

Pasteurella multocida 에 對한 簡易赤血球 凝集反應과

赤血球의 安定化에 關한 研究

嶺南大學校 畜產大學

李 學 喆 · 鄭 永 健

忠南大學校 農科大學

金 教 準

緒 言

Pasteurella multocida(以下 P 菌으로 略記)의 莢膜抗原(以下 K 抗原으로 略記)이 血清學的으로 型特異성을 갖고 있다는 것을 Hoffenrich¹⁾에 의하여 보고 되고 있으나 그以後 Carter²⁾는 많은 分離菌의 K 抗原을 沈降反應 및 莢膜膨化反應에 의하여 4 種類로 型別하였으며, 나아가서 間接赤血球凝集反應을 응용하여 P 菌의 K 抗原을 A, B, C, 및 D의 4 種類로 분류하였다.³⁾ 이 방법은 현재 Roberts⁴⁾의 方法과 함께 국제적으로 널리 사용되고 있다.

이 赤血球凝集反應(以下 HA 反應으로 略記)은 試驗管內에서 실시하는 것이 慣例이나 多數의 材料를 취급하는데 있어서는 좀더 簡便하고 少量의 재료로서 실시할 수 있는 方法의 필요성을 느낀다.

免疫學의 手技의 簡易化와 多數材料의 同時 檢査를 圖謀한 研究가 많이 發表되어 있다.

Takatsy^{5,6)}는 所謂 “micromethod”를 發表하였으나 그 手技의 상세한 점은 알려지지 않았던바 Sever⁷⁾는 Takatsy의 報告를 基準으로 “plexiglass 板”을 使用하여 여러 角度로 詳細히 研究하여 HA 反應을 위시한 여러가지 免疫反應에 광범위하게 응용할 수 있는 反法을 보고하였으며 Edwards⁸⁾는 streptolysin O의 力價決定에 應用할 수 있는 “micro method”를 發表하였는데 이 도 HA 反應에 應用할 수 있는 方法이다. 그러나 이러한 方法은 少量의 材料를 쓰는데 중점을 두고 있으며 그 手技가 상당히 복잡하나 熟練된 사람이 아니면 成績에 誤差가 큰 것으로 생각된다.

赤血球를 媒介體로 應用하는 이 反應은 血球型決定 手技와 같이 slide glass에서도 실시할 수 있다는 것에

관하여는 許⁹⁾가 *Salmonella typhi*, *Shigella flexneri* 및 *Salmonella paratyphi A*에 대한 HA 反應研究에 있어 밝혔다.

한편 P 菌에 對한 HA 反應을 실험에 있어 가장 큰 隘路는 新鮮한 人間 O 型赤血球 浮遊液을 使用해야만 한다는 점이며 血漿과 같이 保有한 적혈구는 4°C에서 2주일, 洗滌하여 保存한 것은 2日以上 경과하면 溶血을 일으키므로 使用할 수 없다. 또 한가지 缺點은 同一個體 또는 同種個體의 赤血球를 使用하여도 개체의 상태 또는 血液採取時期가 다르면 赤血球의 抗原吸着能 및 반응성적에 차이가 나타날 가능성이 있는 점이며 따라서 同一 lot의 赤血球를 사용하여 同時에 실시한 반응성적이 아니면 그 비교에 困難을 느끼는 일이 있는 점이다. 따라서 長時間 保存이 可能하고 一定한 抗原吸着能을 가진 安定된 赤血球를 사용하는 HA 反應의 發展이 期待되어 왔으며 赤血球의 여러가지 處理 및 保有方法에 對하여는 많은 여러 研究者^{9,10,11,12,13,14,15,16,17)}들의 報告가 있다. 그러나 P 菌에 대한 HA 反應에 이들의 方法이 그대로 應用할 수 있는지는 疑問이다.

著者は 現在 應用中인 P 菌에 대한 試驗管內 HA 反應의 簡易化와 多數材料의 同時檢査를 도모하는 目的으로 所謂 “micromethod technique”로 發展 確立 시킴과 同時에 從前의 實驗術技에 있어 不合理한 點이 있으면 이를 改良하고 또한 反應을 실시할때마다 人間 O 型赤血球를 採取 使用해야 할 不便을 除去하고 一定期間 동안은 一定赤血球로써 同一條件下에 反應을 실시할 수 있는 與件을 賦與하기 위하여 本研究를 試圖하였다.

材料 및 方法

供試菌株 : P. 931(A型), P. 932(B型), P. 933(C型) 및 P. 934(D型)의 各美國菌株과 P. 18(A型), P. 656(B型) 및 P. 8498(D型)의 各日本菌株의 冷凍乾燥材料를 1967年 4月 農村振興廳 家畜衛生研究所로부터 분양받아 이들을 各各 14日 간격을 두고 10~15% 羊血液加寒天培地에 繼代하면서 使用하였다.

赤血球 : 3人以上의 人間 O型血液을 等量 混合하여 1,000rpm 10分間 3回 媒液으로써 洗滌한 packed cells를 使用하였다.

赤血球의 浮遊, 洗滌 또는 保存에 使用한 媒液 : 0.9% 식염수 및 等張磷酸鹽緩衝液(以下 IPBS로 略記, 組成은 증류수 1,000ml 中에 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 7.14g, KH_2PO_4 3.36g, NaCl 4.53g를 용해시켰으며 pH는 7.0)을 使用하였다.

抗原 : 抗原으로서 P菌 K抗原을 使用하였으며 다음과 같이 Carter³⁾의 方法에 準하여 調製하였다. 즉 10% 羊血液加寒天平板培地 全面에 供試 P菌을 白金耳로 均등히 塗布하여 37°C에서 18~24時間 배양한 것에 每平板當 4ml의 식염수를 加하여 菌集落 및 菌苔를 培地面에서 掠離, 採取한 菌浮遊材料를 遠心沈澱法으로 3,000rpm 10분간 2回 洗滌하였으며 다시금 沈澱菌渣에 元量이 되도록 식염수를 加해서 菌浮遊液을 만들어 56°C의 溫浴槽에서 30分間 加溫한 다음 3,000rpm 15分間 遠心沈澱하여 얻은 上清液을 K抗原으로 使用하였다.

免疫血清 : 波岡 및 村田¹⁹⁾가 P菌에 대한 血清學의 研究에 應用한 方法에 準하여 上記 各供試菌株을 가지고 家兎를 免疫하여 얻은 抗血清을 使用하였다.

