

BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY IN HIROSHIMA SUBJECTS

広島調査対象群における血液殺菌作用

J. W. HOLLINGSWORTH, M.D.

HOWARD B. HAMILTON, M.D.



THE ABCC TECHNICAL REPORT SERIES
A B C C 業績報告集

The ABCC Technical Reports provide a focal reference for the work of the Atomic Bomb Casualty Commission. They provide the authorized bilingual statements required to meet the needs of both Japanese and American components of the staff, consultants, advisory councils, and affiliated governmental and private organizations. The reports are designed to facilitate discussion of work in progress preparatory to publication, to record the results of studies of limited interest unsuitable for publication, to furnish data of general reference value, and to register the finished work of the Commission. As they are not for bibliographic reference, copies of Technical Reports are numbered and distribution is limited to the staff of the Commission and to allied scientific groups.

この業績報告書は、A B C C の今後の活動に対して重点的の参考資料を提供しようとするものであって、A B C C 職員・顧問・協議会・政府及び民間の関係諸団体等の要求に応ずるための記録である。これは、実施中で未発表の研究の検討に役立たせ、学問的に興味限定せられていて発表に適しない研究の成果を収録し、或は広く参考になるような資料を提供し、又 A B C C において完成せられた業績を記録するために計画されたものである。論文は文献としての引用を目的とするものではないから、この業績報告書各冊には一連番号を付して A B C C 職員及び関係方面にのみ配布する。

BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY IN HIROSHIMA SUBJECTS

広島調査対象群における血液殺菌作用

J. W. HOLLINGSWORTH, M.D.¹

HOWARD B. HAMILTON, M.D.²

From the Departments of Medicine¹ and Clinical Laboratories²

臨床部¹ 及び臨床検査部²



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION
Hiroshima - Nagasaki, Japan

A Research Agency of the
U.S. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL
under a grant from
U.S. ATOMIC ENERGY COMMISSION
administered in cooperation with the
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH of the MINISTRY OF HEALTH & WELFARE

原爆傷害調査委員会
広島 - 長崎

厚生省国立予防衛生研究所
と共同運営される
米国学士院 - 学術会議の在日調査研究機関
(米国原子力委員会研究費に依る)

ACKNOWLEDGMENT
感謝の言葉

The authors express their appreciation to Mrs. Kimiko Monden for her technical assistance; to Mr. Mitsuru Yamasaki and Dr. Paul S. Anderson, Jr., for their statistical analyses; and to Dr. Paul B. Beeson for helpful advice and suggestions.

著者等は技術上の援助をいただいた門田公子氏に、統計的解析を担当した山崎満氏及びDr. Paul S. Anderson, Jr., 又有益なる指導並びに示唆を下されたDr. Paul B. Beesonにそれぞれ感謝の意を述べたい。

TABLE OF CONTENTS

目 次

	<i>Page</i>
List of Tables 挿入表一覧表	i
Introduction 緒 言	1
Observations on the Methods in Relationship to Blood Bactericidal Activity 血液殺菌作用に関する調査方法の考察	2
Selection of the Organism and the Medium for Dilution 細菌類及び希釈液として使用する液体の選定	2
Colony Counting Methods 菌集落数算定法	4
Selection of Incubation Temperature, Bacterial Dilution, and Incubation Time 培養温度, 細菌の希釈度及び培養時間の選定	4
Effects of Heat Inactivation of Serum 血清の加温不活性化の影響	6
Comparison of Whole Blood and Serum and Quantitative Studies of Serum Concentrations 全血及び血清の比較並びに血清濃度の定量的検討	8
Studies of Blood Bactericidal Activity in Radiation- Exposed and Nonexposed Populations 被爆者及び非被爆者人口における血液殺菌作用の検討	8
Results 結 果	10
Discussion 考 察	12
Summary 総 括	14
References 参考文献	14

LIST OF TABLES

挿入表一覧表

	<i>Page</i>
1. Preliminary experiments on effects of time and bacterial quantity on blood bactericidal activity 培養時間及び細菌量が血液殺菌作用に及ぼす影響に関する予備実験	5
2. Bactericidal effect of serum on different concentrations of bacteria (one hour incubation time) 種々の細菌濃度に対する血清殺菌の効力 (1時間培養)	7
3. Bactericidal effects of serum after different incubation times on a standard quantity of organisms (6,000 per pipette) 細菌標準量 (ピペット当り 6,000) に対する種々の培養時間経過後の血清殺菌効力	7
4. Effect of heat inactivation (56°C.) on serum bactericidal activity (1:1,000,000 <i>E. coli</i> dilution) 血清殺菌作用 (大腸菌 1: 1,000,000 希釈液) に対する加温 (56°C) 血清不活性化の影響	7
5. Bactericidal activity of serum dilutions on a 1:100,000 <i>E. coli</i> suspension (incubation time one hour) 1: 100,000 大腸菌浮遊液に対する血清希釈液の殺菌作用 (培養時間 1時間)	8
6. Sample used for analysis of blood bactericidal activity by age and sex. 血液殺菌作用の解析に用いられたサンプルの年齢別及び性別構成	11

INTRODUCTION

緒言

Changes in natural resistance to disease have not been investigated as late radiation sequelae. Many of the subjective complaints of irradiated humans, such as lassitude, weakness, and increase in small illnesses, might relate to some change in the complex mechanisms involved in body resistance to disease. The relatively primitive stage of knowledge concerning the many facets of natural resistance preclude a systematic study in irradiated subjects, but blood bactericidal action has been investigated sporadically over the past 70 years since the phenomenon was described by Nuttall.¹ Despite the efforts of many workers, the basic nature of blood bactericidal activity remains relatively obscure. The action has been ascribed to a heat-stable antibody of possibly natural origin, combined with complement.^{1,2} More recently properdin has been suggested as the active heat-labile component,³ but other studies indicate that this heat-labile protein plays little role in total serum bactericidal activity.⁴

Study of blood bactericidal activity was initiated in Hiroshima in 1959 among the subjects undergoing physical examinations at the Atomic Bomb Casualty Commission (ABCC). The study included exposed and nonexposed subjects of generally comparable ages, allowing comparison of blood bactericidal activity between exposed and nonexposed groups. Because of the potentially large number who might be screened for blood bactericidal activity (20-40 subjects per day), an attempt was made to develop simple methods requiring minimum equipment, media, and technical effort. Problems posed by development of a simple bactericidal test, applicable

