

ワッセルマン反應用血清に抗補体 作用を與へる細菌の研究

其 III. 各種防腐劑のワッセルマン反應に及ぼす影響 竝に血清(血液)の細菌汚染予防に就て

金沢医科大学細菌学教室(主任 谷教授)

青 木 利 弘

Toshihiro Aoki

(昭和24年3月2日受附)

第1章 緒 言

微毒反應検査就中、ワッセルマン反應(以下ワ反應と略記す。)を実施するに當り、反應用患者血清が細菌の混入其他により変敗せる時は抗補体作用の発現強き事は周知の事実であり、特に夏期に於て濕氣が多く、温度の上昇せる時は患者血清(血液)の変敗甚だしく、検査不能に陥る事は屢々である。

そこで私は本報に於て各種防腐劑のワ反應に及ぼす影響竝に各種防腐劑を用ひての血清(血液)の細菌汚染防止に就ての実験を述べる事とする。

各種防腐劑に就ての報告は從來、數多くなされて居り、消毒藥の檢定法等も Rideal-Walker 氏法¹⁾、米國に於ける Hygienic Laboratory Method²⁾等優秀なる檢定法あり、吾國でも小島が消毒劑の標準檢定法³⁾を発表して居り、其他細菌の殺菌試験⁴⁾、發育阻止試験等に関するもの、又防腐劑に依る免疫血清等の保存に関する報告⁵⁾があるが、防腐劑のワ反應に及ぼす

影響に関する報告は極めて少ない。Craig⁶⁾が血清中に耐熱性抗補体物質が生ずるのは Staphylococcus 竝に其他の雜桿菌に依ると報告し、私の先に報告せる実験⁷⁾では枯草菌により著しく影響されるのである。故に微毒反應検査特にワ反應用血清は採血時の注意は勿論であるが、検査所迄の送付期間中、細菌の混入を防ぎ、或はその増殖を予防し、しかもワ反應を障碍せぬ防腐劑があれば好都合である。

かゝる見地より防腐劑として石炭酸(局方)、ホルマリン水(局方)、マーズニン(武田)、トリパフラビン(バイエル)、イスラビン(武田)、リバノール(武田)の6種を使用し、予めワ反應に対する防腐劑自身の影響の有無を比較観察し、次いで各種防腐劑に依る細菌の發育阻止を比較観察した所、マーズニンに於て最も優秀なる成績を示したので茲に一括して報告する次第である。

第2章 各種防腐劑がワ反應に及ぼす影響

第1節 防腐劑加血清に就て

第1項 実験材料竝に実験方法

被檢血清は正常人血清では豫めワ反應陰性なるを確めたものを、微毒患者血清はワ反應強陽性なるを確め

た金澤刑務所受刑者の血液より無菌的に採取した。

ワ反應術式は谷教授の記載⁹⁾に従つた。防腐劑として石炭酸(局方, 武田製), ホルマリン水(局方, 東洋化成製), マーゾニン(粉末, 武田製), トリパフラビン(バイエル製), イスラビン(粉末, 武田製), リバノール(粉末, 武田製)の6種を使用した。

先づ, 血清に石炭酸を夫々 2%, 1%, 0.75%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, ホルマリンは 2%, 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, マーゾニンは 10,000倍, 20,000倍, 40,000倍, 80,000倍, 160,000倍, 320,000倍, 640,000倍, トリパフラビン, イスラビン, リバノールは 1,000倍, 2,000倍, 4,000倍, 8,000倍, 16,000倍, 32,000倍, 64,000倍の割合に加へ, 而後, 防腐劑加血清を 56°C 30分間加温して非衝性となし, 生理的食鹽水で5倍に稀釋して用ひた。對照は防腐劑の入らざる陰性及び陽性血清を使用した。尙, 防腐劑の稀釋は容量%で原液を作成した。原液は石炭酸が 5%液, ホルマリン水はその儘で使用し, 稀釋の進むに従ひ10倍, 100倍液を作成した。マーゾニンは 1,000倍液を, トリパフラビン, イスラビン及びリバノールは 200倍液を作成し, 1cc 並に 0.1cc のピ