抗原感作 : Carter³⁾의 方法에 準해서 0.2ml의 血球沈泥에 3ml의 K抗原液을 加하여 37°C에서 2時間 感作시켜 식염수으로써 1,500rpm 16分間 3回 遠心沈澱法으로 洗滌한 後 1% 血球浮遊液을 만들어 使用하였다.

赤血球의 tannic acid 處理 : Chun²⁰⁾의 方法에 準하여 赤血球浮遊液과 20,000倍 tannic acid(analysed reagent, A.S. Lapine & Co.製) 식염수용액을 混合하여 37°C에서 10分間 處理한 다음 1,500rpm 10分間 3回 遠心沈澱法으로 洗滌하여 使用하였다.

赤血球의 formalin 處理 : 許²¹⁾가 赤血球의 安定化에 관한 研究에 應用한 方法에 準하여 處理하였다. 즉 식염수 또는 IPBS에 浮遊시킨 赤血球 5% 液에 formalin(美藥局方)을 1, 2, 4, 8 및 16%가 되도록 混合시켜 37°C에서 20時間 處理한 다음 1,500rpm 10分間 3回 遠心沈澱法으로 洗滌하여 얻은 血球泥를 所要 %으로 浮

遊시켜 甚히 흔들어서 血球量 均等히 分散시켜 使用하였다.

赤血球의 特殊溶液에서의 保存 : 特殊 溶液으로서는 輸血目的에 使用되는 所謂 "ACD"液(組成은 trisodium citrate 13.2g, citric acid 4.4g, dextrose 147g, 증류수 1,000ml) 1溶에 血液 4溶을 채취하여 5°C에 保存하면서 必要時 洗滌使用하였다.

反應術式 및 成績判定 : 1). 試驗管内 HA反應——Carter³⁾가 보고한 術式에 따라서 시행하였으며 一次判讀은 室溫에서 2時間後, 二次判讀은 室溫에서 判讀한 것을 5°C에 一夜 保存後 各各 肉眼으로 血球凝集의 pattern에 따라서 反應의 程度를 決定하였다.

2) 簡易 HA反應(slide反應)——10個의 凹面部를 가진 Boerner의 血液型 檢査用 microtest slide(以下 slide로 略記)와 自家製의 一滴이 約 0.05ml가 되는 micro pipett를 使用해서 slide의 凹面部에서 抗血清을 倍數 稀釋하였으며 HA反應에 관련되는 여러가지 與件을 檢討하였고 反應의 程度는 肉眼으로 血球凝集의 pattern에 따라서 決定하였다.

實驗成績

簡易法 : 反應時의 抗原 및 抗體의 量과 感作赤血球의 濃度 :

slide의 凹面部에 容量은 0.3ml程度이다 反應 實施途中에 振盪이 필요하므로 感作赤血球 浮遊液과 抗體를 合한 量이 0.2ml를 넘지 않도록 하는 것이 便利하였고 表 1에서 보는 바와 같이 合量 0.2ml와 0.1ml 사이에는 反應結果의 差異를 보지 못하였다. 한편 感作 血球濃도가 HA反應에 미치는 影響에 있어서는 血球濃度 0.5~2.5% 사이는 反應結果에 있어 큰 差異를 認定하지 못하였으나 1%일때 가장 明瞭한 反應을 볼 수 있었고, 0.5%일때는 反應結果를 볼 수 있었으나 不明瞭하여 若干 血球量이 不足한 感이었고 2%以上은 血球量이 많은 관계로 判定上 slide를 若干 흔들어서 잘 보아야 할 不便이 있었다.

免疫血清의 稀釋 : 試驗管内에서 慣用의 方法으로 倍數 稀釋하여 slide의 凹面部에 分注할 수 있으나 手技의 簡便을 도모하기 위하여 slide凹面部에 먼저 0.05ml씩 稀釋液을 滴下하고 一定 稀釋한 免疫血清을 次로 凹面部에 0.05ml 滴下 混合하여 2倍로 稀釋하고 以下 試驗管内에서와 같은 方法으로 點滴用 pipett를 使用하여 2倍 順次稀釋한 血清과 試驗管内에서 2倍 順次稀釋하여 slide에 0.05ml씩 分注한 것에 對한 反應終末價를 比較하여 본바 兩者의 成績이 대체로 一致하였다.

Table 1. Concentration and volume of sensitized erythrocytes suspension for slide HA reaction

Percent of sensitized cells	Volume of sensitized cells	Anti-serum dilution							Control
		10	20	40	80	160	320	640	
2.0	0.1ml	3	4	4	4	1	—	—	—
2.5	1 drop(0.05ml)	3	4	4	4	?	—	—	—
2.0		3	4	4	4	1	—	—	—
1.0*		3	4	4	4	1	—	—	—
0.5		3	3	4	4	1	—	—	—

4, 3, 2 and 1: Degree of hemagglutination reaction.

? : Doubtful, —: Negative, *: Showed the most clear reaction.

試驗管內法과 簡易法의 反應相 比較: 兩者를 比較하 법이 簡易法보다 약간 높은 傾向이었으나 反應程度는 었던 바 表2와 같이 一般的으로 反應終末價는 시험관 簡易法이 시험관 內法보다 强하였다.

Table 2. Comparison of HA reaction between the tube method and the slide method

Method		Anti-serum dilution							Control
		10	20	40	80	160	320	640	
Slide	1	4	4	4	4	1	—	—	—
	2	4	4	4	4	1	—	—	—
	3	4	4	4	4	?	—	—	—
	4	4	4	4	4	1	—	—	—
	5	4	4	4	4	4	—	—	—
Tube	1	2	2	2	2	2	×	×	—
	2	2	2	2	2	2	×	×	—
	3	2	2	2	2	2	2	×	—
	4	2	2	2	2	2	2	×	—
	5	4	4	4	4	4	2	2	—

×: Not tested.

反應溫度 및 判定에 要하는 時間: P 菌에 對한 시험관內 HA 反應은 室溫 2 時間放置後에 一次判讀을 하고 이어서 5°C 一夜保存後에 二次判讀하는 것이 慣例이다. 簡易法에 있어서는 表3에서 보는 바와 같이 反應溫度는 試驗管內法일때와 同樣으로 室溫(15°C)일때는 4°C, 37°C에 比하여 가장 예민하게 反應이 일어났고 高力價의 反應相을 나타냈다. 즉 抗原과 抗體를 混合한 後 15°C 일때는 4°C, 37°C에서 아직 反應發現이 始作되지 않는 48分頃부터 相當力價까지 比較的 明瞭한 反應이 일어났으며 以後 더욱 혈액응집이 明瞭해짐에 따라 反應이 進行되었고 60分頃에 와서는 反應이 終結되어 가장 高力價를 나타냈다. 그리고 더욱 時間이 延長된 70分에서는 反應의 進行을 보지 못하였고 90分에서는 抗原과 抗體의 量이 微量인 까닭에 蒸發로 因하여 判讀이 困難하였다. 한편 4°C 일때는 他溫度일때 보다 反應이 遲延되는 傾向을 나타냈고 37°C 일때는 3者中 가장 高溫임으로 蒸發이 他 2者 溫度일때

보다 빨리 일어나서 60分頃에서 겨우 血球凝集을 判別할 수 있었고 70分에서는 곤란하였다.