遅発性放射線後遺症として疾病に対する自然抵抗の変化が調査されたことはない。原子爆弾被爆生存者の倦怠感、虚弱及び軽い疾患の増加などの主観的な訴えの多くは、疾病に対する身体的抵抗の複雑な機構のなんらかの変化に関係があるのかも知れない。自然抵抗の多くの面に関して知識が比較的乏しいため放射線照射を受けた者の組織的な研究は困難である。Nuttall¹によって血液の殺菌作用が報告されて以来、この現象について過去70年間断片的に調査されて来たが、多くの研究者の努力にもかかわらず、血液殺菌作用の基本的性質は、依然として比較的不明である。この作用は補体と結合した耐熱性の自然抗体のためであろうといわれている。^{1,2} さらに最近では非耐性のプロパージンがその活性成分であろうと示唆されたが³ 他の研究では、血清殺菌作用全体としてはこの非耐性蛋白が演じる役割はきわめて小さいことを示している。⁴

広島で原爆傷害調査委員会 (A B C C) において受診した人々について、1959年に血液殺菌作用の研究を開始した。対象は、年齢構成がほぼ一致している被爆者及び非被爆者であるので被爆者群と非被爆者群との血液殺菌作用の比較が可能であった。血液殺菌作用に関する探知検査が非常に多数の対象者について実施されると予想されたので(1日につき20-40例)、最小限度の設備で、最少の培養液を用いて、しかも最少の技術的操作を要する簡単な方法を考案するよう試みた。疫学的研究に応用することが出来る簡単な殺菌検査の考

to epidemiologic studies, made it mandatory that a variety of observations be taken on the phenomenon of blood bactericidal activity.

OBSERVATIONS ON THE METHODS IN RELATIONSHIP TO BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY

A survey of young school children undergoing examinations was considered as a possible application of the bactericidin technique. Because the children were being subjected only to finger prick to obtain blood, further restrictions on methodology were imposed in relationship to the quantity of blood available and the rapidity with which the test had to be initiated before clotting occurred.

Because of these special considerations, it was decided to develop a method based on the use of a white blood cell pipette as the incubator for blood and bacteria. The white cell pipette would permit a relatively accurate ratio of blood to bacteria; although the absolute volume of the pipettes is not constant, those from a single supplier tend to have a relatively constant volume of approximately 0.25 ml. It was further decided that fresh blood without anticoagulants would be taken in the clinic as the patients underwent their routine blood tests, and that the test would be initiated in the clinic using an appropriate bacterial suspension as the "diluent" for the blood in the pipette.

Once these limitations of method were accepted, experiments were necessary in order to develop a final method to be applied in the population survey.

Selection of the Organism and the Medium for Dilution

Most studies of bactericidal activity of blood or serum have used relatively high concentrations of serum.⁵⁻¹² Physiologically, it may be argued that a few bacteria entering the circulation is the usual situation in which blood bactericidal

案にあたって種々の問題があったので、血液殺菌作用の現象について多くの観察を行なうことが必要であった。

血液殺菌作用に関する調査方法の考察

調査を受ける学童について殺菌素検査法を応用することにした。学童の場合採血法は指の穿孔に限られているので入手し得る血液量及び血液凝固が生じない内に検査を早く開始する必要がある点などからして検査法に一層制限が加えられた。

これらの点について特別の考慮を払う必要があるので血液及び細菌の培養に白血球用ピペットを使用する方法を研究することに決めた。白血球用ピペットを使用すれば、血液と細菌との比較的正確な割合が得られる。もっともピペットの絶対容積は一定ではないが、同一発売元より入手するピペットは約0.25mlの比較的一定した容量のものが得られ易い。受診者より一般血液検査のための採血を行なう際に、血液凝固阻止剤が加えられていない鮮血をピペットに採り、直ちに“希釈液”として適当な細菌浮遊液を加えて検査を開始することにした。

調査方法にこれらの制限があるので、人口調査に応用出来るような最終方法を決定するためには実験が必要であった。

細菌類及び希釈液として使用する液体の選定。

血液乃至血清の殺菌作用に関する研究の多くは、比較的高濃度の血清を使用して行なわれている。⁵⁻¹² 生理学的には循環血液中に少数の細菌が入った場合に血液殺菌作用が保護的に作用するのが普通の状態であり、従って血清の高濃度を用い

activity is protective, and therefore studies using high concentrations of serum are most applicable. Conversely, it may be that leakage of serum bactericidal proteins into tissue areas of inflammation constitutes the major physiologic use of these powerful substances. If the latter mechanism were most important, incubation of relatively low concentrations of serum with bacteria might be more appropriate as a tool for physiologic investigation. Regardless of these theoretical considerations, a 1:10 dilution of blood (less than 1:20 dilution of the active serum) is the maximum that can be achieved using blood pipettes.

A bacterial suspension of appropriate concentration needed to be determined for the blood diluted in the pipette. Further, the viable organisms in dilution from the broth "mother" culture had to be fairly reproducible from day to day in order to supply a relatively constant number of bacteria for the clinical studies. Finally the culture dilution used during a day of testing required a constant number of organisms for several hours daily during which the patients entered the clinic for their examinations.

Inasmuch as both *B. subtilis*^{6,9} and *E. coli*^{5,7,8,11,12} have been used extensively in studies of bactericidal activity, both organisms were investigated. The *B. subtilis* strain produced erratic quantitative growth in eighteen-hour broth cultures inoculated from a slant, but the *E. coli* produced a relatively constant growth of 100-1000 organisms per white cell pipette in the 1:1,000,000 dilution. Therefore, *E. coli* was selected as the test organism.