ペットを使用して前記の割合に稀釋した。

第2項 実験成績

石炭酸では陰性血清は 1%で僅かに痕跡を認める程度に, 2%では陽性の成績を示し, 0.75%より低位の濃度では全然影響なく, 陽性血清では 1%以下の濃度では影響を蒙らなかつた。又, ホルマリンに於ては陰性血清は血清對照管に於て影響を受け, 0.25%以下の濃度では影響なく, 陽性血清に於ては抗元管, 血清對照管の双方に影響を受け, 0.25%以下の濃度では全然影響を蒙らなかつた。マーゾニンに於ては陰性, 陽性血清とも全然影響を蒙らなかつた。トリパフラビン, イスラビン及びリバノールの三者に於ては 2,000倍以上の濃度では影響なく, 1,000倍に於ては著明な影響を受けるも, 3,000回20分間遠心する事により, 充分に溷濁を除去する事が出来, その上清に就ては全然影響を認めなかつた。(第1表, 其I参照)

第1表 各種防腐劑がワ反應に及ぼす影響
其I. 防腐劑加血清に就て

(1) 石 炭 酸

血清中濃度	2%		1%		0.75%		0.5%		0.25%		0.1%		0.05%		對 照	
	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
陰 性 血 清	++	++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽 性 血 清	++	++	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-

(2) ホ ル マ リ ン

血清中濃度	2%		1%		0.5%		0.25%		0.1%		0.05%		0.01%		對 照	
	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
陰 性 血 清	-	++	-	++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽 性 血 清	+	++	±	++	-	+	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-

(3) マ ー ゾ ニ ン

血清中濃度	10.000		20.000		40.000		80.000		160.000		320.000		640.000		對 照	
	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
陰 性 血 清	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽 性 血 清	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-	++	-

(4) トリパフラビン, イスラビン, リバノール

血清中濃度		1.000		2.000		4.000		8.000		16.000		32.000		64.000		對 照	
		A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
トリ パ フ	陰性血清	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	陽性血清	(+++)	(-)	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
イ ビ ン	陰性血清	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	陽性血清	(+++)	(-)	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-
リ バ ノ	陰性血清	(-)	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	陽性血清	(+++)	(-)	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-

註 A = W 抗元管. K = 血清對照管.

() 内の成績は 3,000 回 20 分間遠心による上清の成績

第 2 節 防腐劑加血液の 24 時間

(37°C) 後の血清に就て

第 1 項 実 験 方 法

實驗方法は前記に準ずるも、豫め、遠心管兼用滅菌小試験管に防腐劑を前記の濃度でとり、採血せる血液を可及的速に前記小試験管に投入し、37°C 孵卵器に 24 時間放置後、3,000 回 20 分間遠心して得たる血清を 56°C 30 分間加温して非働性となしたるものを使用した。尚、防腐劑の稀釋は血液の溶血を最小限度に防ぐ爲、生理的食鹽水を使用した。

第 2 項 実 験 成 績

石炭酸では 2% の濃度では血清凝固して採取

不能であつたが、陰性血清では 0.5%迄影響を受け、0.25%以下の濃度では影響を受けなかつた。陽性血清は 0.75%迄影響を受け、0.5%の濃度では全然影響を蒙らなかつた。ホルマリンでは著明な影響を受け、陰性血清は 0.25%迄陽性血清は 0.1%迄影響を受け、それ以下の濃度では影響を受けなかつた。マージンでは両者共に影響を受けなかつた。トリパフラビン、イスラビン、リバノールの三者も 2,000 倍稀釈より始めたが全然影響がなかつた。(第 1 表, 其 II 参照)

其 II. 防腐劑加血液の 24 時間後の血清に就て

(1) 石 炭 酸

血液中濃度		2%		1%		0.75%		0.5%		0.25%		0.1%		0.05%		對 照	
		A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
陰 性 血 清	•	•	+++	+++	+++	++	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽 性 血 清	•	•	+++	+++	+++	++	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++	-	+++

(2) ホ ル マ リ ン

血液中濃度		2%		1%		0.5%		0.25%		0.1%		0.05%		0.01%		對 照	
		A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
陰 性 血 清	++	++	+	+++	-	+++	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
陽 性 血 清	++	+++	+	+++	+	+++	-	+	++	±	+++	-	+++	-	+++	-	+++

