保存血液の殺菌作用に関する研究

国立予防衛生研究所一般検定部 (部長 黒川正身)

斎 藤 晴 一

A STUDY ON BACTERICIDAL ACTIVITY OF CITRATED WHOLE BLOOD

by

Haruichi SAITO (YAMAGUCHI)

The Division of Blood Department of General Biological Control

National Institute of Health, Tokyo

(Director: Dr.M.Kurokawa)

Abstract

Purpose of this experiment was to find a quantitative indication for bactericidal activity of citrated whole blood in which was represented at 37°C. When the experimental materials were removed from the incubator at 37°C to it at 4-6° C, and then cultured, the logarithmic growth curve of surviving bacteria in this materials was parallel to the curve of survival bacteria in bouillon under the same experimental condition. The experiments showed that the logarithmic growth curve of surviving bacteria was regularly constant, and the proportion of the number of bacteria counted in the beginning was almost parallel to the distance of the position between the curves of these bacteria. It was found that the bactericidal activity might be expressed on the number of days (L-Index) from which the distance was calculated by a general arithmetic formula for computing a method of relative potency. The computed standard was found to be a curve of logarithmic surviving bacteria-growth in bouillon. The computed distance was represented by the difference of the positions between the growth curve in materials and in bouillon. The potency of bactericidal activity in test materials could be expressed by the number of L-Index. Studies on the mechanism of bactericidal activity in human stored blood was investigated by this calculating method. The results of this studies pointed out that this

method of the expression on bactericidal activity could be used in practice.

目 次

緒 論

実験材料及び実験方法

第 I 部 血液殺菌力の推測及びその表現に関する基礎的実験

実験 1 殺菌作用の程度と菌増殖曲線との関係

実験 2 血液及びブイヨン中の菌増殖曲線

実験 3 初発菌数とその増殖曲線との関係

第 I 部 考察, 小括

第 II 部 血液殺菌作用の推測—表現方法の有効性に関する実験

実験 1. 血液と血漿との殺菌作用について

実験 2. zymosan 並びに加熱処置による血漿の殺菌力に及ぼす影響

実験 3 血液並びに血漿の保存による殺菌力の変化

第 II 部 小 括

総括並びに結論

緒論

近年保存血液の利用が一段と盛んになつてきているが、この保存血液の製造上、特に重要視される問題点の一つとして細菌汚染²⁾⁸⁾をあげることができる。

保存血液の細菌汚染の防止策としては、器具の

滅菌並びに採血条件を厳しくして器具の製造及び採血操作に伴う細菌の混入を防ぎ、更に混入した細菌に対しては、その発育並びに増殖の抑制を一つの目的として低温に保存する方法がとられている。しかし、所謂グラム陰性好冷菌によつて汚染した保存血液が、しばしば致死的作用を起し、この菌は低温においてよく発育する点から低温保存を唯一の、または最良の対策であるとする考え方に疑いをもつ人もある。

最近 Geller 等⁴⁾は、特に低温発育菌による汚染の重要さを説き、保存血液に混入した細菌に対する一つの対策として、採血して冷蔵する前に血液を短時間37°Cに保つことによつて、血液の殺菌作用により汚染菌を死滅、又はその発育をおくらせることができ、しかも血液の質的変化にはあまり影響をあたえないのでこの方法は有効であると報告している。

このことから、実際に汚染保存血液から分離された低温発育菌 *Pseudomonas* の1株を用いて保存血液の殺菌作用について実験してきたが¹²⁾¹³⁾この研究を進めるための必要性から血液の殺菌作用に関する基礎的実験として、まず血液殺菌力の推定—表現方法について検討し、その結果、合理的であると考えられる方法を考案することができたので報告する。

実験材料及び実験方法

1) 菌株：L-5株 (*Pseudomonas* の1株)。予研、無菌試験室より分与。

2) 保存血液及び血漿：血液としては抗凝固液B液⁶⁾使用のO型人血液を用い、血漿はこの保存血液より遠心分離(3000rpm30分2~4°)して得たものを使用した。

3) 菌液の作製と実験試料への添加：L-5株の普通寒天斜面25°、24時間培養菌を0.2mg/ccの割合にブイヨンに接種、25°、24時間培養し、これを生理食塩液で稀釈して、必要菌量を実験試料に添加し、初発菌量を得た。

