈降反應	72
2.	考察及び結論	74
摘要		76
引用文献		80
Résumé		84

緒 言

從來近代化學の粹を以てしても到底企て得なかつた多數蛋白の異同識別が、近來長足の進歩をして來た血清學により企圖せられ、而も意外な良結果を齎すに至り、單に醫學の方面に多大の貢獻を致したのみならず、この方法により吾人が蛋白質乃至生物の類縁の親疎を推知し得ることとなり、茲に血清學的蛋白質分類法が生物分類の一方便として認められるに至つたことは甚だ興味あることである。

即ち細菌、血球の如き生活體或は蛋白質溶液を動物體内に注射するときは、動物體免疫の理により之を溶解し又は破壊する能力ある一種の物質即ち抗體 (Antibody) を生成し、且つ斯かる抗體は單に動物體内に於て其獨特の作用を逞しくするに止まらず、之を動物體外に取出し、例へば之を含有する血清を取り之を試験管内で其免疫原に作用せしめるときも能く其の能力を發揮し得るもので、之に因り凝集反應 (Agglutination)、沈降反應 (Precipitation)、溶血反應 (Hemolysis)、溶菌反應 (Bacteriolysis) 等の諸免疫反應が現出されるのである。而してこの場合抗體の作用は甚だ特異性を有し、只當該免疫體に對してのみ強く反應し之と異なる物質に對しては反應しないことが一般に認められて居り、この事實こそ吾人が依つて以て蛋白質の異同を識別する根據とする所である。

然し抗體の特異性は常に必ずしも嚴密に發揮せられるものでなく、所謂類屬反應 (Verwandtschaftsreaktion) を有し、即ち A 蛋白質に對する抗血清は A 蛋白質に反應し B 蛋白質には反應しないが、第三者である C 蛋白質とは或程度作用することがある。而して從來の研究成績によれば蛋白質の類縁關係が近い程抗體の示す類屬反應度も強い。故に吾人はこの反應の強弱により蛋白質乃至生物の類縁關係の親疎を推定し得るのである。

併も抗血清が表す反應は甚だ鋭敏で、之によつて蛋白質の微細な差別をも知り得ることは到底普通の化學作用による反應によつては企て及ばぬ所である。故に先進學者は競つてこの微妙な反應を利用して蛋白質又は生物の類縁關係を究めんとし著々としてその成果を收めて來た。

抑々蛋白質は植物體を構成する主要成分であつて、且遺傳因子の擔荷體と考えら

れる以上蛋白質の類似は結局植物の類似を示すものと認められ、従つて血清學的蛋白質識別法を植物分類上の一方便として利用することの不合理でないことが考えられるのである。

而して現今の分類學には血清學的結論も相當加味されてゐるとは雖も先進學者の業績の範圍は未だ植物界の一斑に過ぎないので、當今吾人の急務は其の研究材料を可及的廣く植物界に求め、分類學上に於て未だ血清學的考證無き分野を狭め、その系統を一日も早く整えることにある。

植物分類學上未解決の問題は多々あるが、*Quercus* 屬の分類は樹木分類學上議論の多い問題であるばかりでなく、自然界にはその自然交配による雜種多く併もこれら相互間の親縁關係は從來主として外部形態により論ぜられ、且つ最近細胞學の進歩に伴い Chromosome (染色體) の數、花粉の大きさ、又は花粉の Sterility (不稔性) 等により究明しようとする者もあるが未だ不明な點が少くないのである。

尙又本屬に屬するコルクカシ (*Quercus suber*) は吾人の日常生活上必要不可欠のコルク資材であつて、日本に於ては早くより國產 *Quercus* 屬との接木による増殖が試みられているが、接木活着後 4 乃至 5 年間は生長佳良であるが漸次接木癒着部に於て異常細胞分裂が行われて一種の癌腫を生じ遂に接穂は砧木より離枯死するに至る。而してその原因については未だ不明であるがこれも矢張り接木親和力に關する問題であつて畢竟コルクカシと日本產 *Quercus* との親縁關係の親疎に係るものと推察される。

茲に於て著者はこれら *Quercus* 屬相互間の類縁關係を研究すべく *Quercus* 屬種子の蛋白浸出液を用いて實驗を進めたが、該種子は多量のタンニンを含有し、其の蛋白は化學的及び血清學的に頗る安定であつて抗體を生産し得ないことを知るに至つた。故に著者は斯かる種子蛋白に抗原性を惹起せしめる方法について更に實驗を繼けた所、幸にこれに成功し、其の抗原性賦與法により實驗を進めた結果聊か *Quercus* 屬の類縁關係を血清學的に考究し得たのである。

又 *Castanea* 屬に於いても、1913 及び 1914 年京都府に開催された栗品種協定に於て協定された品種だけでも 46 種に達するが、八木岡新右衛門氏に依れば 67 種を

數え、更に田中諭一郎氏⁽³⁷⁾によれば75種以上に及んでいるのであるが、斯かる多數の品種が如何にして出來たものであるかは暫く措き、斯かる近縁な品種間の異同識別が血清學的蛋白質識別法により果して可能であるか否か、又現在の大果種なるもの、祖先が正しく山野に自生する柴栗であるか否か、將又支那栗及び朝鮮栗と大果種及び柴栗との類縁關係は如何なりや。

本研究はもとより以上の諸問題に斷定を下そうとするものではないが、少くとも之等諸問題の解決に寄與する所あればと、數種代表的大果種と山野に自生する柴栗及び支那栗、朝鮮栗とについてその類縁關係を血清學的に研究してみたのである。

本研究は1943年より1945年に至る間九州大學農學部造林學教室及び同醫學部法醫學教室に於て佐藤敬二教授及び北條春光教授の指導の下に行われたもので、本研究遂行上始終御懇篤な御指導を賜つた兩教授に對し茲に衷心より感謝の意を表すと共に、常に有益な御助言を賜つた瀨瀨理一郎教授、田代歡一助教授及び小島均助教授に深甚の謝意を表する次第である。

尙材料の蒐集に際し多大の便宜と助力とを供せられた農林省林業試験場外山三郎技師、小野陽太郎技師及び朝鮮總督府林業試験場の諸氏に對し感謝の意を表する。

研 究 の 歴 史

植物性蛋白質の種屬特異性を血清學的に研究したのはKowarski氏(1901)⁽¹⁹⁾を以て嚆矢とする。氏は小麥粉を3倍の生理的食鹽水により浸出し、溫浴法によりAlbuminを凝固沈澱せしめたる後の濾過液をAlbumosen溶液として家兔の耳靜脈に8~10 cc宛3~4日おきに6~8週間注射を行つた所が、其の免疫血清は唯小麥のみならず大麥、裸麥の蛋白抽出液に對しても沈降反應を呈し更に豌豆の浸出液に對しても弱度に反應したので植物性蛋白質は動物性蛋白質程は其の特異性が大きくないものと結論した。

1904年Bertarelli氏⁽⁶⁾は豆類蛋白の生理的食鹽水による抽出液の濾過液又はその懸濁液を用い、家兔を免疫しその免疫血清と白大豆、豌豆、匾豆及び莢豆の浸出液との免疫反應の強弱の程度を比較觀察することにより類縁關係を鑑別し得ると主張し

た。

次で 1906 年 Magnus, Friedenthal 兩氏²¹⁾は酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) と松露菌 (*Tuber brumale*) 及びハラタケ (*Agaricus campestris*) の類縁關係を沈降反應により研究し、松露菌に對する抗血清は松露の浸出液のみに反應するが、酵母に對する抗血清は酵母のみならず松露の浸出後とも反應することから、酵母はハラタケよりも松露に近縁で、従つて酵母は *Ascomycetes* と認めることが正當だと説いた。尙同氏等は Kowarski 氏の研究を綿密に追試し豆及び小麥より作つた抗血清に就き其の特異性を立證したのみならず更に裸麥の種子及び花粉を以て夫々免疫血清を作り、之を發芽後 10 日目の裸麥の根及び芽の壓搾液と作用せしめた結果、是等は完全に種屬特異性を有するものであることを證した。而して氏等は是等の結果より植物性蛋白質に對する抗血清の沈降素は動物性蛋白質に於けるよりも一層判然たる特異性を有するものと主張した。

1907 年 Relander 氏³¹⁾も Bertarelli 氏の公表と關連して 2 種の豌豆と 8 種の大麥の亞種とについて沈降反應を検し、これら近縁植物の種及び亞種の類縁關係を沈降反應により證別し得ることを報告した。

1908 年 Gasis 氏⁸⁾は、裸麥、豆及び米の種子粉末を 10% 食鹽水で 24 時間浸出した溶液を透析により鹽分を除去すると共に Globuline を沈澱させて濾過し、その濾液に更にアルコールと稀醋酸とを加えて溶存する蛋白質を沈澱させ、これを濾過し之等蛋白質を蒸溜水、アルコール及びエーテルで順次洗つて精製蛋白質粉末を得、之等の一部は 10% 食鹽水に溶かして皮下に、他は生理的食鹽水に溶かして耳靜脈に 2 日おきに 2 箇月間注射を繼續して免疫し、得た抗血清につき各その種屬特異性を調べた所、植物性蛋白は動物性蛋白よりも血清學的檢索により劃然と鑑別し得るとの結論に至つた。

然るに一方 Magnus 氏 (1909)²³⁾は Gasis 氏の蛋白調製法に於て蛋白質が化學反應により變質されることを沈降反應により實驗的に立證し、又 Wedelstadt, Fellmer 兩氏 (1910)⁴²⁾も化學反應による變質を疑い Gasis 氏と反對に豆類の種實を生理的食鹽水中に一晝夜浸漬した後これを乳鉢内で摺り潰し濾過した溶液を家兎の膜腔内に注

射して免疫血清を得、沈降反應、過敏症反應及び補體結合反應に依り豆類、麥類及び玉蜀黍の種屬特異性を檢し且つその類縁關係を明かにした。但し氏等は免疫に際し多數の動物が注射個所に膿瘡を起して死んだことを報じている。尙氏等は葉の浸出液に依る家兎の免疫を試みて不成功であつたが、蠶豆の種實の浸出液に依る抗血清は同植物の葉の浸出液とも反應することを實驗した。

1907年既に Magnus, Friedenthal 兩氏 (1907)²²⁾ は植物の種子、花粉、莖及び根の蛋白が同一であるか否かに就き血清學的に研究し、種子又は花粉の蛋白浸出液を以て免疫した抗血清は種子又は花粉は勿論根及び葉の蛋白浸出液とも反應することを報じたが、一方 Dunbar W. P. 氏 (1910)²³⁾ は Magnus, Friedenthal 兩氏の研究を追試し、高等植物の花粉蛋白によつては沈降素血清が得られないこと、且つ花粉蛋白は植物の他部分の蛋白と血清學的に性質を異にすることを説いた。然し Magnus, Friedenthal 兩氏はこの問題に對する解答を與えるために彼等の研究を繰返し追試し、1907年に公表したのと同じの結果を得たことを報ずると共に尙乾腊植物が兔免疫の材料になり得るか否かを試験し、乾燥種子の蛋白質は抗原性強く損傷され免疫體を生産し得なかつた結果に依り、Dunbar 氏が氏等の研究と反對の結果を得たのは、氏等が新鮮な花粉を使用したのに對し Dunbar 氏は乾燥花粉を免疫用に供したことに因るものと論じた。

K. Sturm 氏 (1910)²⁴⁾ は *Adoxa* と *Sambucus* との類縁關係を沈降反應により證明せんとしたが免疫材料が充分でなかつたため殆ど成績を得る事が出来なかつたことを報じ、植物性抗原による免疫實驗は容易でないことを論じた。

なほ Lake, Osborn, Wells 三氏 (1906)²⁵⁾ は穀類に就て沈降反應を檢し、家兎を短時日間に免疫して得た血清に於ては比較的嚴密な特異性沈降素を得るが、長期間頻回數の免疫を行うときは類屬反應の強い免疫血清を得ることを實驗した。

Uhlenhuth, Jüng 兩氏 (1905)⁴¹⁾ は罌粟、大麻及び巴且杏の種子蛋白を以て沈降素血清を作り之により檢索し、罌粟及び大麻は之を鑑列し得たが、甘味巴且杏と苦味巴且杏とはこれを區別し得なかつたことを報じた。

1910年 Azuma, T. 氏⁴⁾ は米麥及び豆類の種子並に胚の浸出液を用いて研究し、胚

の浸出液によつても沈降素の生産が可能であることを證明した。

1913年 Mez, Gohlke, 兩氏²⁵⁾は被子植物を材料とし沈降反應及び凝集反應により其等の類縁關係を研究分類し、Gohlke 氏 (1915)⁹⁾は沈降反應、補體結合反應、過敏症反應により之を追證した。樹木に關する血清學的類縁關係の研究は實に氏等の研究を以て嚆矢とする。

1914年 Zade 氏⁴³⁾は5種の荳科植物及び小麥の各種間の差異を沈降反應により明かにし、血清學的に之を分類した。次いで 1915年 Thöni, Thysen 兩氏³⁹⁾は裸麥、小麥及び大麥について其の蛋白浸出液に硫酸アンモニアを加えて部分的 Fraction を得、之を以て免疫をなすときは全蛋白質を以てするよりも優れた特異性を有する沈降素血清を得ると報じた。

1917年 纈纈氏¹⁷⁾は裸子植物及び被子植物に就て、又小島氏 (1921年)¹⁶⁾は裸子植物及び双子葉植物に就て其等の類縁關係を血清學的に研究し、兩氏共種子の蛋白質浸出液を以て行つた血清學的類縁反應は現今の植物分類學の所説と大體に於て一致することを結論した。而して纈纈氏は種子浸出液が何れも正常家兎血清とも著しく沈降反應を呈する事を見、該液を以て沈降反應を行おうとするときは豫め正常家兎血清によつて吸収した後使用しなければならないことを主張し、斯くの如く前處理を施した種子浸出液を利用して行方方法を沈降反應變法と名づけた。

1922年 比企氏¹⁰⁾は Thöni, Thaysen 兩氏の方法に従い大豆の蛋白質で實驗し比較的高度の特異性を有する沈降素血清を得たことを報じた。

Baldwin, Fred, Hastings 三氏 (1927)⁶⁾は荳科植物 21種について、又小松原氏 (1922)¹⁸⁾は 14種の荳科植物について夫々其の特異性を追究し、氏等は荳科植物の血清學的類縁關係は根瘤菌の寄生力と一致することを見た。

1928年 加藤及び丸山兩氏¹⁴⁾は稻の各種類について研究し、無處理抗血清では識別し得ないが、生體內飽和吸收法を用うるときは或程度迄之を鑑別し得ると結論した。

又増田氏 (1930)²⁴⁾は粳米と糯米とは補體結合反應を以てするとき、蛋白質に於ては之を鑑別し得ないが其の澱粉に於ては之を鑑別し得ると報告した。然るに尾山氏 (1932)²⁹⁾は粳米と糯米との血清學的比較研究をなすに當り上記の増田氏の實驗を追試

すると共に更に粳米及び糯米に就いて異種抗原性の有無を検索した結果、粳米と糯米とは其の類脂體に於て著明な差異を有し、兩者の種屬特異性は、増田氏の言う如く澱粉によつて存在するものでなくて、類脂體によつて存在するものであると結論した。

1931年北條氏¹¹⁾は蔬菜類の葉の壓搾液及び葉綠素を用い經膚免疫による血清學的研究を行い、葉の壓搾汁液を以てした經膚免疫によつては強い抗體を得、アブラナ、大根、甘藍、菠薐草及びチンヤ間の類縁關係は勿論、アブラナの品種間の鑑別をも可能なことを明かにし得たが葉綠素を以てしては經膚及び注射の何れの方法に依るも殆んど抗體を生産し得なかつた事實を報告した。

尙又青木氏(1941)¹¹⁾は數種の樹木及び草木の花粉の加重曹食鹽水による浸出液により過敏症反應を起し得、且つ植物分類學上極めて近接せる種の花粉間には緊密な類縁關係を認め得ることを證し、更に1941年にはハンノキ及び赤松の花粉浸出液により沈降素血清をも得たことを報じた²⁾。

又 Moritz 氏³²⁾は非常に綿密な方法により *Larix europaea* と *Larix leptolepis* とを區別することが出來又 *Berberis empetrifolia* と *B. darwinii* との雜種を血清學的にその兩親より區別することが出來たと報じている。

又今井氏(1932)¹²⁾は銀杏種子の澱粉、類脂肪體及び蛋白質について補體結合反應により研究し之等の單獨免疫により各抗體を生産することを得ると共に、各抗體、抗原間には夫々獨立した特異性が存することを確認した。

尙又近時足立氏(1936)³⁾は葫蘆科、荳科、禾本科及び裸子植物の各種の種子の蛋白質を0.1%の割合に苛性ソーダを加えた生理的食鹽水で浸出し、其の免疫學的性狀を検した結果、之等で家兎を免疫すると特異沈降素を生産すると同時に類屬反應を呈し、其の程度は植物分類學上の近親度と概ね並行することを報ずると共に、近親關係の特に密接な各種に於ける種屬特異性に關しては、其の大多數に於ては In vitro の飽和吸收法に依り鑑別し得るが、近親度の頗る緊密な數種に於ては更に進んで In vivo の飽和吸收法により初めて鑑別し得ることを報じた。

以上諸研究者の研究成績を通觀すると、各其の研究材料及び免疫方法の相違によ

ゞ其の得た抗體の特異性は一樣でない様に見えるが、然し一般に植物蛋白質の生理的食鹽水又は弱アルカリ液による浸出液は容易に免疫體を生産し得、且つ其の免疫血清は種屬特異性を有すると共に類屬反應を示し、併もその類屬反應の強弱は現今行われている植物分類學上の親縁度と大體に於て一致する點に於ては總て同様であるようである。

I. Quercus 屬に關する研究

1. 豫備實驗

Quercus 屬を以て血清學的研究をなすに當り、著者は蛋白質浸出材料として蛋白質含量最も大なる種子を用い、且その蛋白質浸出法としては從來の研究者により通用され來つた生理的食鹽水及び弱アルカリ液によることとして實驗を進めたが之等の浸出液を以てしては遂に抗體を生産し得なかつた。故に著者はその原因が *Quercus* 屬種子の含有する過多のタンニン質に由來するものであらうと推察し、*Quercus* 屬樹木のタンニン質が抗原性に及ぼす影響について試験し、該タンニン質は蛋白の試験管内抗原性は或程度之を抑制しても、生體內抗原性は毫も之を損傷しない事實を明かにした。従つて *Quercus* 屬樹木種子内の貯藏蛋白は元來抗原性を缺ぐとの結論に達したのである。

然るに著者は更に該種子蛋白に抗原性を賦與せしめる處理法について考究し、種子の發芽處理が種子は貯藏蛋白の變形と共に抗原性を獲得せしめる事實を明かにし、従つて發芽處理による抗原性賦與法を用いて *Quercus* 屬の血清學的類縁關係を研究した。以下豫備實驗の經過を記す。

1) 種子蛋白浸出液の抗原性に關する實驗

a. 生理的食鹽水浸出液の蛋白反應

コナラ (*Quercus serrata*)、カシワ (*Quercus dentata*) 及びアラカシ (*Quercus (Cyclobalanopsis) glauca*) の前年度成熟種子(採種後地中に埋藏)を用い其の外皮及び内皮を取除き、乳鉢内で摺り潰し、これに10倍量の生理的食鹽水を加えた後時々振盪しつ

一晝夜靜置後、遠心分離により得た上澄液について其の蛋白の反應及び其の含有度を調べた。この際浸出液は何れも悉く淡黃褐色、且つ酸性を呈した。

(1) 呈色反應

Biuret 反應、Xanthoprotein 反應、Millon 氏反應等による呈色反應を試みた所、何れも不鮮明ながら呈色反應を示した。然るに比較の目的で調製した日本藥局方タンニン酸の 0.1% 水溶液及び上記のヨナラ浸出液に Albumin を溶かした溶液も矢張り類似反應を示し、タンニン質の存在する限り呈色反應により蛋白質の存否を確知することは不可能なことを知つた(第 1 表參照)。

(2) 沈澱反應

上記食鹽水浸出液に硝酸、アルコール、硫酸アムモニア及びエスバツハ試藥等の蛋白沈澱劑を加えても沈澱物を生ぜず且又之等を煮沸しても何等凝固沈澱物を生じなかつた(第 1 表)。然るに比較の目的で同じ食鹽水浸出液に少量の Albumin を加えて溶かした溶液は上記の諸沈澱劑により沈澱を生じ且つ加熱により凝固沈澱物を生じた。故に蛋白沈澱劑並に加熱によつては浸出液内の蛋白の存在を認め得ないと言える。

(3) リトマス紙による檢出

上記食鹽水浸出液少量を試験管内に採り、之に少量のソーダ石灰を落した後之を

第 1 表 *Quercus* 屬種子の生理的食鹽水浸出液の蛋白反應

供試液	反應	生理的食鹽水による浸出液			タンニン酸溶液 (0.1%)	ヨナラ浸出液に Albumin を溶かした液
		コナラ	カシハ	アラカシ		
呈色反應	Biuret 反應	+	+	+	+	+
	Xanthoprotein 反應	+	+	+	+	+
	Millon 氏 反應	+	+	+	+	++
沈澱反應	硝酸による沈澱	-	-	-	-	++
	アルコールによる沈澱	-	-	-	-	++
	硫酸アムモニアによる沈澱	-	-	-	-	++
	Esbach 試藥液による沈澱	-	-	-	-	++
熱による凝固	-	-	-	-	++	
リトマス紙による檢出	+	+	+	-	++	
鹽化第二鐵による呈色	濃藍	濃藍	濃藍	濃藍	濃藍	

