

## 日本脳炎の診断学的研究：硫酸銅反応法に依る診断に就いて

赤司, 景  
九州大学農学部

<https://doi.org/10.15017/21185>

---

出版情報：九州大学農学部学藝雑誌. 12 (4), pp.399-404, 1952-09. 九州大学農学部  
バージョン：  
権利関係：



# 日本脳炎の診断学的研究 (第1報)

## 硫酸銅反応法に依る診断に就いて

赤 司 景

### Diagnostic studies of Japanese Encephalitis (1)

#### Colour changes of the copper-sulphate reaction method in the serum of horses and man

Akira Akashi

#### 1. 緒 言

馬の流行性脳炎は1947年夏と1948年夏に猛威を逞うしたが、殊に1948年夏には人に於ても従来の記録を破る大発生となり、人畜に大恐慌を与へたことは人の耳目に新たなるところである。

之等の大流行を契機として、過去4ケ年間医学獣医学両方面から本病の研究が盛んに行われた。著者も亦研究の重要性を認め1944年の夏以来その早期診断法の考案に努力を重ねて来た。

人畜いづれに就いてもその早期診断は大切であり、その病気の真疑の判定に徒らに時日を費して居ては予防治療の時期を失することになる。

本病の診断に関しては石井、<sup>1)</sup>木全<sup>2)</sup>は血液検査により、米村は血液分析に基き、又川島は免疫学的に、特に補体結合反応により抗体出現の時期に診断し得ることを提唱した。併し、之等の診断法は時間的経過を必要とし、特に補体結合反応は抗体の出現が陰性期3—7日間後にある為に即時に診断することの出来ない憾みがある。

著者は血液を利用して迅速簡易に診断する方法の案出に努力した。

硫酸銅反応法は硫酸銅と苛性加里とを試薬とするものであり、蛋白質及びポリペプチド検出法たるビウレット反応と還元性糖類検出たるトロンメル反応とを併用したと見るべきで、このトロンメル反応は蛋白質の存在に依つて妨げられる。

蛋白質と還元糖との種々の割合に応じて複雑な反応を生じ、夫々異つた銅の錯塩を生じ著しい色の變化を生ずる。その色調の變化は太陽スペクトルの色調配置と同じように規則正しく配列される。

流行性脳炎馬の血清に就いては、米村<sup>3)</sup>は罹病後期には總蛋白質、グロブリン、アルブミンの増加があると報告して居り、又血糖は罹病後期には減少し、或一定量で減少は止つていと述べている。故に蛋白の量的變化、糖の量的變化に依る本硫酸銅反応法の利用可能が想像される。依つて著者は流行性脳炎早期診断に硫酸銅反応法の応用を企図し、所期の結果を得たのでここに簡単に報告することにした。

## 2. 人の全血清の呈色反応

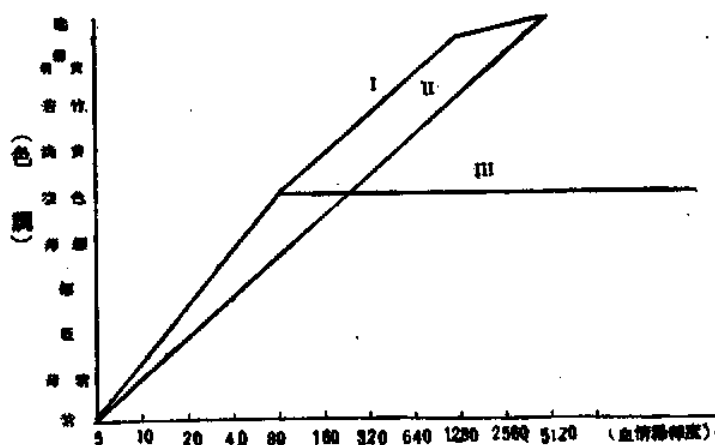
日本脳炎の患者血清は山口県下に発生したもから得たのであるが、之等の患者血清は補体結合反応に依つて日本脳炎の眞性疑似の判定が行われている。従つて、下表の(一)とあるのは日本脳炎患者ではなく、他の熱性患者と認められたものであり、(±)は疑似と判定されたものである。(+)はもとより眞症のものである。

第1表. 人の全血清の呈色反応.