4) 菌数の計測：菌加試料0.1ccを普通寒天平板に混稀して25°、48時間培養し、その集落数を算出して菌数を得た。なお1試料につき2枚の平

板を用いてその平均値をとり試料の菌数とした。表の菌数は被検試料0.1cc中の菌数をあらわす。

増殖した試料中の菌数の計測は、10倍連続稀釈により、1枚の平板の菌集落数が約100コをかぞえる平板の集落数から原試料の菌数を推定した。

5) ブイヨン：普通ブイヨンを用いた。

6) 推計学的分析：直線性の検定は通常直交多項式の方法⁷⁾により、平行性の検定、測定値及びその信頼限界の推定等は Finney³⁾によつた。

第1部 血液殺菌力の推測及びその表現に関する基礎的実験

血液、血漿の殺菌力を定量的にあらわす方法としては、殺菌力の作用過程の或る時期の生残菌数を計測し、その減少の程度によつて殺菌力の程度を表現する方法が最も直接的な方法として考えられ、実際にもこの方法が使用されているが¹¹⁾、この方法には次の三つの難点がある。

1) 被検試料の一部を用いて菌数を計測するにあたり、生残菌数がある程度以下に減少すると菌数の測定が不可能になる。

私の当面の研究目的である血液の汚染では、自然の状況では多くの場合、混入する菌は多くないと考えられるので、自然に近い状態で実験を行なうためには、この欠点は実験遂行上大きな制約となる。

2) 殺菌作用による菌数減少の速度及びその終末時点が、被検試料や、管理しがたい実験条件によつて異ってくるものと考えられるので、終末菌数の測定は極めて困難であり、また一定の測定時点の菌数を比較する場合には計測時点が変わると、違つた結果が得られる可能性が大きい。

3) 殺菌作用による菌数の減少のしかたは直線的でなく曲線的であるものと考えられるので、何点かの測定値を求めてそれを平均するという方法の採用は極めて困難である。

以上のような理由から他の推測並びに表現方法について検討してみた。

殺菌作用をもっている血液に加えられた菌は、37°下で血液の殺菌作用をうけて著しく減少するが、4~6°に移されると血液の殺菌作用が発揮

されなくなり、生残した菌は一定の潜伏期後増殖を始める。この場合対数増殖期の増殖の割合またはその最大発育菌数（或はその両者）にも血液の殺菌作用の影響が及ぶものなら、対数増殖期の増殖の割合即ち対数増殖直線の傾斜または、最大増殖菌数が血液の殺菌作用の指標となるかもしれない。逆にこれらの影響を受けないものであるなら、対数増殖期の増殖直線の傾斜は、最初に加えられた菌数や、血液の殺菌作用を受けて一度減少した菌が適当な環境下におかれて増殖しはじめる時の菌数の大小には関係なく一定であり、したがって対数増殖期の増殖直線の位置は対数増殖期に入る時期の違い、即ち遅退期の大小と一定の関係があるはずであるから、遅退期の大小を対数増殖期の増殖直線の位置で表現することができる。

殺菌作用を受けて一度減少した菌数の大小は、それが適当な環境下におかれて増殖に移行する時期の菌数とほぼ同じであろうと考えられるので、もしもこの遅退期の大小がこれらの菌数と比例するものなら、対数増殖期の増殖曲線の位置によつて殺菌作用の大小を表現することができるものと考えられる。

この方法はすべて相対的な関係で殺菌作用の大小を表現するのであるから当然その相対値のよりどころとなる標準が必要となる。この標準は比較的容易に得られ、しかも再現性のあるものでなければならない。この点でブイヨン等の培地はこの目的に最も適當するものと考えられる。4～6℃下におけるブイヨン中の菌の増殖曲線の位置が一定であり、対数増殖直線の傾斜が血液中所ける菌増殖のそれと同一であるならば、ブイヨン中の菌の対数増殖直線を標準にして、被検試料とブイヨン中の菌の増殖直線の位置の差を日数であらわすことができるものと考ええる。