(3) マーゾニン

血液中濃度	10.000		20.000		40.000		80.000		160.000		320.000		640.000		對 照	
	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
陰 性 血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
陽 性 血 清	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—

(4) トリパフラビン, イスラビン, リバノール

血 液 中 濃 度		2.000		4.000		8.000		16.000		32.000		64.000		對 照	
		A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K	A	K
トリ ビ ン	陰 性 血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	陽 性 血 清	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—
イ ス ラ	陰 性 血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	陽 性 血 清	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—
リ バ ノ ール	陰 性 血 清	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	陽 性 血 清	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—	+++	—

尙, W 反應以外の村田反應, カーン反應に於ても, W 反應に影響を與へざる濃度では同様, 影響がなかつた. ホルマリンの 2%, 1% の濃

度にて陽性血清が村田反應, カーン反應で陰性を示す事は恐らくホルマリンにより抗元が或種の影響を受けるのであらう.

第3章 各種防腐剤に依る葡萄状球菌, 大腸菌, 枯草菌の發育阻止試験

第1節 防腐剤加血清に就て

第1項 実験材料並に実験方法

實驗に供せし菌株は葡萄状球菌は寺島株, 大腸菌は教室保存の學生株, 枯草菌は私の分離した H_2 株⁶⁾ を使用した.

豫め各種防腐剤を正常人血清にて種々に稀釋せるものを夫々 2cc 宛小試験管にとり, 之に普通ブイオンに 37°C 24時間培養した前記菌の 0.2cc を加へ, 37°C 孵卵器に24時間放置し, 次いで夫々の小試験管より1白金耳宛を採り, 10cc 宛の普通ブイオンに投入し, 後者を再び 37°C で48時間放置し, 之に於ける發育の程度に依つて成績を判定した.

尙, 菌の發育を見なかつた後培養には新しいブイオン培養菌の1白金耳を加へて48時間 37°C に培養して菌の發育を吟味した.

第2項 実験成績

石炭酸に於ては葡萄状球菌, 枯草菌は共に 0.5% 以下で, 大腸菌では 0.1% 以下で發育を見

た. ホルマリンに於ては3種の菌とも 0.01% で發育を見, 0.05% では發育を見なかつた. マーゾニンでは葡萄状球菌が 320,000 倍で, 大腸菌, 枯草菌は 640,000 で發育を見た. トリパフラビンでは枯草菌が 8,000 倍, 大腸菌は 16,000 倍, 葡萄状球菌が 32,000 倍で夫々發育を見た. イスラビンでは大腸菌, 枯草菌が 8,000 倍, 葡萄状球菌は 16,000 倍で夫々發育を見た. リバノールでは大腸菌, 枯草菌共に 4,000 倍, 葡萄状球菌のみ 16,000 倍で發育を見た. 以上の成績を一括すると第2表, 第Iに示す如くである.

第2節 防腐剤加血清に就て

第1項 実験方法

血液の凝固を防ぐ爲, 豫め採血量に對してクエン酸ソーダが 0.6% の割合に混ざる如くにし, 10% の滅菌クエン酸ソーダ液を使用した他は前記實驗方法に全く同じである.

第 2 表 細菌の發育阻止試験
其 I. 防腐劑加血清に就て

稀釋度		2%	1%	0.75%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%
藥品名	S	—	—	—	+	+	+	+
	C	—	—	—	—	—	+	+
	H	—	—	—	+	+	+	+
稀釋度		2%	1%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.01%
藥品名	S	—	—	—	—	—	—	+
	C	—	—	—	—	—	—	+
	H	—	—	—	—	—	—	+
稀釋度		10.000	20.000	40.000	80.000	160.000	320.000	640.000
藥品名	S	—	—	—	—	—	+	+
	C	—	—	—	—	—	—	+
	H	—	—	—	—	—	—	+
稀釋度		1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000	64.000
藥品名	S	—	—	—	—	—	+	+
	C	—	—	—	—	+	+	+
	H	—	—	—	+	+	+	+
稀釋度		1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000	64.000
藥品名	S	—	—	—	—	+	+	+
	O	—	—	—	+	+	+	+
	H	—	—	—	+	+	+	+
稀釋度		1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000	64.000
藥品名	S	—	—	—	—	+	+	+
	C	—	—	+	+	+	+	+
	H	—	—	+	+	+	+	+

