

## 8 発熱性物質の検出に関する研究

### (第一報) T B P 反応の再検討

北海道立衛生研究所 (所長 中村 豊)  
薬学科長 岩本 多喜男

発熱性物質の本態やその検出法については、既に多くの報告があるが、今回はその検出法の一つである T B P 反応に再検討を加え、その方法の改良、確認限界、人体発熱との関係、市販注射液の試験等につき実験を行つたので報告する。

T B P 反応 (Tetrabrom-phenolphthalein-ethyl-ester を用いて行ふ蛋白反応——以下 T B P 反応と省略) の原法は Feigl<sup>1)</sup> によつて発見され、本邦では石館、坂口<sup>2)</sup> によつて再確認されたが、その後この方法が小林、浦口<sup>3)</sup> によつて改良されている。

先ず T B P の変色限界は PH4.5~5.5 であるが、これが蛋白の存在により、ずれを生ずることを利用したのが T B P 反応の本態である。

この事実を改めて再確認しようとした実験結果は第 1 図の通りであるが、この変色限界のずれが予想より小さく且つ検体の PH の相違で大なる変化を受けるので、先ず検体の PH 調節という事が重要になつてくる。検体の含有蛋白量が大きければ勿論ずれも大きくなるが、市販注射液中の蛋白は、若し存在しても極めて微量であるから、この検出に際しては、液性を変色限界のずれが最も大なる PH に調節せねばならない。液性は PH5.0~5.5 が適當である。

次に検体の量の問題であるが、原法では検体 1 滴 (約 0.05cc) をとり点滴反応を行つている。この方法では満足な結果が得られないので、その後の改良により検体量を 0.5cc~2.0cc に増加しているが、私の実験でも、やはり 2cc を使用した方が良好な結果が得られた。

即ち点滴反応で肉眼で判定するよりも 2cc をとつて比色計で比色する方が、はるかに正確であつた。

次に検体を濃縮して判定する方法は勿論確認度は増大するが、実際問題として原液が反応陰性であり濃縮して反応陽性となるものを人体実験で施行しても発熱を起さなかつた。従つてこの濃縮の問題はあまり重要視するに及ばないと思われる。

市販アンプルの抽出試験では第 9 表に示すように、その成績は極めて良好であつたが、一部戦時中の製品に T B P 反応強陽性であり、人体発熱も顕著なものが見られた。

又同一製品番号、同一包装のものから 1~2 本のアンプルを抽出して試験した結果を他の残部のアンプルにも適用し得るかの問題は、実験の結果は殆ど 100% の確率であつた。

最も問題となる点は、T B P 反応陽性のは必ず人体発熱を起すか否かであるが、私の実験で

は一例の例外（ザルソブロカ糖注で PH5.0 で吸光係数0.5のものが人体発熱を起さなかつた）があつた。この例外の場合、蛋白質量をゲラチンとして換算すると20r/ccの場合は人体発熱は見られぬことになる。

以上から結論として次のことが言える。

検体の PH を5.0~5.5とし、検体 2cc に T B P 液 1 滴を加え、

- 1) 肉眼で見て黄色に止る場合
- 2) 吸光係数0.15以下の場合（フィルター No.610）

反応陰性と判定する。

この限界をこえた場合は一応蛋白含有を予想し、検体を大量にして再検討する。然し前述のザルソブロカ糖の場合は塩類誤差を考慮する必要があり、これについては後日再検討したいと考える。

## 實 験 の 部

### 1. T B P の変色限域

PH 3.8~6.6の蒸溜水 7 種をつくり、この10ccに Tetrabromphenolphthalein-äthylester-kalium の0.1%アルコール溶液（以下 T B P 液と略す）0.1ccを加え、光電比色計により吸光係数を測定した（フィルターNo.610）。

第 1 表

番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調	番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調
1	3.8	0.03	黄	5	5.4	0.20	緑
2	4.2	0.07	黄	6	6.0	0.48	青
3	4.6	0.12	黄	7	6.6	0.56	青
4	5.0	0.15	黄緑				

### 2. 各種濃度のゲラチン溶液の変色

0.0024%, 0.0049%, 0.01%の三種のゲラチン水溶液をつくり PH を1.と同様に3.8~6.6に変化せしめて各 7 種をつくり吸光係数を測定した（フィルターNo.610）。