Stability of viable organisms in dilute suspensions proved a troublesome requirement. Several strains of *E. coli*, obtained from patients with urinary tract infections were tested for their viability in 0.85 per cent saline. Standing for several hours at 4°C. produced a marked decrease (50-90 per cent) in viable organisms as determined by colony count. It seemed

た研究が最も適当であるといえるかも知れない。一方、血清中の殺菌性蛋白が炎症を起した組織へ滲透することによってこれらの強力な物質の主要な生理学的役割が果されるのではなからうかとも思われる。もし後述の機構が最も重要であれば比較的低い濃度の血清に細菌を加えて培養を行なう方法が生理学的調査としてより適切であろう。これらの理論的考察にかかわらず、血液ピペットを使用した場合、血液の最大希釈度は1:10 (活性血清の希釈度1:20以下)である。

ピペット内の希釈血液中の適当な細菌濃度を決定することが必要であった。さらに臨床調査に比較的一定数の細菌を供給するため、ブイヨン培地より菌をとって希釈液を作る場合、その中に含まれる生菌の数には毎日かなりの再現性がなければならない。さらにその検査当日用いられる希釈液中には、診察時間中の数時間にわたって一定数の細菌が必要である。

枯草菌^{6,9}及び大腸菌^{5,7,8,11,12}はいずれも殺菌作用の研究に広範に使用されて来たので、この2つの細菌を検討した。枯草菌株は、斜面寒天培地よりブイヨン培地に接種して18時間培養を行なつたところ一定の発育が得られなかった。これに対して大腸菌は1:1,000,000希釈で白血球用ピペットに菌数100-1000の比較的一定の発育を示したので検査に大腸菌を用いることにした。

希釈浮遊液中の生菌数を安定にすることは困難な要求であった。尿路感染患者より入手した大腸菌のいくつかの菌株について0.85%食塩水中の発育力を検査した。4°Cで数時間放置して菌集落数算定を行なうと生菌に著しい減少(50-90%)が認められた。ブイヨン液は血清の殺菌性物質の非特異的な、かつ種々の程度の中和を生じるかも

best to use a simple, non-nutrient media for dilution, since nutrient broth might provide non-specific and possibly variable neutralization of serum bactericidal substances. Properdin, in particular, tends to combine and be neutralized by a variety of proteins.¹³ The phosphate buffered saline medium used by Davis and Mingioli¹⁴ (without added glucose) proved to be an effective stabilizing agent for one of three strains of *E. coli* tested, and that strain was used in all subsequent studies. The organism was transferred weekly to a fresh nutrient agar slant (Difco), and the tests of the week were done from that slant kept at 4°C. A small inoculum from the slant was placed in 10 ml of nutrient broth (Difco) each afternoon, incubated at 37°C., and the eighteen-hour culture was used to prepare the dilutions for use in the tests.

Colony Counting Methods

For initial experiments, the entire contents of the white cell pipette were expelled into a tube of molten agar, and counts were performed after twenty-four hours' incubation at 37°C., using a Quebec colony counter. Later, it was found that satisfactory counts could be obtained by expelling the contents onto the surface of a nutrient agar plate (Difco) and rotating the plate to obtain smooth distribution of the fluid. Plates several days old and slightly dry were preferable.

Selection of Incubation Temperature, Bacterial Dilution, and Incubation Time

Experiments were conducted to determine the effect of incubation temperature of the blood-bacteria mixture in the pipette on bactericidal activity. No difference in bactericidal activity was noted between incubation temperatures of 23-25°C. (room temperature) and 37°C.; incubation at 4°C., however, markedly inhibited blood bactericidal activity. Because of greater convenience, room temperature incubation was used in all subsequent experiments.

知れないので希釈液としては簡単な栄養成分のない液体を使用するのが最善であると思われた。特にプロパージンとは種々の蛋白と結合して中和される傾向がある。¹³ 検討された大腸菌の3種の菌株中の1つに対してDavis及びMingioli¹⁴が使用した磷酸塩緩衝食塩水(ブドウ糖は含まない)が効果的な安定剤であることが証明され、爾後この菌株が、総ての検査に用いられた。毎週細菌は新鮮な斜面寒天培地(Difco)に移され、4°Cで保存しその1週間の検査に用いる細菌はこの斜面寒天培地より採った。即ち毎日午後、斜面寒天培地より少量をブイヨン培地(Difco)10ml内に接種し、37°Cで18時間培養して検査に用いる希釈液を作成した。

菌集落数算定法

最初の実験では、白血球用ピペットの全内容を溶解寒天培地を入れた試験管の中へ流して37°Cで24時間培養後 Quebec 集落計算器で集落数の計算を実施した。寒天培地平板(Difco)に材料を入れて平板を回転して材料を均等に拡げたものを用いても、満足な集落計算が行なえることが、その後分った。平板は数日経過し、僅かに乾燥したものが望ましい。

培養温度、細菌の希釈度及び培養時間の選定

ピペット内の血液、細菌混合液の培養温度の殺菌作用に及ぼす影響について実験を行なった。培養温度が23-25°C(室温)である場合と37°Cである場合との間では、殺菌作用には差異は認められなかったが、4°Cでは血液殺菌作用は著しく抑制されると認められた。爾後の実験では、便宜上総て室温で培養を行なった。

Because the amount of blood was limited to that used in a single white cell counting procedure, it was desirable to have the final test yield a countable number of colonies (approximately 100-1000) from the total contents of the pipette. Inasmuch as the 1:1,000,000 E. coli dilution in buffer contained such a minimal number of organisms, tests were set up to determine the bactericidal activity on that dilution and the subsequent more concentrated mixtures. In these experiments a 1:10 dilution of blood and bacterial suspension in buffered saline was incubated at room temperature for 30 minutes to two hours. In experiments using the higher concentrations of organisms, total organisms per white cell pipette were determined from duplicate counts of the 1:1,000,000 dilution in buffered saline. The results of three experiments are shown in Table 1. From these studies it seemed apparent that there was no direct correlation between the number of bacteria and the blood bactericidal effect. Indeed, the bactericidal action appeared greater with the more concentrated bacterial suspension.