熱し、發生する瓦斯に赤色リトマス紙を當てた所、青變した(第1表)。これは即ち浸出液内の蛋白質の分解により生ずるアムモニア瓦斯に由來する現象であつて、即ち浸出液内に蛋白質の溶存する事を證明するものである。

b. 生理的食鹽水浸出液内の蛋白含量

以上の實驗に於て、*Quercus* 屬種子の生理的食鹽水浸出液内の蛋白質の存在は、沈澱反應によるときは疑わしいが、リトマス紙による検出によれば之を明かに證し得るから、浸出液内の蛋白質の有無及び其の含有度をより精密に確める目的で浸出液内の蛋白質の定量分析を行つた。即ちクヌギ(*Quercus acutissima*)、アベマキ(*Quercus variabilis*)、ナラガシワ(*Quercus aliena*)及びコナラ(*Quercus serrata*)の新鮮種子を用い上記と全く同様に、各種子の生理的食鹽水による10倍浸出液を調製し各種子粉末及び浸出液内の粗蛋白質含量を Kjeldall 法により又その純蛋白質含量を Barnstein 氏法により、何れも Semi-Micro-Kjeldall の装置を用いて精密に定量した結果、種子粉末には6%内外の粗蛋白質、4%内外の純蛋白質を含有し、その10倍生理的食鹽水浸出液内にも0.10乃至0.23%の粗蛋白質、0.03乃至0.07%の純蛋白質が溶存する事實を確めた(第2表参照)。

第2表 *Quercus* 屬種子粉末及其生理的食鹽水浸出液の蛋白含量

區分 樹種	粗蛋白質含量 (%)		純蛋白質含量 (%)	
	種子粉末	10倍生理的食鹽水浸出液	種子粉末	10倍生理的食鹽水浸出液
クヌギ	6.43	0.20	4.76	0.07
アベマキ	5.67	0.10	4.41	0.03
ナラガシワ	6.60	0.23	—	—
コナラ	5.57	0.10	4.20	0.03

c. 生理的食鹽水浸出液の免疫原性

以上により *Quercus* 屬種子の生理的食鹽水浸出液には明かに可溶性蛋白質が溶存する事實が確められたので、該浸出液を以て常法による免疫試験を行うことにした。

(1) 免疫原の調製

クヌギ、アベマキ、コナラ、カシワ及びアラカシの各新鮮種子の種皮を取去り乳鉢で摺り潰し、これに各5倍量の醋酸エーテルを加えて約5時間時々振盪しつゝ

ニン分を浸出し、醋酸エーテルを除去し尙扇風機で醋酸エーテルを完全に揮發せしめて褐色の種子粉末を得た。該種子粉末各 5 g に 25 cc 宛の生理的食鹽水を加え時々振盪して一夜室内で浸出をなし、翌朝その上澄液を遠心分離器にかけて透明な液を得之を注射用に供した。而して斯くして得た注射用液は何れも茶色の透明液であつて弱酸性を示し、鹽化第三鐵により濃藍色を呈した。而して何れの浸出液に於ても早色反應及び沈澱反應によつては蛋白を検出し得なかつたが、リトマス紙による檢出法で明かに蛋白を検出し得た。尙注射液は注射の都度新しく調製し、苛性ソーダにより反應を中性にして使用した。

(2) 免疫法

2 kg 内外の健康家兔を選定し各樹種の注射液を以て各 5 匹宛の家兔について注射を行つた。注射は耳靜脈に 5 cc 宛 2 日おきに 5 乃至 6 回繼續したが、注射液内のタンニン質により注射に使用した耳靜脈が固化したため同一靜脈に 2 回以上注射を繰返すことが出來ず毎回靜脈を變えて注射した。最後の注射日より 7 日目に試驛採血をなし沈降素價を調べたが、何れに於ても抗體の生産を認め得なかつたため更に上記の注射液各 10 cc 宛を腹腔内に 2 日おきに 4 回注射を行い、最後の注射日より 7 日目に全採血をし常法により血清を分離した。但し免疫期間中家兔の體重は悉く減じた。

(3) 試験法及び試験成績

以上の様にして得た血清について Ringprobe により夫々沈降素價を調べた。即ち免疫血清 0.1 cc 宛を毛細試験管に入れて臺上に並べ、其の上より注射用液と全く同様にして調製した各種子の浸出液 (5 倍浸出液) を原液としこれに生理的食鹽水を加えて逐次 2 倍に稀釋した 1 列の溶液 0.2 cc 宛を靜かに添加し兩者の中間に生ずる沈澱の有無を調べた。尙この際對照として正常家兔血清にも同時に浸出液を重ねると共に免疫血清に生理的食鹽水を重ねた場合の反應をも檢した。而して反應度の比較は試験液重層後 2 時間後に於ける反應の現われ得る最大限度の稀釋度數に由ることにした。尙同一試験に必ず 2 回繰返し常にその結果の一致する事を認めたのである。扱て今その試験成績を見ると、何れの樹種の種子浸出液も總ての抗血清に對し 160

倍の稀釋度迄明かに反應を現すと共に 正常家兔血清に對しても同一程度に反應した (第3表 A 參照)。

第 3 表 *Quercus* 屬種子生理的食鹽水浸出液による免疫血清の沈降反應

		A 正常血清に依る吸收前								
免疫血清番號	抗 原	クヌギ浸出液の稀釋倍數								生 理 的 水
		5	10	20	40	80	160	320	640	
抗クヌギ血清	1	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	2	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	3	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
	4	+++	++	++	++	+	+	-	-	-
	5	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	正常血清	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
アベマキ浸出液の稀釋倍數										
抗アベマキ血清	6	免疫中斃死								
	7	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	8	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	9	免疫中斃死								
	10	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	正常血清	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
コナラ浸出液の稀釋倍數										
抗コナラ血清	11	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	12	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	13	免疫中斃死								
	14	+++	++	++	+	++	+	-	-	-
	15	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	正常血清	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
カシワ浸出液の稀釋倍數										
抗カシワ血清	16	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	17	免疫中斃死								
	18	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	19	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	20	+++	++	++	+	+	+	-	-	-
	正常血清	+++	++	++	+	+	+	-	-	-

アラカシ浸出液の稀釋倍數

		アラカシ浸出液の稀釋倍數								
抗 ア ラ カ シ	21	卅	卅	卅	+	+	+	-	-	-
	22	卅	卅	卅	+	+	+	-	-	-
	23	卅	卅	卅	+	+	+	-	-	-
	24	免疫中斃死								
	25	卅	卅	卅	+	+	+	-	-	-
正常血清		卅	卅	卅	+	+	+	-	-	-

・斯く植物種子浸出液が比較的稀釋なる濃度に至る迄正常家兎血清と反應し沈降反應に彷彿した沈澱現象を起す點については古くより Bertarelli (1904)⁶⁾、Wedelstadt、Fellmer (1910)⁴²⁾ 及び Kōketsu (1917)¹⁷⁾ 氏等が注意している所であるが、本試験に於ける正常家兎血清に對する偽沈降反應は浸出液内のタンニン質の血清蛋白凝固作用に由るものと解されたので、著者は Kōketsu 氏の提唱した沈降反應變法に従い豫め種子浸出液を正常家兎血清により飽和吸収した後試験用に供することにした。即ち種子浸出液の原液に同量の正常家兎血清を加えよく混和し、孵卵器内に1時間置いた其沈澱物を遠心器により除去したものを基本液とし、之を逐次2倍に稀釋した一列の溶液を試験に供した。然るに其結果は何れの樹種の種子浸出液も免疫血清及び正常血清に對し全く反應陰性であつた(第3表B参照)。

B 正常血清による吸収後

抗 原	クヌギ浸出液の稀釋倍數								生理的 食鹽水
	5	10	20	40	80	160	320	640	
免疫血清番號									
抗 ク ヌ ギ 血 清	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
正常血清		-	-	-	-	-	-	-	-

アベマキ浸出液の稀釋

抗アベマキ血清	6.	免	疫	中	斃	死	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	免	疫	中	斃	死	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
正常血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
コナラ浸出液の稀釋														
抗コナラ血清	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	13	免	疫	中	斃	死	-	-	-	-	-	-	-	-
	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
正常血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
カシワ浸出液の稀釋														
抗カシワ血清	16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	17	免	疫	中	斃	死	-	-	-	-	-	-	-	-
	18	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	19	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	20	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
正常血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
アラカシ浸出液の稀釋														
抗アラカシ血清	21	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	24	免	疫	中	斃	死	-	-	-	-	-	-	-	-
	25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
正常血清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

以上の事實より觀れば、正常血清により吸收處理を施す以前の種子浸出液が免疫血清となす反應は浸出液内のタンニン質の血清蛋白凝固作用に因る偽沈降反應と認むべきか、或は以上の免疫血清には沈降素が生産して居ないことを示すものかと解

すべきである。

d. アルカリ液による浸出液の免疫原性

(1) 免疫原の調製

クヌギ、アベマキ、コナラ、カシワ及びアラカシの新鮮種子を用い、c に於けると全く同様にして調製した乾燥種子粉末 5g を採り、之に 0.2% NaOH 液(生理的食鹽水で調製した。以下常に同様) 2.5 cc を加え時々振盪して一夜室内に置いて浸出し、翌朝遠心分離により沈澱物を除去して上澄液を得た。斯うして得た浸出液は何れも紅色乃至暗褐色の透明液であつて弱アルカリ性を示すと共に鹽化第二鐵により濃藍色を呈したが、Biuret 反應、Xanthoprotein 反應、Millon 氏反應等の呈色反應、硝酸、アルコール、硫酸アムモニア、エスバツハ試薬液等による沈澱反應及びリトマス紙による檢出等の蛋白檢出反應何れも陽性を示して、エスバツハ氏 Albumimeter の示す蛋白含量は 0.2% 内外であつた。而して注射に際し浸出液の反應を醋酸により中性にすると共に 37°C に温めて使用した。

(2) 免疫法

重量 2 kg 内外の健康家兎 25 匹を準備し各樹種に對し各 5 匹宛の家兎を用いて免疫を行つた。即ち上記各樹種の種子浸出液を 5 cc 宛 2 日おきに 2 回耳靜脈に注射を繼續したが、何れの家兎も總て使用耳靜脈が固化すると共に耳全體が腫れて炎症を起し注射の繼續が不能となつたため、第 3 回目よりは各浸出液 10 cc 宛を腹腔内に 2 日おきに 3 回注射を繼續した。而して最後の注射日より 7 日目に試験採血をなし沈降素價を調べた所全く反應が陰性であつたため、更に腹腔内注射を 5 回繼續し最後の注射日より 7 日目に全採血をなし常法により血清を分離した。この場合免疫中動物の體重は悉く減少を示し且つ數匹は免疫の途中死亡したが死亡の原因は何れも注射の誤ちによる内臓の刺傷に原因したものであつた。

(3) 試験法及び試験成績

斯くして得た免疫血清に、注射用液と全く同様にして調製した抗原液(種子粉末: 0.2% NaOH 液=1:5、醋酸により反應を中性にする。蛋白含有度は各浸出液共 0.1%)を原液として之を逐次 2 倍に稀釋した液を重ね Ringprobe により前同様にして

沈降試験を行つた。其結果を見るに、何れの抗血清に於ても各其の免疫原に對し 80 倍稀釋度迄反應を呈したが、同時に正常家兔血清に對しても同程度に反應を示した(第 4 表、A 參照)。故に抗原液を同量の正常血清により飽和吸收せしめた後各夫々の免疫血清に重ねた所、何れに於ても全く反應は陰性であつた(第 4 表 B 表參照)。

第 4 表 *Quercus* 屬種子アルカリ浸出液に對する免疫血清の沈降反應

A 正常血清による吸收前

免 疫 血 清 番 號	抗 原	クヌギのアルカリ浸出液の稀釋								生 理 的 食 鹽 水
		5	10	20	40	80	160	320	640	
抗 ク ヌ ギ 血 清	26	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	27	免	疫	中	斃	死				
	28	免	疫	中	斃	死				
	29	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	30	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	正 常 血 清	++	++	+	+	+	-	-	-	-
アベマキのアルカリ浸出液の稀釋										
抗 ア ベ マ キ 血 清	31	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	32	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	33	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	34	免	疫	中	斃	死				
	35	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	正 常 血 清	++	++	++	+	+	-	-	-	-
コナラのアルカリ浸出液の稀釋										
抗 コ ナ ラ 血 清	36	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	37	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	38	++	++	+	+	+	-	-	-	-
	39	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	40	++	++	++	+	+	-	-	-	-
	正 常 血 清	++	++	++	+	+	-	-	-	-

コナラのアルカリ浸出液の稀釋

抗 コ ナ ラ 血 清	36	-	-	-	-	-	-	-	-
	37	-	-	-	-	-	-	-	-
	38	-	-	-	-	-	-	-	-
	39	-	-	-	-	-	-	-	-
	40	-	-	-	-	-	-	-	-
正 常 血 清	-	-	-	-	-	-	-	-	-

カシワのアルカリ浸出液の稀釋

抗 カ シ ワ 血 清	41	免疫中斃死							
	42	-	-	-	-	-	-	-	-
	43	免疫中斃死							
	44	-	-	-	-	-	-	-	-
	45	-	-	-	-	-	-	-	-
正 常 血 清	-	-	-	-	-	-	-	-	-

アラカシのアルカリ浸出液の稀釋

抗 ア ラ カ シ 血 清	46	-	-	-	-	-	-	-	-
	47	-	-	-	-	-	-	-	-
	48	-	-	-	-	-	-	-	-
	49	免疫中斃死							
	50	-	-	-	-	-	-	-	-
正 常 血 清	-	-	-	-	-	-	-	-	-

即ち以上の實驗結果により弱アルカリ液による *Quercus* 屬種子浸出液を以てしても生理的食鹽水浸出液による場合と同様免疫體を生産し得ないことが結論された。

2) 種子のタンニン質が抵原性に及ぼす影響

以上實驗 1.) により、*Quercus* 屬種子の生理的食鹽水及び弱アルカリ液による浸出液を以てしては免疫現象を認め得ないことが判明されたが、今其の原因としては次記の二つの場合が想像される。

a) *Quercus* 屬種子内の貯藏蛋白が元來抗原性を缺ぐため抗體を生産し得ない場合。

1.) a. に於て實驗した如く、*Quercus* 屬種子の生理的食鹽水浸出液中には可成りの可溶性純蛋白質が溶存して居るにも拘らず、鑛酸、アルコール及び中性鹽等の一般蛋白質沈澱劑によつては全然沈澱を生じないと共に熱によつても凝固されなかつた諸事實は、該浸出液内の蛋白は化學的に頗る安定であつて一般蛋白質とは性質を異にすることを示すものと解され、従つて血清化學的にも頗る安定で免疫體構成作用に關與するところでないものと推察される。

b) *Quercus* 屬種子蛋白は元來抗原性を有するが浸出液内のタンニン質が其の抗原性に悪影響を及ぼす結果抗體を生産し得ない場合。

今 *Quercus* 屬種子の蛋白含量とタンニン含量との割合を見るに(第5表)、其のタンニン含量は純蛋白質含量の一倍半以上であつて、過剰のタンニンを含有して居ることが知られる。従つてその浸出液中には多量のタンニンを含有し、その生理的食鹽水による5倍浸出液に於てすら約0.3%のタンニン含有度を示した。(新鮮シラカシ *Q. myrsinaefolia* 種子粉末5gに25ccの生理的食鹽水を加え一夜浸出した液は鹽化第二鐵溶液に對し、0.3%のタンニン酸溶液と同一程度に呈色した。)

第5表 *Quercus* 屬種子の蛋白及びタンニン含有量の比

區別		純蛋白質 (%)	タンニン (%)	タンニン 純蛋白質
樹種				
ク	ヌギ	4.77	7.22 ⁽¹⁾	1.51
ア	ベマキ	4.42	7.14 ⁽¹⁾	1.62
コ	ナラ	4.20 ⁽²⁾	6.65 ⁽²⁾	1.58

(1) : 野崎氏²⁶⁾の分析成績 (2) : 岩田氏¹³⁾の分析成績

而してタンニン質は蛋白質を凝固せしめる作用が著しいものであるから、*Quercus* 屬種子蛋白は元來抗原性を有して居ても、浸出液内の過剰のタンニンが蛋白の血清化學的作用に悪影響を及ぼす結果免疫體が生産され得ないか、或いは血清内に免疫體は生産して居ても、浸出液内のタンニンが試験管内に於ける免疫反應の出現を妨

害するかの何れかの理由により免疫反應が現れない場合が想像され得る。

茲に於て著者は以上二者の場合の何れが眞なるかを明かにしようとして、先づ後者の場合の可能性について實驗する爲に、明かに抗原性を有すると認められて居る栗の浸出液及び卵白溶液に *Quercus* 屬種子のタンニン質又は藥局方タンニン酸を加えたもので家兎を免疫して、先づ蛋白の抗體生産能に及ぼすタンニンの影響を調べることにした。

a. タンニン質が生体内抗原性に及ぼす影響

(1) 實驗材料及び免疫原

a) クリ蛋白液にタンニンを加えた免疫原

前年度成熟の新鮮ヘイジョウグリ (*Castania bungeana*) 種子の種皮を取り去り、乳鉢で摺り潰し、これに脱脂の目的で約 5 倍量の石油エーテルを加えて時々振盪しつゝ 3 時間室内に置いた後、石油エーテルを除去揮發せしめて得た乾燥粉末 5g に 5 倍量の *Quercus* 種子タンニン液(新鮮シラカシ *Q. myrsinaefolia* 種子粉末を 5 倍の生理的食鹽水で一晝夜浸出を行つた液、茶褐色、透明、PH 4.0、鹽化第 2 鐵により濃藍色を呈する。)を加え一夜氷室内に置いてタンニン質をクリ粉末に充分作用せしめた後、翌朝これに 0.4% NaOH (生理的食鹽水にて調製) 15 cc を加えて液をアルカリ性にするによつてアルカリ可溶のクリ蛋白の浸出を促し、3 時間静置後遠心分離により上澄液を得、之を免疫原に使用した。而して本液は栗色、半透明、微アルカリ性を呈し、エスバツハ氏の Albumimeter により約 0.2% の蛋白含有度を示し且つ鹽化第 2 鐵により著しく濃藍色を呈した。尙この際對照免疫原としてタンニンを作用せしめないヘイジョウグリの脱脂粉末 5g に生理的食鹽水 40 cc を加え 3 時間浸出後、遠心分離により得た上澄液を用い免疫を行つた。而して本液は白色透明、微酸性、エスバツハ氏 Albumimeter により 0.35% の蛋白含有度を示した。

b) 卵白溶液にタンニンを加えた免疫原

シラカシ種子の 5 倍生理的食鹽水浸出液が約 0.3% のタンニン酸含有度を示した事實に鑑み、新鮮卵白の生理的食鹽水溶液に 0.3% の割合にタンニン酸を加えた液

と、その10倍即ち3%の割合にタンニン酸を加へた液との2種の卵白液を調製し免疫原として使用した。

即ち前者は卵白3ccに日本薬局方タンニン酸の0.3%液(生理的食鹽水にて調製)30ccを加え一夜氷室内に置きタンニン酸が卵白に充分作用した後、1%NaOH(生理的食鹽水にて調製)數滴を落して溶液を中性にすると共にタンニン酸により一旦凝固した卵白の大部分を再び溶解せしめ、遠心分離により得た上澄液を用い、而して後者は0.3%タンニン酸液の代りに3%タンニン酸液(生理的食鹽水にて調製)を用いる外、前者に於けると全く同様にして得た液を用いた。但し前者の調製液は暗綠色の不透明液であつて、反應中性、鹽化第2鐵に對し濃青色を呈し、エスバツハ氏Albumimeterの示す蛋白含量は0.5%であるに對し、後者の調製液は暗栗色、不透明、反應中性、鹽化第2鐵に對し濃青色を呈し、エスバツハ氏Albumimeterの示す蛋白含有度は0.06%であつた。

尙この際對照免疫原として、新鮮卵白を10倍の生理的食鹽水で溶かした液(白色透明、蛋白含有度0.7%)を用いた。

(2) 免疫法

以上の各免疫原に對し重量2kg内外の健康家兎各4匹宛を用い、以上の如くして調製した免疫原を注射の都度新しく調製して用いた。

即ち家兎番號No.51よりNo.54迄はクリ蛋白液にタンニンを加えた免疫原(以下「クリ+タンニン」免疫原と略稱)によつて、No.55よりNo.58迄はクリの對照免疫原(以下クリ免疫原と略稱)により、又No.59よりNo.62迄は卵白溶液に0.3%の割合にタンニン酸を加えた免疫原(以下「卵白+0.3%タンニン酸」免疫原と略稱)により、No.63よりNo.66迄は卵白溶液に3%の割合にタンニン酸を加えた免疫原(以下「卵白+3%タンニン酸」免疫原と略稱)により、尙No.67よりNo.70迄は卵白の對照免疫原(以下卵白免疫原と略稱)によつて免疫することにし、夫々一回に5cc宛耳靜脈に2日おきに6回注射を繼續した。この際タンニン酸を加えた免疫原で注射した家兎は悉く注射に使用した耳靜脈が固化したため注射の度毎に使用靜脈を變えたが、「卵白+3%タンニン酸」免疫原で注射した家兎は初回の注射により耳部が腫