上記の問題点について一つ一つ実験的に確かめ、次に述べるような結果を得た。

実験1 殺菌作用の程度と菌増殖曲線との関係方法

1) 4℃に冷却した保存血液に菌を加えて短時間振盪攪拌し、各12cc宛18本の試験管に分注し

図1-1 殺菌作用の程度と菌増殖曲線

→印はその前回の計測で菌を検出できなかった事を示す。各線の数字は作用時間を示す

図1-2 殺菌作用の程度と菌増殖曲線

→印はその前回の計測で菌を検出できなかった事を示す。各線の数字は作用時間を示す

て、各試験管毎に初発菌数を計測すると同時に37℃恒温槽に入れる。なお18本中2本の血液は恒温槽に入れずに、初発菌数の計測後直ちに4～6℃の冷蔵庫に移す。

2) 恒温槽に入れた血液は、2本を1組として1時間毎にとりだし直ちに菌数を計測する。

3) 加温終了後の菌数計測を終った血液は4～6℃の冷蔵庫に移して培養し、図1-1, 2のように日を追つてその菌数を計測して増殖曲線をとつた。

4) 対照実験としてブイヨンを用いて血液と同様の実験を行つた。

成績

37℃作用直後に菌を検出できなかった血液で

も、何日か後には菌を検出できた例が多かつた。この菌の検出され始める時期は 37° の作用時間をながくうけたほどおくれしている。

一方、血液が $4\sim 6^{\circ}$ に移されてからの生残菌の増殖が対数増殖期に入ってから菌増殖の割合は一定である可能性が考えられ、またその最大増殖菌数はいずれも同じ値を示しているようにみうけられた。

同一実験が5 lotの血液について行われたがすべて上記と同様の成績であつた。したがつて、最大増殖菌数や、対数増殖直線の傾斜を殺菌力の表現とする可能性は否定される。

ブイヨン及び加温しないで $4\sim 6^{\circ}$ においた血液中の菌の消長も、遅退期に差はあるが、その対数増殖期の増殖の割合は、加温した血液と大差ないものとみてもよいとおもわれる成績であつた。

即ち以上の成績は $4\sim 6^{\circ}$ での対数増殖期の菌の増殖の速度は 37° の加温の有無及び血液、ブイヨンの區別なくいずれも同様であることを示唆しているとおもわれた。

実験2 血液及びブイヨン中の菌増殖曲線。

次に対数増殖期の菌増殖の速度について更に詳しい実験を行った。

方法

1) 4° に冷却した保存血液及びブイヨンに菌を加えて短時間振盪攪拌後、血液は8本、ブイヨンは4本の試験管に分注して初発菌数を計測する。

2) 直に血液の試験管4本は $4\sim 6^{\circ}$ に、残りの4本はブイヨンと共に 37° 恒温槽に入れて6時間作用させ、加温直後の菌数を計測してから $4\sim 6^{\circ}$ に移し、以後24時間毎に菌数を計測してその増殖曲線をとつた。

37° の作用時間を6時間とした理由は、実験1の成績から、生残菌数はできるだけ少ないが菌が完全には殺されないとおもわれる最もながい作用時間としてえらんだものである。

成績

得られた成績は推計学的に検討した結果、対数増殖期における各増殖曲線がほぼ直線であるこ

図2 37° C、6時間加温血液、ブイヨン並びに非加温血液中の菌増殖曲線

→印はその前日の計測で菌を検出できなかった事を示す。

と、お互に平行していることを確かめることができた(図2)。

即ち、血液の殺菌作用をうけた生残菌及び殺菌作用をうけない血液中の菌の対数増殖期における菌増殖の割合はほぼ同一であると考えられ、したがつて菌の増殖が対数増殖期に入つてからは、血液の殺菌作用の影響を殆んどうけないと考えてよいことが実証されたわけである。

また 37° の作用をうけたブイヨン中の菌の増殖直線が、加温血液、及び非加温血液での対数増殖直線と平行していることから、はじめに述べた殺菌力測定標準としてブイヨンをを用いることが可能であると考えられる。

実験3 初発菌数とその増殖曲線との関係

方法

4° に冷却した保存血液0.1ccに対し、菌数を10コ、3コ、1コ、0.3コ、0.1コの割合になるように加え、加温することなく $4\sim 6^{\circ}$ に培養、24時間毎に菌数を計測してその増殖曲線を求めた。なお同一条件のものについて常に2本あて実験した。

成績

これまでの実験と同様、対数増殖期の各増殖曲線がほぼ直線であり、且平行であることがたしか

図3 4～6℃血液中の菌増殖曲線 Lot. 2218

→印はその前日の計測で菌を検出できなかった事を示す。

図4 対数増殖期における各種線間隔の同一性

められたので(図3), 次に各増殖直線上の4日目, 5日目, 6日目の菌数(対数)の平均値を求めて最初の接種菌量(対数)に対してプロットすると両者に直線関係が認められた(図4)。別に3 lotの血液を用いて実験を繰返したが, 結果は全く同じであった。このことは一定比に加えられた菌数と, 対数増殖期における一定日の菌数とが比例していることを示すものであり, また, 初発菌数の割合が一定であるならば各対数増殖直線間の間隔(x軸)がほぼ同一であることを意味してい