1回の白血球数算定に使用される血液量は制限されているので、最終検査のために、ピペットの全容量より算定し得る数の集落(約100-1000)が発育することが望ましい。大腸菌に緩衝液1:1,000,000の割合で加えた希釈液では細菌はごく少数である故、この希釈度のほかにもっと高濃度の混合液についても殺菌作用の検査を行なった。これらの実験では、血液に細菌の緩衝食塩水浮遊液を1:10の割合で加えた混合液を30分乃至2時間室温で培養した。細菌のより高い濃度を用いる実験では、各白血球用ピペットあたりの細菌総量は緩衝食塩水で1:1,000,000の割合で希釈した液の重複算定によって測定した。3つの実験の結果は表1に示した。この研究より細菌数と血液殺菌作用との間には、直接相関関係がないことは明白のようであった。実は、殺菌作用は高濃度の細菌浮遊液でより顕著であるように見えた。

TABLE 1 PRELIMINARY EXPERIMENTS ON EFFECTS OF TIME AND BACTERIAL QUANTITY ON BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY

表1 培養時間及び細菌量が血液殺菌作用に及ぼす影響に関する予備実験

EXPERIMENT NUMBER	E. COLI DILUTION	TOTAL ORGANISMS PER PIPETTE	INCUBATION TIME IN MINUTES	VIABLE ORGANISMS REMAINING	ORGANISMS KILLED	PER CENT REMAINING
実験番号	大腸菌希釈度	ピペット当りの細菌総数	培養時間(分)	残った生菌	殺された細菌	残留生菌の%
20	1:1,000,000	482	30'	47	435	10
	1:1,000,000	431	60'	47	384	10
	1:1,000,000	421	90'	45	376	10
	1:1,000,000	419	120'	26	393	6
23	1:100,000	1300	30'	217	1100	17
	1:100,000	1300*	60'	202	1100	16
	1:100,000	1300*	90'	133	1170	10
	1:100,000	1350	120'	103	1250	8
24	1:10,000	31,600	30'	1,142	30,000	4
	1:10,000	31,600*	60'	975	30,000	3
	1:10,000	31,600*	90'	780	30,000	3
	1:10,000	31,400	120'	1,584	30,000	5

*30-minute count used as basis of calculation.
計算の基準として30分値が用いられた。

The effect of bacterial concentration was subsequently studied independently, using a one-hour incubation time. The results (Table 2) confirmed the fact that the bactericidal capacity of blood was greater with more concentrated bacteria.

The time of incubation between 30 minutes and two hours seemed of slight importance in determining serum bactericidal effect, although in several experiments twenty-four hour incubation resulted in marked bacterial overgrowth. The time factor was further elucidated, using fresh serum and a variety of incubation times with a 1:100,000 organism suspension (Table 3). The bactericidal action of serum was immediately detectable by this method, and was optimal within a few minutes.

It seemed possible that the blood bactericidal effect was continued after the material had been expelled onto the agar plates; i. e., the serum on the plates continued to exert a bactericidal effect. To investigate this possibility, a pipette of 1:10 blood dilution in buffer was expelled onto the surface of the plate, followed by a pipette of *E. coli* in suspension. The plate impregnated with the fresh blood dilution did not exhibit any bactericidal properties. Therefore, it was evident that bactericidal activities recorded in the experiments were due only to blood-bacterial interaction within the pipettes.

In these experiments, it was ascertained also that frequent shaking of the pipette during the incubation period did not influence the bacterial killing effect.

Effects of Heat Inactivation of Serum

Effect of heat inactivation of serum on the bactericidal activity was investigated. By heating sera at 56°C. for varying periods it was possible to demonstrate progressive loss of bactericidal activity (Table 4).

細菌濃度の影響については別に1時間培養を行なって検討した。その結果(表2),細菌濃度の高い場合の方が血液の殺菌力はより大であることが確認された。

いくつかの実験において,24時間培養で著しい細菌の発育が認められたが,30分より2時間の範囲では培養時間は血清殺菌効力の判定に殆んど重要性はないように思われた。新鮮な血清及び細菌の1:100,000浮遊液を使用して種々の培養時間についてさらに検査を行なって時間的要素を調べた(表3)。この方法で血清の殺菌作用を速やかに検出することが出来,数分間以内が最適であった。

材料を寒天培地平板上に流した後も血液殺菌作用が継続しているのではないか,即ち培地平板上の血清は引き続き殺菌効力を有する可能性があると考えられた。この可能性を検討するため,ピペットより血液と緩衝液の割合を1:10にした液を培地平板の表面上に流し,引き続いて大腸菌浮遊液をその上に流した。鮮血希釈液を入れた培地平板では殺菌性の特性は認められなかった。従って実験において記録された殺菌作用は,ピペット内の血液と細菌間の相互作用のみによるものであることが明らかであった。

検査の結果,培養中しばしば振盪することは殺菌効力に影響はないと認められた。

血清の加温不活性化の影響

熱による血清不活性化の殺菌作用に対する影響を検討した。種々異なった時間の間血清を56°Cで熱することにより殺菌作用の累進的減少を証明することが出来た(表4)。

TABLE 2 BACTERICIDAL EFFECT OF SERUM ON DIFFERENT CONCENTRATIONS OF BACTERIA
(ONE HOUR INCUBATION TIME)

表2 種々の細菌濃度に対する血清殺菌の効力 (1時間培養)

E. COLI DILUTION 大腸菌 希 釈	ESTIMATED TOTAL ORGANISMS PER PIPETTE ピペット当りの 細菌の推定総量	VIABLE ORGANISMS REMAINING 残った生菌	ORGANISMS KILLED 殺された 細菌	PER CENT ORGANISMS REMAINING VIABLE 残留生菌の%
1:10,000,000	18	7	9	39
1:1,000,000	180	21	159	12
1:100,000	1,800	131	1,670	7
1:10,000	18,000	750	11,250	4
1:1,000	180,000	2,830	177,170	1.5

TABLE 3 BACTERICIDAL EFFECTS OF SERUM AFTER DIFFERENT INCUBATION TIMES
ON A STANDARD QUANTITY OF ORGANISMS (6,000 PER PIPETTE)

表3 細菌標準量 (ピペット当り 6,000) に対する種々の培養時間経過後の血清殺菌効力

INCUBATION TIME 培養時間	COLONY COUNT 集落数算定	PER CENT VIABLE ORGANISMS 生 菌 %
0*	706	12
1 MINUTE 1分	909	15
5 MINUTES 5分	706	12
10 MINUTES 10分	432	7
30 MINUTES 30分	350	6
2 HOURS 2時間	347	6
6 HOURS 6時間	517	9
24 HOURS 24時間	9720	151

*Saline controls incubated for each of the time intervals showed insignificant changes in colony counts, except at 24 hours when there was a marked increase to approximately 25,000 organisms.