れ炎症を起したので第 2 回よりは腹腔内に 10 cc 宛注射することにした。而して最後の注射日より 7 日目に全採血をなし常法により血清を分離した。

(3) 試験法及び試験成績

a) 「クリ+タンニン」免疫原により免疫した場合

以上に於て得た抗「クリ+タンニン」血清及び抗クリ血清に夫々クリの 10 倍生理的食鹽水浸出液(エーテルで脱脂したヘイジョウグリ粉末に 10 倍の生理的食鹽水を加え一夜氷室内で浸出後、遠心分離により得た上澄液、白色透明、PH 6.0、エネバツハ氏 Albumimeter の示す蛋白含有度 0.3%) を原液としこれを逐次 2 倍に稀めた一列の稀釋液を重ね、前同様 Ringprobe により沈降反應を検した。然るにクリ免疫原に對する抗血清に於ては 800 倍液迄反應陽性であつたが、「クリ+タンニン」免疫原に對する抗血清に於ては更に高く 1600 倍乃至 3200 倍液まで反應を呈した。但しこの際正常家兎血清に於ても 20 倍液迄反應を示したのである(第 6 表參照)。

第 6 表 抗「クリ+タンニン」血清及び抗クリ血清の沈降素價

抗 原	稀釋 倍數	ヘイジョウグリの生理的食鹽水浸出液										
		10	20	40	80	100	200	400	800	1600	3200	6400
蛋白 含量 %		0.3000	0.1500	0.0750	0.0375	0.0300	0.0150	0.0075	0.0038	0.0019	0.0010	0.0005-
抗血清番號												
抗「 クリ + タン ニ ン」 血 清	51	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	-
	52	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	-
	53	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	-
	54	+++	+++	++	++	++	++	++	++	+	+	-
抗 ク リ 血 清	55	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	56	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	57	+++	+++	++	++	++	++	+	+	-	-	-
	58	+++	+++	++	++	++	+	+	+	-	-	-
正 常 血 清		+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-

さて以上の結果の示す如く抗「クリ+タンニン」血清が抗クリ血清よりも沈降素價の高い事實は、*Quercus* 種子浸出液が含有する程度のタンニンは蛋白の生体内抗原

に作用せしめて次の6種の抗原を調製した。

a 抗原：ヘイジョウグリの10倍生理的食鹽水浸出液(蛋白含有度0.3%)に同量の *Quercus* 種子タンニン液(前記同様調製したシラカシ種子タンニン液、タンニン含有度約0.3%)を加え凝固沈澱したクリ蛋白の沈澱を遠心分離により除去した上澄液(蛋白含量0)。

b 抗原：a 抗原を同量の正常家兎血清を以て飽和吸収した液。

c 抗原：ヘイジョウグリの10倍生理的食鹽水浸出液(蛋白含有度0.3%)に同量の *Quercus* 種子タンニン液を加えて一旦蛋白を凝固せしめた後これに同量の正常家兎血清を加えて再び凝固蛋白を溶かした液(この際添加正常血清量が少いときは浸出液内のタンニンにより血清蛋白が却つて凝固されるが、添加血清量がタンニン量に比して多量なときは一旦凝固された蛋白は悉く完全に溶解された)。

d 抗原：ヘイジョウグリの10倍生理的食鹽水浸出液に同量の *Quercus* タンニン液を加えてクリ蛋白を悉く凝固沈澱せしめ、この凝固蛋白を遠心分離により取り出し、これに元浸出液と同量の液0.1% NaOH 液(生理的食鹽水で調製)を加えて再び溶解せしめた液(微アルカリ性、蛋白含有度0.3%)。

e 抗原：ヘイジョウグリの10倍生理的食鹽水浸出液に同量の *Quercus* 種子タンニン液を加えて一旦クリ蛋白を悉く凝固せしめた後これに5% NaOH 液數滴を落して溶液の反應を中性にすると共に凝固蛋白を完全に溶解せしめた液(蛋白含有度0.15%)

f 抗原：e 抗原を同量の正常血清で飽和吸収せしめた液

沈降試験——以上6種の抗原を生理的食鹽水で1—2—4—8—10—20の稀釋法により稀釋して6列の試験液を作り、これらを抗クリ血清及び抗「クリ+タンニン」血清に重層して Ringprobe により沈降反應を検した。

尙各抗血清の沈降素價を検するためヘイジョウグリ10倍生理的食鹽水浸出液(蛋白含有度0.3%)の稀釋液及び比較の目的でヘイジョウグリ粉末を10倍量の0.1% NaOH 液(生理的食鹽水を以て調製)で浸出した液(蛋白含有度0.3%)の稀釋液を夫々兩抗血清に重層した場合及び以上の各試験液を正常血清に重層した場合の沈降反應をも検

することにした。而してこの際各試験液のクリ蛋白含有度 0.3% 液を基本液として次の如き番號を附することにし、反應程度の比較は試験液重層後 2 時間後に於ける反應の顯れ得る最大限度の稀釋度番號數に由ることにした。

試験液番號	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
稀釋倍數	10	20	40	80	100	200	400	800	1600	3200
蛋白含有度(%)	0.3	0.15	0.075	0.0375	0.0300	0.0150	0.00075	0.00375	0.00190	0.0001

尙この際各抗血清の血清價は同一でなく、血清の血清價による實驗結果の修正を必要とするから、抗「クリ+タンニン」血清に於ては沈降素價 3200 のものを、又抗クリ血清に於ては沈降素價 800 なるものを夫々標準血清とし、斯かる血清を以てした實驗の結果は修正を要しないものとし、これより一階段だけ低い沈降素價を有する抗血清を以てした實驗結果は之を修正して一階段だけ増加することにした。

試験結果——以上の如くして得た試験成績を見ると(第 8 表參照)。

a 抗原は抗クリ血清及び抗「クリ+タンニン」血清の何れに對しても第 8 號液迄反應したが、正常家兔血清とも同程度に反應し、

b 抗原は兩抗血清及び正常血清何れに對しても全く反應は陰性であつた。然るに、

c 抗原及び d 抗原は共に正常家兔血清に對して陰性であると共に抗クリ血清及び「クリ+タンニン」に對しては全然タンニンを作用せしめないクリ生理的食鹽水浸出液が示した反應度と同程度に反應した(第 8 表及び第 6 表參照)。而して、

e 抗原は抗クリ血清に對して第 7 號液迄、抗「クリ+タンニン」血清に對して第 9 號液まで反應したが、正常家兔血清に對して第 5 號液迄反應し。

f 抗原は、正常血清に對しては反應は陰性であると共に抗クリ血清に對して第 6 號液迄、抗「クリ+タンニン」血清に對して第 8 號液迄反應し、タンニンを作用せしめないクリ生理的食鹽水浸出液が示した反應に比して稍々弱いことを示した。

考 察——以上の實驗結果を觀ると、a 抗原及び b 抗原に於て眞正沈降反應が全く陰性であるのは沈降反應に與かるべきクリ蛋白が悉く除去されたための當然の結果であるべきで、

第 8 表 タンニンを作用せしめたクリ抗原の沈降反應度
(抗血清に反應する抗原液の最大稀釋度番號にて示す)

抗血清	抗原	Quercus のタンニンを作用せしめたクリ抗原						正 常 クリ抗原	0.1% NaOH にて浸出せる クリ抗原	生理的 食鹽水
		a 抗原	b 抗原	c 抗原	d 抗原	e 抗原	f 抗原			
抗「 クリ + 」 血清	51	8	0	10	10	9	8	10	10	0
	52	8	0	10	10	9	8	10	10	0
	53	8	0	10	10	9	8	10	10	0
	54	8	0	10	10	9	8	10	10	0
抗 クリ 血清	55	8	0	8	8	7	6	8	8	0
	56	8	0	8	8	7	6	8	8	0
	57	8	0	8	8	7	6	8	8	0
	58	8	0	8	8	7	6	8	8	0
正常血清	8	0	0	0	5	0	0	0	0	

c 抗原が正常血清に對して偽沈降反應を呈しないと共にその反應力がタンニンを作用せしめない場合に比して毫も衰弱を示さない事實は、抗原液に加えた正常血清が抗原液内のタンニンと作用しその作用を全く無効にした結果と解せられ、

d 抗原の沈降反應力がタンニンを作用せしめない場合に比して少しも衰弱して居ないのは、一旦タンニンにより凝固された抗原蛋白もタンニン質が存在しない状態に於て再びアルカリ液で溶解せしめるときはその抗原性は些かも損傷されずに再び發揮されることを示す事實と解される。

然るに、e 抗原及び f 抗原に於てはタンニンを作用せしめない場合或は存在少き場合に比して沈降反應力が稍々衰弱する事を示すのは、d 抗原の沈降反應力が毫も衰弱を示さなかつた事實及び比較のためにヘイジョウグリ粉末を 10 倍量の 0.1% NaOH 液(生理的食鹽水にて調製)を以て浸出した液が抗クリ血清及び抗「クリ+タンニン」血清となす沈降反應を検した結果、クリの生理的食鹽水浸出液(正常のクリ抗原)の示すと同程度に反應した實驗結果(第 8 表参照)に徴して、抗原液内のアルカリの悪作用に因るものではなくて溶液内に溶存する有効タンニン質の悪作用に因るものと解せられ、尙且つ正常家兔血清はタンニンの悪作用を無効ならしめ得るが、ア

ルカリはそれに及ばないことが示されている。

以上之を要するに、抗原液にタンニンを加うるときは抗原蛋白の凝固を來し眞正沈降反應は全く消失されると共に強い偽沈降反應を現出し、又該抗原液をアルカリにより反應を鹽基性にすると共にタンニンによる凝固抗原蛋白を溶解せしめるときは眞正沈降反應は再現するけれどもその程度はタンニンを含有しない抗原液に比して弱く且つ偽沈降反應も可成りの強さに現われ、又この場合アルカリの添加の代りに正常家兎血清を充分加えてタンニンによる凝固抗原蛋白を溶解せしめると、眞正沈降反應は完全に復活されると共に偽沈降反應は全く消失することが示されている。併しこれらの諸事實は畢竟するに、抗原液内のタンニンは抗原の試験管内抗原性を損傷せしめる事實を示すものと解される。

ロ、豫め *Quercus* 種子タンニンを充分作用せしめたクリ粉末を生理的食鹽水で浸出した液を抗原とした場合

抗原——ヘイジョウグリ粉末に 5 倍量の *Quercus* 種子タンニン液(新鮮シラカン種子浸出液、タンニン含有度約 0.3%)を加え、一晝夜氷室内に置いてタンニンを充分クリ粉末に作用せしめた後、過剰のタンニン液を濾過排除し、これを扇風機により充分乾燥せしめて乾燥クリ粉末を得、これを用いて次の如き抗原を作つた。

g 抗原： 上記クリ粉末を 10 倍量の生理的食鹽水によつて浸出した液(弱酸性、鹽化第二鐵に對し青色を呈し、蛋白反應はない)。

h 抗原： g 抗原を同量の正常家兎血清で飽和吸収した液。

i 抗原： 上記クリ粉末を 10 倍量の 0.1% NaOH 液(生理的食鹽水を以て調製)で浸出した液(反應中性、鹽化第二鐵により青色を呈し、蛋白含有度 0.3%)

j 抗原： i 抗原を同量の正常家兎血清によつて飽和吸収した液。

沈降試験——前記實驗イに於けると全く同様の方法により、以上 4 種の抗原が抗クリ血清及び抗「クリ+タンニン」血清に對する沈降反應を検じた。

試験成績——今その實驗結果を観ると(第 9 表參照)

g 抗原は抗クリ血清及び抗「クリ+タンニン」血清に對して第 8 號液迄反應したが、

正常血清に対しても同程度に偽沈降反応を示し、*h* 抗原は兩抗血清及び正常血清に對して何れも反應は陰性であつた。

第.9 表 豫めタンニンを作用せしめたクリ粉末にて調製せる抗原の沈降反應度
(抗血清に反應する抗原液の最大稀釋度番號にて示す)

抗血清番號	抗 原	タンニンを作用せしめたクリ粉末による抗原				正 常 クリ抗原	0.1% NaOH にて浸出せ るクリ抗原	生理的 食鹽水
		<i>g</i> 抗 原	<i>h</i> 抗 原	<i>i</i> 抗 原	<i>j</i> 抗 原			
抗 タン ニン 酸 血 清	51	8	0	9	9	10	10	0
	52	8	0	9	9	10	10	0
	53	8	0	9	9	10	10	0
	54	8	0	9	9	10	10	0
抗 クリ 血 清	55	8	0	7	7	8	8	0
	56	8	0	7	7	8	8	0
	57	8	0	7	7	8	8	0
	58	8	0	7	7	8	8	0
正 常 血 清	8	0	4	0	0	0	0	

i 抗原及び *j* 抗原は、抗クリ血清に對しては第7號液迄、抗[クリ+タンニン]血清とは第9號液迄反應した。但し *i* 抗原は正常血清に對しても第4號液迄反應を示したのである。

以上の結果より觀ると、*g* 抗原及び *h* 抗原に於て眞正沈降反應を認め得ないのは、クリ粉末内の可溶性蛋白がタンニンにより悉く凝固されている爲に生理的食鹽水により蛋白が浸出されなかつた結果 其の浸出液中にクリ蛋白を缺ぐための當然の結果と解せられるが、*i* 抗原及び *j* 抗原に於て、抗血清と反應は呈してもタンニン酸を作用せしめないクリ粉末の0.1% NaOH 浸出液の示す反應より弱い事實は矢張り溶液内の若干のタンニン酸が沈降反應の出現を妨げた結果に外ならないのである。

(2) 卵白免疫血清による實驗

以上クリ免疫血清による實驗結果を更に前記の實驗に於て得た卵白免疫血清に對しても確める目的で①卵白溶液にタンニン酸を各種の程度に加えた液、②豫めタン

ニン酸を充分作用せしめた卵白を用いて浸出した液、を夫々抗原として重層した場合の沈降反應を検した。

イ、卵白に各種濃度のタンニン酸液を加えて抗原とした場合。

抗原——新鮮卵白各 3 cc 宛に日本薬局方タンニン酸の 0.3%、3% 及び 5% 溶液(生理的食鹽水にて調製)を夫々 30 cc 宛を加え、之等を一夜氷室内に置いて充分作用せしめた後更に其の各々に 10% NaOH 液(生理的食鹽水で調製) 1 乃至 2 滴を落して溶液を中性にすると共に一旦凝固した卵白蛋白を再び溶解せしめた液を抗原液とした。但しこの際添加するタンニン酸液の濃度が増すほど溶液内の蛋白凝固度は大であるのみならずアルカリを加えても溶解しない凝固蛋白量が増加した。故にこれらのアルカリ不溶物質を遠心分離により除去した透明液を原液として用いた。従つてタンニン酸添加量により各抗原液内の溶存卵蛋白量を異にし、即ち、

α 抗原即ち 0.3% タンニン酸液を作用せしめた液に於てはその溶存卵蛋白含有量は 0.5% であるが、

β 抗原即ち 3% タンニン酸溶液を作用せしめた液に於ては溶存蛋白量 0.06%、又

γ 抗原即ち 5% タンニン酸液を作用せしめた液に於ては更に少く 0.03% であつた。

尙これらの液は何れも暗褐色中性を示し鹽化第二鐵により青色を呈した。

尙又 α 抗原、β 抗原及 γ 抗原を各々同量の正常家兎血清で飽和吸収せしめこれらを夫々 α' 抗原、β' 抗原及び γ' 抗原として試験に供したのである。

沈降試験——以上 6 種の抗原液を生理的食鹽水で倍數稀釋を行つて 6 列の試験液を作り、これらを抗卵白血清、抗「卵白 + 0.3% タンニン酸」血清及び抗「卵白 + 3% タンニン酸」血清に重層したときの沈降反應を前同様にして檢した。但しこの際各抗原の稀釋液に次の如き番號を附し、反應度の比較は抗原重層後 2 時間後に於ける

試験液番號	1	2	3	4	5	6	7
稀釋倍數	10	20	40	80	160	320	640
蛋白含有度(%)	0.5000	0.2500	0.1250	0.0625	0.0312	0.0156	0.0078
試験液番號	8	9	10	11	12	13	14
稀釋倍數	1280	2560	5120	10240	20480	40960	81920
蛋白含有度(%)	0.0039	0.0020	0.0010	0.0005	0.00025	0.00012	0.00006

反應の顯れ得る最大限度の稀釋番號數に由つた。

尙對照として、正常血清に各試験液を重層した場合及び各抗血清に生理的食鹽水を重層した場合の反應をも檢した。尙又この場合各抗血清の沈降素價の檢定をなし、これにより實驗結果の修正を行つた。即ち沈降素價 51200 なる血清を標準血清とし、かゝる血清を以てした實驗結果は修正を要しないが、その沈降素價 102400 なる血清を以てした實驗結果は一階段だけ減少せしめたのである。

試験成績——今斯くして得たる實驗結果を觀ると(第 10 表)、

第 10 表 卵白にタンニン酸液を加へた抗原の沈降反應度

(抗血清に反應する抗原液の最大稀釋度番號で示す)

抗血清番號	卵白にタンニン酸液を加へた抗原						正 常 生理的		
	α 抗原	α' 抗原	β 抗原	β' 抗原	γ 抗原	γ' 抗原	卵白溶液	食鹽水	
抗タンニン酸 卵白+0.3%血清	59	11	11	10	10	9	9	12	0
	60	11	11	10	10	9	9	12	0
	61	11	11	10	10	9	9	12	0
	62	11	11	10	10	9	9	12	0
抗タンニン酸 卵白+3%血清	63	11	11	10	10	9	9	12	0
	64	11	11	10	10	9	9	12	0
	65	免疫中斃死							
	66	免疫中斃死							
抗卵白血清	67	11	11	10	10	9	9	12	0
	68	11	11	10	10	9	9	12	0
	69	11	11	10	10	9	9	12	0
	70	11	11	10	10	9	9	12	0
正常血清	4	0	6	0	6	0	0	0	

正常卵白溶液とは第12號液(蛋白含量 0.00025%)迄反應した抗血清が、0.3%タンニン酸液を作用せしめた抗原液に對しては第 11 號液(蛋白含量 0.0005%)迄、3%タンニン酸液を作用せしめた抗原液に對しては第 10 號液(蛋白含量 0.001%)迄、又 5%タンニン酸液を作用せしめた抗原液に對しては第 9 號液(蛋白含量 0.002%)迄反應を

示し、抗原液の含有するタンニン酸量が大なるほど抗血清に對する沈降反應が低下することが明かに示されて居り、抗原液内のタンニン質により明かに試験管内抗原性が阻害された事實が示されている。

ロ、豫めタンニン酸を充分作用せしめた卵白より浸出した液を抗原とした場合
 抗原——新鮮卵白 30 cc に日本藥局方タンニン酸の 25% 液 20 cc を加へて卵白を完全に凝固せしめた後三晝夜間氷室内に置きタンニン酸が卵白に充分作用するのを待ち、これを吸引デシケーターで乾燥せしめ、淡黄の乾燥卵白粉末を得た。

尙對照として新鮮卵白 30 cc を吸引デシケーター内で乾燥せしめ白色卵白粉末を得た。而して次の種の抗原を調製して試験に供した。

δ 抗 原： タンニン酸を作用せしめた卵白粉末 0.5 g に生理的食鹽水 5 cc を加え、時々振盪しつゝ 3 時間浸出した後遠心分離した上澄液(反應中性、透明、蛋白反應はない)を同量の正常血清で飽和吸収せしめた液。

ε 抗 原： タンニン酸を作用せしめた卵白粉末 0.5 g に 0.33% NaOH (生理的食鹽水で調製) 5 cc を加へ、3 時間浸出後醋酸により中性にして遠心分離した上澄液(反應中性、黄色透明、卵白蛋含有度 0.5%)を同量の正常血清によつて飽和吸収せしめた液。

γ 抗・原： タンニンを作用せしめざる乾燥卵白粉末 0.5 g に 5 cc の生理的食鹽水を加え 3 時間浸出遠心分離した上澄液(白色透明、反應中性、蛋白含量 0.55%)を得これに生理的食鹽水數滴を加えてその蛋白含有量 0.5% になる様にし、更にこれに同量の正常血清を加えて飽和吸収せしめた液。

θ 抗 原： タンニンを作用せしめるが乾燥卵白粉末 0.5 g に 5 cc の 0.33% NaOH (理的食鹽水で調製)を加え、3 時間浸出を行つた後醋酸で中性にし、遠心分離した上澄液(反應中性、蛋白含量 0.6%)を得、これに生理的食鹽水數滴を加えてその蛋白含有度 0.5% になるようにした後更に之に同量の正常血清を加えて飽和吸収せしめた液。

沈降試験——以上 4 種の抗原を生理的食鹽水で逐次 2 倍に稀め、これらを抗「卵白 + 0.3% タンニン酸」血清、抗「卵白 + 3% タンニン酸」血清及抗卵白血清に重層した場

合の沈降反應を前記實驗「イ」に於けると同様の方法により檢した。即ちこの際各抗原液の稀釋液の番號及びその各稀釋液の卵蛋白含量は實驗「イ」に於けると全く同様であると共に抗血清は沈降素價 51200 であるものを標準として血清價による實驗結果の修正を行つたのである。

試験成績——今以上の試験成績を観ると(第 11 表参照)。

- α 抗原は、抗血清に對して全然反應しない。
- β 抗原は抗血清に對し反應はしてもその程度は正常卵白溶液の場合に比して弱く第 10 號液(卵蛋白含量 0.001%)まで反應を呈し。
- γ 抗原及び δ 抗原は正常卵白溶液と同程度即ち第 12 號液(卵蛋白含量 0.00025%)まで反應した。

第 11 表 豫めタンニン酸を作用せしめた卵白で調製した抗原液の沈降反應度
(抗血清に反應する最大稀釋度番號で示す)