健病別	患者及び月名採日	補合反 結成	各稀釈度に於ける呈色反応										
			1:5	1:10	1:20	1:40	1:80	1:160	1:320	1:640	1:1,280	1:2,560	1:5,120
健	○可某 23. 9.15. 113		紫	薄紫	薄紫	靑	靑	空色	空色	若竹	若竹	若竹	靑
	24. 3.10. 112		紫	紫	藍	空色	空色	空色	若竹	若竹	若竹	若竹	
	24. 3.10. 106		紫	紫	靑	薄靑	薄靑	空色	淺黄	若竹	若竹	靑 弱黄	
	24. 3.10. 130		紫	藍	薄靑	空色	空色	空色	若竹	靑 弱黄	靑	靑	
	24. 3.10.		紫	紫	藍	薄靑	薄靑	空色	若竹	若竹	若竹	水淺黄	
	24. 3.10.		紫	紫	藍	薄靑	薄靑	空色	若竹	若竹	若竹	水淺黄	
病	富某 23. 9.15.	-	紫	薄紫	空色	空色	若竹	空色	若竹	若竹	靑	靑	靑
	○野某 23. 9.15.	-	紫	薄紫	空色	空色	靑	靑	靑	靑	靑	靑	靑
	○田某 23. 9.28.	-	紫	空色	空色	空色	空色	空色	靑	空色	空色	空色	靑
	茂○某 24.11. 4.	-	紫	薄紫	薄紫	空色	空色	空色	空色	空色	靑	靑	靑
	清○某 23. 9.15.	±	紫	薄紫	空色	空色	空色	若竹	若竹	若竹	靑	靑	靑
	島○某 23. 9.28.	±	紫	薄紫	空色	空色	空色	若竹	若竹	若竹	靑	靑	靑
	沖○某 23. 9.28.	±	紫	薄紫	靑色	靑色	空色	水色	水色	靑	靑	靑	靑
	○井某 23. 9.28.	±	紫	空色	空色	空色	空色	空色	空色	水色	水色	水色	靑
	中○某 23. 9.28.	++	紫	薄紫	空色	空色	空色	空色	空色	空色	空色	空色	空色
	m 23. 9.28.	++	紫	薄紫	靑	薄靑	空色	空色	空色	空色	空色	空色	空色
	国○某 23. 9.18.	++	紫	靑色	靑色	空色	空色	空色	空色	空色	水色	水色	水色

この第1表の結果をわかり易くするためにグラフ的に表示すると、第1図に掲げたようになる。併し各例ともその結果は全く同一とは認め難いので平均的に大体の傾向を示すことにした。

第1表並びに第1図から見ると、健康なものと補体結合反応(-) (±)のものとは多少の差異はあるが、大体その傾向は似ている。それと(+)のものとは著しく傾向を異にしていて1:40乃至1:80以上の稀釈度では(+)のものはすべて空色を呈する。



第1図. 全血清に於ける呈色反応.

I→補体結合反応 ± 又は - II→健康 III→補体結合反応 ++

## 3. 馬の全血清の呈色反応

家畜衛生研究所から分譲された馬血清 66 例に就いて、之を倍数稀釈してその呈色反応を検したが人の血清の場合のような明確な差異を認めることが出来なかつた。又試薬を加えた場合の振盪攪拌の程度や温度などに依る成績が変動し判定にも誤りを生ずる場合が起るので、本実験では稀釈度を 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 の程度に止め、且色調の安定と時間の短縮の爲加温することにした。可検血清を生理的食塩水で稀釈し、之に等量の一規定苛性ソーダを加え、重湯煎で1分間加温し、直ちに 0.5% 硫酸銅液を加え、更に重湯煎で 3~5分加温した。

第2表. 馬全血清の呈色反応.

稀 釈 度	呈 色 反 応		備 考
	健康馬血清	病馬血清	
1 : 5	濃 色	紫 色	判定の能であるが少しく濃厚すぎる傾あり
1 : 10	桜 色	藤 色	色調が明澄で判別し易い
1 : 20	桜 色	藤 色	同上
1 : 40	柿 色	肉 色	判定可能であるが少しく薄過ぎる傾あり

註. 病馬血清は接種後 3日 5日 8日のものを使い且その色調が最も明澄で判別に都合のよいことが分つた。夫以下の稀釈度では色調が余りに濃過ぎて判定に不便なことも分つたようである。

それで 1:10, 1:20 の稀釈度に於て桜色から藤色までの色調の呈色程度を実験したが、第3表の様な結果を得た。数字の多い程夫々明確な桜色 (+) 及び藤色 (-) を示す。

第 3 表. 馬血清の 1:10, 1:20 の稀釈度に於ける呈色反応

試料 番 号	呈色反応に於ける色調の明確度						備 考	
	接種前 (健)	接種後 3 日	接種後 4 日	接種後 5 日	接種後 6 日	接種後 7 日		接種後 10 日
No. 7	4		-4					斃死は接種後12日
No. 8	3		-2					〃 〃 10日
No. 9	3		1					〃 〃 12日
No. 10	4	-2		-2				〃 〃 6日
No. 11	2~4	2		-3				〃 〃 10日
No. 12	3~4	-2		-3		-4		〃 〃 8日
No. 13	3~4	-2			-4			〃 〃 12日
No. 16	4	-3			-3		-4	〃 〃 11日
No. 17	1~3	2			-3		-3	〃 〃 13日
No. 20	2	1			1			〃 〃 9日
No. 19	3	1			1		1	〃 〃 11日

第3表から見ると、接種後日浅く3日のもものでは、試料 No. 11, No. 17 に於ては、健病の診断が困難であり、No. 19, No. 20 では、接種後6日を経ても色調が稍々桜色に傾いている。之は何等かの原因で血清成分の異常があるものと考えられるが、大体の傾向は各試料を通じて健病両血清の間に色調の差異がある。