食塩水を使用した対照を各時間培養した結果、菌集落数算定に著変を認めなかった。但し24時間では細菌は約25,000に著しく増加した。

TABLE 4 EFFECT OF HEAT INACTIVATION (56° C) ON SERUM BACTERICIDAL ACTIVITY
(1:1,000,000 E. COLI DILUTION)

表4 血清殺菌作用 (大腸菌 1:1,000,000 希釈液) に対する加温 (56°C) 血清不活性化の影響

INCUBATION SUBSTANCE 培養物質	BACTERIAL COUNT PER PIPETTE ピペット当りの細菌数	% VIABLE ORGANISMS 生 菌 %
FRESH SERUM 新鮮な血清	35	9.5
SERUM, 56° C FOR 15 MINUTES 血清, 56°C 15分間	249	67
SERUM, 56° C FOR 30 MINUTES 血清, 56°C 30分間	268	73
SERUM, 56° C FOR 45 MINUTES 血清, 56°C 45分間	345	96
SERUM, 56° C FOR 60 MINUTES 血清, 56°C 60分間	322	88
BUFFERED SALINE CONTROL 緩衝食塩水対照	369	100

Comparison of Whole Blood and Serum, and Quantitative Studies of the Serum Concentrations

It seemed possible that the erythrocytes present in whole blood, through the phenomenon of "immune-adherence" of bacteria to red blood cells in the presence of complement^{14,15} might enhance or inhibit the bactericidal effects of serum. In several experiments comparing fresh whole blood and fresh serum in 1:10 dilution from the same donor, whole blood showed only slightly less bactericidal activity. The influence of serum concentration on the bactericidal activity was studied and seemed to indicate an insignificant difference over the range of serum dilutions used. From Table 5 it can be seen that a five-fold difference in the serum concentration had only a slight effect on the bactericidal activity, i.e., a 1:10 dilution killed 98 per cent of the organisms while a 1:50 dilution killed 92 per cent of the organisms in the same time period.

全血及び血清の比較並びに血清濃度の定量的検討

補体のある場合に生じる細菌の、赤血球への“免疫性付着”の現象^{14,15}によって全血中に存在する赤血球は血清の殺菌効力を増進するか又は抑制するのではないかと思われた。数回の実験において同一供血者より得た新鮮な全血1:10希釈液と新鮮な血清の1:10希釈液をそれぞれ比較した結果、全血における殺菌作用の方が僅かに低いに過ぎないことを示した。殺菌作用に対する血清濃度の影響も検討した結果、使用された血清希釈度の範囲では有意な差がないと思われた。表5より血清濃度に5倍の差があっても殺菌作用には僅かな影響しかないと分かる。即ち1:10希釈液で細菌の98%が殺されたが、1:50希釈液では同一時間中に92%が殺された。

TABLE 5 BACTERICIDAL ACTIVITY OF SERUM DILUTIONS ON A 1:100,000 E. COLI SUSPENSION (INCUBATION TIME ONE HOUR)

表5 1:100,000大腸菌浮遊液に対する血清希釈液の殺菌作用(培養時間1時間)

SERUM DILUTION 血清希釈液	VIABLE ORGANISMS REMAINING 残った生菌	PER CENT REMAINING 残留菌の%
BUFFERED SALINE 緩衝食塩	4,360	100
1:50	338	8
1:40	180	4
1:30	168	4
1:20	92	2
1:10	103	2

STUDIES OF BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY IN RADIATION-EXPOSED AND NONEXPOSED POPULATIONS

The experiments in methodology confirmed the feasibility of establishing a simple method suitable for epidemiologic surveys of blood bactericidal activity. At the same time the preliminary studies indicated

被曝者及び非被曝者人口における血液殺菌作用の検討

検査法に関する実験より、血液殺菌作用の疫学的調査に適した簡単な方法を決定することの可能なることを確認した。同時に予備的研究の結果細菌濃度には変動があり、又血清濃度を大きく変

that variations in the concentration of bacteria and the relatively small changes in bactericidal activity related to large changes in serum concentration would make this an insensitive assay. Indeed, it seemed likely that only virtual absence of blood bactericidal substances would be detected by this method.

Nevertheless, it was decided to use the method in the study of an adult population of atomic bomb survivors and control subjects being examined routinely in the Hiroshima Clinic of ABCC as part of the Adult Health Study. The population consisted of four groups, equally matched as to sex and age, and being seen in random manner in the clinic. Two groups of exposed subjects (groups 1 and 2) and two groups who serve as intrinsic and extrinsic controls comprised the population of the Adult Health Study. Group 1 consisted of the individuals receiving the highest radiation dose who were exposed within 2000 meters of the hypocenter (ground zero) and experienced major acute radiation symptoms in 1945. Group 2 subjects were also exposed within 2000 meters of the hypocenter, but did not have acute radiation symptoms and received smaller radiation doses. The intrinsic controls, group 3, were exposed beyond the area of irradiation but experienced much of the physical damage and economic disruption consequent to the bombing. Group 4 were nonexposed migrants who entered the destroyed city to establish residence after the bombing.

Method of study consisted of preparing a 1:10 dilution of blood obtained from venipuncture at the time of routine examination. A drop of blood from the syringe was placed on a sterile glass slide, and immediate dilution was performed in sterile white cell pipettes with a well-mixed 1:100,000 dilution in buffered saline of an eighteen-hour *E. coli* broth culture kept in the clinic in an ice-water bath. Pipettes were incubated at room temperature for one hour, the contents expelled onto the surface of nutrient agar plates, and colony counts performed after twenty-four hour incubation at 37° C. Approximately ten

えても殺菌作用の変化は比較的小さいと認められたのでこの検査の感受性は低いものであろうと考えられる。実際に、血液殺菌性物質が殆んど欠如した場合のみがこの検査法により恐らく探知されるだろうと思われた。

成人健康調査の一環として広島A B C Cで通常診察を受けている被爆生存者及び非被爆対照例の成人人口集団の調査にこの検査を用いることにした。この母集団は、性及び年齢構成が一致している4つの群よりなり、任意抽出によって診察を行なっている。この4つの群とは被爆者よりなる2つの群（第1群及び第2群）及び内部的と外部的対照例よりなる2つの群で、成人健康調査の母集団を構成する。第1群は最高の放射線量を受け爆心地（零地点）より2000m未滿で被爆し、1945年に主要急性放射能性症状の罹病体験を持つ人々よりなる。第2群も爆心地より2000m未滿で被爆したが、放射能性症状はなく、より少量の放射線量を受けた。内部的対照である第3群は、放射線有効範囲外で被爆したが、爆撃のため多くの身体上の外傷及び経済的な打撃を受けた。第4群は爆撃後破壊された都市に転入した非被爆者である。

調査方法としては、通常検査の際、静脈穿刺によって採取した血液の1:10希釈液を用いた。注射器より1滴の血液を無菌ガラススライドの上に乗せ、検査室で氷水中に保存されている18時間培養大腸菌の緩衝食塩水1:100,000希釈液を用いて、無菌白血球用ピペット内で即刻希釈を行なった。ピペットは室温で1時間培養して内容を寒天培地平板上に落した。次に37°Cで24時間培養後集落数算定を行なった。毎朝任意に選出した約10名の受診者につき調査した。生菌総数を決定するため白血球用ピペットに1:100,000希釈液を採

randomly selected clinic patients were studied each morning. The total viable bacteria was determined daily by the count of the 1:100,000 dilution in a white cell pipette, and the stability of the suspensions checked by obtaining such counts at the beginning and at the end of the daily work. The two control counts did not vary greatly, and the mean was used for daily computation of the number of bacteria present.