抗血清番號	抗原	豫めタンニン酸を使用せしめた卵白による抗原		タンニン酸を作用せしめない卵白による抗原		正 常 生 理 的	
		α 原 抗	β 原 抗	γ 原 抗	δ 原 抗	卵白溶液	食鹽水
抗「タンニン酸」 卵白+0.3%血清	59	0	10	12	12	12	0
	60	0	10	12	12	12	0
	61	0	10	12	12	12	0
	62	0	10	12	12	12	0
抗「タンニン酸」 卵白+3%血清	63	0	10	12	12	12	0
	64	0	10	12	12	12	0
	65	免疫中斃死					
	66	免疫中斃死					
抗卵白血清	67	0	10	12	12	12	0
	68	0	10	12	12	12	0
	69	0	10	12	12	12	0
	70	0	10	12	12	12	0
正 常 血 清	0	0	0	0	0	0	

δ 抗原の反應が全く陰性であるのはタンニン酸により卵白が悉く凝固され不溶性

となつた結果 その食鹽水浸出液中には 卵蛋白は全く溶存しない理であつて、従つてその反應が陰性であるのは當然の結果であるが、 γ 抗原及び θ 抗原の反應度が正常卵白溶液に比して毫も劣らないにも拘らず、抗原の反應度が著しく弱い事實は、該抗原液内のタンニン質の悪影響に基因することを示すものである。

以上抗ツリ血清及び抗卵白血清を以て、抗原液内のタンニンが試験管内に於ける沈降反應の出現に及ぼす影響について試験した結果を總括すれば、

① 抗原液にタンニンを添加するときは 抗原蛋白が悉く凝固沈澱するため抗原の試験管内抗原性は全く消失される事實。

② 一旦タンニンの添加により 溶存蛋白を悉く凝固せしめた 抗原液に直接強アルカリを加え 溶液の反應を中性にすると共に 凝固蛋白を再び溶解せしめた液は沈降反應力が明かに減弱されているにも拘らず、抗原液よりタンニンによる 凝固蛋白のみを別に取出してこれをアルカリにより溶解せしめた液は その沈降反應力は 毫も減弱されない事實。

③ 豫めタンニンを充分作用せしめた材料より 蛋白を浸出した抗原液は 溶存蛋白を検出し得ないと共に試験管内抗原性を全く缺ぐ事實。

④ 豫めタンニンを充分作用せしめた (抗原蛋白浸出用の爲) 材料をアルカリで浸出した抗原液はタンニンのみならず 蛋白をも溶存し従つて沈降反應力を有するがその應力は明かに減弱している事實。

等が認められ、これらの諸事實は、活性タンニン質が抗原液に溶存するときは、このために抗原蛋白の試験管内抗原性が阻害される事實を立證するものである。

3) タンニン質除去の化學的處理が抗原性に及ぼす影響

以上實驗 2) の結果により、タンニン質は 抗原蛋白の生体内抗原性には 何等悪影響を及ぼさないが、その試験管内抗原性には 或る程度悪影響を及ぼすことが明かにされた。

されば先に推察した様に、*Quercus* 屬種子浸出液による 免疫反應を認め得ないの

は、その蛋白自體が非抗原性である事に因るものではなくその含有する多量のタンニン質の悪影響に因るものであると假定すれば、そのタンニン質の悪影響は上記の實驗結果により、生體內に於ける抗原蛋白の免疫體生産作用に顯はれるものではなく、試験管内に於ける免疫反應の出現に顯はれるべきことが明かである。故にこのタンニン質の試験管内抗原性に及ぼす悪影響を除去し得れば *Quercus* 屬種子浸出液による沈降反應の出現も可能となる理である。而してこのタンニン質の試験管内抗原性に及ぼす悪影響を除去する方法としては、抗原浸出材料中のタンニンを完全に除去し去るか又は浸出材料中より抗原蛋白のみを純粹に取出しこれを以て抗原液を調製するかの二法に依る外はないのである。

茲に於て著者は化學的藥劑により蛋白浸出材料中のタンニンを可及的完全に除去した後蛋白浸出を行つた液及び化學的處理により浸出材料中の蛋白を純粹に取出し、これを以て調製した溶液を夫々抗原とした場合の試験管内に於ける反應の出現狀況を調べることにした。

a. 化學的タンニン浸出操作を繰返した材料による抗原の試験管内抗原性

實驗 2) に於て調製した様に豫めタンニンを充分作用せしめたクリ粉末及び同卵白粉末(これらよりせる蛋白浸出液は明かに試験管内抗原性を有する)を材料とし、タンニン浸出藥劑により充分タンニン浸出を繰返し行つた後これを用いて抗原液を調製し、これらの抗血清に對する沈降反應を検した。

抗原——豫め *Quercus* タンニンを充分作用せしめた上記のクリ粉末及び卵蛋白粉末〔實驗 2) b, (1) のロ及同 (2) のロ参照〕を材料とし、Soxlet 抽出裝置を使用し、醋酸エーテル及びエーテルにより各 10 時間宛繼續してタンニン浸出を行い、浸出藥液が鹽化第二鐵により殆んど着色しないようになった後、これらの粉末を抽出器より取出し、扇風機により浸出藥劑を完全に揮發せしめた後、これらを用いて生理的食鹽水及び 0.1% NaOH 液(生理的食鹽水によつて調製)による浸出液を調製し、之等の抗血清に對する反應を検した。

クリ抗原 I: 醋酸エーテルによりタンニン浸出を行つたクリ粉末 2g を 10 倍の生理的食鹽水で浸出した液(鹽化第二鐵により 少々青色を呈すると共に蛋白反應は

ない)。

クリ抗原 II: 同上クリ粉末 2g を 10 倍の 0.1% NaOH 液によつて浸出した液。(鹽化第二鐵により稍々青色を呈し、蛋白含有度 0.3%)。

クリ抗原 III: エーテルによりタンニン浸出を行つたクリ粉末 2g を 10 倍の生理的食鹽水によつて浸出した液(鹽化第二鐵により稍々青色を呈し、蛋白反應はない。)

クリ抗原 IV: 同上クリ粉末 2g を 10 倍量の 0.1% NaOH 液で浸出した液。(鹽化第二鐵により稍々青色を呈し、蛋白含量 0.3%)。

卵白抗原 I: 醋酸エーテルによりタンニン浸出を行つた卵白粉末 0.5g を 10 cc の生理的食鹽水によつて浸出した液(鹽化第二鐵により青色を呈し、蛋白反應はない。)

卵白抗原 II: 同上卵白粉末 0.5g を 10 cc の 0.1% NaOH 液で浸出した液(鹽化第二鐵により稍々青色を呈し、蛋白含量 0.25%)。

卵白抗原 III: エーテルによりタンニン浸出を行つた卵白粉末 0.5g に 10 cc の生理的食鹽水で浸出した液(鹽化第二鐵により稍々青色を呈し、蛋白反應陰性)。

卵白抗原 IV: 同上卵白粉末 0.5g を 10 cc の 0.1% NaOH 液で浸出した液(鹽化第二鐵により稍々青色を呈し、蛋白含量 0.25%)。

以上の諸抗原液は使用に際して同量の正常家兔血清により飽和吸収せしめた後試験に供することとし、且つ 0.1% NaOH 液で浸出した液は何れも反應は微アルカリ性であるので正常血清による吸収前に稀醋酸により中性にした。

沈降試験——上記の諸抗原は各其の 10 倍浸出液を基準液とし、各種クリ抗原は實驗 2) b, (1) のロに於けるクリ抗原の稀釋法と、又各種卵白抗原は實驗 2) b, (2) のロに於ける卵白抗原の稀釋法と全く同様な方法により稀釋液を調製し(但しこの場合本實驗に於ける卵白抗原は 20 倍液が原液となり、又クリ抗原液の 20 倍液及び卵白抗原液の 40 倍液は正常家兔血清により稀釋されるので實際の稀釋に際しては、クリ抗原液では 40 倍液、卵白抗原液では 80 倍液より稀釋することにした)、これらを夫々抗クリ血清及び抗卵白血清に重層した場合の沈降反應を検した。而して實驗結果は前記實驗 2) に於けると同様な方法により、各抗血清の血清價による修正を行つたのは勿論である。

尙この場合各抗原液を正常血清に重ねた場合又生理的食鹽水(の稀釋液)を各抗血清に重ねた場合の反應は全く陰性である事を認めた。

試験成績——以上の實驗成績を観ると(第12表及び第13表參照)、タンニン浸出の化學處理を繰返した材料を以て調製した抗原液と雖も、生理的食鹽水により浸出調製したものは何れも沈降反應は全く陰性であつて試験管内抗原性を缺ぐことを示した。これはこれらの抗原液が鹽化第一鐵により尙青色を呈する事實より觀て、タンニン浸出藥劑による10時間繼續浸出も材料中のタンニンを完全に除去するに至らず尙相當量のタンニンがクリ及び卵白粉末に残る事が知られ、そのために生理的食鹽水により蛋白質が浸出されなかつた結果と解される。

然るに尙アルカリにより浸出した抗原液に於ては、各その抗血清と藥劑によるタンニン浸出を行わない場合〔實驗2) b(1)一ロ及同(2)一ロ〕と同程度に反應し、即ちクリ抗原は抗「クリ+タンニン」血清と第9號液まで、抗クリ血清とは第7號液まで反應し且づ卵白抗原は各種の抗卵白血清と第10號液まで反應した。

即ち以上の結果は要するに、化學的處理による抗原調製材料中のタンニン分の完

第12表 化學的タンニン浸出處理を繰返したるクリを以て調製せる
抗原液の沈降反應度 (抗血清に反應する最大稀釋度番號で示す)

抗血清番號	抗原	化學的タンニン浸出處理を繰返したるクリ抗原				化學的處理前のクリ抗原 (j 抗原) ※	正常血清	生理的食鹽水
		クリ抗原 I	クリ抗原 II	クリ抗原 III	クリ抗原 IV			
抗「タンニン+」血清	51	0	9	0	9	9	10	0
	52	0	9	0	9	9	10	0
	53	0	9	0	9	9	10	0
	54	0	9	0	9	9	10	0
抗クリ血清	55	0	7	0	7	7	8	0
	56	0	7	0	7	7	8	0
	57	0	7	0	7	7	8	0
	58	0	7	0	7	7	8	0
正常血清		0	0	0	0	0	0	0

※ 第9表より

第 13 表 化學的タンニン浸出處理を繰返したる卵白を以て調製せる
抗原液の沈降反應度 (抗血清に反應する最大稀釋度番號で示す)

抗血清番號	抗原	化學的タンニン浸出處理を繰返した卵白抗原				化學的處理前の卵白抗原 (ϵ 抗原) ※	正常生理的 卵白抗原	食鹽水
		卵白抗原 I	卵白抗原 II	卵白抗原 III	卵白抗原 IV			
抗タンニン 卵白+0.3% 血清	59	0	10	0	10	10	12	0
	60	0	10	0	10	10	12	0
	61	0	10	0	10	10	12	0
	62	0	10	0	10	10	12	0
抗タンニン 卵白+3% 血清	63	0	10	0	10	10	12	0
	64	0	10	0	10	10	12	0
	65	免疫中斃死						
	66	免疫中斃死						
抗卵白血清	67	0	10	0	10	10	12	0
	68	0	10	0	10	10	12	0
	69	0	10	0	10	10	12	0
	70	0	10	0	10	10	12	0
正常血清	0	0	0	0	0	0	0	0

※.....第 11 表より

全除去は至難であるのみならずその浸出處理に因る抗原液内のタンニン減少はその試験管内抗原性に何等好影響を及ぼすことなく且つ醋酸エーテル又はエーテルによる長時間の化學處理は毫も試験管内抗原性を害するものでもないことを示している。

b. 化學的操作により純粹に取出した蛋白の試験管内抗原性

實驗 2) に於て調製した、豫めタンニンを充分作用せしめたクリ粉末及び卵白粉末を材料として、次の如き各種の化學的處理により蛋白の純粹分離を行い、これらを以て抗原液を調製し、その試験管内抗原性を調べた。

(1) 蛋白分離法及び抗原液調製法

イ)、鹽酸による蛋白の反復沈澱による場合

、豫めタンニンを充分作用せしめたクリ及び卵白粉末〔實驗 2) b、(1)、ロ及び同(2)ロに於て調製〕各 5 g 宛に各その 10 倍量の 0.2% NaOH 液(生理的食鹽水にて調製)を

加え一夜氷室内に於て充分浸出を行つた後これを濾過し、その濾液に 0.5% HCl を加えて溶存蛋白を悉く沈澱せしめ、遠心分離により蛋白沈澱のみを集め、これを更に 0.2% NaOH 液 50 cc により完全に溶解せしめた後 0.5% HCl を加えて再び蛋白を沈澱せしめ遠心分離により蛋白のみを分離し、斯くすること 10 回にしてアルカリ溶液のタンニン反應を認め得ない迄に至り、タンニンを含まないクリ及び卵白の蛋白沈澱を得、これらを再び前記の 0.2% NaOH 液の各 50 cc に溶解せしめ、醋酸により溶液の反應を中性にして夫々「クリ蛋白液 I」及び「卵白液 I」を得た。而してこれらの兩液は共に無色で鹽化第二鐵によるタンニン反應も認められず、且その蛋白含有度は「クリ蛋白液 I」に於ては 0.3%、「卵白液 I」に於ては 0.5% であつた。

ロ)、ピクリン酸により蛋白を沈澱せしめ、エーテルによりピクリン酸を除去した場合

豫めタンニンを充分作用せしめたクリ粉末及び卵白粉末各 5 g 宛に各その 10 倍量の 0.2% NaOH 液を加え一夜氷室内に於て浸出を行つた後これを濾過しその濾液にエスバツハ氏試薬を加えて蛋白を悉く沈澱せしめ、遠心分離により蛋白沈澱のみを集めこれを Soxhlet の液體浸出装置に入れ、0.5% HCl を加えてピクリン酸を溶解せしめた後エーテルで HCl 溶液のピクリン酸による着色が完全に取れる迄浸出を続け、濾過により蛋白の沈澱のみを集めこれを生理的食鹽水で調製した 0.2% NaOH 液の、50 cc によつて溶解せしめ、更に醋酸によりこれらの反應を中性にした後、遠心分離により各その上澄液を得、之等を夫々「クリ蛋白液 II」及び「卵白液 II」とした。但しこの際溶液は無色であつてタンニンの反應を認めないがアルカリにより溶解されない蛋白沈澱を生じ従つてこれら兩液の抗原蛋白含有度は減じ、即ち「クリ蛋白液 II」のクリ蛋白含有度は 0.15%、「卵白液 II」の卵蛋白含有度は 0.3% であつた。

ハ)、ピクリン酸により蛋白を沈澱せしめ、透析によりピクリン酸を除去した場合

豫めタンニンを作用せしめたクリ粉末及び卵白粉末各 5 g に各々其 10 倍量の 0.2% NaOH 液を加え一夜氷室内で浸出をした後これを濾過し、濾液にエスバツハ氏試薬を加えて蛋白を悉く沈澱せしめ、遠心分離により蛋白の沈澱のみを集め、これらを

コロチオン膜の透析袋に入れ更に 0.5% HCl を加えてピクリン酸を溶解せしめ、一夜透析によりピクリン酸分を完全に除去した後濾過により蛋白沈澱を集め、生理的食鹽水で調製した 0.2% NaOH 液各 50 cc に溶解せしめ、醋酸により反應を中性にした後遠心分離により各々其上澄液を得て、これらを夫々「クリ蛋白液 III」及び「卵白蛋白液 III」とした。但しこの際もアルカリ液に溶解されない蛋白を生じ各液の蛋白含有度は前者に於ては 0.2%、後者に於ては 0.3%であつた。

(2) 沈降試験法及び其の成績

以上三種の化學的操作により得たクリ及び卵白の蛋白液(約 10 倍溶液)を夫々原液とし、これらを基準としてクリ蛋白液に於ては實驗 2) a. (1)、ロに於けると、又卵白蛋白液は實驗 2) b. (2) ロに於けると各々同様の方法により生理的食鹽水による稀釋液を調製した。但しこの際各原液共同量の正常家兔血清により飽和吸收を行つたので生理的食鹽水による稀釋は各其の 40 倍液よりなしたのである。

斯うして得た各種クリ抗原液は各種の抗クリ血清に、又各種卵白抗原液は各種の抗卵白血清に夫々重層し、實驗 2) に於けると全く同様の方法により沈降反應を検した。

然るにその結果は何れの抗原液に於ても沈降反應は全く陰性であつた(第 14 表及

第 14 表 化學的操作により純粹に分離したるクリ蛋白液の沈降反應度
(抗血清に反應する最大稀釋度番號で示す)

抗血清番號	抗原	化學的操作により純粹に分離したるクリ蛋白液			正常 クリ抗原	生理的 食鹽水
		クリ蛋白液 I	クリ蛋白液 II	クリ蛋白液 III		
抗「 タ クリ ニ + 」 血清	51	0	0	0	10	0
	52	0	0	0	10	0
	53	0	0	0	10	0
	54	0	0	0	10	0
抗 クリ 血清	55	0	0	0	8	0
	56	0	0	0	8	0
	57	0	0	0	8	0
	58	0	0	0	8	0
正常血清		0	0	0	0	0

び第 15 表参照)。

以上の結果を観ると、実験 2)、b (1) ロ及び同 (2)、ロに於て実験した様に、豫めタンニンを充分作用せしめたクリ粉末及び卵白粉末のアルカリ浸出液は何れも抗血清と強い沈降反應を呈するにも拘らず、上記の化學的操作により純粹に取出した蛋白のアルカリ溶液が全く沈降反應力を有しない事實は、取りも直さず上記の化學的操作が抗原蛋白に變質を來し其等の抗血清に對する沈降反應力を消失せしめるに至つたことを示すものである。

第 15 表 化學的操作により純粹に分離した卵白液の沈降反應度
(抗血清と反應する最大稀釋番號にて示す)

抗血清番號	抗原	化學的操作により純粹に分離した卵白液			正 常 卵白抗原	生理的 食鹽水
		卵 白 液 I	卵 白 液 II	卵 白 液 III		
抗タンニン 卵白+ 0.3% 血清	59	0	0	0	12	0
	60	0	0	0	12	0
	61	0	0	0	12	0
	62	0	0	0	12	0
抗タンニン 卵白+ 3% 血清	63	0	0	0	12	0
	64	0	0	0	12	0
	65	免疫中斃死				
	66	免疫中斃死				
抗卵白 血清	67	0	0	0	12	0
	68	0	0	0	12	0
	69	0	0	0	12	0
	70	0	0	0	12	0
正常血清		0	0	0	0	0

以上本實驗の結果を總括すると、化學的タンニン浸出處理による抗原液浸出用材料中のタンニン除去操作は抗原蛋白の試験管内抗原性に好悪何れの影響も及ぼさず且つ含タンニン材料中より蛋白を純粹に取出す化學的操作は蛋白を變質させて其の試験管内抗原性を全く喪失せしめることが結論され、従つて斯かる方法によりタン

ニン質の試験管内抗原性に及ぼす悪影響の除去の困難なことと共に *Quercus* 屬種子浸出液に對し抗原性を惹起せしめることの不可能なことが知られる。

4) 發芽處理による種子蛋白質の抗原性賦與

以上實驗 2) のにより、タンニンは少くとも生體內抗原性に對しては明かに抑制的影響を及ぼさず、又試験管内抗原性に對しては明かに抑制的影響を及ぼすとはいえ、反應の出現を全然妨害するものではなくて、タンニンの存在の下に於ても浸出液内に抗原蛋白が溶存するときは明かに沈降反應を起す事實を知つた。

而して實驗 3) の結果によつて化學的操作により抗原蛋白の試験管内抗原性に及ぼすタンニン質の悪影響を除去することは不可能であるという事實をも知り得た。

然るに實驗 1) の結果が示す様に、*Quercus* 種子の生理的食鹽水及びアルカリ液による浸出液は明かに可溶性蛋白を含有するにも拘らず該浸出液によつて免疫した動物血清と何等沈降反應を呈しない事實を見れば、*Quercus* 屬の休眠種子は蛋白質による血清學的研究には不適當なものと考えられる。

されば斯様に、*Quercus* 屬種子蛋白が抗原性を缺く理由は果して如何であろうか。それは實驗 1) に於て示されている様に該蛋白は化學的に頗る安定であるから血清化學的にも元來頗る安定であつて生活細胞の免疫體構成作用に關與し得ない事因るものと解される。故に今斯かる蛋白をして血清化學的に labile なものに變形せしめることを得れば抗原性を獲得するに至るのではないかと推察される。

而して種子蛋白をより labile なものに變形せしめるには、化學藥品又は人工的に蛋白分解酵素を作用させることによつても可能であらうが、斯かる化學的處理は不自然であつて、實驗 3) の結果より觀て蛋白質の種屬特異性を變質せしめる虞れがあるので賞用するに足らない方法である。故に若し生物的自然現象により種子蛋白を軟化せしめることが出來れば最も好都合である筈である。

茲に於て著者は休眠種子の發芽の際に於ける種子蛋白質の溶解轉流の生物現象に思いつき、種子を休眠より覺醒せしめることにより或程度蛋白質軟化の目的を達し得るのではないかと推察したのである。

即ち著者は以上の様な想定の下に、豫め *Quercus* 屬種子を人工的に甲析せしめた

後これを材料として蛋白浸出をなした液を以て免疫実験を行うこととした。

a. 実験材料及び注射液調製法

前年度に成熟した新鮮コナラ (*Q. Serrata*) 種子を材料とし、その発芽させるために種皮に傷を付けた後ポットに播種し温室内に置いて毎日適度に灌水し、発芽後幼根が辛うじて種皮外に析出したときこれを採り集め、水洗して種皮を除き、消毒の目的でアルコールを以て種實を一粒宛よく拭き、ナイフを用いて細く刻み滅菌乳鉢で摺り潰し、これに約5倍量の醋酸エーテルを加えて2-3時間タンニンの浸出を行った後、醋酸エーテルを除去し、更に扇風機により完全に醋酸エーテル分を揮発せしめて、黄褐色の粉末を得、これを滅菌した褐色瓶内に貯え蛋白浸出材料に供した。而してこの粉末を以て、生理的食鹽水及び弱アルカリによる二種の浸出液を調製し免疫に供した。