る。したがって対数増殖直線の位置によつて初発菌数の大小の割合を間接的に表現できるものと考ええる。

考察

37°におかれて一定の血液の殺菌作用をうけて減少した菌数は, この血液が4～6°に移されてから, その生残菌が増殖しはじめる時の菌数と同一であるか否かはまだかならずしも明らかでないが, 少なくともこの両者は比例するものと考えてさしつかえないものとおもわれる。したがって上記の実験結果から, 対数増殖直線の位置によつて血液の殺菌作用の大小, または殺菌作用の効果の大小を相対的に表現して大きなあやまりはないものと考えられる。

ブイオンでの対数増殖直線の位置を標準として, 被検血液の対数増殖直線との位置の差を日数(x軸)であらわすには次に示す相対力価(M)の一般式³⁾を用いて計算することができる。

$$M = \bar{x}_s - \bar{x}_T - \frac{\bar{y}_s - \bar{y}_T}{\bar{b}} \quad \text{..... (1)}$$

$\bar{x}_s$ = ブイオンでの対数増殖期の3～4点の日数の総加平均 = $\frac{\sum x_T}{N}$ (2)

$$\bar{x}_T = \text{同上 (被検試料)} = \frac{\sum x_T}{N} \quad \text{..... (3)}$$

$\bar{y}_s$ = ブイオンでの対数増殖期の3～4点の菌数(対数)の総和平均 = $\frac{\sum y_T}{N}$ (4)

$$\bar{y}_T = \text{同上 (被検試料)} = \frac{\sum y_T}{N} \quad \text{..... (5)}$$

$\bar{b}$ = 共通の回帰係数

$$\bar{b} = \frac{S_{xy}(T_1) + S_{xy}(T_2) + \dots + S_{xy}(s)}{S_{xx}(T_1) + S_{xx}(T_2) + \dots + S_{xx}(s)} \quad \text{..... (6)}$$

(T_1), (T_2) …各被検体, (S)は標準(ブイオン)をあらわす。

$$S_{xx} = \sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N} \quad \text{..... (7)}$$

$$S_{xy} = \sum xy - \frac{\sum x \sum y}{N} \quad \text{..... (8)}$$

S_{xx} 及び S_{xy} を各試料毎に計算した後(6)によつて $\bar{b}$ を計算する。

実験3の血液3 lotを用いて行つた実験成績をもとにして30本の対数増殖直線より求めた共通の

回帰係数値は 1.2であつた。

計算によつて得られたMは、被検血液中の菌の対数増殖直線がブイヨンでの対数増殖直線の位置から何日はなれているかをあらわしているものであつて、いゝかえれば、ブイヨンでの遅退期を基準にして、これと被検血液での遅退期との差をあらわしたものであるから、得られたMの値を **lag phase** (遅退期) のLをとつて便宜上L指数とよぶことにする。

ブイヨンと被検血液との対数増殖直線の位置の差は、血液により殺菌された菌数の程度に関係するから、殺菌力の強い血液での対数増殖直線ほどブイヨンでの対数増殖直線からその位置がはなれることになる。したがつてL指数は大きくなる。このL指数の示す意味を別な角度から表現すると37°で血液の殺菌作用をうけて一度減少した菌が、一定の菌数に増殖するまで何日かゝるかということであらわしているものといえる。

この測定方法を用いて血液の殺菌力を表現するにあつては次の点に注意しなければならない。

- 1) 毎回の実験条件をできる限り一定にする。
- 2) 1回の実験毎にブイヨンを対照にとり、各実験毎のブイヨンでの対数増殖直線の位置及び回帰係数の変化に注意する。
- 3) ブイヨン及び被検血液の対数増殖期における増殖直線の平行性及びその共通の回帰係数を計算してそれらの変化に注意する。

実験誤差については計測による誤差、即ち2枚の平板を用いての計測誤差を計算した結果、Mの信頼限界(95%)は±0.2であつた。しかしながら、実験による誤差の要因はこのほかにも次の場合が考えられる。

- 1) 実験に用いる種培養のちがひ。
- 2) 低温培養に移してから温度の変動による菌の増殖速度の変化。
- 3) 菌数計測時の稀釈操作。
- 4) その他、実験上一定できない実験条件。

註：第1部、実験1の結果から、この初発菌数及び37°での作用の關係が適当とおもわれる。

小括

血液殺菌力の新しい推測—表現方法について実験検討した結果、殺菌作用後の試料を4～6°に培養して、生残菌の増殖曲線をとる、その対数増殖期での増殖直線の位置と標準として同時に培養したブイヨンでの対数増殖直線の位置との差を相対力価の一般式によつて計算してこれを日数であらわし、殺菌作用の力価を定量的に表現する方法が可能であることがわかつた。