註 S = 葡萄狀球菌 C = 大腸菌 H = 枯草菌

第 2 項 実験成績

石炭酸に於ては葡萄狀球菌、枯草菌は共に 0.5% 以下で、大腸菌では 0.25% 以下で發育を見た。ホルマリンに於ては葡萄狀球菌、枯草菌は共に 0.05% 以下で、大腸菌は 0.01% で發育を見た。マーゾニンでは 3 種の菌とも 320,000 倍で發育を見た。トリパフラビンでは大腸菌、枯

草菌は共に 8,000 倍、葡萄狀球菌は 16,000 倍で夫々發育を見た。イスラビンでは枯草菌が 4,000 倍で、葡萄狀球菌、大腸菌が 8,000 倍で夫々發育を見た。リバノールでは枯草菌、大腸菌は共に 4,000 倍、葡萄狀球菌のみ 8,000 倍で發育を見た。以上の成績を一括すると第 2 表、其 II に示す如くである。

其II. 防腐剤加血液に就て

薬品名		稀釋度	2%	1%	0.75%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%
石炭酸	S		—	—	—	+	+	+	+
	C		—	—	—	—	+	+	+
	H		—	—	—	+	+	+	+
薬品名		稀釋度	2%	1%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.01%
ホルマリ	S		—	—	—	—	—	+	+
	C		—	—	—	—	—	—	+
	H		—	—	—	—	—	+	+
薬品名		稀釋度	10.000	20.000	40.000	80.000	160.000	320.000	640.000
マーゾニ	S		—	—	—	—	—	+	+
	C		—	—	—	—	—	+	+
	H		—	—	—	—	—	+	+
薬品名		稀釋度	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000	64.000
トリパフ	S		—	—	—	—	+	+	+
	C		—	—	—	+	+	+	+
	H		—	—	—	+	+	+	+
薬品名		稀釋度	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000	32.000	64.000
イスラビ	S		—	—	—	+	+	+	+
	C		—	—	—	+	+	+	+
	H		—	—	+	+	+	+	+
薬品名		稀釋度	1.000	2.000	4.000	80.000	16.000	32.000	64.000
リバノール	S		—	—	—	+	+	+	+
	C		—	—	+	+	+	+	+
	H		—	—	+	+	+	+	+

註 S = 葡萄球菌 C = 大腸菌 H = 枯草菌

第4章 総括竝に考按

以上の実験成績を総括竝に考按すれば、使用する防腐剤の新旧により、幾分結果に相違を來すは自明の理なるも先づ、防腐剤自身のワ反應に及ぼす影響は石炭酸では血清の場合は0.75%以下で、血液に於ては0.25%以下の濃度が使用可能であり、ホルマリンでは陽性血清が著しく影響を受け、血清では0.25%以下、血液では

0.05%以下で、マーゾニは使用せる防腐剤中最も優秀な成績を示し、血清、血液の双方に1万倍以上の濃度では全然影響を受けない。トリパフ、イスラビ、リバノールの三者は血清では1,000倍で著しい絮状濁を來すも、3,000回20分間遠心する事により、濁を完全に除去する時は影響がなく、2,000倍以上の濃