RESULTS

Bactericidal blood activity was assayed on a total of 152 subjects examined in groups of five to thirteen daily during a seventeen-day period. Examination of the daily results revealed a marked fluctuation in the range of bactericidal activity observed on different days. However, relatively small differences were noted within groups of subjects examined on the same day. On some days only 3 to 5 per cent of the bacteria remained viable, while on other days ten times as many were viable. The explanation of these daily fluctuations was not definitely established but in general seemed related to the quantity of bacteria present (Table 2).

For age-sex-exposure analysis, data was selected from 88 subjects studied on nine separate days. On those days the quantity of bacteria in the 1:100,000 dilution was relatively high (5,000-15,000) and the percentage of viable organisms was relatively low (less than 10 per cent) after bactericidal blood activity exposure. Even with this selection of data for analysis, the heterogeneity of the data obtained on individual days was statistically significant. However, because the selection of patients for age, sex, and radiation exposure group was purely random, it seemed appropriate to examine these variables in the 88 subjects. The composition of the sample is shown in Table 6. This sample group was approximately equal in number as to exposure status: group 1, 25; group 2, 16; group 3, 28; and group 4, 19.

って毎日計算した。日課の開始及び終了時にこのような計算を行なって浮遊液の安定性を毎日調べた。この2つの対照の計算値の間には著しい相違はなく、その平均値をその日の細菌数として計算に用いた。

結果

17日間にわたって毎日5—13名ずつ総計152例につき血液殺菌作用の検査を行なった。日々の検査の結果を検討すれば、殺菌作用の範囲に著しい日変動を認めたが、同一日に検査した例の間では差異は比較的小さい。或る日には細菌の3—5%のみが残り、別の日には10倍もたくさんの細菌が残った。この日変動の原因は明確に立証されなかったが、全般的に細菌数と関係があると思われた(表2)。

9日間にわたって検査された88例の資料について、年齢、性及び被爆状態に関する解析を行なった。これらの検査日では、1:100,000希釈液中の細菌数は比較的多く(5,000—15,000)、血液殺菌作用を受けた後の残留生菌の百分率は比較的低かった(10%以下)。解析のためにこのような資料を選択してさえも、各検査日の資料には統計学的に有意な差がある。しかし年齢、性及び被爆分類群に関して患者の選出は全く任意であったので、上述88例についてこれらの変数を検討することは適当であると思われた。サンプルの構成は表6に示す。各群は被爆状態別に人数はほぼ相等しかった。即ち第1群25名、第2群16名、第3群28名、第4群19名。

TABLE 6 SAMPLE USED FOR ANALYSIS OF BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY BY AGE AND SEX

表6 血液殺菌作用の解析に用いられたサンプルの年齢別及び性別構成

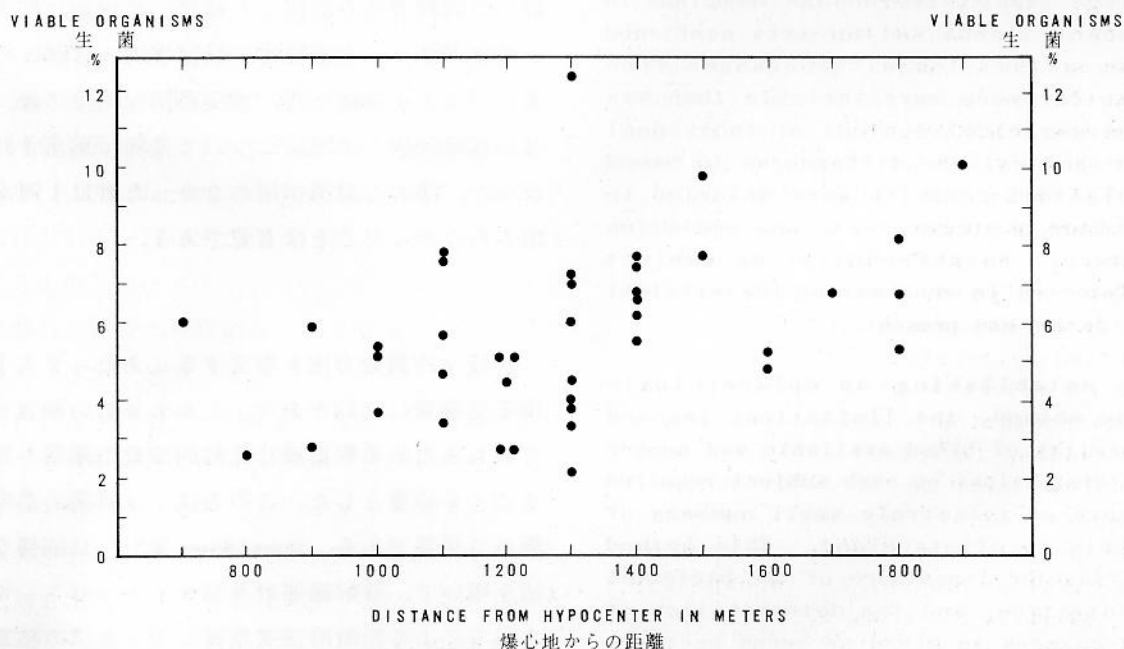
SEX 性別	AGE IN YEARS 満年齢						TOTAL 計
	10-19	20-29	30-39	40-49	50-59	60-OVER 以上	
MALE 男性	0	3	6	3	7	9	28
FEMALE 女性	4	7	19	13	13	4	60
TOTAL 計	4	10	25	16	20	13	88

No statistical difference was noted in bactericidal power of blood in relationship to age in the entire sample. Sex variation was similarly negative, with mean values of 5.7 and 5.6 per cent viable organisms remaining for males and females, respectively. In relationship to radiation exposure, no differences were noted in mean bactericidal values for each of the four exposure categories. The 41 exposed subjects in groups 1 and 2 were examined more closely for possible correlation of blood bactericidal activity with exposure distance. The data are depicted individually in Figure 1, and the correlation was not statistically significant ($P = .60-.30$). In all of these tests, however, the inconsistencies in the methods and the small number of observations hardly will permit completely valid negative conclusions.