この方法は、従来使用されている殺菌作用により減少した菌数を測定して殺菌作用の大小を表現する方法と比較して合理的であり実験誤差の少ない方法であると考えられる。

第II部 血液殺菌作用の推測—表現方法の有効性に関する実験

次に第I部で得られた血液の殺菌作用の推測並びに表現方法の有効性の確認及び保存血液の殺菌作用に關係する機構の追求を目的として次の実験を行つた。

実験1 血液と血漿との殺菌作用について。

まず血液の殺菌作用の所在が血漿部分にあるか血球部分にあるかについて検討した。

方法

1) 血液、血漿及びブイヨンを4°に冷却して、菌を200～500コ/0.1cc(註)の割合に加え、振盪攪拌して均一浮遊液として、各10cc宛分注して初発菌数を計測する(同一試料につき2本宛実験した)。

2) 初発菌数の計測後血液、血漿及びブイヨンは直ちに37°恒温槽で2時間加温(註)した後4～6°の冷蔵庫に移して培養する。

3) 4～6°に移してからは24時間毎に試料中の菌数を計測して各試料毎に増殖曲線をとる。菌数の計測は菌の増殖が対数増殖期をすぎるまで継続する。

4) 以上の実験で得られた数値からL指数を求めた。

成績

血液及び血漿は同一lotのものを用い、その殺菌力を同時に実験して比較した。

表1 血液、血漿のL指数

Lot		1	2	平均
7713	血液	3.65	3.70	3.675
	血漿	3.82	2.98	3.400
9393	血液	4.12	4.85	4.485
	血漿	4.64	4.66	4.650

得られたL指数をみると両者の差は実験誤差の範囲内にある(表1)。

このことから血液と血漿の殺菌力にはあまり違いがないものとおもわれ、血液の殺菌作用は主に血漿部分にあると考えてもよいものと考えられる。したがって、37°で発揮される新鮮保存血液の殺菌作用については、同一lotの血液から得られた新鮮血漿についてしらべた実験成績をもつて判断しても大きな誤りはないものと考ええる。

実験2 zymosan¹⁰⁾ 処置、並びに加熱処置による血漿の殺菌力に及ぼす影響

殺菌作用の本態が血漿中に存在するものと考え、血漿の殺菌作用は properdin system¹⁵⁾⁹⁾ ¹⁰⁾¹¹⁾によるものではなからうかと推定し次の実験を行った。

材料

1) zymosan浮游液の作り方¹¹⁾:(Fleischman Lab., Lot 9 B 551 Typ A 及び Nutritional Biochemicals Co., Lot 7943)

バルビタール緩衝液¹⁰⁾で50mg/ccの zymosan浮游液を作り、これを熱湯中で1時間煮沸し、4000rpm 30分間遠心分離して上清をすて、前記バルビタール緩衝液で原量にもどして再浮遊させ、1~0°に保存する。使用時に無菌的に乳鉢で磨砕して実験に使用した。

2) zymosan 処置血漿: 血漿 0.9ccに対し上記 zymosan 浮游液を 0.1ccの割合に加えて37°恒温槽で15分毎に振盪攪拌しながら1時間加温し、加温終了後4000rpm 30分間(2~4°)遠心分離して zymosan を除き、上清を zymosan 処置血漿とした。

3) 加熱血漿: 56°の恒温槽で30分間加熱処置した血漿。

方法

同一 lot の血漿を3分し、zymosan 加熱の各処置血漿と無処置血漿の3種の血漿についてその殺菌力を測定した(実験手技は第Ⅱ部、実験Ⅰと同じ)。但し無処置血漿は zymosan 処置血漿と実験条件を揃えるために37°、1時間加温した後実験に用いた。

以上の実験を5 lot の血漿についてしらべた。
成績

表2に示す如く、各血漿のL指数は無処置血漿が一番大きく、zymosan 処置血漿、加熱血漿の順に減っている。また各実験毎に無処置血漿の開きが最も大きく、zymosan 処置血漿のL指数にも相当に開きがみられるが、加熱血漿のL指数は殆んど0.8~1.0の間にあつて実験誤差の範囲内にある。zymozan 処置血漿のL指数の開きは実験操作のちがいによつて生じたと考えられる点も

表2 各処置血漿のL指数の変化

Lot	試験管	Zymo- san	加熱	無処置
A	1	1.63	0.83	3.61
	2	1.81	0.62	3.80
B	1	0.99	0.72	∞
	2	0.87	0.91	4.09
C	1	2.11	0.99	∞
	2	2.04	0.87	∞
D	1	0.90	0.93	3.03
	2	0.82	0.87	2.72
E	1	1.10	0.79	3.74
	2	1.00	0.73	3.55