病馬血清の呈色反応が桜色に傾いて健康馬血清との判別が困難になることは、診断に慣れぬ一般人の利用には面白くないので、蛋白質の少量添加によつて、色調の移動を行つと判別が容易になることを利用し、種々基礎実験を行つた。その結果 10% のペプトン水を 0.095~0.1 cc 添加するのが都合の良いことが判つた。即ち血清 0.05 cc に 10% ペプトン水 0.095~0.1 cc (0.1 cc が比較的良好) を加え、蒸溜水 0.5 cc を注加し、1規定苛性ソーダを 0.8 cc 加えて重湯煎で1分間加温し、直ちに 0.5% 硫酸銅液 1 cc を加えて、更に 3~5 分間重湯煎で加温すれば、その色調は安定的であり、且つ明確に健病両者を判別し得る(尙腐敗或は溶血を起した結果が良くない。脳脊髄液は血清よりは反応が一層明瞭である)。

#### 4. 馬血清の蛋白分層の呈色反応

米村の血液分析結果によると、脳炎馬血清では前、中期にはアルブミン、総蛋白の血糖は何れも減少するが、グロブリンは増加すると云ふ事である。而してグロブリン分層を用いると最も硫酸銅反応が明瞭に出ることが想像される。家畜衛生研究所の好意により分与を受けた脳炎馬血清約 30 例に於ける概要は次の通りである。

それで、グロブリン血清分層又は血清 0.05 cc を 10 倍に稀釈し、1規定苛性ソーダ液を等量加え、重湯煎で7分間加温し、0.5% 硫酸銅液を倍量加えて、更に重湯煎で1分間加温した。全血清は非動性にしたものも、せぬものもいづれも 10% ペプトン水 0.1 cc を加えた。その結果は次の通りである。

第4表. 全血清及び血清分層の呈色反応.

血 清 別	呈 色 反 応			
	接種前(健康)	接種後2日	接種後5日	接種後10日
グロブリン分層	薄茶褐	紫	薄紫	薄紫
アルブミン分層	青白濁	黄	黄褐	黄茶褐
全血清(非動性にしたもの)	薄茶褐	赤紫	紫	紫
全血清(非動性にしないもの)	薄茶	赤褐	紫	紫

第4表から見ると、グロブリン分層と非動性にした血清に於て最もよく、健病両者を判別し得ることが分る。アルブミン分層では判別は稍々困難である。

### 5. 総括及び摘要

日本脳炎の血清に於ける硫酸銅反応法の応用は、全血清、グロブリン血清、アルブミン血清にては、全血清、グロブリン血清共に明瞭に健病の差を表わしアルブミン血清は明瞭でない。その診断法は

全血清→非動性にした血清 0.05 cc をとり、10% ペプトン水を 0.1 cc 添加し蒸留水で10倍にし、1N 苛性ソーダを 0.8 cc 添加後重湯煎にて1分煮沸し、後 1cc の 0.5% 硫酸銅液を注加し再び重湯煎 3~5分にて判定〔日本脳炎は(紫色—黄色)健康及び疑似は茶褐色〕。

グロブリン血清→グロブリン血清 0.05 cc を蒸留水で 10 倍にして、1N 苛性ソーダを 0.8 cc 添加後重湯煎にて 1 分煮沸し後 1cc の 0.5% 硫酸銅液を注加し再び重湯煎 1~3 分にて判定〔日本脳炎は紫色—黄色、健康及び疑似は茶褐色〕。

尙脳脊髄液を用うれば一層明瞭になると思われるが之については今後の研究にまつ。

### 文 献

- 1) 石井 進：家畜衛生研究所報告, 22, 57~63 (1950).
- 2) 木全春生：日本脳炎の研究 (1949).
- 3) 米村寿男：家畜衛生研究所報告, 22, 85~107 (1950).
- 4) 川島秀雄：同上, 22, 41 (1950).
- 5) 日野 巖：硫酸銅法に依る植物グアイラス診断, 教育農芸, 12, 29~34 (1943).

撰筆するに当り主任教授加藤嘉太郎教授に敬意を表し本研究に御指導御校閲を賜つた家畜衛生試験場石井研究部長、山口大学日野巖教授及び東大越智勇一教授に深甚なる謝意を表する次第である。

**R é s u m é**

In this study the author found that the copper-sulphate reaction serves to the diagnosis of Japanese Encephalitis. But a little difficulty is often observed because of the existence of albumin in serum. For the diagnosis of Encephalitis, globuline serum is better. The whole serum, in which 0.1 cc of 10 % pepton fluid is added, must be inactivated. The method is as follows: Dilute the material (0.05 cc) 1:10 with distilled water, and heat it in the water-bath for 1 minute after adding 0.5 cc of 1 N caustic sodium, and then add to it 1 cc of 0.5 % copper-sulphate solution in distilled water. In the case of the globuline serum, it must be heated again in the water-bath for 1 minute, while in the whole serum 3 minutes. Then the healthy serum shows orange-red or yellow-brown in colour, but the diseased serum changes violet.