全サンプルにおいて、血液の殺菌力と年齢との関係について統計学的に有意な差は認められなかった。男性及び女性の残留生菌の平均値は各々5.7及び5.6%で性による差異も同じく認められなかった。被爆状態に関しては、4つの被爆分類群の間には殺菌平均値に差異は認められなかった。さらに第1及び第2群の被爆者41例について、血液殺菌作用と被爆距離との間に相関関係があるかどうかを厳密に検討した。資料は図1に個々別々に示したが統計学的に有意な関係はなかった($P = .60-.30$)。しかしこれら検査のいずれにおいても検査方法に変動があり、少数例のみの観察が行なわれているので十分信頼できる否定的な結論は殆んどできない。

FIGURE 1 BLOOD BACTERICIDAL ACTIVITY, 41 EXPOSED SUBJECTS BY DISTANCE FROM HYPOCENTER

図1 被爆者41例について血液殺菌作用と被爆距離との間の相関関係



DISCUSSION

In this study an attempt was made to evaluate the phenomenon of blood bactericidal activity for *E. coli* by simple methods applicable to population epidemiologic surveys.

A variety of studies to evaluate the method revealed that results varied markedly depending on the method employed. Particularly, it was shown that the concentration of bacteria was of greater importance than the quantity of blood; as was previously discussed (Table 2) very small numbers of bacteria in dilute suspension were relatively impervious to blood bactericidal action.

It seems reasonable to assume, because agglutination could not take place in very dilute bacterial suspensions, the organisms are in same way protected from destruction that would have occurred with the same quantity of blood exposed to the heavier bacterial concentrations.

Preliminary investigations of the methods suggested that the technical aspects alone would preclude a test of bactericidal activity that would detect small differences between individual subjects. Application of the technique to a group of irradiated subjects confirmed the fact that technical changes from day to day were more variable than was the bactericidal content of individual blood samples. No differences in blood bactericidal activity were detected in relationship to age, sex, and radiation exposure. Significantly, no subject was detected in whom strong bactericidal activity was not present.

In establishing an epidemiologic survey method, the limitations imposed by quantity of blood available and number of determinations on each subject required exposure of relatively small numbers of bacteria to dilute blood. This method magnifies the importance of the bacterial concentration, and for determination of small changes in blood or serum bacteri-

考 察

本研究では人口集団の疫学的調査に応用できる簡単な方法によって大腸菌に対する血液殺菌作用の現象を評価すべく試みた。

この検査法の評価について種々の研究を行なったところ、用いられた方法によって検査結果に著しい差異があることが分った。特に細菌の濃度は血液量よりも遥かに重要であった。上に述べたように(表2)希釈浮遊液中の細菌が極めて少数である場合、血液の殺菌作用は比較的弱い。

極めて希釈度の高い細菌浮遊液で凝集反応が発生し得なかった故、同量の血液をもっと高濃度の細菌に接した場合に発生したであろう破壊より細菌が保護されていると仮定することは妥当であると思われる。

検査方法の予備的検討では、技術的にみて個々の被爆者間の小さい差異を発見できる殺菌作用の検査は不可能であろうと思われた。原爆被爆者群にこの検査法を応用した結果、技術面に関する日変動が個々の血液標本の殺菌能力の変動よりも著しいことを確認した。血液殺菌作用は年齢、性及び被爆状態との関係について差異は見出されなかった。強力な殺菌作用のなかった者は1例も見出されなかったことは有意である。

疫学的調査方法を樹立するにあたって入手し得る血液量に制約があり、しかも多数の検査が行なわれるため希釈血液に比較的少数の細菌を加えることを必要とした。この方法では細菌の濃度が極めて重要である。Donaldson等^{16,17}は同様な方法を用いて、放射線照射及びナイトロゼンマスタードによる急激療法実施後に兎の血清の枯草菌

cidal levels it would seem more desirable to use large numbers of bacteria in concentrated blood or serum, although Donaldson et al.,^{16,17} using similar methods, were able to demonstrate differences in *B. subtilis* bactericidal activity of rabbit serum following acute treatment with irradiation and nitrogen mustard.

The different techniques used by each investigator of bactericidal activity make it difficult to draw absolute conclusions as to the nature of this phenomenon. However, most studies support the importance of a heat-stable protein, probably an antibody. Particularly, the study of Dancis and Kunz⁸ on newborn and premature infants supports the importance of this stable antibody, first by passive transfer from the mother and later by active production by the infant. In these studies heat-labile complement seemed adequate in the infants. As regards the heat-labile component, the recent study of Osawa and Muschel⁴ supports the concept that complement, not properdin, is the important heat-labile factor. Donaldson and Marcus¹⁷ also were able to correlate fall in complement level with loss of serum bactericidal activity in irradiated rabbits.

The marked bactericidal effects observed *in vitro*, and the constancy of this activity in sera from normal subjects in this study as well as in the observations of Roantree and Rantz,¹² certainly suggest that blood bactericidal activity has some important *in vivo* protective action against bacterial invasion. The latter authors suggest that the blood bactericidal activity is important in prevention of invasion of the bloodstream by enteric micro-organisms, and that this mechanism rarely breaks down. Further study of the correlations between stable anti-bacterial antibody, complement level, blood bactericidal activity, and enteric bacteremia in seriously and chronically ill patients may help to clarify the clinical importance of a system that acts so dramatically *in vitro*.