即ち生理的食鹽水浸出液は上記の種子粉末6gを滅菌乳鉢内に取り、これに滅菌生理的食鹽水30ccを少しづつ追加しよく摺り潰し全量を入れた後3時間室内に静置し、これを1分間2000回轉の速度で3分間遠心分離することにより粉末の残滓と、微粒子の浮游した淡褐色の懸濁液との二部に分離し、その上部の懸濁液を注射用に供した。但し該液は酸性であるので注射に際し1% NaOH液數滴により中性にした。

又アルカリ浸出液は上記の種子粉末を滅菌フラスコに取りこれに滅菌した0.3% NaOH液(生理的食鹽水で調製)30ccを加え、時々振盪しつゝ3時間室内に静置した後、これを1分間2000回轉の速度で3分間遠心分離することにより、種子粉末の残滓と微粒子の浮游した暗褐色の懸濁液との二部に分離し、その上部の懸濁液を醋酸によつて中和して注射に供した。

b. 免疫法

重量2kg内外の健全な家兎6匹を用意し、3匹宛二組に分ち、一組は食鹽水浸出液による免疫に他の一組はアルカリ浸出液による免疫に供した。

即ち前記の如き調製法による浸出液を注射の都度新しく調製し、これを37°Cに温めて、耳靜脈に2日おきに5回注射を繼續した。注射量は初回は、3cc回を重ねて

3回毎に1cc宛増量した。最後の注射日より第3日目より毎日試験採血をなし沈降素質を調べた所、3日目より既に最大值を示し、第5日目には少々低下する傾向を認めたので、第5日目に直ちに全採血をなし常法により血清の分離をなし56°Cに30分間保つて非動化し、石炭酸を加え、褐色アンブレンに入れて保存した。

但しこの際食鹽水浸出液及びアルカリ浸出液共に注射後使用耳静脈が固化した爲に同一静脈に繰返し注射を行うことが困難であつたが、その程度はアルカリ浸出液の場合が食鹽水浸出液の場合よりも甚しかつた。而して何れの場合も注射直後は呼吸困難を起し、且つ免疫期間中免疫動物の體重の減少を見た。

c. 沈降試験

上記試験採血に於て兩種の免疫血清共明かに沈降素が生産されて居る事を認めたので尙これを詳細に調べる目的で次の如き沈降試験を行つた。

(1) 抗原

注射液調製に於けると全く同様な方法で甲析コナラ種子の5倍生理的食鹽水浸出液及び5倍アルカリ浸出液を調製すると共に、尙比較の目的で發芽處理を行わない休眠コナラ種子を用い、前者と全く同様にしてその5倍生理的食鹽水浸出液及び5倍アルカリ浸出液を調製して試験液に供した。

而して是等試験液の蛋白含有度を Aufrecht の Albumimeter により檢した所、甲析種子及び休眠種子のアルカリ浸出液は夫々0.10%及び0.15%を示したが、兩種子の生理的食鹽水浸出液に於ては僅かにその痕跡を示すに過ぎなかつたので、Mikro-kjeldall 装置を用い Farnstein 氏法により各々その純蛋白質を定量した所、前者0.050%、後者0.075%の含有度を示した。

尙試験に供するに際し、生理的食鹽水浸出液の酸性は1% NaOH 液によつて、又アルカリ浸出液の鹽基性は醋酸を用いて夫々中和せしめると共に、各同量の正常家兔血清により飽和吸収した後、これらを生理的食鹽水で逐次2倍に稀め各一列の稀釋液を作つた。

(2) 沈降試験法及び試験成績

以上4種の抗原稀釋液を夫々抗コナラ生理食鹽水液血清及び抗コナラアルカリ

浸出液」血清に重層し Ringprobe により沈降反應を檢した。この際各試験液の稀釋液に次の如き番號を附し、反應度の比較は試験液重層後 4 時間後に於ける反應の顯われ得る 最大限度の稀釋度番號數に由ることとした。但し對照として正常血清に各試験液を重層した場合及び生理的食鹽水を抗血清に重層した場合の反應をも檢したのである。

溶液番號	1	2	3	4	5	6	7	8
稀釋倍數	10	20	40	80	160	320	640	1280
蛋白含有度(%)	0.075	0.0375	0.0188	0.0094	0.0047	0.00235	0.00118	0.00059

尙この場合、各浸出液の蛋白含有度を異にするので蛋白含有度 0.075% 乃至 0.038% の液を標準とし、斯かる液を以てした試験成績は修正を要しないが、その含有度 0.0375 乃至 0.019% なる液を以てした試験成績は之を修正して一階段だけ増加することにした。

(3) 試験成績

さて以上の如くして得た試験成績を見ると(第 16 表)、

第 16 表 甲析コナラ種子浸出液に對する免疫血清の沈降反應
(反應の現はれる抗原液最大稀釋度番號によつて示す)

抗 原	抗血清	甲析コナラ種子の		休眠コナラ種子の		生理的食鹽水
		生理的食鹽水浸出液	アルカリ浸出液	生理的食鹽水浸出液	アルカリ浸出液	
抗ナ食液 「ラ鹽」 甲生水血 析理浸 コの出清	71	7	5	4	3	0
	72	7	5	4	3	0
	73	7	5	4	3	0
抗ナリ血 「ラ浸」 甲ア出 析ル液 コカ」清	74	0	3	0	1	0
	75	0	3	0	1	0
	76	0	3	0	1	0
正 常 血 清		0	0	0	0	0

抗「甲析コナラ生理的食鹽水浸出液」血清は、その免疫原たる「甲析コナラ生理的食鹽水浸出液」とは第 7 號液迄反應したが、「甲析コナラのアルカリ浸出液」とは第 5 號液迄反應し、

抗「甲析コナラアルカリ浸出液」血清は、その免疫原たる「甲析コナラのアルカリ浸出液」とは第3號液迄しか反應せず又「甲析コナラの食鹽水浸出液」とは全く反應を示さなかつた。

尙比較のため休眠コナラの生理的食鹽水浸出液及びアルカリ浸出液と上記抗血清との反應を見たところ、

生理的食鹽水浸出液は、抗「甲析コナラ生理的食鹽水浸出液」血清と第4號液まで反應し、抗「甲析コナラアルカリ浸出液」血清とは反應せず、又

休眠コナラのアルカリ浸出液は、抗「甲析コナラ生理的食鹽水浸出液」血清とはその第3號液まで反應したが抗「甲析コナラアルカリ浸出液」血清とは第1號液まで反應した。

以上の諸事實により、甲析コナラの生理的食鹽水浸出液及びそのアルカリ浸出液は、共に生体内抗原性を有し沈降素を生産するが、その強さを異にし、食鹽水による浸出液がアルカリによる浸出液よりも生体内抗原性の大きなることが示されている。

尙、休眠種子の生理的食鹽水浸出液及び同アルカリ浸出液も弱度乍ら甲析コナラに對する免疫血清に對し沈降反應を呈する事實は、休眠種子の浸出液が、生体内抗原性はこれを缺くが、試験管内抗原性は弱い乍らこれを保有することを示すものと解される。

而して甲析コナラ種子及び休眠種子のアルカリ浸出液は抗「甲析コナラの食鹽水浸出液」血清及び抗「甲析コナラアルカリ浸出液」血清の何れに對しても反應するに對して、甲析種子及び休眠種子の生理的食鹽水浸出液が甲析コナラの生理的食鹽水浸出液に對する免疫血清に對してのみ反應し、そのアルカリ浸出液に對する免疫血清に對しては反應を呈しない事實は免疫血清の特異性に由來するものと解される。

以上之を要するに、本實驗によりコナラ休眠種子を發芽せしめることにより種子内蛋白が生体内抗原性を獲得するに至ることが明かにされた譯であり、従つて發芽處理は *Quercus* 屬種子蛋白に抗原性を賦與する一方法であることが結論される。

5) 發芽處理の種子蛋白の免疫原性に對する意義

以上實驗4)の結果、*Quercus* 種子蛋白は、所謂發芽處理により始めて免疫原性を

獲得し得ることが明かにされたが、然らば斯く發芽處理が *Quercus* の種子蛋白をし、て抗體生産を可能ならしめた原因は、果して如何であろうか。

その主要原因としては、前記の如く發芽現象による貯藏蛋白の變形も勿論考えられるが、又發芽現象による貯藏蛋白の溶解の結果可溶性蛋白の増加が豫想され、若しこれが眞であればこの事實が抗體生産に預つて力あるべきことも當然豫想されるのである。

茲に於て著者はこの間の消息を明かにしようとして、實驗 1) に於て休眠状態に於ける種子蛋白質定量用に使用したクヌギ、アベマキ、ナラガシワ及びコナラについて、その發芽處理後に於ける種子粉末内、及びその生理的食鹽水浸出液内の蛋白含量を測定比較した。即ち Mikro-kjeldall の装置を用い、Kjeldall 法により粗蛋白質を、Barnstein 氏法により純蛋白質を夫々定量し、その發芽前後に於ける數値を比較對照した。

その成績は第 17 表の如くで、この結果により次の諸事項が示されている。

第 17 表 *Quercus* 屬種子の發芽前後に於ける種子内及其生理的食鹽水浸出液内の蛋白含量の比較

區別 樹種	粗蛋白質含量(%)							
	種子粉末				10倍生理的食鹽水浸出液			
	發芽前 [※]	發芽後	較差	減少率	發芽前 [※]	發芽後	較差	減少率
クヌギ	6.433	5.724	0.709	11.02	0.201	0.144	0.057	28.36
アベマキ	5.677	4.636	1.041	18.38	0.103	0.061	0.042	40.78
ナラガシワ	6.608	6.200	0.408	6.17	0.234	0.182	0.052	22.22
コナラ	5.577	4.880	0.697	12.50	0.105	0.072	0.033	31.15
	純蛋白質含量(%)							
クヌギ	4.769	4.354	0.415	8.70	0.077	0.053	0.024	31.17
アベマキ	4.416	4.043	0.373	8.45	0.038	0.027	0.011	28.95
ナラガシワ	—	—	—	—	—	—	—	—
コナラ	4.201	3.844	0.357	8.50	0.037	0.025	0.012	32.43

※ 印は第 2 表より

①、種子内の粗蛋白質及び純蛋白質の含量は、共に発芽處理後に於ては處理前に於けるよりも減少する。

②、種子内の生理的食鹽水可溶蛋白質含量も亦發芽後に於ては發芽前に比して減少する。

③、發芽前後に於ける種子内純蛋白質の減少率は、其の全量に於けるよりも、その食鹽水可溶性蛋白質量に於て特に顯著である。

以上を要するに、種子内の粗蛋白質及び純蛋白質は共に發芽後に於てはその前に於けるよりも減少することが示されて居り、この事實は發芽に要するエネルギー供給に貯藏蛋白が消耗された當然の結果として、他一般植物種子に於て汎く見られる現象であるが、生理的食鹽水可溶性蛋白質量も、矢張り發芽開始後に於ては休眠時に於けるよりも減少する事實が示されて居り、この事實は前記の推察に反し、發芽處理による種子蛋白質の抗原性獲得は決して發芽處理による食鹽水可溶性蛋白の増加に由來するものでないことを明かに示すものである。

されば發芽處理により種子蛋白質が抗原性を獲得するに至るのは果して何に由來するのであろうか。

それは前に推察した如く、發芽現象による蛋白質の變形に由るの外は考えられない、即ち休眠種子の浸出液内には存在しない或物質が發芽後の種子浸出液内に存在し、併もそれは發芽に際し蛋白質の分解途中に生成される抗原性を有する或種の蛋白質に相違ないのである。

種子の發芽に際し、蛋白質が加水分解して各種の Aminoacids 及び Polypeptide に分離することは周知の事實であるが、然し既に Aminoamid 迄に分解したものは抗原性を有しないことも一般に知られている事である。故に發芽種子の生理的食鹽水浸出液内の抗原性蛋白は、種子蛋白質の完全分解生産物ではなく、其分解の極く初期に於て生成される所謂變形蛋白質である筈である。實際に於て Osborne 氏等は種子發芽時に蛋白質が分解して Amino 化合物となる前に、蛋白質自身の性質が變化されることを實驗し、氏等は小麦の發芽の際其の主成分である Hordein, Edestin 等が殆んど消滅して、Bynedestin と稱する普通の Edestin とは全く性質を異にする

蛋白質を生じ、又 Bynin と稱するアルコール可溶性の蛋白質が生成されることを発見した³⁶⁾。

さればコナラ種子の發芽の際に生成される變形蛋白質の實體が何であるかと云うことは本研究に於ては之を闡明し得ないが、然しそれが種子の發芽に際し、種子内總貯藏物質の轉化轉流が行われる場合に於て、貯藏蛋白質が完全に分解される前に生成される或種の變形蛋白質であることは上記 Osborne 氏等の實驗結果に徴しても疑い得ない事實である。

而して、尙本研究により、コナラの休眠種子内の貯藏蛋白質は生體內抗原性を缺ぐが、休眠より覺醒して貯藏物質の動員が開始されるに従い種子内に抗原性を具える或蛋白質が生成される事實が血清學的に證明されたと觀るべく、且つこれに依り従來の研究法である休眠種子の生理的食鹽水或はアルカリ浸出液による免疫を以てしては、到底不可能であつた *Quercus* 屬種子、蛋白による血清學的蛋白質識別が本研究により始めて可能となり、従つて血清化學的蛋白質識別に新研究法が賦與されたことは注目すべき事實である。

著者は茲に於て、種子蛋白質によつて免疫體を生成せしめんとする時種子を、休眠状態より覺醒せしめた後使用する研究方法を一般に「發芽處理に依る抗原性賦與法」又は單に「發芽處理法」(Germinating Method, Keimungsverfahren) と稱することを提唱するものである。即ち本法は *Quercus* の如くタンニン質であつて休眠状態では抗原蛋白を有しない種子に對し抗原性を賦與せしめる一の方法であり、又一般脂肪質種子の如く休眠状態に於ても抗原蛋白を有する種子に對しても本法により一層其の抗原性を増強せしめると共に、その免疫反應を一層鋭敏ならしめ得ることが期待される。

2. 本 實 験

以上豫備實驗により、常態に於ては免疫體の生産能を有しない *Quercus* 屬種子蛋白質も發芽處理によりこれに抗原性を賦與せしめ得ることが明かにされたので、本法により *Quercus* 樹木の血清學的類縁關係を研究することにした。

1) 供試樹種

日本産 *Quercus* の類縁関係のみならず、これらとコルクガシとの類縁関係を調べる目的で次の如き樹種を實驗に供した。

免疫原用樹種

- アベマキ (*Quercus variabilis* Bl.)
 コルクガシ (*Quercus suber* L.)
 コナラ (*Quercus serrata* Thunb.)
 カシワ (*Quercus dentata* Thunb.)
 アカガシ (*Quercus acuta* Thunb.) (*Cyclobalanopsis acuta* Oerst.)

反應原用樹種

上記5樹種の外

- クヌギ (*Quercus acutissima* Carr.)
 ウバメガシ (*Quercus phylliraeoides* A Gray.)
 オオバコナラ (*Quercus major* Nakai.)
 ナラガシワ (*Quercus aliena* Bl.)
 モンゴリナラ (*Quercus mongolica* Fisch.)
 イチイガシ (*Quercus gilva* Bl.) (*Cyclobalanopsis gilva* Oerst.)
 アラガシ (*Quercus glauca* Thunb.) (*Cyclo. glauca* Oerst.)
 ツクバネガシ (*Quercus paucidentata* Franch.) (*Cyclo. sessilifolia* Bl.)
 シラカシ (*Quercus myrsinaefolia* Bl.) (*Cyclo. myrsinaefolia* Oerst.)
 ウラジロガシ (*Quercus stenophylla* Makino.) (*Cyclo. stenophylla* Schottky.)

-等の *Quercus* の外尙これ等と同科異屬なる次の3樹種

- シリブカガシ (*Kuromatea glabra* Nakai)
 シイ (*Shiia Sieboldi* Makino)
 クリ (*Castanea crenata* S. et. Z.)

2) 免疫原の調製及び免疫法

上記免疫原用樹種の新鮮種子を發芽促進の目的を以て種皮に傷を付け、樹種別に淺い皿に濕砂と混ぜて入れ、これらを温室内に置いて常に適當の溫度を保たしめその發芽を待ち、幼根が種皮の外部に析出したときこれを集め、直ちに水洗いして種皮を取り去り、消毒するために一粒宛アルコールで拭き、之を細く刻み滅菌乳鉢内に入れて摺り潰し 3 乃至 5 倍量の醋酸エーテル内に入れ、3 乃至 5 時間タンニン質を浸出した後醋酸エーテルを除去し、更に扇風機により完全に揮發せしめた粉末を滅菌褐色瓶に貯え、注射の都度浸出液の調製に供した。

而して種子蛋白の浸出は、豫備實驗の結果アルカリ浸出液よりも食鹽水浸出液が遙かに強い免疫體を生産した事實に鑑み、本實驗に於ては總て食鹽水浸出液のみを免疫用に供することにした。

即ち注射の都度上記の粉末各 5 g 宛を滅菌乳鉢内に取り、これに 30 cc の滅菌生理的食鹽水を數回に分けて少し宛加えながら摺り潰し、3 時間室内に靜置して浸出した後遠心分離機にかけ、1 分間 2000 回轉の速度で 3 分間遠心分離して、その上部の上澄液を取り、その酸性を 1% NaOH 液により中性にした後、これを 37°C に温めて注射に供した。

而して免疫動物は重量 2 乃至 3 kg の健全な家兔を選び 1 樹種につき 3 頭宛を用意し、注射の都度新しく調製した浸出液を耳靜脈に最初は 3 cc 宛、次回よりは回を重ねる毎に 1 cc 宛増量して、2 日措きに 5 回注射を繼續した。而して豫備實驗の結果に鑑み注射日より 4 日目に試験採血をなし、抗體を生産したものは直ちに全採血をなし、常法により血清の分離を行い、56°C に 30 分間温浴させて非動化せしめ、而して石炭酸を 0.5 % の割合に加え、褐色アンブーレンに入れて保存した。

この際豫備實驗に於けると同様に注射に使用した靜脈は固化したため 5 回以上注射の繼續は困難であるのみならず、注射直後は呼吸困難を起すと共に免疫期間中一般に家兔は體重を減じ(第 18 表)衰弱の徴を示したので、實際上 5 回以上の注射は危険と認め注射回數を 5 回に止め、これにより免疫體を生産し得ぬものは免疫體生産能がないものと見做すことにした。

而して後記の試験法と全く同様の方法により各免疫動物の血清の沈降素價を測定したのによれば 320 乃至 640 であつた(第 18 表参照)。

第 18 表 免疫動物の體重及其血清の沈降素價

免疫動物 番 號	免 疫 原	免疫前の 體重 (g)	免疫後の 體重 (g)	免疫血清の 沈 降 素 價
77		2520	2130	320
78	アベマキ	2350	2170	640
79		2630	2350	320
80		2120	1890	320
81	コルクガシ	2600	2200	640
82		2450	2100	640
83		2150	1770	640
84	コナラ	2350	2120	640
85		2000	1730	640
86		1850	1570	640
87	カシワ	2150	1730	640
88		2150	1820	640
89		2400	2210	640
90	アカガシ	2000	1780	640
91		2550	2280	640

3) 沈 降 試 験

a. 抗 原 液

前記の供試樹種の新鮮種子を用い、免疫原調製に於けると全く同様な方法により發芽處理をなし(但しクリ及びシイを除く)、これを粉碎し醋酸エーテルでタンニンを浸出して褐色種子粉末を得、これらの粉末各 5g 宛を乳鉢内に取りこれに 25 cc の生理的食鹽水を加えながら摺り潰し、3 時間室内に靜置して浸出した後 1 分間 2000 回轉の速度で 3 分間遠心分離して其の上澄液を得、その一部を取り溶液の酸性を 1% NaOH 液(生理的食鹽水で調製)數滴を加えて中和すると共に、これに同量の正常家兔血清を加えて 1 時間孵卵器内に置いて對正常血清反應物質を吸收せしめ、

1 分間 2000 回轉の速度で 10 分間遠心分離して透明な上澄液を得(10 倍液となる)、これを原液として生理的食鹽水で逐次 2 倍に稀めて各一列の稀釋液を調製しこれ等に次の如き番號を附した。

溶液番號	1	2	3	4	5	6	7	8
稀釋倍數	10	20	40	80	160	320	640	1280

尙上記上澄液の殘部に就いて、エスバツハ試藥液を加え、Aufrecht の Albumimeter により蛋白含量を検したが、クリ及びシイ浸出液(5 倍液)に於ては共に 0.2% を示したけれども、*Quercus* 種子及びシリブカガシ種子浸出液に於ては何れも僅かに痕跡を示すに過ぎなかつたので、更に別途に上記と全く同様の方法によりこれら樹種の種子の 10 倍生理的食鹽水浸出液を調製し、Mikro-kjeldall 装置を用い Barnstein 氏法により浸出液内の純蛋白質を定量した結果、第 19 表に示す如く樹種により多少の相違を示し、少いのは 0.023 %、多いものは 0.081% を示した(第 19 表)。

第 19 表 發芽種子 10 倍生理的食鹽水浸出液の純蛋白含量 (%)