水素 Ion 濃度の slide HA 反應에 미치는 影響: 水素 Ion 濃度 4.53~8.3 磷酸鹽緩衝液에서 slide 反應을 實施하였던 바 表4에서 보는 바와 같이 弱酸性 乃至 alkali 性 領域에서 反應이 잘 發現하는 傾向을 나타냈다. 즉 6.6은 7.0에 比하여 若干 낮은 듯한 反應度를 보았으나 力價는 同一하였고 7.0 乃至 8.3 사이는 反應度에 있었으나 上述한 6.6에 比해서 反應度 및 力價가 낮았고 5.6 以下の 領域에서는 이보다 못한 反應相을 나타냈다.

赤血球에 대한 抗原感作溫度가 slide HA 反應에 미치는 영향: 常規試驗管內法에 依한 37°C 以外로 15°C, 4°C의 各溫度下에 3ml의 K 抗原을 加한 血球沈澱 0.2ml를 各各 2 時間 感作하여 Slide HA 反應을 實施하였던 바 表5에서 보는 바와 같이 37°C에서의 感性이 15°C, 4°C에 比하여 反應度나 力價에 있어서도 가장

Table 3. Effects of temperature and time for the slide HA reaction

Temperature	Time	Anti-serum dilution							Control	
		10	20	40	80	160	320	640		
15°C	30min.	—	—	—	—	—	—	—	—	
	38min.	—	—	—	—	—	—	—	—	
	48min.	2	2	2	—	—	—	—	—	
	15°C	53min.	4	4	4	4	2	—	—	—
		60min.	4	4	4	4	4	—	—	—
		70min.	4	4	4	4	4	—	—	—
		90min.	* Difficult to read							—
37°C	30min.	—	—	—	—	—	—	—	—	
	38min.	—	—	—	—	—	—	—	—	
	48min.	—	—	—	—	—	—	—	—	
	53min.	2	?	?	?	—	—	—	—	
	60min.	3	1	?	?	—	—	—	—	
	70min.	* Difficult to read							—	
	4°C	30min.	—	—	—	—	—	—	—	—
38min.		—	—	—	—	—	—	—	—	
48min.		—	—	—	—	—	—	—	—	
53min.		?	?	—	—	—	—	—	—	
60min.		3	2	1	?	—	—	—	—	
90min.		3	3	2	—	—	—	—	—	

Due to evaporation.

Table 4. Effect of Hydrogen-Ion concentrations for the slide HA reaction*

PH values	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
4.53	—	—	—	—	—	—	—	—
5.6	—	—	—	—	—	—	—	—
6.2	1	—	—	—	—	—	—	—
6.6	2	1	—	—	—	—	—	—
7.0	3	1	—	—	—	—	—	—
7.4	3	1	—	—	—	—	—	—
8.0	3	1	—	—	—	—	—	—
8.3	3	1	—	—	—	—	—	—

*: Sørensen phosphate buffer solution was employed for the test.

成績이 좋았고 15°C, 4°C의 兩者는 反應力價는 同一하 였으나 前者가 後者보다 反應度가 若干 强하였다.

Table 5. Effect of temperature of erythrocytes sensitization for the slide HA reaction

Temperature	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
37°C(Incubator)	4	4	4	4	4	—	—	—
15°C(Room temperature)	2	2	1	?	—	—	—	—
40°C(Refrigerator)	1	1	1	?	—	—	—	—

赤血球에 대한 感作抗原量이 Slide HA 反應에 미치는 影響: 常規試驗管內法에 있어서는 血球泥 0.2ml 를 感作함에 3ml 的 K 抗原量을 使用하는데 이 以外로 感作量을 달리하여 0.5, 1.0, 2.0ml 의 各各을 上記 血球沈澱泥量에 施行하였던바 一次試驗에서는 表 6-1 에 서 보는 바와 같이 0.5ml 일때 이 보다 많은 抗原量일 때에 比하여 反應度에 있었으나 力價에 있어 若干 낮

은 듯한 反應相을 나타냈고 1.0ml 는 2.0ml 以上에 比하여 力價는 同一하였으나 反應度가 약간 낮았다.

二次試驗에서는 0.5ml 보다 적은 量인 0.3ml 와 一次試驗일때의 最大量인 3.0ml 를 比較하였는데 表 6-2 에서 보는 바와 같이 兩者間에는 反應相上 別差異가 없 다고 認定되는 成績을 얻었다.

Table 6. Effect of doses of sensitizing antigen for the slide HA reaction

Doses of antigen	Anti-Serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
0.5ml	4	3	3	1	?	—	—	—
1.0ml	4	3	3	2	1	—	—	—
2.0ml	4	4	4	4	2	—	—	—
3.0ml	4	4	4	4	1	—	—	—

2.

0.3ml	4	4	?	—	—	—	—	—
3.0ml	4	4	1	—	—	—	—	—

赤血球에 對한 感作抗原濃도가 slide HA 反應에 미치는 影響: 常規試驗管內法에서는 前述한 바와 같이 18~24 時間 培養 平板培地 1 枚當 4ml 的 食염수를 加하여 K 抗原을 調製하여 使用한다. 感作抗原濃度の HA 反應上에 미치는 影響을 보기 위하여 이보다 적은 量의 2ml 를 加하였을 때와 反對로 이보다 많은 6ml 를 加하였을 때를 比較하였던바 表 7에서 보는 바와 같이

濃縮抗原인 食염수 2ml 를 加한 것이 他 2 者보다 若干 강한 듯한 反應度를 나타냈고 4ml 와 6ml 的 食염수를 加하여 調製한 抗原사이에는 全혀 差異를 認定치 못하 였다.

그러나 總體的 結果上으로 볼때 이들 3 者의 抗原濃 度間에는 反應差를 招來할만한 影響을 미친다고는 認 定되지 않았다.