∞ 10日後においても菌を検出できなかったもの

あるが、多くの血漿では無処置血漿のL指数の大小に比較的平行していることからみると、各血漿中に含まれる殺菌作用物質と加えた zymozan との量的関係が主な原因となつていようにおもわれる。

zymozan 処置血漿のL指数と無処置血漿のL指数とを比較すると明らかな差があり、血漿の殺菌力は zymozan 処置によつて減弱することがわかつた。

加熱血漿のL指数が一定の値であることは37°で発揮される血液の殺菌作用は56°C、30分加熱に

よりほぼ完全に不活化されることを示すものであろう（加熱血漿は菌を加えて37°に作用させても菌数の減少は認められなかつた）。Pillemer 等⁹⁾は血清中の properdin は56°，30分の加熱処置により不活化されると述べている。

また、加熱血漿のL指数が一定の値を示していることは加熱血漿での遅退期がブイオンでの遅退期よりも常に一定してながいことを示しているものである。これは（1）血漿中にL-5株の増殖を抑制する作用があり、56°，30分の加熱によつて不活化されない物質の存在を示すものか、（2）56°加熱によりL-5株の発育を阻害する物質が生じたのか、あるいは（3）ブイオンに培養された菌が異つた培地に移されたことによる適応等によるものか、少なくとも3つの場合がありうるとおもわれる。

これらの点についてまず（3）の可能性について次の実験を行った。

ブイオン及び無処置血漿、加熱血漿にL-5株をうえて4～6°に培養し、菌の増殖が対数増殖期に入る時期をえらんで、それぞれの培地で2代継代し、各々をブイオン及び無処置血漿、加熱血漿にそれぞれ加え、L指数を測定したが、いずれの場合も加熱血漿のL指数に差異は認められなかつた。一方無処置血漿のL指数は大体において加熱血漿よりその値は大きく、小さい場合でも加熱血漿より小さい例は一例もなかつた。即ち（3）の可能性は殆んどないとおもわれる。

（2）の可能性については、積極的に否定する材料も肯定する材料もないが、zymozan 処置によるL指数の低下の最大値が、加熱血漿のL指数とほぼ一致することからみると、この可能性を考えるために更にいくつかの前提が必要になるとおもわれる。

（1）の可能性についても積極的な材料がないが、もしもこのような物質があるものとする、56°，30分の加熱処置によつてL指数が一定の値まで低下するということから考えて、この「物質」は各血漿に一樣に含まれるものであると考えられる。また、この「物質」と56°30分で完全に不

活化される作用物質とは温度に対する安定性を異にするものであり、また加熱血漿と無処置血漿の37°加温直後の菌数の変化に明らかな差があることから、それぞれの作用機序は異なるものと考えられる。

以上のように、加熱血漿中での遅退期がブイオンのそれより一定して大きいことの原因を明確にするにはまだ実験が必要であるが、このような現象はこの方法を使うことによりはじめて見出されたものである。

zymozan 処置血漿の補体価は無処置血漿に比較して低下している。この点 Pillemer¹⁾⁹⁾¹⁰⁾等の37°下で zymozan と properdin が共同して補体を不活化すると報告していることと一致する。

実験3 血液並びに血漿の保存による殺菌力の変化

血液と血漿という異つた状態で保存された場合の、37°で発揮される殺菌作用の消長をすることを目的として次の実験を行った。

方法

同一 lot の保存血液から、その約 $\frac{1}{2}$ を用いて血漿を分離し、全血液の残部及び血漿を同一条件下で4～6°に3週間保存し、1週間毎に血液及び血漿それぞれの殺菌力を測定した（実験手技は第Ⅱ部、実験1と同じ）。

血液の殺菌力の推測には殺菌力測定をつど、保存した全血液から必要だけの血漿を分離して試験に供した。

なお殺菌力の推測は、各試料毎に zymozan 処置及び加熱処置の血漿をつくり、平行して実験した。また、殺菌力の変化が実験毎の変動でないことを確かめるために、毎週1 lot ずつの血液の推測を新たに開始し、例えばDの採血直後、Cの保存1週目、Bの保存2週目、Aの保存3週目の各血液、血漿を同時に試験して、お互の比較対照する方法をとつた。