樹 種	純蛋白含量	樹 種	純蛋白含量
クヌギ	0.077	カシワ	0.056
アベマキ	0.027	イチイガシ	0.028
コルクカシ	0.032	アカガシ	0.026
ウバメガシ	0.038	アラガシ	0.041
コナラ	0.025	ツクバネガシ	0.038
オオバコナラ	0.028	シラカシ	0.031
モンゴリナラ	0.072	ウラジロガシ	0.023
ナラガシワ	0.081	シリブカガシ	0.052

b. 試 験 法

試験法は總て重層反應 (Ringprobe) に依つた。即ち上記の各免疫血清 0.1 cc 宛を毛細試験管に入れ、其の上より上記の各抗原稀釋液 0.2 cc 宛を靜かに添加し、免疫血清と試験液との中間に生ずる沈澱物の有無を検した。

尙この際對照試験として ①正常家兔血清 0.1 cc に各抗原液 0.2 cc を。②各免疫血清 0.1 cc に生理的食鹽水 0.2 cc を夫々重層した場合の反應をも檢し、その陰性であ

ることを確めると共に、時々各免疫血清の沈降素價の検定を併せて行つた。

而して試験結果は重層後 30 分、2 時間、3 時間、4 時間後に於て都合 5 回の觀察をしたが、本試験に於ては 4 時間後に至る迄反應は漸次高度に達したので、反應度の較は總て重層後 4 時間後に於て反應の顯われ得る 最大限度の稀釋度番號數を以てした。又實驗は通常同一試験を同時に兩組行い 兩者の結果が常に一致することを確認した。

尙以上の様にして得た試験結果は總て同一條件の下に於ける數値に換算する必要があるので、抗原液の蛋白含有量より又各免疫血清の沈降素價より 夫々結果の修正を行つた。即ち各抗原液の蛋白含有度は 0.040%—0.081% を標準とし、斯かる蛋白含有度を有する抗原液を以てした結果は修正を要しないが、これより 1/2 の蛋白含有度を有する抗原液を以てした試験結果は 1 階段だけ増加せしめることにして、更に免疫血清の沈降素價は、以上の如くして試験液の蛋白含量より修正した 640 を標準とし、この様な血清を用いて行つた試験結果は修正を要しないがこの 1/2 の沈降素價を有する血清でした試験結果はこれを 2 倍に増大せしめて修正した。

但し豫備實驗の結果明かにされた如く *Quercus* 發芽種子浸出液の抗原性は該液内の總可溶性純蛋白質に由來するのではなく、その一部をなすべき未知の變形蛋白質に由來するものと解されるので、以上の如く沈降反應度を浸出液内の總純蛋白質量により評價することは勿論正確とは言えないが、浸出液内の眞抗原蛋白質は種子内の可溶性純蛋白質より變形生成さるべく、従つてその含量は浸出液に溶存する純蛋白質量と正比例的關係を持つものと見做し得るので、浸出液内の總純蛋白質量による沈降反應度の評價は當らずと雖も遠からざるものと言えよう。

4) 實 驗 結 果

以上の様にして得た實驗結果を總括表示すれば次の如くなる。表中類縁反應度として示された數字は、反應を認め得る溶液の最高稀釋度の番號を示し、0 とは原液に於ても反應が無いものを意味する(第 20 表參照)。

今以上の表により各免疫血清毎に それと反應する抗原を、その反應度の順位に従つて列記すれば次の如くなる。

(1) アベマキの免疫血清に対する各抗原の類縁反應度

- 第 7 號液迄 アベマキ、クヌギ
 第 6 號液迄 コルクガシ、ウバメガシ、ナラガシワ
 第 5 號液迄 コナラ、カシワ、モンゴリナラ
 第 4 號液迄 アカガシ、アラガシ、シラカシ
 第 3 號液迄 オオバコナラ、ウラジロカシ、イチイガシ、ツクバネガシ
 反應陰性 シリブカガシ、クリ、シイ

(2) コルクガシの免疫血清に対する各種抗原の類縁反應度

- 第 7 號液迄 コルクガシ
 第 6 號液迄 アベマキ、クヌギ、ウバメガシ
 第 5 號液迄 コナラ、カシワ、モンゴリナラ、ナラガシワ、オオバコナラ
 第 4 號液迄 アカガシ、アラカシ、シラカシ、ウラジロカシ、ツクバネカシ
 第 3 號液迄 イチイガシ
 第 1 號液迄 シリブカガシ
 反應陰性 クリ、シイ

(3) コナラの免疫血清に対する各種抗原の類縁反應度

- 第 7 號液迄 コナラ、オオバコナラ
 第 6 號液迄 モンゴリナラ、ナラガシワ
 第 5 號液迄 カシワ、アベマキ、クヌギ、コルクガシ、ウバメガシ
 第 4 號液迄 イチイガシ、アカガシ、アラガシ、シラカシ、ウラジロカシ、
 ツクバネガシ
 第 2 號液迄 シリブカガシ
 第 1 號液迄 クリ
 反應陰性 シイ

(4) カシワの免疫血清に対する各種抗原の類縁反應度

- 第 7 號液迄 カシワ
 第 6 號液迄 ナラガシワ、モンゴリナラ

- 第 5 號液迄 コナラ、オオバコナラ
- 第 4 號液迄 コルクガシ、クヌギ、アベマキ、ウバメガシ
- 第 3 號液迄 イチイガシ、アカガシ、アラカシ、シラカシ、ウラジロガシ、ツクバネガシ
- 第 1 號液迄 シリブカガシ、クリ
- 反應陰性 シイ

(5) アカガシの免疫血清に對する各種抗原の類縁反應度

- 第 7 號液迄 アカガシ
- 第 6 號液迄 イチイガシ、アラカシ、ツクバネガシ、シラカシ、ウラジロカシ
- 第 5 號液迄 クヌギ、アベマキ、コルクガシ、ウバメガシ
- 第 4 號液迄 カシワ、モンゴリナラ、ナラガシワ
- 第 2 號液迄 シリブカガシ
- 反應陰性 コナラ、オオバコナラ、クリ、シイ

第 20 表 發芽處理法による *Quercus* 種子免疫血清の沈降反應
(抗血清に反應する最大稀釋度番號にて示す)

抗 原 抗血清	抗 原									
	アベマキ	クヌギ	コルクガシ	ウバメガシ	コナラ	オオバコナラ	モンゴリナラ	ナラガシワ	カシワ	
抗アベマキ	7	7	6	6	5	3	5	6	5	
抗コルクガシ	6	6	7	6	5	5	5	5	5	
抗コナラ	5	5	5	5	7	7	6	6	5	
抗カシワ	4	4	4	4	5	5	6	6	7	
抗アカガシ	5	5	5	5	0	0	4	4	4	

抗 原	抗 原									
	イチイガシ	アカガシ	アラカシ	ツクバネガシ	シラカシ	ウラジロガシ	シリブカガシ	シイ	クリ	
抗アベマキ	3	4	4	3	4	3	0	0	0	
抗コルオガシ	3	4	4	4	4	4	1	0	0	
抗コナラ	4	4	4	4	4	4	2	0	1	
抗カシワ	3	3	3	3	3	3	1	0	1	
抗アカガシ	6	7	6	6	6	6	2	0	0	

3. 考 察 及 結 論

1) 血清學的方法による類縁關係と植物分類學の示す類縁關係との比較

本實驗の期する所は記す迄もなく、免疫血清の類屬反應(Verwandtschafts-reaktion)により植物蛋白質の類縁關係を表わさんとするものであつて、即ち 試験液と免疫原の蛋白質が類似すればする程、より稀釋な試験液でも猶反應を起すべく、従つて反應を起す液の稀釋度の大小により植物の類縁度を推定し得る譯である。

今この免疫血清の類縁反應度による 供試樹木の類縁關係を論及すれば 次の如くなる。

(1) 對コナラ免疫血清及び對カシワ免疫血清に對する常綠カシ類(但しウバメガシを除く)種子浸出液の示す反應は、同抗血清に對し落葉性のナラ、カシワ類種子浸出液の示す反應よりも弱く、且つ對アカガシ免疫血清は常綠カシ類(ウバメガシを除く)種子浸出液とは強く反應するが、落葉性のナラ、カシワ類種子浸出液とは弱い反應を示し、落葉性のナラ、カシワ類と常綠カシ類とは血清學的に判然と區別される。

(2) ウバメカシ種子浸出液は對アカガシ免疫血清よりも對アベマキ及び對コルクガシ免疫血清と強く反應し、ウバメガシは常綠カシ類よりもアベマキ及びコルクガシとより近縁であることが示されている。

(3) 對コルクガシ免疫血清は供試樹種中アベマキ、クヌギ及びウバメカシ種子浸出液と特に強く反應すると共に、對アベマキ免疫血清もクヌギ、コルクガシ及びウバメカシ種子浸出液と強く反應し、且つコナラ、カシワ及びアカガシに對する免疫血清は何れもコルクガシ種子浸出液とは比較的弱い反應を呈して、コルクガシは日本産 *Quercus* 中アベマキ、クヌギ及びウバメカシと最も近縁であることが示されてゐる。

(4) 對コナラ免疫血清はカシワ浸出液よりもモンゴリナラ及びナラガシワ浸出液と強く反應すると共に、對カシワ免疫血清はコナラ浸出液よりもモンゴリナラ及びナラガシワの浸出液と強く反應して、コナラとカシワとは類縁上明かに隔りがあると共に、モンゴリナラ及びナラガシワは類縁度に於てコナラとカシワとの中間に位

することが示されている。

(5) オオバコナラの浸出液は對コナラ免疫血清に對しコナラ浸出液と同程度に反應し、この兩樹種は頗る近縁であることが示されている。

(6) シリブカガシ浸出液は總ての抗血清に對して反應が甚だ弱く *Quercus* と明かに類別されるようである。

(7) クリ及びシイの浸出液は總ての抗血清に對して反應は殆んど陰性であつて、*Quercus* と離れていることが明かに示されてゐる。

さて以上に對し今日の植物分類學が之等樹種の類縁關係を示す所を見れば次の通りである。即ち Rehder 氏 1927³⁰⁾ に依れば *Quercus* 屬を殼斗の鱗片の形態により

- 1). Subgenus *Cyclobalanopsis* Prantl.
- 2). Subgenus *Erythrobalanopsis* Spach.
- 3). Subgenus *Lepidobalanus* Endl.

の三亞屬に分類し、即ち殼斗の鱗片が癒着して輪狀をなす所の常綠カシ類は總て Subgenus *Cyclobalanopsis* (輪被殼斗亞屬)に屬せしめ、殼斗の鱗片が癒着せず覆瓦狀をなすか或は毛狀をなす所のアベマキ、クヌギ、ナラ類、カシワ類、コルクカシ等は總て Subgenus *Lepidobalanus* (鱗被殼斗亞屬)に屬せしめて互に類別して居り就中 Oerstedt 氏 (1966) の如きは *Cyclobalanopsis* を Genus に昇格せしめて *Quercus* に對立する獨立屬にすべきことを主張し、今日多くの分類學者も Oerstedt 氏の說に同意して常綠カシ類を *Quercus* と對立する Genus *Cyclobalanopsis* に入れている程であるが、前記の如く血清學的にもこの兩者が判然と區別されることは偶然の一致とは云えないのである。

又ウバメガシは通常常綠カシ類に入れているが、その殼斗の鱗片が他のカシ類の如く癒着せずに覆瓦狀に重つている事實により Rehder 氏³⁰⁾ はこれをクヌギ、ナラ、カシワ類と同じく Subgenus *Lepidobalanus* に入れて居り、カシ類を獨立屬 *Cyclobalanopsis* とする學者もウバメガシを Genus *Quercus* に入れて常綠カシ類と離しているが、(2)に於ける如く血清學的類縁反應より觀ても、ウバメガシが常綠カシ類よりも明かにクヌギ、アベマキに近縁であることが示されていることは興味深いこと

である。

殊に(3)に於て述べた如く、コルクガシが日本産 *Quercus* 屬中特にアベマキ、クヌギ及びウバメガシに近縁であることが示されて居り、この事實は樹藝學上注意すべきことであつて、先に述べた如くコルクガシを日本産 *Quercus* に接木した場合癒着後4乃至5年間は生長佳良であるが漸次接木の癒着部に於て異常細胞分裂を起し、一種の癌腫を形成し遂に接穂が砧木より分離するに至る現象は樹藝上の一難問であり、未だこの現象に關する立入つた研究はないようであるが、一般にこの現象はこれら兩樹種の接木親和力に關するものであつて、コルクガシと日本産 *Quercus* との親縁關係に係るものと推察されているが、以上の實驗結果は尠くともこの現象の解明及びその豫防に寄與する所があるものと考えられる。

尙分類學上コナラとカシワは同一亞屬に屬するが、Section を異にし、Rehder 氏はコナラを Section *Prinus* Loud. に、カシワを Section *Dentata* Schneid. に入れて居るが、血清學的類縁反應よりしても、(4)に於て述べた如く、この兩樹種間に明かに隔りのあることが示されて居り、又分類學上未だ明かにされては居ないが、ナラガシワ及びモンゴリナラは、その分布及び形態上より見て、コナラとカシワとの中間に位するものと解される節が多いが、血清學的類縁反應に於てもこの間の消息が認められ、又植木氏⁴⁰⁾によれば、オオバコナラはその形態上よりしてナラガシワとコナラとの Hybrid と見做したが、(5)に於て述べた様に、血清學的類縁反應より觀ても、オオバコナラはコナラに最も近縁であることが示されている。

尙又アベマキ及びクヌギはコナラ及びカシワと同亞屬に屬するけれども其の外部形態よりすれば、其差異點が多く且つ自然界に於てコナラとカシワとの雜種と認められるものは多くあつても、ナラ及びカシワ類とクヌギ又はアベマキとの間のもの未だ發見されない事實等により、この兩者間の親縁關係は稍々遠いものと解され、Oerstedt 氏はアベマキ及びクヌギのために Section *Cerris* を設け、Schneider 氏は之を Subgenus *Cerris* に昇格せしめたが⁴⁰⁾、本研究に於ては、以上の事柄を明かにするに至らなかつたのである。

又シリブカガシは Thunberg 及び Blume 氏等により元來 *Quercus* に入れられ、

Nakai 氏はこれを Genus *Lithocarpus* に入れ *Quercus* より離したが、(6)に於て述べた如く、血清學的類縁反應よりするも該樹種が *Quercus* とは明かに類別させることが示されて居り、又クリ及びシイも分類學上 *Quercus* 屬と「科」は同じくしても「屬」を異にしているが、(7)に於ける様に、血清學的類縁反應に於てもこの兩樹種が *Quercus* と明かに離れていることが示されている。

以上之を要するに、血清學的類縁反應による *Quercus* 類の類縁關係は今の植物分類學の示す所と大體に於て一致することが認められるが、この際特に注目すべきことは、*Quercus* に於ては血清學的蛋白質の類縁反應は外部形態の内、特に殻斗の總苞の形態による分類とよく一致していることで、この事實は即ち *Quercus* の外部形態に於ては殻斗の總苞の形態が最も種屬特異性の強い遺傳的形質の一つであることを示すものとも解されよう。

2) 血清學的蛋白質識別法の植物親縁度研究上の應用價值

蛋白質は植物體を構成する主要成分である以上、蛋白質の類似は植物類似を示すものと認めることが出来、従つて尠くとも蛋白質を基礎とする一種の分類系を構成し得る譯である。

抑々も植物が親から繼承する遺傳的形質としては、外部形態、内部構造、蛋白質、染色體及び生理生態的性質等が数えられる譯であるが、これらの遺傳的形質を親より繼承するとき特に顯著な差をもつ或る形質が存する筈である。従つて植物の類縁關係は植物體が親より繼承せる最も強い遺傳的形質の比較によりなすとき最も判然とすべきであり、即ち斯る強い特性が何れの植物に於ても同一であるときは最も簡單であつて、例えば總ての植物が親より最も強い特性として外部形態上の特徴を繼承したとすれば外部形態の比較により最も容易に且つ明かにその類縁關係を知ることが出来、若しも外部形態よりも内部構造を、或は蛋白質を、又は染色體の形態又は數を、或は生理的生態的性質を強い特性として繼承した場合は外部形態上の比較よりも是等植物間に共通する特に強い遺傳的形質の比較により最も明かに且つ容易に其等植物間の類縁關係を知り得る譯である。

然るに若し供試植物の親より繼承した最も強い遺傳的形質が植物により相異なる

場合は、或一種の植物に於ける強い遺傳的特性の比較のみによつては總ての植物間の類縁關係は明かにし得ないであらうし、結局總ての植物に於ける強い遺傳的形質の綜合的比較により始めて明かになし得る譯である。

然るに自然界に於ては、親より繼承した最も強い形質が總ての植物に於て同一であることは望み難いことであるから、一般には、或一つの形質のみの比較により類縁關係を決定し得ることは、特別な場合の外は不可能と考うべきである。

斯くの如く考察するとき、血清學的蛋白質識別法も他の諸形質による場合と同様植物の類縁關係を決める一つの方便とはなり得ても、これのみにより分類系を確立する事は尙不完全である場合が多いから、結局外部形態、内部構造、ゲノム分析、染色體の量的關係及び生理的生態的特性等から觀た類縁關係を總括考察することにより始めて完全な類縁關係が判明され得る理であつて、斯くして分類學は漸次實驗分類學として發達すべきものであらう。

然し茲に考慮すべき問題は、以上の様な植物の諸遺傳的形質の内何れの形質が最も種屬特異性が大きであるかの問題である。即ち類縁の遠い「屬」、又は「科」を異にする植物は何れの形質より觀ても容易に之を區別し得るが、近縁の種類程差別が困難となるので、何れの形質が最も鋭敏に近縁の植物間の差別を示し得るかの問題である。

然るに血清學的蛋白質識別法は一般化學的反應よりも一層鋭敏であることが認められて居り、且つ免疫血清の種屬特異性は免疫操作の改善によりこれを著しく増強せしめ得るので本法によるときは他の如何なる形質の比較によつても明かに判別し得ない點をも識別することが出来、進んでは著しく近縁な品種間の判別も本法により容易に可能となることが豫期される。

而して本研究の材料たる *Quercus* 屬はその種類は極めて多く、その分類に關しては植物分類學上に於ても議論の多い問題であつて、未だこれに關する定説が少い現狀であるが、本研究により完全とは言えないが其の血清學的類縁反應度による分類の一據點たり得ば幸甚である。

3) 免疫用植物と抗原浸出用植物とを互に交換して試験した場合

その反應度に相違ある理由

上記の沈降試験に於て、注意すべき事實は對コナラ免疫血清はアカガシ浸出液と或程度反應するのに反し、對アカガシ免疫血清はコナラ浸出液と反應が陰性であり、又アベマキに對する免疫血清はカシワ浸出液と第4號液迄反應するにも拘らず、對カシワ免疫血清はアベマキ浸出液と第3號液迄しか反應しないように(第21表參照)免疫用植物と抗原浸出用植物とを互に交換して試験した場合その反應度に相異のある事は、瀨瀨氏¹⁷⁾及び小島氏¹⁶⁾等も既に注意して居り、これは單に免疫血清の種屬特異性の多少により説明すべきか、或は系統關係上重大な意味を有するものであるかは斷定し得ないが、今斯かる現象の起り得る場合として次の様な場合が想像され得る。

即ち今コナラとアカガシの場合について考えると、コナラの抗原蛋白は例えば「イ」「ロ」「ハ」「ニ」「ホ」なる Fraction より成り、又アカガシの抗原蛋白は「ニ」「ホ」「ヘ」「ト」「チ」なる Fraction より成るものと假定し、これらを以て免疫した場合、抗コナラ血清には「イ」「ロ」「ハ」「ニ」「ホ」に對する免疫體「い」「ろ」「は」「に」「ほ」が悉く生産されても、抗アカガシ血清には「ヘ」「ト」「チ」に對する免疫體「へ」「と」「ち」のみを生じ、コナラと共通 Fraction なる「ニ」「ホ」に對する免疫體は生産されなかつた場合に斯かる現象が起るべく、又アベマキとカシワの場合も同様にして、例えばアベマキの抗原蛋白は「a」「b」「c」「d」「e」なる Fraction より成り、又カシワの抗原蛋白は「c」「d」「e」「f」「g」なる Fraction より成るものと假定し、これらを以て免疫した場合、抗アベマキ血清には「b」「c」「d」「e」に對する免疫體「B」「C」「D」「E」は生産されても「a」に對する免疫體「A」は生産されない。又抗カシワ血清には「d」「e」「f」「g」に對する免疫體「D」「E」「F」「G」は生産されても「c」に對する免疫體「C」は生産されなかつた場合に起り得る現象である。

而して叙上の如き現象は異植物間に共通する抗原蛋白の各 Fraction 抗原性が、各その含有されている植物の種類により相違するときに顯出すべく、結局この問題も植物の類縁度の問題に歸着するが、本問題に關する立入つた研究は尙將來に俟たね

第 21 表 免疫用植物と抗原用植物とを交換して
試験した場合の沈降反応度の相違

抗 血 清	種 子 浸 出 液	沈 降 反 應 度
抗 コ ナ ラ	ア カ ガ シ	3
抗 アカガシ	コ ナ ラ	0
抗 アベマキ	カ シ ワ	4
抗 カシワ	ア ベ マ キ	3
抗 コルクガシ	ア カ ガ シ	3
抗 アカガシ	コ ル ク ガ シ	4
抗 コルクガシ	カ シ ワ	4
抗 カシワ	コ ル ク ガ シ	3
抗 カシワ	ア カ ガ シ	2
抗 アカガシ	カ シ ワ	3

ばならない。

以上、本研究の結果に対する考察を試みたが、之を要するに本研究の結果次の如く結論し得る。

- ① 血清學的蛋白質識別法による *Quercus* 屬樹木の類縁關係は概して植物分類學の示す所と一致する。
- ② 血清學的蛋白質識別法による *Quercus* 屬樹木の類縁關係は特に殼斗の總苞の形態による分類とよく一致する。
- ③ モンゴリナラとナラガシワは共にコナラとガシワとの中間に位する。
- ④ ウバメカシは常緑カシ類よりもアベマキ、クヌギに近縁である。
- ⑤ コルクカシはナラ、カシワ類及び常緑カシ類よりもアベマキ、クヌギ及びウバメカシにより近縁であり、この事實は樹藝上注目に價することである。

以上、本研究により *Quercus* に屬する總ての「種」の類縁關係が悉く明かにされた譯ではないが、通常法を以てしては全然不可能である *Quercus* 種子蛋白による血清學的研究が本研究の結果案出された「發芽處理法」により可能となつた。

而して *Quercus* の内でも Subgenus *Lepidobalanus* に属するものは自然交配による雑種が非常に多く年と共に新種発見が増加されつゝある現状であるから、それらの相互関係は極めて複雑であつて外部形態によりこれを總て判断することは至難であるが、本研究により *Quercus* の分類に初めて血清學的類縁反應度よりする分類の據點が與えられたのであり、尙免疫法の改善により免疫反應をより鋭敏ならしめると共に抗血清の種屬特異性を増強ならしめるときは、血清學的蛋白質識別法により容易に總ての種類 *Quercus* 屬樹木の類縁關係を明にし得るであろうが、これは將來の研究に俟たねばならない問題である。

II. *Castanea* 屬に關する研究

1. 實 驗

1) 實驗材料及び其の處理

本實驗に於ては次記の栗品種の果實を使用した。即ち

柴 栗 (*Castanea crenata* S. et Z. var. *kusakuri* Nakai)

支邦栗 (*Castanea bungeana* Bl.)