Table 7. Effect of concentration of antigen sensitizing erythrocytes for the slide HA reaction

Added doses of saline solution to each culture plate	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
2ml	4	4	3	1	—	—	—	—
4ml	4	4	2	?	—	—	—	—
6ml	4	4	2	?	—	—	—	—

赤血球에 對한 抗原感作時間이 slide HA 反應에 미치는 影響: 常規試驗管에서는 赤血球의 K 抗原感作時間이 37°C 에서 2 時間이다.

위하여 2 時間 以外로 30 分, 1 時間, 3 時間의 各抗原 感作時間을 比較하였던바 表 8에서 보는 바와 같이 이 들 4 者間에는 反應相에 있어 別差異를 認定치 못하 였다.

Table 8. Effect of sensitizing time to erythrocytes for the slide HA reaction

Sensitizing time	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
30min.	35	4	4	4	?	—	—	—
1hr.	4	4	4	4	—	—	—	—
2hrs.	4	4	4	4	?	—	—	—
3hrs.	4	4	4	3	—	—	—	—

tannic acid 處理赤血球의 抗元吸着能: 赤血球의 tannic acid 處理는 HA 反應의 免疫反應手技로서의 利用可能範圍를 넓게 하였다. 그러므로 이 處理가 P 菌에 對한 HA 反應에 미치는 影響을 열기 위하여 前述한 바

와 같이 20,000 倍 tannic acid 로 處理된 赤血球과 非處理赤血球를 使用하여 slide 反應을 施行하여 比較하였는데 表 9에서 보는 바와같이 이들 兩者間에는 反應精에 있어 別差異를 보지 못하였다.

Table 9. Effect of the tannic acid treatment to erythrocytes for the slide HA reaction

Erythrocytes	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
Treated with tannic acid	4	4	1	?	—	—	—	—
Untreated(control)	4	4	3	—	—	—	—	—

ACD 液에서의 保存赤血球의 安全性: ACD 液에 保存한 赤血球가 HA 反應上 어느 程度 安定한가를 보기 위하여 前述한 바와 같이하여 이 液에 一定 容量 採血하여 4°C에서 保存한 것을 10日 간격을 두고 70日까지 新鮮赤血球와 slide HA 反應을 施行하여 比較하였던바

表 10에서 보는 바와 같은 結果를 얻었다. 즉 溶血은 採血後 30日頃부터 일어나기 始作하였으나 60日까지는 反應力價에 있어 兩者間 別差異를 보지 못하였으며 70日에 이르러 ACD 保存血球가 新鮮血球에 比하여 低力價를 나타냈다.

Table 10. Comparison of HA titers between erythrocytes preserved in the ACD solution and the fresh erythrocytes*

Erythrocytes	Time							
	1	10	20	30 [§]	40	50	60	70
Erythrocytes preserved in the ACD solution	*80	160	40	40	80	160	80	40
Fresh erythrocytes	80	160	40	40	80	160	80	160

*: The antigen of different lot was used in this experiment.

†: HA titer, §: Beginning of hemolysis.

formalin 處理赤血球의 安定性: 各種 formalin 濃度로 前述한 바와 같이 處理한 赤血球를 식염수 또는 IPBS에 浮游시켜 37°C와 4°C에 保存하면서 時日의 경과에 따라 溶血의 有無를 본바 表 11과 같다. 즉 處理한 formalin 濃도가 높으면 溶血이 自然되었으며 低濃度로 處理한 것은 溶血이 速히 일어났다. 赤血球를 1% 以下の formalin 으로 처리하여 식염수나 buffer에 浮遊시켜 37°C에 保存한 것은 처리 翌日부터 溶血이 일어나기 始作하였으며 非處理 赤血球와 別差異가 없었으나 2% 以上으로 처리한 것은 formalin 濃度の 增加에 따라 溶血이 自然되었으며 8%로 處理한 것은 約 1週日 間은 溶血이 일어나지 않았다. 4°C에 保存하면 1%로 處理한 것도 約 1주일간은 溶血을 일으키지 않았으며 2%로 처리한 것은 2個月間 4 내지 16%로 처리한 것은 試驗日數의 最長인 8個月까지 溶血을 일으키지 않았다. buffer를 媒液으로 使用하면 식염수에 比하여 低濃度 formalin 處理에서 溶血이 일어나는 時日이 多少 自然되었다. 處理赤血球의 色調 및 粘着性을 보면 formalin 濃도가 1% 以下이면 色調가 若干 갈색으로 變하였으나 2% 以上에서는 차차 갈색度가 높아지고 있

었으며 8乃至 16%일 때는 暗褐色이었다.

赤血球의 粘着性은 formalin 濃度, 1 내지 2%에서는 非處理赤血球에 比하여 약간 粘着性이 있었으나 非處理血球를 分散시킬 수 있는 같은 程度의 振盪으로써 쉽게 分散시킬 수 있었으나 4 내지 16%의 범위는 formalin 濃도가 높아짐에 따라서 더욱 粘着性이 높아졌으므로 血球分散에도 더욱 强하게 또한 時間을 더욱 延長시켜 振盪하지 않으면 안되었다.

formalin 處理赤血球의 抗元吸着能: 前記와 같이하여 各種 濃度の formalin 으로 처리한 赤血球의 抗元吸着能을 보기 위하여 時日이 몇일 경과되지 않는 赤血球와 약 2개월이 경과된 赤血球에 常規試驗管内法에 準하여 各各 抗元을 感作시켜 非處理新鮮赤血球과의 抗元吸着能의 差異를 抗血清과의 反應凝集價로 判定하였던바 表 12-1와 12-2에서 보는 바와 같은 結果를 얻었다.

즉 formalin 處理後 몇일 경과되지 않는 것에 있어서는 formalin 濃度 1 내지 8%로 처리된 것은 非處理인 것이나 抗元吸着能에 있어 別로 差異를 認定치 못하였고 formalin 濃度 16%로 처리된 血球에 對하여는 실험

Table 11. Effect of formalin concentration for the treatment of human O type erythrocytes*

Diluent	Preserved	Concentration of formalin	Preserved for							
			1D	3D	1W	1M	2M	4M	6M	8M
Saline	37°C	0%	+	卅						
		1.0	+	卅						
Saline	37°C	2.0	-	±	卅					
		4.0	-	-	卅					
		8.0	-	-	-	卅				
		16.0	-	-	-	+				
Saline	4°C	0	-	-	卅					
		1.0	-	-	-	+	+	卅		
		2.0	-	-	-	-	-	±	+	+
		4.0	-	-	-	-	-	-	-	-
		8.0	-	-	-	-	-	-	-	-
		16.0	-	-	-	-	-	-	-	-
I P B S	37°C	0	+	卅						
		1.0	+	卅						
		2.0	-	+	卅					
		4.0	-	-	+					
		8.0	-	-	±	卅				
		16.0	-	-	-	+				
	4°C	0	-	-	±	卅				
		1.0	-	-	-	-	-	卅		
		2.0	-	-	-	-	-	±	±	±
		4.0	-	-	-	-	-	-	-	-
		8.0	-	-	-	-	-	-	-	-
		16.0	-	-	-	-	-	-	-	-

*: Erythrocytes were treated with formalin in saline or buffer at 37°C for 20 hours, washed 3 times and preserved at 37°C or 4°C.