に対する殺菌作用は差異を証明することが出来たが、血液又は血清の殺菌力の小さい変化の測定には高濃度の血液又は血清と多数の細菌を使用することがもっと望ましいように思われた。

殺菌作用の諸研究で用いられた検査法が異なるため、この現象の性質につき絶対的な結論を下すことは困難である。しかし研究の大部分は恐らく抗体と思われる耐熱性蛋白の重要性を示している。特に新生児及び未熟児についての Dancis 及び Kunz⁸ の研究は、最初母親より受動的に与えられ、後には乳幼児によって能動的に産出されるこの耐熱性抗体の重要性を示している。これらの研究では、非耐熱性補体は乳幼児には十分であるように思われた。非耐熱性要素に関しては Osawa 及び Muschel⁴ の最近の研究は、プロパージンではなく、補体が重要な非耐熱性要素であるという意見を支持する。Donaldson 及び Marcus¹⁷ も、放射線照射を受けた兎では、血清殺菌作用の減少と補体の下降との相関を認めている。

本研究において、試験管内にて観察された著しい殺菌効果及び正常者より採取した血清に例外なくこの作用を認めたこと、又 Roantree 及び Rantz¹² の観察結果によっても、血液殺菌作用が細菌感染に対して何か重要な体内保護活動をなすものであることを確かに示唆する。後者の研究では、血液殺菌作用が腸内微生物の血流への浸入防止に重要であること、及びこの機構が狂うことはまれであることを示唆する。重篤かつ慢性的疾患を有する患者について耐熱性抗菌性抗体、補体値、血液殺菌作用及び腸菌血症の相関関係に関して、なお一層の研究を行なえば、試験管内で非常に劇的な作用を示すこの系統の臨床的重要性を解明するに役立つであろう。

SUMMARY

A simple screening method for blood bactericidal activity was developed for study of irradiated atomic bomb survivors and nonirradiated subjects in Hiroshima. Blood bactericidal activity was found to be a relatively constant biological phenomenon in all subjects studied. No differences in activity were detected in relationship to radiation exposure in 1945.

総 括

血液殺菌作用に関する簡単な探知検査法が、広島における原爆被爆生存者及び非被爆例の研究のために考案された。検討された全例において、血液殺菌作用は比較的一定した生物学的現象であることが判明した。1945年の放射能被爆との関係について調べたが、作用には差異は何も見出されなかった。

REFERENCES

参考文献

1. Nuttall, G.: Experimente über die bacterienfeindlichen Einflüsse des thierischen Körpers. *Z. Hyg. Infectiouskr* 4:353, 1888.
(感染性疾患の衛生)
2. Wilson, G. S. and Miles, A. A.: The natural antibodies: Their nature, origin and behaviour, Topley & Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity. 4th Ed. Baltimore, Williams & Wilkins Co., 1955, Vol. 2, pp. 1223-1252.
(自然抗体: 抗体の性状, 起源及び行動)
3. Pillemer, L., Blum, L., Lepow, I. H., Ross, O. A., Todd, E. W., and 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* 120:279-285, 1954.
(プロパージン系及び免疫: I. 新しい血清蛋白, プロパージンの立証及び分離, 並びに免疫現象におけるその役割)
4. Osawa, E., and Muschel, L. H.: The bactericidal action of normal serum and the properdin system. *J. Immunol.* 84:203-212, 1960.
(正常血清の殺菌作用及びプロパージン系)
5. Spink, W. W., Agnew, S., Mickelsen, O., and Dahl, L.: Ascorbic acid and immunity. III. The effect of ascorbic acid upon the bactericidal action of human blood. *J. Immunol.* 44:303-308, 1942.
(アスコルビン酸及び免疫性: III. 人間の血液の殺菌作用に対するアスコルビン酸の影響)
6. Jacox, R. F.: The activating effect of calcium on a bactericidal substance for bacillus subtilis in human serum. *J. Exper. Med.* 92:101-111, 1950.
(人間血清中の枯草菌に対する殺菌物質に対するカルシウムの賦活効果)
7. Gordon, J. and Hall, R. A.: The sensitivity of glycine-resistant organisms to the bactericidal action of serum. *J. Path. & Bact.* 62:274-277, 1950.
(血清の殺菌作用に対するグリシン抵抗性微生物の感受性)
8. Dancis, J. and Kunz, H. W.: Studies of the immunology of the newborn infant. VI. Bacteriostatic and complement activity of the serum. *Pediatrics* 13:339-345, 1954.
(新生児の免疫学の研究. VI. 血清の細菌発育阻止性及び補体作用)

9. Myrvik, Q. N. and Weiser, R. S.: Studies on antibacterial factors in mammalian tissues and fluids. I. A serum bactericidin for bacillus subtilis. *J. Immunol.* 74:9-16, 1955.
(哺乳類の組織及び体液における抗菌性素因の研究. I. 枯草菌に対する血清殺菌素)
10. Stanziale, W. G.: In vitro bactericidal activity of blood for Pasteurella tularensis. *J. Immunol.* 78:156-159, 1957.
(試験管内における野兎病菌についての血液の殺菌作用)
11. Wardlaw, A. C.: Observations on the increase in serum bactericidal activity in the presence of clinical dextran. *Brit. J. Exper. Path.* 38:601-610, 1957.
(臨床上デキストランの存在する場合の血清殺菌作用増加の観察)
12. Roantree, R. J. and Rantz, L. A.: A study of the relationship of the normal bactericidal activity of human serum to bacterial infection. *J. Clin. Invest.* 39:72-81, 1960.
(細菌性感染と人間血清の正常殺菌性作用との関係の研究)
13. Wedgwood, R. J.: Immunity, infection, and properdin. *Arch. Int. Med.* 104:497-505, 1959.
(免疫, 感染及びプロパージン)
14. Davis, B. D. and Mingioli, E. S.: Mutants of Eecherichia coli requiring methionine or vitamin B₁₂. *J. Bact.* 60:17-28, 1950.
(ミチオニン又はビタミンB₁₂を必要とする大腸菌の突然変異体)
15. Nelson, R. A. Jr.: The immune-adherence phenomenon: immunologically specific reaction between microorganisms and erythrocytes leading to enhanced phagocytosis. *Science* 118:733-737, 1953.
(免疫-付着現象)
16. Donaldson, D. M. and Marcus, S.: Serological aspects of the suppression of normal bactericidal action of rabbit serum following whole body x-irradiation. *J. Immunol.* 72:203-208, 1954.
(全身X線照射後の兎血清の正常殺菌作用抑制の血清学的様相)
17. Donaldson, D. M. and Miller, M. L.: Depression on normal serum bactericidal activity by nitrogen mustard. *J. Immunol.* 82:69-74, 1959.
(ナイトロゼンマスタードによる正常血清殺菌作用の低下)