成績

血液及び血漿の、37°でみられる殺菌力は保存によつて緩徐に、または急速に低下し、その速さ

表3 4～6℃保存による血液及び血漿のL指数

Lot	処置	試験管	採血直後	1週間保存		2週間保存		3週間保存	
				血液	血漿	血液	血漿	血液	血漿
A	無処置	1	3.61	1.87	0.83	1.47	0.74	1.25	0.91
		2	3.80	2.07	0.88	1.44	0.74	1.24	0.69
	加熱	1	0.83	0.82	0.78	0.69	0.68	0.46	0.67
		2	0.62	0.72	0.76	0.74	0.89	0.56	0.63
	Zymosan	1	1.63	1.00	0.73	0.76	0.69	0.88	0.58
		2	1.81	0.80	0.70	1.01	0.71	0.97	0.58
B	無処置	1	∞	∞	3.12	∞	∞	∞	1.45
		2	4.09	3.50	3.22	4.15	2.76	5.08	1.46
	加熱	1	0.72	0.64	0.70	0.77	1.03	0.54	0.63
		2	0.91	0.70	0.79	0.81	1.00	0.50	0.39
	Zymosan	1	0.99	0.74	0.89	0.99	1.09	1.88	0.71
		2	0.87	0.81	0.79	1.00	1.13	1.84	0.75
C	無処置	1	∞	∞	5.30	4.12	4.79	4.50	3.88
		2	∞	∞	4.25	3.82	4.58	4.22	3.91
	加熱	1	0.91	0.88	0.86	0.63	0.75	0.76	0.73
		2	0.96	0.92	0.99	0.73	0.73	0.66	0.59
	Zymosan	1	2.11	1.18	1.19	3.99	1.57	／	／
		2	2.04	1.30	1.54	3.97	1.61	／	／
D	無処置	1	3.03	3.05	0.75	1.28	1.04	0.46	0.56
		2	2.72	2.86	0.78	1.36	0.97	0.51	0.57
	加熱	1	0.93	0.54	0.68	1.11	1.02	0.51	0.60
		2	0.87	0.61	0.58	0.84	0.89	0.59	0.69
	Zymosan	1	0.90	0.62	0.76	／	／	／	／
		2	0.82	0.54	0.68	／	／	／	／
E	無処置	1	3.74	3.29	1.44	2.76	1.07	1.64	1.10
		2	3.55	3.31	1.26	2.72	0.97	1.64	1.13
	加熱	1	0.79	0.77	0.79	1.26	0.92	0.78	0.83
		2	0.73	0.94	0.88	1.07	0.85	0.76	0.88
	Zymosan	1	1.05	／	／	／	／	／	／
		2	1.03	／	／	／	／	／	／
F	無処置	1	3.84	3.85	2.01	2.80	1.35	2.55	0.91
		2	3.90	4.22	2.05	2.64	2.01	2.40	0.94
	加熱	1	1.03	1.12	1.33	1.08	1.49	0.79	0.90
		2	1.00	1.14	1.01	0.96	1.37	0.73	0.84
	Zymosan	1	／	／	／	／	／	／	／
		2	／	／	／	／	／	／	／

∞ 10日後においても菌を検出できなかったもの

は血液の lot によつて著しく開きがあり、血液と血漿との間にも差がある（表3，図5）。血液の殺菌力は lot によつて異なるが、かならずしも急速に低下するものではなく、3週間後も殆んど殺菌力の低下が認められない例もあつた。一方血漿の殺菌力は、大部分が3週間後に殆んど失なわれるが、完全には失なわれない例もあつた。血液、血漿の殺菌力の低下を同一 lot 間で比較してみると、常に血液より血漿で保存された試料の方が低下速度がはやく、この逆の場合は1例もな

かつた。

加熱血漿を殺菌力の完全に失なわれた対照と考え、これを基準にして血液及び血漿の保存別に殺菌力低下の程度を各週毎に lot 数で比較してみても血漿より血液のまゝ保された場合の方が低下率が小さいことがわかる。

以上のことから血漿で保存された場合よりも、全血液の状態で保存された方が一般に殺菌力は安定であることをしることができた。

なお保存後も残存する37°で発揮する殺菌作用

図5 4~6°保存による血液及び血漿のL指数
の変化 Lot. A

は zymosan 及び 56° 30分加熱の各処置によって減弱され、その減弱の程度から考えて採血直後に示される殺菌作用の性状と同一のものと考えられる。

小括

新鮮保存血液、血漿の37°でみられる殺菌作用が同一であることを確かめることができたので、この血液殺菌作用の本態が血漿部にあるものと考え、これが properdin system によるものではなからうかとの推定から、血漿につき zymosan を用いて実験した結果、殺菌作用が zymosan によつて不活化されることがわかった。

また56° 30分の加熱によつてもこの殺菌作用は不活化される。これらの事実は、血液の37°でみられる殺菌作用が properdin system によるものとする推定に背馳しないが、これを積極的に肯定するためにはまだ実験が不足していると考えられる。