卅, 卍, and +: Degree of hemolysis,

-: Nonhemolysis.

하지 않았다. formalin 處理後 약 2 個月이 경과된 것 을 보았고 formalin 濃度 16%로 處理된 것은 非處理인 에 있어서는 formalin 濃度 1 내지 8%로 處理된 것은 것에 比하여 抗原吸着能이 同一하거나 그 보다 强하 非處理인 것에 比하여 抗原吸着能이 減退되어 있는 것 였다.

Table 12. Effect of formalin concentration for the treatment of human O type erythrocytes on antigen sensitization

1. Test on the formalinized erythrocytes preserved for several days

Formalin concentration	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
0%	4	4	1	-	-	-	-	-
1%	4	3	?	-	-	-	-	-
2%	4	1	-	-	-	-	-	-
4%	4	3	1	-	-	-	-	-
8%	4	3	?	-	-	-	-	-
16%	×*	×	×	×	×	×	×	×

*: Not tested

2. Test on the formalinized erythrocytes preserved for 2 months

Formalin concentration	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
0%	4	4	?	—	—	—	—	—
1%	3	—	—	—	—	—	—	—
2%	1	—	—	—	—	—	—	—
4%	1	—	—	—	—	—	—	—
8%	2	1	—	—	—	—	—	—
16%	4	4	?	—	—	—	—	—
0%	3	1	—	—	—	—	—	—
2%	?	—	—	—	—	—	—	—
16%	4	3	?	—	—	—	—	—
0%	2	1	—	—	—	—	—	—
1%	×	×	×	×	×	×	×	×
2%	×	×	×	×	×	×	×	×
4%	—	—	—	—	—	—	—	—
8%	—	—	—	—	—	—	—	—
16%	4	4	4	4	2	?	—	—

tannic acid 處理한 處理赤血球의 抗元吸着能: formalin 處理後 約 20日 경과된 赤血球를 다시 前述한 同一方法으로 tannic acid 處理를 하여 tannic acid 處理를 하지 않았는 formalin 處理赤血球와 抗元吸着能을 比較하였던바 表 13에서 보는 바와 같이 tannic acid 處理는 非處理한 것에 比하여 오히려 低力價를 나타냈으며 또

한 formalin 處理赤血球는 tannic acid 處理의 有無에 不拘하고 2 乃至 8% formalin 濃度로 처리한 것을 除外한 16% formalin 濃度로 처리한 것만이 抗血清과의 反應結果를 나타냈고 非處理新鮮赤血球에 比해서 高力價를 나타냈다.

Table 13. Effect of the tannic acid treatment to the formalinized erythrocytes on antigen sensitization

Erythrocytes	Treatment	Anti-serm dilution							Control
		10	20	40	80	160	320	640	
Formalinized	2%	—	—	—	—	—	—	—	—
	4%	—	—	—	—	—	—	—	—
	8%	—	—	—	—	—	—	—	—
	16%	4	3	2	—	—	—	—	—
Formalinized	2%	—	—	—	—	—	—	—	—
	4%	—	—	—	—	—	—	—	—
	8%	?	—	—	—	—	—	—	—
	16%	4	4	4	3	1	—	—	—
Fresh	Untreated	3	—	—	—	—	—	—	—
		2	—	—	—	—	—	—	—

新鮮赤血球와 ACD 液保存赤血球 및 formalin 處理赤血球와의 抗元吸着能比較: 約 2個月間 保存된 ACD 液保存赤血球와 formalin 處理赤血球의 抗元吸着能을 新鮮赤血球와 比較하였던바 表 14에서 보는 바와 같은 結果를 얻었다. 즉 ACD 液保存血球의 吸着能은 新鮮血

球와 同一하였으나 formalin 처리 血球의 抗元吸着能은 新鮮血球에 比하여 2% formalin 濃度로 處理한 것은 吸着能이 낮았고 16% formalin 濃度로 處理한 것은 약간 높은 傾向을 나타냈다.

Table 14. Comparison of antigen sensitization activity between erythrocytes preserved in ACD solution and formalinized erythrocytes as compared with fresh erythrocytes

Erythrocytes	Anti-serum dilution							Control
	10	20	40	80	160	320	640	
Fresh	3	1	—	—	—	—	—	—
Preserved in ACD solution	3	1	—	—	—	—	—	—
Treated with formalin 2%	?	—	—	—	—	—	—	—
16%	4	3	?	—	—	—	—	—

溶媒가 slide HA 反應에 미치는 影響: 反應에 所要 되는 溶媒의 種類에 따르는 反應發現에 미치는 影響을 보고서 生理食鹽水와 IPBS 의 2 種類를 使用하여 新鮮 赤血球, ACD 液保存赤血球의 各血球에 對하여 Slide

HA 反應을 施行하여 比較하였던바 表 15 에서 보는 바와 같이 上記 兩溶媒間에는 赤血球의 種類에 따르는 反應의 發現上에서 인정할만한 差異를 보지 못하였다.

Table 15. Effect of diluent for the slide HA reaction

Diluent	Erythrocytes	Anti-serum dilution							Control
		10	20	40	80	160	320	640	
Saline	Fresh	2	1	—	—	—	—	—	—
	Preserved in ACD solution	2	?	—	—	—	—	—	—
	Treated with formalin 4%	—	—	—	—	—	—	—	—
	8%	—	—	—	—	—	—	—	—
	16%	4	4	4	3	2	?	—	—
IPBS	Fresh	2	1	—	—	—	—	—	—
	Preserved in ACD solution	2	?	—	—	—	—	—	—
	Treated with formalin 4%	?	—	—	—	—	—	—	—
	8%	?	—	—	—	—	—	—	—
	16%	4	4	4	3	2	?	—	—

考 察

細菌抗原으로 處理한 赤血球를 媒介體로 使用하는 凝集反應은 Middlebrook and Dubos²¹⁾, Keogh 等²²⁾, Alexander 等²³⁾, Sorkin and Boyden 等²⁴⁾에 依하여 研究되기 始作하였으며 그후 많은 學者들에 의하여 이 方法이 우수한 免疫反應手技로 認定되었고 우리나라에서도 各種 細菌 特히 Salmonella, Shigella 等の 腸內細菌의 抗原과 抗體의 研究에 많이 利用되고 있다^{9,25,26)}. P 菌은 獸醫學上 哺乳動物의 出血性敗血症, 慢性肺炎의 原因菌으로서 大端히 重要시되며 Carter⁹⁾는 P 菌의 K 抗原을 人間 O 型赤血球에 吸着시켜 HA 反應을 成立시키고 同時에 P 菌을 A, B, C 및 D 型으로 分類하였다.