度ではその儘で影響を受けない。血液では 2,000 倍より始めたが影響を受けなかつた。

腐敗菌の代表的菌種として葡萄狀球菌、大腸菌、枯草菌の 3 種を選んで実験に供した結果は、石炭酸では大腸菌に特に強く作用し、血清では 0.25% 迄、血液では 0.5% 迄發育を阻止し、葡萄狀球菌、枯草菌では血清、血液共に 0.75% の濃度迄發育を阻止する。ホルマリンでは三者共に血清では 0.05% 迄、血液では葡萄狀球菌、枯草菌は 0.1% 迄、大腸菌は 0.05% 迄發育を阻止する。マーゾニンでは血清が葡萄狀球菌で 160,000 倍、大腸菌、枯草菌は共に 320,000 倍迄、血液では三者共に 160,000 倍迄、トリパフラビンでは血清が枯草菌で 4,000 倍、大腸菌 8,000 倍、葡萄狀球菌 16,000 倍迄、血液では大腸菌、枯草菌共に 4,000 倍、葡萄狀球菌は 8,000 倍迄、イスラビンでは血清が大腸菌、枯草菌で 4,000 倍、葡萄狀球菌が 8,000 倍迄、血液では葡萄狀球菌、大腸菌が 4,000 倍、枯草菌が 2,000 倍迄、リバノールでは血清が大腸菌、枯草菌で 2,000 倍、葡萄狀球菌が 8,000 倍迄、血液では大腸菌、枯草菌が 2,000 倍、葡萄狀球菌は 4,000 倍迄の濃度で夫々完全に發育の阻止を見た。

第 5 章 結 論

6 種の防腐剤を使用して防腐剤のワ反應に及ぼす影響を観察し、併せて細菌の發育阻止試験を試みて次の結論を得た。

(1) 防腐剤がワ反應に影響を興へず且つ、細菌の發育を完全に阻止する濃度は血清に加へるには、石炭酸 0.75%、ホルマリン 0.1%~0.05% 迄、マーゾニン 10,000 倍~160,000 倍迄、トリパフラビン、イスラビンは共に 2,000 倍~4,000 倍迄、リバノールは 2,000 倍の濃度である。

又、血液に加へるには、石炭酸、ホルマリンは使用不能でマーゾニンでは 10,000 倍~160,000 倍迄、トリパフラビンは 2,000 倍~4,000 倍、

以上の結果より使用せる 6 種の防腐剤の中、ワ反應に影響がなく且つ、細菌の發育を完全に阻止するものは、血清に使用する場合、石炭酸では 0.75%、ホルマリンでは 0.1%~0.05%、マーゾニンでは 10,000 倍~160,000 倍迄、トリパフラビン、イスラビンはその儘使用すれば 2,000 倍~4,000 倍迄、リバノールでは 2,000 倍のみ、遠心する時はトリパフラビン、イスラビンは 1,000 倍~4,000 倍迄、リバノールは 1,000~2,000 倍迄使用可能である。

又、防腐剤を血液に予め投入後の血清を使用する場合は、石炭酸、ホルマリンは使用不能でマーゾニンは 10,000 倍~160,000 倍迄、トリパフラビンでは 2,000 倍~4,000 倍迄、イスラビン、リバノールは 2,000 倍のみ使用可能である。

以上のワ反應に影響を興へない防腐剤の濃度では他の微毒反應たる村田反應、カーン反應に於ても亦、影響を興へない。

結局、ワ反應実施に当り、細菌の混入に依る抗補體作用の発現を予防する薬剤として、マーゾニンが最も優れたる防腐剤であり、トリパフラビン、イスラビン、リバノールが之に次ぐものである。

イスラビン、リバノールは 2,000 倍の濃度である。

(2) 以上のワ反應に影響を興へない濃度は村田反應、カーン反應にも亦、影響を興へない。

(3) ワ反應のみならず村田反應、カーン反應にも影響を興へず且つ、防腐の目的を果し得る薬剤としてマーゾニンが最も優れて居り、トリパフラビン、イスラビン、リバノールが之に次ぐものである。

(摺筆するに當り恩師谷教授の終始御懇篤なる御指導と御校閲とを深く感謝す。)

文 献

- 1) Baker: The estimation of the power of disinfectants. A system of bact. **9**, 289 (1930).
2) Public Health Report. **36**, 1559 (1921).
3) 小島・中込: 日本公衆保健協會雜誌, **6**, 450, 460 (1930). 4) 鉢谷: 十全醫學會雜誌に發表の豫定. 5) 鐵本: 實驗醫學雜誌, **21**, 1 (1937). 6) 手塚: 實驗醫學雜誌, **21**, 705 (1937). 7) Craig: Jour. of exp. Med. **13**, 521 (1911). 8) 青木: 十全醫學會雜誌に發表の豫定. 9) 谷: 醫學微生物學, 初版, (1948) 南山堂書店.