咸從栗 (平從栗) (*Castanea bungeana* Bl.)

朝鮮栗 (*Castanea crenata* S. et Z. var. *dulcis* Nakai)

の外、日本内地に於ける栽培大果種 (*Castanea crenata* S. et Z. forma *gigantea* Makino)

オサヤ (OSAYA)

銀 寄 (GINYOSE)

毛 長 (KENAGA)

鹿 爪 (KANOTSUME)

岸 根 (GANNE)

鈴 成 (SUZUNARI)

霜 被 (SHIMOKATSUGI)

長光寺 (SHŌKŌJI)

晩 赤 (BANSEKI)

の9種の果實を實驗に供した。

上記の内柴栗は 福岡市郊外の山野に自然生のもを、支那栗及び栽培大果種は、埼玉懸入間郡越生町大字上野苗圃に於ける 農林省林業試験場栗接木試験地に於て採取し、咸從栗は朝鮮平安南道山林會に又 朝鮮栗は朝鮮總督府林業試験場に 夫々依頼して採取送附を受けたものである。

而して是等は直ちに果皮及び種皮を取り去り、ナイフで細かく刻んだものを乳鉢内に入れて摺り潰し、更に扇風機にかけて乾燥せしめた後更に乳鉢で細粉し、石油エーテルで3—4時間脱脂して白色粉末を得、之を滅菌瓶内に貯えてデシケーター内に保存した。

2) 注射用液の調製法

上記の品種中、晩赤、霜被、柴栗及び支那栗の4種を免疫原調製用に使用することとし、注射に際し各粉末5gに生理的食鹽水30ccを加え時々振盪して5時間室内に放置後、1分間4000回轉の速度で10分間遠心分離して得た上澄液を注射用に供した。斯くして得た浸出液は白色乃至淡黄色を呈し、蛋白質含量を Aufrecht 氏の Albumimeter で測定した結果は何れも約0.3%であつた。尚注射用液の調製は總て滅菌状態の下で行い、且つ注射に臨み之を37°Cに温めることにした。

3) 免 疫 法

免疫動物は體重1.7~2.0kgの健全な家兎を用い、耳靜脈注射により免疫した。即ち各品種に對し各4匹宛の家兎を使用し、上記の如くして調製した注射用液を各5cc宛耳靜脈内に2日おきに5回注射を繰返し、其の後1週間を経て試験採血を行い、免疫血清として使用に堪えない時は更に2回注射を行い其の後1週間を経て全採血を行つた。採取した血液は常法により血清を分離採取しこれを直ちに56°Cに30分間保ち、非動化した後0.5%の割合に石炭酸を加え褐色アンプルに入れて氷室内に保存した。

4) 沈降試験用溶液の調製法

各栗粉末 1g に 5cc の生理的食鹽水を加えよく振盪して一夜氷室内に放置した後、これを 1 分間 4000 回轉の速度で 10 分間遠心分離を行い透明な上澄液を得た。斯くして得た上澄液の蛋白含有量を Aufrecht の Albumimeter により調べた結果は 0.2% ~ 0.3% であつたので、0.2% 以上のときはこれに生理的食鹽水を加え丁度 0.2% になる様に稀釋した。然るに斯くして得た蛋白浸出液は嘗て 瀨瀨氏が指摘した様に正常家兔血清に對しても反應を呈するので同氏の「沈降反應度法」に従い、これら浸出液に同量の正常家兔血清を加えて混合し、孵卵器に入れ 1 時間放置後生じた沈澱物を遠心分離により除去した上澄液(栗粉末に對し 10 倍液)を以て基本液とし、これを生理的食鹽水により 1—2—4—6 稀釋法により稀釋し、次の如き一列の稀釋液を作つた。

稀釋液番號	1	2	3	4	5	6	7
稀釋倍數(對栗粉末)	10	20	40	60	80	100	200
栗蛋白含量(%)	0.1	0.05	0.025	0.018	0.013	0.010	0.005
稀釋液番號	8	9	10	11	12	13	
稀釋倍數(對栗粉末)	400	600	800	1000	2000	4000	
栗蛋白含量(%)	0.0025	0.0018	0.0013	0.0010	0.0005	0.00025	

尙免疫動物は免疫期間中體重の減少を來し且つその免疫血清の沈降素價は 3500~4000 であつた(第 1 表)。

第 1 表 免疫動物の體重及免疫血清の沈降素價

免疫動物番號	免疫原	雌雄原	免疫前に於ける體重(g)	免疫後に於ける體重(g)	免疫血清の沈降素價
1	晚赤	♂	1635	免疫中斃死	—
2	〃	♂	1665	1400	3500
3	〃	♂	1800	1390	4000
4	〃	♀	1850	1380	4000
5	霜被	♀	1770	1490	3500
6	〃	♂	1710	1370	3500
7	〃	♀	1990	1630	4000
8	〃	♀	1650	免疫中斃死	—

9	柴 栗	♂	1760	1560	4000
10	〃	♂	2050	免疫中斃死	—
11	〃	♀	2300	1780	4000
12	〃	♀	1785	1370	4000
13	支那栗	♂	2315	1870	4000
14	〃	♀	1980	1580	3500
15	〃	♀	1990	1370	4000
16	〃	♂	2070	1625	4000

5) 沈降試験法

沈降反應は總て輪環反應 (Ringprobe) に依つた。即ち上述の様にして得た免疫血清 0.1 cc 宛を各一列の沈降試験管に入れ、其の上より試験用蛋白浸出液各 0.2 cc 宛を靜かに添加して室内に靜置し兩液重層後 15 分、30 分、60 分及び 120 分の 4 回に亘り兩者の境界部に生ずる沈降物の有無を検した。而して反應程度の比較は 120 分後に於て反應の顯われ得る最大限度の溶液稀釋度番號數に由ることにした。

尙試験を行うに當つては常に對照として、(1) 正常血清に試験液を重層したもの、(2) 免疫血清に生理的食鹽水を重層したものとを設け、その反應が常に陰性である事を認めた。又實驗は通常同一試験を同時に兩組行う事とし、兩者の結果が常に一致することを確めたのである。

6) 試験管内飽和吸收法

以上の様にして各免疫血清の主、副沈降素價を調べると共に更に免疫原調製に使用した 4 品種につき、weichart 氏法により試験管内飽和吸收試験を行つた。即ち各免疫血清を正常家兔血清で 2 倍に稀釋せしめた後、その一部分を採りこれらに注射用液と全く同様にして調製した晚赤、霜被、紫栗及び支那栗の各 5 倍生理的食鹽水浸出液を別々に同量宛加え、之を 2 時間 37°C の孵卵器内に靜置した後遠心分離し、其の上澄液につき吸收の完否を検し、若し吸收不完全なときは吸收用浸出液の量を増加し、吸收操作を繰返して吸收完全なるを確めて後これらにつき上記免疫用に供した 4 品種の栗試験用液との沈降反應を上記と同様の試験方法により檢した。但しこの

際對照試體として、前記の外尙免疫血清に正常血清の 1/2、1/1 稀釋液を重層したものを増設し、その反應が常に陰性なる事を認めた。

7) 實驗成績

a. 無處理血清を以てした沈降反應

以上の様にして得た實驗結果の内、先づ飽和吸收處理を施さない抗血清を以てした實驗結果を總括表示すれば次のようである。但し表中類縁反應度として示された數字は反應を認め得る溶液の最高稀釋度の番號を示すのである。(第 2 表)。

即ち表に示されている様に、何れの抗血清に於ても各品種の抗原液と第 12 號液乃至第 13 號液まで反應し、其等の沈降反應度に大差なく、供試品種は何れも血清學的に頗る近縁なことが示されて居り、従つて互に識別することが困難であつた。

第 2 表 栗免疫血清の沈降反應度

(抗血清に反應する最大稀釋度番號數によつて示す)

免疫血清 抗原	抗晚赤	抗霜被	抗柴栗	抗支那栗
オ サ ヤ	12	12	12	12
銀 寄	12	13	13	12
毛 長	12	12	12	12
鹿 爪	12	12	13	12
岸 根	12	12	12	12
鈴 成	13	13	13	12
長 光 寺	12	12	12	12
霜 被	13	13	12	12
晚 赤	13	13	12	12
柴 栗	13	13	13	12
支 那 栗	12	12	12	13
咸 從 栗	12	12	12	13
朝 鮮 栗	12	12	13	12

故に以上の實驗に於て第 12 號液と第 13 號液との間を更に細分し陽性反應の境界を仔細に檢する目的を以て、以上に於ける第 11 號液(栗粉末に對する 1000 倍液、栗

蛋白含量 0.001%) を基準としてこれを 1—1.5—2.0—2.5 式に稀釋し、次の如き一列の稀釋液を調製し、以て以上に於けると同様の試験方法により沈降反應を檢した。但しこの際試験結果は血清價により修正を行い、即ちその免疫原に對する沈降素價 4000 を標準とし、その沈降素價 3500 なるものによる試験結果は一階段だけ増加せしめることにした。

稀釋液番號	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)
稀釋倍數(對栗粉末)	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000
栗蛋白含量(%)	0.00100	0.00066	0.00050	0.00040	0.00033	0.00028	0.00025

然るにその結果は、次表に示す如く、各抗血清の沈降反應度に稍々明かな差異を生じ、以上に於て識別困難であつた品種間の識別が或程度可能となつたようである(第 3 表)。

第 3 表 栗免疫血清の沈降反應度
(抗血清に反應する最大稀釋度番號數によつて示す)

免疫血清 抗 原	抗晚赤	抗霜被	抗柴栗	抗支那栗
オ サ ヤ	(4)	(4)	(3)	(3)
銀 寄	(4)	(6)	(7)	(3)
毛 長	(4)	(4)	(3)	(3)
鹿 爪	(4)	(4)	(6)	(3)
岸 根	(5)	(5)	(5)	(3)
鈴 成	(5)	(6)	(7)	(4)
長 光 寺	(5)	(5)	(4)	(3)
霜 被	(5)	(7)	(4)	(3)
晚 赤	(7)	(5)	(4)	(3)
柴 栗	(6)	(6)	(7)	(4)
支 那 栗	(3)	(3)	(4)	(7)
成 從 栗	(3)	(3)	(4)	(7)
朝 鮮 栗	(4)	(4)	(7)	(4)

即ち今第 3 表により各抗血清毎にそれと反應する抗原をその反應度の順位に従い列記すれば次の如くなる。

(イ) 晩赤の免疫血清に對する各種抗原の類縁反應度。

第(7)號液迄。 晩赤。

第(6)號液迄。 柴栗。

第(5)號液迄。 岸根、鈴成、長光寺、霜被。

第(4)號液迄。 オサヤ、銀寄、毛長、鹿爪、朝鮮栗。

第(3)號液迄。 支那栗、咸從栗。

(ロ) 霜被の免疫血清に對する各種抗原の類縁反應度。

第(7)號液迄。 霜被。

第(6)號液迄。 銀寄、鈴成、柴栗。

第(5)號液迄。 岸根、長光寺、晩赤。

第(4)號液迄。 オサヤ、毛長、鹿爪、朝鮮栗。

第(3)號液迄。 支那栗、咸從栗。

(ハ) 柴栗の免疫血清に對する各種抗原の類縁反應度。

第(7)號液迄。 柴栗、銀寄、鈴成、朝鮮栗。

第(6)號液迄。 鹿爪。

第(5)號液迄。 岸根。

第(4)號液迄。 長光寺、霜被、晩赤、支那栗、咸從栗。

第(3)號液迄。 オサヤ、毛長。

(ニ) 支那栗の免疫血清に對する各種抗原の類縁反應度。

第(7)號液迄。 支那栗、咸從栗。

第(4)號液迄。 鈴成、柴栗、朝鮮栗。

第(3)號液迄。 オサヤ、銀寄、毛長、鹿爪、岸根、長光寺、霜被、晩赤。

b. 試験管内飽和吸収血清を以てした沈降反應

試験管内飽和吸収處理を行つた抗血清を以てした沈降反應を見ると(第4表)、何れの血清も吸収處理の結果多くの場合沈降反應能を消失するに至つたが尙或種の抗原に對しては弱度ながら反應を示したのである。

第 4 表 試験管内飽和吸収処理を行つた栗抗血清の沈降反應

(抗血清に反應する最大稀釋度番號數によつて示す)

免疫血清		抗 晚 赤 血 清				抗 霜 被 血 清			
抗原	吸収原	晚 赤	霜 被	柴 栗	支那栗	霜 被	晚 赤	柴 栗	支那栗
晚 赤	0	0	0	3	0	0	0	2	
霜 被	0	0	0	3	0	0	0	3	
柴 栗	0	0	0	3	0	0	0	3	
支 那 栗	0	0	0	0	0	0	0	0	

免疫血清		抗 柴 栗 血 清				抗 支 那 栗 血 清			
抗原	吸収原	柴 栗	晚 赤	霜 被	支那栗	支那栗	晚 赤	霜 被	柴 栗
晚 赤	0	0	0	2	0	0	0	0	0
霜 被	0	0	0	2	0	0	0	0	0
柴 栗	0	3	3	3	0	2	2	0	
支 那 栗	0	2	2	0	0	3	3	3	

今上表により各抗血清の吸収の結果を總括すると、

① 抗晚赤血清及び抗霜被血清を晩赤、霜被及び柴栗で吸収した場合は、何れの抗原に對しても反應は陰性であるが、同血清を支那栗で吸収した場合は支那栗を除く晩赤、霜被及び柴栗に對し尙弱度の反應を示した。

② 抗柴栗血清を柴栗で吸収した場合は何れの抗原に對しても反應が陰性であるが、同血清を晩赤又は霜被で吸収した場合は、晩赤及び霜被に對しては反應皆無となるが柴栗及び支那栗に對しては尙弱い反應を示し、又同血清を支那栗で吸収した場合は、支那栗を除き晩赤、霜被及び柴栗に對して尙弱度の反應を呈した。

③ 抗支那栗血清を支那栗で吸収した場合は、何れの抗原に對しても反應は陰性であるが、同血清を晩赤又は霜被で吸収した場合は柴栗及び支那栗に對して尙弱度の反應を示し、又同血清を柴栗で吸収した場合は晩赤、霜被及び柴栗に對しては反應無しとなるけれども支那栗に對しては尙弱度の反應を示した。

以上の實驗結果を要するに、供試栗品種の類縁關係は何れも頗る近縁であつて、ために無處理抗血清を以てした沈降反應によつては栗品種間の識別が困難であるが、抗原用試験液の稀釋倍數を細分することにより稍々類縁反應度に差異を認め得るに

至り、尙抗血清を試験管内で飽和吸収することにより、その反應振りに稍々明かな差別を生じて、即ち飽和吸収操作により抗血清の種特異性が增強されたことが示されている。

2. 考 察 及 び 結 論

以上の實驗結果により供試栗品種間の類縁反應度を總括分類すれば、次の如くなる。

A) 日本産大果種栗相互間の類縁關係を示す事項

1) 晩赤(晩生)に對する免疫血清は、オサヤ(早生)、銀寄(中生)、毛長(中生)鹿爪(中生)よりも、岸根(晩生)、鈴成(晩生)、長光寺(晩生)、霜被(晩生)との類縁反應度が稍々高い(第3表)。

2) 霜被(晩生)に對する免疫血清は、銀寄(中生)、鈴成(晩生)と最も反應が強く、岸根(晩生)、長光寺(晩生)及び晩赤(晩生)との反應はそれに次いで強く、オサヤ(早生)、毛長(中生)及び鹿爪(中生)の反應が最も低い(第3表)。

3) 抗晩赤血清を霜被で、又抗霜被血清を晩赤で夫々吸収した場合は、共に何れの抗原に對しても反應せず、其等の沈降素が互に完全に吸収されたことを示した(第4表)。

B) 日本産大果種栗品種と野生柴栗との類縁關係を示す事項

1) 日本産大果種栗品種中晩赤及び霜被に對する免疫血清は柴栗と比較的高い類縁反應度を示し(第3表)、且つこれらの抗血清を柴栗を以て吸収した場合は何れの品種に對しても反應を示さず、その沈降素が悉く吸収されたことを示した(第4表)。

2) 柴栗に對する免疫血清の大果種栗品種に對する類縁反應は品種によりその強さを異にし、即ち銀寄、鈴成及び鹿爪との反應が最も強く、岸根、晩赤、霜被及び長光寺との反應がこれに次ぎ、オサヤ及び毛長との反應が最も低い(第3表)。

3) 柴栗に對する免疫血清を晩赤及び霜被で吸収した血清は、晩赤及び霜被に對しては全然反應しないが、柴栗に對しては尙弱度の反應を示し(第4表)、晩赤

及び霜被により柴栗免疫血清内の沈降素を悉く吸収し得なかつたことを示した。

C) 野生柴栗と支那栗との類縁關係を示す事項

1) 抗柴栗血清は支那栗と少々弱く反應すると共に抗支那栗血清も柴栗と少々弱く反應する(第3表)。

2) 支那栗を以て吸収した抗柴栗血清は柴栗と尙弱度の反應を示すと共に、柴栗を以て吸収した抗支那栗血清も支那栗と尙弱度の反應を示した(第4表)。

D) 日本産大果種栗と支那栗との類縁關係を示す事項

1) 晩赤及び霜被に對する免疫血清は支那栗及び咸從栗と最も弱く反應すると共に、對支那栗免疫血清に對する大果種栗品種の反應度も何れも低い(第3表)。

2) 支那栗で吸収した抗晩赤及び抗霜被血清は何れも晩赤及び霜被に對して尙弱度の反應を示すと共に、晩赤又は霜被にて吸収した抗支那栗血清も共に支那栗に對し尙弱度の反應を示し(第4表)、互に其の沈降素が完全に吸収され得なかつたことを示している。

E) 朝鮮栗、日本栗及び支那栗間の類縁關係を示す事項

1) 朝鮮栗は抗晩赤血清及び抗霜被血清と少々低い反應を示す(第3表)。

2) 柴栗に對する免疫血清は朝鮮栗と強い反應を示す(第3表)。

3) 支那栗に對する免疫血清は朝鮮栗と少々弱く反應する(第3表)。

以上之を要するに、本研究に於て得た栗に對する沈降素血清は種の特異性が大でなく、よつて抗原用浸出液の稀釋度の細分又は抗血清の試験管内飽和吸収處理等により始めて血清の反應度に少々差異を生ぜしむることを得だが、然しこれにより各品種間の類縁關係に斷定を下すには未だ不充分であつて、従つて本問題に對する決定的結論は尙今後の研究に俟たなければならぬが、今以上の様な諸事實により推論すれば次の如き事項が言えるようである。

1) 日本産栽培大果種栗品種相互間の類縁關係は、之を充分明かにし得ないが、その類縁度は大體に於て果實の熟期と關係があるようである。

2) 大果種品種と野生柴栗とは近縁であるが、その近縁度は品種の相異により多少の差異がある。

- 3) 野生柴栗と支那栗とは稍々疎縁であつて明かに互に識別される。
- 4) 日本産大果種栗品種と支那栗とは類縁度が低い。
- 5) 朝鮮栗は柴栗と頗る近縁であつて、支那栗とは縁が比較的疎いようである。

尙翻つて今日植物分類學による栗分類の結果を見ると、日本産は 1816 年 Siebold et Zuccarini 氏等が *Castanea crenata* と命名したのに據り Nakai 氏は 1931 年野生柴栗を其の變種即ち、*Castanea crenata* var. *kusakusi* となし²⁷⁾、牧野氏²⁸⁾は大果種品種を總て *C. crenata* の forma *gigantea* として何れも同一種に屬することを示したが、支那栗又は咸從栗に對しては最初中井氏 (1917)²⁶⁾ はこれを中部支那産の *C. mollissima* Bl. とし朝鮮栗をば北支那産の *C. bungeana* Bl. とし、朝鮮栗を支那系統のものとしたが、其の後の調査により支那栗(咸從栗)こそ *C. bungeana* Bl. であり、朝鮮栗は *C. crenata* var. *dulcis* と命名して日本栗の一變種とした。¹⁷⁾