P 菌에 對한 免疫反應手技로서는 上記 HA 反應 以外로 凝集反應, 沈降反應 및 萊膜膨化反應 등이 있으나 上記 Carter⁹⁾의 HA 反應은 現在 國際적으로 널리 使用되고 있다. P 菌에 對한 免疫學的 手技를 簡易化하는

研究로서는 最近 Namioka 等¹⁹⁾의 報告가 있으나 이는 凝集反應에 관한 것이며 HA 反應에 관해서는 아직 報文에 接하지 못하였다. P 菌에 對한 HA 反應 簡易化에 관한 本研究에 있어서는 우선 Carter⁹⁾의 試驗管内 HA 反應을 slide 上에 實施할 수 있는가를 알기 위하여 HA 反應에 關聯되는 모든 反應系는 Carter⁹⁾의 方法에 準해서 準備施行하였으며 먼저 slide 反應時의 抗原, 抗體의 量을 赤血球의 濃度를 決定하였던 바 抗原, 抗體는 試驗管内에서 倍數稀釋한 것만큼 精確하였고 tube 反應보다 迅速容易하였다.

tube 反應과 slide 反應의 反應上의 比較에 있어서는 一長一短이 있어 優劣을 認定할 수가 없었고 slide 反應의 反應溫度가 室溫일 때 가장 적합하였던 것은 tube 反應과 同一하였으나 判定에 要하는 時間이 slide 反應에 있어 반응후 약 1 시간이면 만족한 것은 tube 反應일 때 2 時間이어서 5°C 에서 翌日再判讀하는 方法에 比하면 훨씬 편리하였다. 反應에 있어 pH 6.6 내지 8.3 은

反應에 큰 영향이 없었던 것은 diluent로서 食鹽水를 사용하는데 있어 하등의 지장이 없다는 것을 意味한다. 赤血球에 대한 抗原感作溫度가 試驗한 범위내의 溫度中에서 37°C가 가장 적합하였던 것은 tube 反應에서 37°C를 應用하고 있는 것이 합당하다고 인정되었고 적혈구에 대한 抗原感作量이 tube 反應에서 應用되는 10分之1 量으로서 相當하였던 結果는 抗原量을 減弱할 수 있다는 것을 意味한다. 또한 赤血球에 대한 感作抗原濃도가 tube 反應에서 應用되는 抗原濃도의 2倍濃厚, 1.5倍稀薄에서도 反應相에 있어 別差異가 없었던 것은 抗原調製時 이 범위內의 菌量의 差異는 反應에 영향을 미치지 않는다는 것을 알 수 있다」 그리고 赤血球에 대한 抗原感作時間이 37°C에서 30分乃至3時間의 試驗범위內에서는 反應上 差異가 없었던 것은 tube 反應에 있어 37°C 2時間感作은 必要以上の 無意味한 操作으로 看做된다」

赤血球에 대한 tannic acid 處理에 관하여는 Boyden²⁷⁾이 tannic acid로 처리함으로써 蛋白質抗原을 吸着시킬 수 있음을 報告한 以後 Chen and Meyer²⁸⁾, Stavitsky²⁹⁾, Boyden and Sorkin³⁰⁾ 등이 HA 反應에 있어서의 赤血球의 tannic acid 處理의 意義를 追究하여 이 反應의 免疫反應手技로서의 利用 可能範圍를 더욱 넓게 하였다. 그러나 著者が 施行한 P 菌에 대한 slide HA 反應에 있어 formalin 處理前 또는 後의 tannic acid 處理가 하등의 效果를 보이지 않았던 것은 使用抗原이 炭水化合物性質에 由來한 것이기 때문이라고 생각된다.

ACD 液은 病院에서 血液을 可及의 오랫동안 保存하여 輸血하려는 目的에 사용되는 液이다. 이를 사용하여 P 菌에 대한 HA 反應에 사용되는 人間 O 型赤血球의 安定性を 試驗하였던 바 約2個月間은 安定하다는 것이 밝혀졌으므로 이 方面에 손쉽게 利用할 수 있는 方法이라고 생각되나 만족하지 않다. HA 反應에 사용하는 赤血球의 安定性を 높이기 위하여 formalin 기타 약품으로 處理固定한 研究가 많이 있으나 各報告者에 따라서 結果에 整異가 있고 또한 許⁹⁾ Salmonella typhi, Shigella flexneri 및 Salmonella Paratyphi A 에 대한 簡易 HA 反應研究에 있어 人間 O 型赤血球 및 山羊血球의 安定化에 관하여 報告하였으므로 이를 追試하는 한편 P 菌에 대한 HA 反應에 있어서는 어떤 結果를 가져오느냐를 研究하였다. 그 結果 formalin 處理赤血球의 安定性에 관한 試驗에서는 그와 같은 結果를 얻었다.

formalin 處理赤血球의 抗原吸着能 試驗에 있어서는 formalin 처리 후 오래 경과되지 않은 것에 있어서는 處理 formalin 濃도의 高低에 不拘하고 非處理 新鮮血球와 같은 程度의 抗原吸着能을 維持하였으나 約2個月

경과된 것에 있어서는 高濃度 formalin 處理에서 非處理 新鮮血球와 同一 혹은 이보다 強한 吸着能을 나타냈 것은 許⁹⁾의 報告와는 다르다.」許⁹⁾는 處理 formalin 濃도가 16% 以上の 경우 粘着性이 생기고 集塊를 만드는 경향이 나타난다고 하였다. 이에 관한 문제에 있어서 著者が 관찰한 비교적 오랫동안 경과한 formalin 處理血球에 있어서는 低濃度 formalin(8% 以上) 處理血球가 抗原吸着能을 감퇴하고 高濃度 formalin(16%) 處理血球에서만이 抗原吸着能을 그대로 혹은 그 以上으로 갖고 있다는 것은 理解하기 어려운 일이라 아니할 수 없다.