なお、血液、血漿の保存による殺菌作用の変化についてしらべた結果、血液で保存した方が血漿で保存した場合よりも安定であることがわかった。

以上の殺菌作用の性状に関する実験は、この実験を通じて、第I部で提案した推測—表現方法の有効性についての検討をも同時に行なわれた実験であるが、はじめに述べたこの方法は、実験手技

の点で改良しなければならない部分もあるが、得られた実験結果から考えてこの方法の理論的根拠の有意性を確認することができ、また実際にも有効であると考えられた。

総括並びに結論

保存血液の37°で発揮される殺菌作用の力価を定量的にあらわす新しい方法について実験検討した。その結果、殺菌作用後の試料を4~6°に移して培養するとき、試料中の生残菌の対数増殖直線と同一実験操作で行なわれたブイヨンでの菌のそれとがほぼ平行であり、またブイヨンでの対数増殖直線の位置がほぼ一定していること、初発菌数の割合と対数増殖直線の位置の開きがほぼ平行していることが実験的に確かめられた。これらの事実を応用して、ブイヨンでの対数増殖直線を標準にとり、これと被検試料での対数増殖直線の位置との開きを相対力価の一般式によつて計算してその差を日数であらわし(L指数と名づけた)、これをもつて被検試料の殺菌作用の力価を表現する方法を考案した。

次にこの方法を実際に応用して血液の殺菌作用の性状—機構に関する諸実験を行い、その結果から私の考案した血液殺菌力の推測—表現方法が有効であることを確認した。

また、これらの実験を通じて、保存血液の細菌汚染に重要な関係をもつグラム陰性低温発育菌の血液中での増殖に関し、いくつかの新しい知見を得ることができた。

稿を終るに臨み、終指懇篤な御指導御鞭撻御校閲を賜った順天堂医科大学 土屋毅教授、国立予防衛生研究所 黒川正身博士並びに市川洋一博士に対して深甚な究る謝意を表す。又推計学的処理で協力いただいた石田説而氏に謝意を表す。

(本研究は厚生科学研究費の援助によつたことを附記する)。

文 献

- 1) Arday, F.R., Pillemer, L. & Lepow, I.H.: The properdin system and immunity: VIII. Studies on the purification and properties of the third component of human complement. J. Immunol., 82: 458, 1959.

- 2) Borden, C.W. & Hall, W.H.: Fatal transfusion reactions from massive bacterial contamination of blood. *New England J. Med.*, 245 : 766, 1951.
 - 3) Finny, M.A.: *Statistical Method in Biological Assay*. 1952. Charls Griffin. London.
 - 4) Geller, P., Chandler, L. & Jawetz, E.: Experimental studies on bacterial contamination of bank blood: III. The survival and growth of bacteria in bank blood incubated at 37C. for short periods before refrigeration. *J. Lab. & Clin. Med.*, 49: 573, 1957.
 - 5) Isliker, H.C.: The properdin system, a review. *Vox Sang.*, 1 : 8, 1956.
 - 6) 厚生省: 生物学的製剤基準, 1959.
 - 7) 森口繁一: 統計解析, 1957, 岩波書店.
 - 8) Pittman, M.: A study of bacteria implicated in transfusion reactions and of bacteria isolated from blood products. *J. Lab. & Clin. Med.*, 42. 273, 1953.
 - 9) Pillemer, L., Blum L., Lepow, I.H., Ross, O.A., Todd, E.W. & Wardlaw, A.C.: The properdin system and immunity: I. Demonstration and isolation of a new serum protein, properdin, and its role in immune phenomena. *Science*, 120 : 279, 1954.
 - 10) Pillemer, L., Blum L., Lepow, I.H., Wurz, L. & Todd, E.W.: The properdin system and immunity: III. The zymosan assay of properdin. *J. Exp. Med.*, 103 : 1, 1956.
 - 11) Wardlaw, A.C. & Pillemer, L.: The properdin system and immunity: V. The bactericidal activity of the properdin system. *J. Exp. Med.*, 103 : 553, 1956.
 - 12) 山口晴一 (斎藤), 尾崎順一, 市川洋一: 保存血の細菌汚染防止に関する研究 (第2報): 保存血の温度変化と汚染菌の消長 (1), 第6回日本輸血学会総会誌 (血液と輸血), 4 : 246, 1958.
 - 13) 山口晴一 (斎藤), 市川洋一: 保存血の細菌汚染防止に関する研究 (第3報): 保存血の温度変化と汚染細菌の消長 (2), 第7回日本輸血学会総会誌 (日本輸血学会雑誌), 5: 235, 1959.
-