而して上記の實驗結果に於ても支那栗(咸從栗)は柴栗、大果種品種及び朝鮮栗と比較的疎縁なこと、及び柴栗と大果種、又柴栗と朝鮮栗とは互に近縁なことが示されて居り、即ち血清學的蛋白質識別法による栗の類縁關係は植物分類學の分類結果と概して一致することが認められる。

尙本實驗に於て抗晩赤及び抗霜被血清は柴栗と第(6)號液迄反應するのに對して、抗柴栗血清は晩赤及び霜被と第(4)號液迄しか反應せず、斯く免疫用植物と試験液調製用植物とを交換した場合その沈降反應度に差のある事實は前編 I. *Quercus* 屬に於ける場合と同様であるが、これは免疫血清の「種特異性」に因るものか將又系統上重大な意味を有するものであるかは猶今後の研究に俟たねばならない。

摘 要

著者は *Quercus* 屬及び *Castanea* 屬の類縁關係を血清學的蛋白質識別法により研究する目的を以て實驗材料としてその種子を用い且つその蛋白質浸出法としては、從來の研究者により使用され來つた生理的食鹽水及び弱アルカリ液によることゝし、家兔を免疫動物として耳靜脈又は腹腔内注射法により實驗を進めたのであるが、

I. *Quercus* 屬に於て 1) 生理的食鹽水により浸出された *Quercus* 種子可溶性蛋

白は、熱により凝固せず、又一般蛋白質沈澱劑により沈澱しない特性を有すると共に、これにより免疫體を生産し得ない事實。

2) 弱アルカリ液により浸出された種子蛋白質は、一般蛋白質同様熱により凝固すると共に蛋白沈澱劑により沈澱するが、これにより免疫體を生産し得ない事實等を明かにした。

故に著者は *Quercus* 屬種子蛋白質により免疫體が生産されない理由が該種子の含有する多量のタンニン質に由來するのであるとの推察の下に、*Quercus* 種子タンニンが蛋白の抗原性に及ぼす影響について實驗し、

タンニン質は蛋白の試験管内抗原性には或程度悪影響を及ぼすが、生体内抗原性には毫も悪影響のない事實を明かにすると共に、*Quercus* 種子内貯藏蛋白は元來血清學的に頗る安定であつて生体内抗原性を缺ぐとの結論に達した。

茲に於て著者は、更に *Quercus* 種子蛋白質に抗原性を賦與せしめる處理法について考究し、その結果種子の發芽處理が該種子蛋白質に抗原性を獲得せしめるに至ることを實驗的に明かにし、且つそれは種子發芽の際貯藏蛋白の分解の初期に生成さるべき一種の變形蛋白質に由來するのではなからうかと推測した。

故に著者は以上の方法を「發芽處理による抗原性賦與法」又は單に「發芽處理法」と稱することとし、本法により次記の 15 種の *Quercus* 屬及び比較のため *Lithocarpus* *Shiia* 及び *Castanea* の各一種について血清學的類縁關係の研究を行つた。

免疫原用樹種

- ア ベ マ キ (*Quercus variabilis* Bl.)
- コ ル ク ガ シ (*Quercus suber* L.)
- コ ナ ラ (*Quercus serrata* Thunb.)
- カ シ ワ (*Quercus dentata* Thunb.)
- ア カ ガ シ (*Quercus acuta* Thunb.) (*Cyclobalanopsis acuta* Oerst.)

反應原用樹種

上記 5 樹種の外

- ク ス ギ (*Quercus acutissima* Carr.)

- ウバメガシ (*Quercus phylliraecides* A. Gray.)
 オオバコナラ (*Quercus major* Nakai)
 ナラガシワ (*Quercus aliena* Bl.)
 モンゴリナラ (*Quercus mongolica* Fisch.)
 イチキガシ (*Quercus gilva* Bl.) (*Cyclobalanopsis gilva* Oerst.)
 アラカシ (*Quercus glauca* Thunb.) (*Cyclobalanopsis glauca* Oerst.)
 ツクバネガシ (*Quercus paucidentata* Franch.) (*Cyclo. sessilifolia* Bl.)
 シラカシ (*Quercus myrsinaefolia* Bl.) (*Cyclo. myrsinaefolia* Oerst.)
 ウラジロガシ (*Quercus stenophylla* Makino) (*Cyclo. stenophylla* Schottky.)
 シリブカガシ (*Kuromatea glabra* Nakai.)
 シ イ (*Shiia Sieboldi* Makino.)
 ク リ (*Castanea crenata* S. et Z.)

即ち免疫原及び反應原用抗原としては、以上の種子に發芽處理を施して得た甲析種子の可溶性蛋白質を生理的食鹽水により浸出した液を用い、免疫動物としては家兔を使用し、耳靜脈注射により免疫を行つて得た抗血清について Ringprobe により沈降反應を検し、以てこれら樹種の血清學的類縁關係の研究を爲し次のような結論に達した。

- 1) 血清學的蛋白質識別法による *Quercus* 屬樹木の類縁關係は概して植物分類學の示す所と一致する。
- 2) *Quercus* 屬樹木の血清學的類縁反應は特に殼斗の總苞の形態による分類とよく一致する。
- 3) モンゴリナラ及びナラガシワは共にコナラとカシワとの中間に位する。
- 4) ウバメガシは常綠カシ類よりもアベマキ、クヌギと近縁である。
- 5) コルクガシはナラ、カシワ類及び常綠カシ類よりも、アベマキ、クヌギ及びウバメガシに近縁であり、この事實は樹藝學上注目に價することである。

以上之を要するに、本研究により *Quercus* に屬する總ての樹種の類縁關係が悉く明かにされた譯ではないが、通常法を以てしては困難である *Quercus* 屬の種子蛋白

による血清學的研究が「發芽處理による抗原性賦與法」により可能となり、従つて分類學上議論の多い *Quercus* 屬樹木の分類に、血清學的類縁反應度よりする分類の一據點を與えたことは特に注目すべきことである。

2 *Castanea* 屬に於て

日本内地に於ける栽培大果種栗品種、野生柴栗、支那栗及び朝鮮栗等の中、栽培栗品種中晩赤及び霜被の2種、野生柴栗及び支那栗の計4種を免疫原用として因つて得た沈降素血清について上記4種の外オサヤ、銀寄、毛長、鹿爪、岸根、鈴成、長光寺等の大果種栗品種及び咸從栗並びに朝鮮栗の合計13種の栗實の生理的食鹽水浸出液を抗原として反應せしめ、通常法及び抗血清の試験管内飽和吸収法による沈降試験により其等相互間の類縁關係を研究し次の如き成績を得た。

即ち供試栗品種の類縁關係は何れも頗る近縁であつて、そのために通常法による沈降試験によつては其等相互間の類縁反應度を明かに識別することが困難であつたが、試験用浸出液の稀釋度數を細分して試験することにより稍々類縁反應度に差異を生ずるに至り、尙抗血清に飽和吸収處理を施すことにより稍々その種特異性を增強せしめ、因つて品種間の識別を或程度明かになし得たが、猶各品種間の類縁關係を悉く明かにするに至らなかつた。而して實驗の結果次の諸事項が推論された。

- 1) 日本産栽培大果種栗品種間の類縁關係は之を充分明かにするに及ばなかつたが、大體に於て其等相互間の血清學的類縁關係は果實の熟期と關係があるようである。
 - 2) 大果種栗品種は野生柴栗と近縁であるがその程度は品種の相異により多少の差異がある。
 - 3) 野生柴栗は支那栗と疎縁であつて且つ明かに互に識別される。
 - 4) 日本産大果種栗品種と支那栗とは類縁度が低い。
 - 5) 朝鮮栗は柴栗と近縁であつて、支那栗とは縁が比較的疎いようである。
- 而して以上の諸結果は植物分類學による栗分類の結果と概して一致する。

引用文献

- (1) 青木巳三男 (1941): 諸種の花粉に因る 實驗的過敏症現象の研究、成醫學雜誌、60 卷、8 號。
- (2) — (1941): 花粉による Schwarzman 現象と沈降素產生及過敏症反應との關係、犯罪學雜誌、15 卷、6 號。
- (3) 足立雪郎 (1936): 植物性蛋白(主として種子より)の免疫血清 Artspezifität. 衛生學傳染病學雜誌 No. 617.
- (4) Azuma, T. (1910): Beiträge zum Stadium der Präzipitierenden Eigenschaften pflanzlicher Antigen. Zeitschr. f. Immunität II. Teil.
- (5) Baldwin, I. L., E. B. Fred & E. G. Hastings (1927): Grouping of legumes according to biological reactions of their seed proteins. Bot. Gaz. vol. 83.
- (6) Bertarelli, E., (1904): Die Verwendung der biologischen Methode zur Auffindungs und Diagnose der Hülsenfruchtmehl mit besonderer Berücksichtigung der Wicke. Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 2.
- (7) Dunbar, W. P. (1910): Über das serologische Verhalten der Geschlechtszellen. Zeitschr. f. Immunitätsforschung. Ed. 4.
- (8) Gasis, D., (1908): Über die Untersuchung verschiedener Pflanzeneiweißarten mit Hilfe spezifischer Sera. Berliner klein Wochenschr. Nr. 7.
- (9) Gohlke, Kr., (1915): Die Serumdiagnostik im Dienste der Pflanzensystematik. Centralbl. Bakt. Abt. 128.
- (10) 比企能之 (1922): 生體內に輸入せる異種蛋白の血清學的研究、實驗醫學雜誌、6 卷、9 號。
- (11) Hōdyō, H., (1931): Immunologische Untersuchungen über Blattpressäfte und Blattfarbstoffe. Jour. of Biochemistry. vol. 15. No. 2.
- (12) 今井忠次郎 (1932): 植物性抗原並に抗體に關する 實驗的研究、社會醫學雜誌、第 551 號。

- (13) 岩田久敬 (1941): 樹實類の飼料的利用、中央畜産會發行。
- (14) 加藤茂苞、丸山吉雄 (1928): 稻の異なる種類間に於ける類縁關係の血清學的研究、九州帝大農學部學藝雜誌、第3卷、1號。
- (15) 河本台鉉 (1943): 朝鮮森林植物圖說、P. 120.
- (16) Kojima H., (1921): Serobiologische Untersuchungen über die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen der Dikotyledon und Gymnospermen. Kyushu Imp. Univ. College Med. Mitt. 6.
- (17) Kôketsu R., (1917): Serodiagnostische Untersuchungen über die Verwandtschaftsverhältnisse der Gymnospermen. Kyushu Imp. Univ. College Med. Mitt. 4.
- (18) 小松原謙三 (1922): 植物性血球凝集素の研究、東京醫學會雜誌、36卷。
- (19) Kowarski, A., (1901): Über die Nachweis von pflanzlichen Eiweiss auf biologischen Wege. Deut. Med. Wochenschr. Bd. 27.
- (20) Lake, Osborn, Wells, (1906): The immunological relationship of barley and gliadin of wheat as shown by the complement fixation, passive anaphylaxis of the vegetable protein. Jour. of infect, disea. Bd. 14.
- (21) Magnus u. Friedenthal, (1906): Ein experimenteller Nachweis natürlicher Verwandtschaft bei Pflanzen. Berichte d. deut. bot. Gesellschaft. Bd. 24.
- (22) —, (1907): Über die Spezialität d. Verwandtschaftsreaktionen der Pflanzen. Berichte d. deut. bot. Gesellschaft. Bd. 25.
- (23) Magnus, W, (1909): Die Erkennung von Mehlverfälschungen durch die serodiagnostische Methode. Landwirtschaft. Jahrbuch. Bd. 37. Erg. Bd. 5.
- (24) 増田義男 (1950): 粳米及糯米の血清學的比較研究、社會醫學雜誌、521號。
- (25) Mez, C., K. Gohlke (1913): Physiologisch-systematische Untersuchungen über die Verwandtschaften der Angiospermen. Beitr. zur Biolog. der

Pflanzen. 12.

- (26) 中井猛之進 (1917): 朝鮮森林植物編、第3輯、殼斗科。
- (27) — (1931): 日鮮植物管見、第40、植物學雜誌、第45卷、531號。
- (28) 野崎伸三、尾石元興 (1944): 朝鮮に於けるタンニン資源の研究、(第1報) 朝鮮産植物のタンニン含有量、日本林學會誌、26卷、4號。
- (29) 尾山友三 (1932): 粳米及糯米の血清學的比較研究、衛生學傳染病學雜誌、28卷、4號。
- (30) Rehder (1927): Manual of cultivated trees and shrubs.
- (31) Reländer, L. K. (1907): Kann Man mit Präzipitinreaktion Samen von verschiedenen Pflanzarten u. Abarten voreinander unterscheiden? Zentralbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. 20.
- (32) 佐藤敬二 (1943): 林木育種論、P. 24.
- (33) Schütze, A. (1901): Weitere Beiträge zum Nachweis verschiedener Eiweissarten auf biologischen Wege. Zeitschr. f. Hygiene. Bd. 38.
- (34) Strum, K. (1910): Monographische Studien über *Adoxa moschatellina*. Vierteljahrschr. d. Naturforsch. Gesellsch. in Zurich. 28.
- (35) 杉本順一 (1936): 日本樹木總檢索表、P. 54.
- (36) 鈴木梅太郎 (1942): 植物生理化學、P. 90.
- (37) 田中諭一郎 (1933): 栗の栽培法。
- (38) 田代歡一 (1941): 凝固血清蛋白の沈降原性、血清學免疫學雜誌、2卷、3號。
- (39) Thöni u. Thaysen (1915): Versuche zur Herstellung von spezifisch wirkenden Getreideantiseris für den Nachweis von Mehlverfälschungen. Zeitschr. f. Imm. Bd. 23.
- (40) 植木秀幹 (1936): 朝鮮産コナラ類に就きて、日本林學會誌、第18卷、第7號。
- (41) Uhlenhuth-u. Jüng, (1905): Über ein Ausflockungsphänomen in künstlichen öl-Emulsionen durch Serum normaler und vorbehandelter Tiere.

Vereinsbeilage der deutsch. med. Wochenschr. Nr. 14.

- (42) Wedelstadt u. Fellmer (1910): Beitrag zur Kenntnis d. Immunisierung durch Pflanzeneiweiss. Zeitschr. f. Imm. Bd. 8.
- (43) Zade, A. (1941): Serologische Studien an Leguminosen u. Gramineen. Zeitschr. Pflanzenzuchtung. 2.

SERODIAGNOSTIC INVESTIGATION ON THE AFFINITIES
OF DIFFERENT SPECIES OF GENUS *QUERCUS* AND
GENUS *CASTANEA*

(Résumé)

Sinkyu HYUN

(Japanese name: Nobuo KÔYAMA)

The affinities of different species of genus *Quercus* and genus *Castanea* have been investigated serodiagnostically, taking advantage of seed protein.

In order to carry out this study, rabbits have been immunized by means of intravenous and intraperitoneal injection with solutions obtained by extracting their seeds in physiological salt solution and weak alkali solution. The precipitin reaction has been tested on the obtained immune serum by means of "Ringprobe" or "Absättigungsverfahren".

1. On the genus *Quercus*.

First, the preliminary experiments were carried out to test the antigenic properties of *Quercus* seed protein and as a result the following facts have been proved:

1). *Quercus* seed protein extracted in physiological salt solution differs from the common protein in that coagulation takes place neither by heat nor general precipitants of protein, nor is it able to produce an antibody in vivo.

2) *Quercus* seed protein extracted in weak alkali solution coagulates by both heat and general coagulens of protein in the manner of common proteins, but it is unable to produce an antibody in vivo.

Therefore, on the theory that tannin contained in *Quercus* seeds restrains the antibody forming power of the seed protein, the author carried out an experiment to find out how the *Quercus* seed tannin influenced the antigenic properties of protein. The results show that the tannin contained in precipitinogen, to a certain extent, hinders the appearance of precipitin reaction in vitro, but the tannin in immunogen does not affect badly the precipitin forming property of protein in vivo at all. The author concluded that the seed protein of *Quercus* was too stable to affect it serochemically and lacked the antigenicity in vivo by nature.

Hereupon, the author continued the experiment to learn how to endow

the seed protein of *Quercus* with antigenicity. The result proved that the germination treatment of seeds made the seed protein become antigenic active due to the formation of a kind of metamorphosed protein in seeds, caused by seed protein decomposition at the first stage of germination.

The author called the above treatment the "Germinating Method" or "Antigenicity Endowing Method by Germination." By means of this method the serodiagnostic investigation on the relationships between the following fifteen species of genus *Quercus* and each species belonging to *Genera Lithocarpus, Shiia* and *Castanea* have been carried out.

Tree species used for preparation of immunogen :

- ABEMAKI (*Quercus variabilis* Bl.)
- KORUKUGASHI (*Q. suber* L.)
- KONARA (*Q. serrata* Thunb.)
- KASHIWA (*Q. dentata* Thunb.)
- AKAGASHI (*Q. acuta* Thunb.) (*Cyclobalanopsis acuta* Oerst.)

Trec species used for preparation of precipitinogen :

- KUNUGI (*Q. acutissima* Carr.)
- UBAMEGASHI (*Q. phylliraeoides* A. Gray.)
- ÔBAKONARA (*Q. major* Nakai)
- NARAGASHIWA (*Q. aliena* Bl.)
- MONGORINARA (*Q. mongorica* Fisch.)
- ICHIIGASHI (*Q. gilva* Bl.) (*Cyclo. gilva* Oerst.)
- ARAGASHI (*Q. glauca* Thunb.) (*Cyclo. glauca* Oerst.)
- TSUKUBANEGASHI (*Q. paucidentata* Franch.) (*Cyclo. sessilifolia* Bl.)
- SHIRAGASHI (*Q. myrsinaefolia* Bl.) (*Cyclo. myrsinaefolia* Oerst.)
- URAJIROGASHI (*Q. stenophylla* Makino) (*Cyclo. stenophylla* Shottky)
- SHII (*Shiia Sieboldi* Makino)
- SHIRIBUKAGASHI (*Kuromatea glabra* Nakai)
- KURI (*Castanea crenata* S. et Z.)

The tree seeds were treated for germination and sown in pots in the greenhouse. Both immunogen and precipitinogen were prepared by extracting the germinated seeds in physiological salt solution, rabbits were immunized by means of intravenous injection, and the affinities of these tree species were investigated by precipitin reaction, viz. FORNET'S "Ringprobe", with the obtained antisera.

Consequently, the author arrived at the following conclusions :

1). The relationships between different species of *Quercus* determined by serological method coincides with the results concluded by systematic botany in general.

2). The degree of serological reaction of seed protein of *Quercus* coincides with that of relations between species of genus *Quercus* according to the shape of cupula scale.

3). Both of MONGORINARA and NARAGASHIWA situate between KONARA and KASHIWA in the serological relationship.

4). UBAMEGASHI, one of the evergreen oaks, is more closely related to both ABEMAKI and KUNUGI, which are deciduous oaks, than to other evergreen oaks belonging to the so-called Cyclobalanopsis.

5). Cork-oak (*Q. suber*) is more closely related to those species of ABEMAKI, KUNUGI and UBAMEGASHI than to any other oak trees in Japan.

In short, it is worth-while to say that the following two facts are of great value :

1) According to the usual method in the past, such a serological study on the affinity of *Quercus* taking advantage of the nature of seed protein was difficult to make, whereas it has become possible to make such a study by means of the above mentioned Germinating Method and :—

2) A new system of classification according to serological method has been evolved in the classification of genus *Quercus*.

2. On the genus *Castanea*.

In order to carry on this experiment ten races of Japan proper (nine cultivated chestnuts and one wild chestnut), one species of China, and one species native to Korea were arranged.

As a result of this investigation, the following facts have been proved :

1) Though the races of chestnut used have not been clearly distinguished from one another by means of ordinary methods of precipitin test owing to their close relationship, they have been differentiated through diluting the antigens in fine division for the precipitin test and treating the antiserum by "Absättigungsverfahren".

According to these results, the following conclusions have been made :

(1) The relationships between the cultivated chestnuts of Japan proper

(horticultural forma of *Castanea crenata* S. et Z.) have not been proved clearly, but it seems that their relationships have some connection with the rapidity of their ripening season.

(2) Though the wild chestnut (*Castanea crenata* var. *kusaguri*) and the cultivated chestnuts of Japan proper are closely related, the degree of relationship between them differs according to the difference of race, namely: GINYOSE, SUZUNARI and KANOTSUME most highly, BANSEKI, SHIMOKATSUGI, GANNE and CHÔKÔJI intermediately, and OSAYA and KENAGA are least related to wild chestnut.

(3) Clear differences have been found between the wild chestnut and Chinese chestnut (*Castanea bungeana* Bl.) as well as between cultivated chestnut of Japan proper and Chinese chestnut.

(4) Korean native chestnut (*Castanea crenata* S. et Z. var. *dulcis* Nakai) is closely related to wild chestnut, but that is remotely related to the Chinese chestnut.

2) Above results show that the relationships between different races of chestnut determined by serological method coincide with the results concluded by systematic botany.

The above investigation was carried out in the College of Agriculture as well as in the College of Medicine, Kyūshū Imperial University from 1943 to 1945. The author takes great pleasure in acknowledging his indebtedness to Prof. Dr. K. Satō and Prof. Dr. H. Hōdyō, under whose directions this investigation has been conducted. Thanks are also due to Prof. Dr. R. Kōketsu and Ass. Prof. K. Tashiro for their kind and valuable advice during the work.