赤血球處理에 使用한 formalin의 濃도를 보면 許⁹⁾가 4乃至16%, McKenna¹¹⁾는 約18%, Ingraham¹²⁾과 Czizms¹³⁾는 8%, Fulthroe¹⁴⁾ 등은 10%, Park¹⁵⁾은 alcohol-formalin 혼합액에 10%, Butler¹⁸⁾는 9%를 使用하였다.

formalin 處理赤血球 抗原吸着能에 대한 安定 期間 동안 계속해서 抗原吸着能의 安定性을 보지 못하였던 것에 對해서는 追後 이를 補充코져 한다.

以上の 考察을 통해서 著者が 研究한 P 菌에 대한 slide HA 反應은 어떤 檢査室에서도 손쉽게 실시할 수 있는 좋은 方法이라고 生覺되며 從前의 tube 反應施行에 있어 몇가지의 不合理한 점을 밝혔다고 본다.

結 論

免疫學의 手技의 簡易化와 多數의 材料의 同後檢査를 圖謀하는 目的으로 現在 應用中인 Pasteurella multocida 에 대한 試驗管內 間接赤血球凝集反應을 所謂“micro-method technique”로 發展確立시킴과 同時에 從前의 實驗術技에 있어 不合理한 점이 있으면 이를 改良하고 또한 反應을 실시할 때마다 人間 O 型赤血球를 採取해야 할 不便을 除去하기 위하여 赤血球에 對한 安定化에 關聯되는 研究를 하였다.

1. slide 上에서 Pasteurella multocida 에 대한 間接赤血球 凝集反應을 실시할 수 있는 術技를 確立하였으며 抗原, 抗體의 含量은 0.1ml 로서도 滿足하였고 血球濃도는 1%일 때 가장 適合하였던 slide 上에 있어서의 免疫血清의 倍數稀釋은 試驗管內에서 稀釋한 것만치 正確하였다.

2. 試驗管內 反應과 slide 反應의 兩者間의 反應結果의 比較에 있어서는 反應相에 一長一短이 있어 優劣을 決定할 수가 없었다.

3. pH 6.6 乃至 8.3 은 反應에 영향을 미치지 않는다.

4. 赤血球에 대한 抗原感作溫度는 37°C가 적합하다.

5. 試驗管内反應에 사용되는 抗原量의 10分之1量으로서도 充分히 血球가 感作되며 反應에 影響이 없다.
6. 試驗管内 反應에 사용되는 抗原濃度보다 2倍 濃厚, 1.5倍 稀薄하여도 反應에 影響이 없다.
7. 赤血球에 對한 抗原感作은 30分으로서도 充分하다.
8. 赤血球에 對한 formalin 處理前 또는 後의 tannic acid 處理는 反應에 影響이 없다.
9. ACD 液 保存赤血球는 採血保存後 60日頃까지는 抗原吸着能이 安定하다.
10. 赤血球를 處理하는 formalin 濃度가 낮으면 溶血이 速히 일어나며 濃度가 높음에 따라서 지연된다. formalin 濃度 4 乃至 8%일 때는 試驗範圍內的 最長期 間인 8個月 以上 4°C에서 保存이 可能하다.
11. formalin 處理 赤血球의 抗原吸着能은 保存時間이 2個月이던 formalin 低濃度處理(1~8%)에서는 不良하고 高濃度處理(16%)에서는 良好하였다.
12. 新鮮赤血球, ACD 液保存赤血球 및 formalin 處理 赤血球의 三者間의 抗原吸着能에 있어 前二者는 差異가 없었으나 formalin 高濃度處理 赤血球에서만이 前二者보다 높은 傾向을 보였다.
13. 食鹽水와 等張磷酸鹽 緩衝液間에는 反應에 있어 差異가 없다.

References

- 1) Hoffenrich, F.: Zbl. Bakt. I. Orig., 108:87, 1928.
- 2) Carter, G.R.: Canad. J. Med. Sci., 30:48, 1952.
- 3) Carter, G.R.: Studies on Pasteurella multocida. I. A hemagglutination test for the identification of serological types. Amer. Jour. Vet. Res., 16:487, 1955.
- 4) Roberts, R.S.: J. Comp. Path., 57:261, 1947.
- 5) Takatsy, G. and Kiserl.: Orvostud. Res., 2:393, 文獻 7에서 引用
- 6) Takatsy, G.: Acta Microbiol. Hung., 3:191, 1955. 文獻 7에서 引用
- 7) Sever, J.L.: Application of a microtechnique to viral serological investigations. J. Immunol., 88:320-329, 1962.
- 8) Edwards, E.A.; Protocol for micro antistreptolysin O determinations. J. Bacteriol., 87:1254, 1964.
- 9) 許東燮: 赤血球의 安定化 및 簡易赤血球凝集反應에

關한 研究, 現代醫學, 5:325-337, 1966.

- 10) Flick, J.A.: Use of formalin-treated red cells for the study of influenza A virus hemagglutination activity. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 68:448-450, 1948.
- 11) McKenna, J.M.: A stable preparation of antigen-sensitized erythrocytes. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 95:591-593, 1957.
- 12) Ingraham, J.S.: The preparation and use of formalized erythrocytes with attached antigens of haptens to titrate antibodies. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 99:452-456, 1958.
- 13) Czizms, L.: Preparation of formalized erythrocytes. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 103:157-160, 1960.
- 14) Fulthorpe, A.J., Roitt, I.M., Doniach, D. and Couchman, K.: A stable sheep red cell preparation for detecting thyroglobulin autoantibodies and its clinical application. J. Clin. Pathol., 14:654~660, 1961.
- 15) Park, H.K.: Toxoplasma hemagglutination test. Using alcohol-formalin fixed sensitized lyophilized erythrocytes. Arch. Ophthalmol., 65:184-191, 1961.
- 16) Park, H.K.: The use of fixed, sensitized lyophilized erythrocytes for the Middlebrook Dubos tuberculin test. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., 109:156-159, 1962.
- 17) Hubert, E.G., Kalmanson, G.M. and Guze, L.B.: Preservation of antigen-coated sheep erythrocytes by freezing for use in indirect hemagglutination procedure. J. Bacteriol., 86:569-572, 1963.
- 18) Butler, W.T.; Hemagglutination studies with formalized erythrocytes. Effect of bisdiazobenzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. J. Immunol., 90:663-671, 1963.
- 19) Namioka, S. and Murata, M.: Serological studies on Pasteurella multocida, I.A. simplified method for capsule typing of the organism. Cornell Vet., 51:498-507, 1961.
- 20) Chun, D., Yang, Y. and Park, H.: A study of the tannic acid hemagglutination test with antigenic substances of Shigella flexneri. J. Infect. Dis., 100:241-248, 1957.
- 21) Middlebrook, G. and Dubos, R.J.: Specific serum agglutination of erythrocytes sensitized with extracts of tubercle bacilli. J. Exper. Med., 88:521-528,

- 1948.
- 22) Keogh, E.V., North E.A. and Warburton, M.F.: Adsorption of bacterial polysaccharide to erythrocytes. *Nature*, 191:687-688, 1948.
 - 23) Alexander, M.M., Wright, G.G. and Baldwin, A.C.: Observation on the agglutination of polysaccharide-treated erythrocytes by tularemia antisera. *J. Exper. Med.*, 91:561-565, 1950.
 - 24) Sorkin, E. and Boyden, S.V.: A study of antigen active in the Middlebrook-Dubos hemagglutination test present in filtrates of culture of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 75:22-27, 1955.
 - 25) Chun, D. and Park, B.: Demonstration of *Shigella flexneri* antigens by means of hemagglutination test. *J. Infect. Dis.*, 98:82-87, 1956.
 - 26) 任煥學: *Shigella flexneri* R型菌의 赤血球凝集反應에 관한 研究. *北里實驗醫學(日)*33:951-220, 1960.
 - 27) Boyden, S.V.: The adsorption of proteins of erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination by antiprotein sera. *J. Exper. Med.*, 93:107-120, 1951.
 - 28) Chen, T.H. and Meyer, K.F.: Studies on immunization against plague. VII. A hemagglutination test with the protein fraction of *Pasteurella pestis*. *J. Immunol.*, 72:282-298, 1954.
 - 29) Stavitsky A.B.: Micromethods for the study of proteins and antibodies. 1. Procedure and general applications of hemagglutination and hemagglutination-inhibition reactions with tannic acid and protein-treated red blood cells. *J. Immunol.*, 72:360-367, 1954.
 - 30) Boyden, S.V. and Sorkin, E.: A study of antigen active in the tannic acid hemagglutination test present in filtrates of culture of *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.*, 75:15-21, 1955.
 - 31) McKenna, J.M.: A stable preparation of antigen-sensitized erythrocytes. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 95:591-593, 1957.
 - 32) Ingraham, J.S.: The preparation and use of formalinized erythrocytes with attached antigens of haptens to titrate antibodies. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 99:452-456, 1958.
 - 33) Czizms, L.: Preparation of formalinized erythrocytes. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 103:157-160, 1960.
 - 34) Fulthorpe, A.J., Roitt, I.M., Doniach, D. and Couchman, K.: A stable sheep red cell preparation for detecting thyroglobulin auto antibodies and its clinical applications. *J. Clin. Pathol.*, 14:654-660, 1961.
 - 35) Butler, W.T.: Hemagglutination studies with formalinized erythrocytes. Effect of bisdiazobenzidine and tannic acid treatment on sensitization by soluble antigen. *J. Immunol.*, 90:663-671, 1963.

Studies on the Simplified Hemagglutination Reaction to *Pasteurella multocida* and the Stabilization of Erythrocytes

Hak-Cheul Lee, D.V.M., Ph.D. Yung-Gun Chung, D.V.M.
College of Animal Science, Yeung-Nam University

Kyo-Joon Kim, D.V.M.
College of Agriculture, Choong-Nam University

Abstract

Recently Carter(1952) reported the capsule antigens of *Pasteurella multocida* could be divided into four serological types A,B,C and D by means of precipitation tests. Subsequently he showed that the most sensitive for identification of these types involved the use of capsule substance adsorbed by erythrocytes in hemagglutination test. It may be somewhat difficult to conduct the hemagglutination test in small laboratory, because relatively large amounts of antisera and erythrocytes of the human

O type are required for the test.

A simple method for serological typing of *P. multocida* was the slide agglutination test employed by Little et al. (1943) and Namioka et al. (1962), but this method is still in controversy.

The author tried adapting Carter's hemagglutination method to the slide method so called "micro-method technique", and studied on the stabilization of erythrocytes for use of slide hemagglutination to *P. multocida* although many investigators reported the stabilization of erythrocytes.

The results obtained are summarized as follows:

1. A simplified method (slide method) for capsule typing of the organism was developed by adapting Carter's hemagglutination reaction (tube method). Antibody-containing serum can be diluted serially on Boerner's microtest slide with capillary or serological pipetts with a considerable accuracy. The slide reaction can be carried out with ease on the slide by adding 0.05ml of antigen-sensitized erythrocytes suspension diluted to one percent on 0.05ml of serially diluted antibody-containing sera, and the final result can be read after 60 minutes at the room temperature (15°C).
2. It is difficult to determine superiority of inferiority between the slide method and the tube method on the pattern of the reaction of hemagglutination.
3. The pH range of 6.6 to 8.3 is optimal for the slide hemagglutination reaction.
4. The antigen-sensitization against erythrocytes at 37°C is optimal for the slide hemagglutination.
5. Both the doses and concentration of antigen do not influence the antigen-adsorbing capacity of erythrocytes.
6. The reduction of antigen-sensitizing hours does not influence the antigen-adsorbing capacity of erythrocytes even 30 minutes.
7. The tannic acid treatment against formalinized and non-formalinized erythrocytes showed no effect on the reaction of hemagglutination.
8. The erythrocytes preserved at 4°C in the ACD solution do not decrease the reactivity on the reaction of hemagglutination for 60 days, while they begin slight hemolysis 30 days after preserving.
9. The stable preparation of erythrocytes can be obtained by treating the cells at 37°C for 20 hours with from 4 to 8 percent of formalin in saline or buffer. These cells can be preserved at 4°C for more than 8 months experimented without hemolysis. With low concentration of formalin, the cells were not sufficiently stabilized resulting in the hemolysis after short period of preservation at 4°C.
10. The erythrocytes treated with 16 percent of formalin remain constantly or increase the reactivity for the reaction of hemagglutination. On the contrary, the cells treated with 1 to 8 percent of formalin decrease the reactivity.
11. There is no difference between nontreated fresh erythrocytes and the erythrocytes preserved in the ACD solution on the reactivity against the hemagglutination, and the erythrocytes treated with 16 percent of formalin showed the reactivity of higher level than that of the above two kinds of erythrocytes.
12. There is no difference between the saline and the isotonic buffer solution on the reaction of hemagglutination.