#### a. 0.0024%の場合

第 2 表

番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調	番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調
1	3.8	0.10	黄	5	5.4	0.37	青
2	4.2	0.13	黄	6	6.0	0.50	青
3	4.6	0.15	黄緑	7	6.6	0.57	青
4	5.0	0.18	緑				

#### b. 0.0049%の場合

第 3 表

番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調	番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調
1	3.8	0.12	黄	5	5.4	0.46	青
2	4.2	0.16	黄緑	6	6.0	0.50	青
3	4.6	0.18	緑	7	6.6	0.57	青
4	5.0	0.26	青緑				

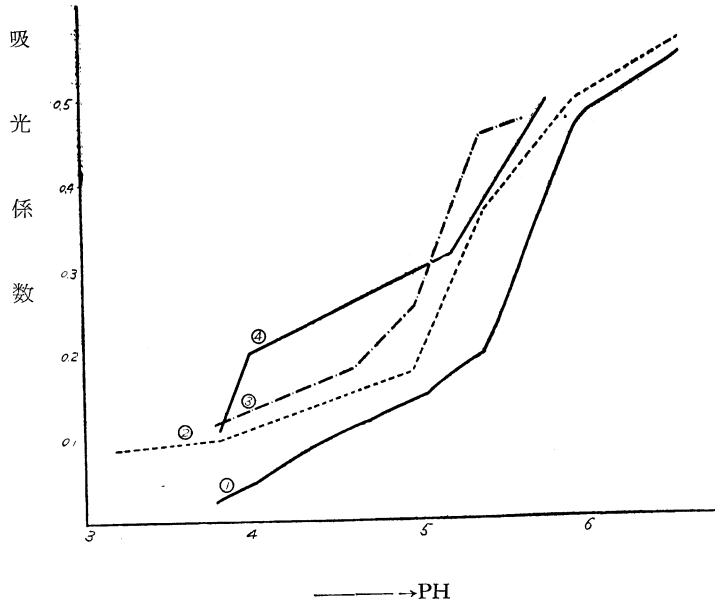
c. 0.01%の場合

第 4 表

番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調	番号	PH	吸光係数	肉眼で見た色調
1	3.2	0.09	黄	4	4.0	0.20	黄緑
2	3.4	0.09	黄	5	5.2	0.32	青
3	3.8	0.10	黄	6	5.8	0.50	青

第 1 図

- ① TBPの変色限界
- ② 0.0024%ゲラチン溶液
- ③ 0.0049%ゲラチン溶液
- ④ 0.01%ゲラチン溶液



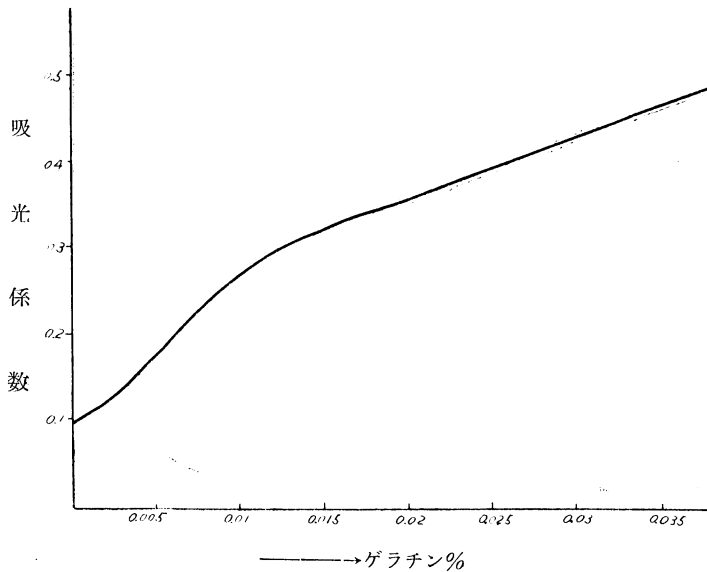
3. 蛋白濃度の變化によるTBP反應

ゲラチンの種々の濃度の溶液をつくり、その10ccにTBP溶液0.1ccと $\frac{1}{2}$ N酢酸0.1ccを加え (PH4.8となる) その吸光係数を測定した (ヌイター610)。

第 5 表

番号	ゼラチン%	吸光係数	肉眼で見た色調	番号	ゼラチン%	吸光係数	肉眼で見た色調
1	0.05	0.56	青	9	0.01	0.27	青緑
2	0.045	0.55	青	10	0.005	0.17	緑
3	0.04	0.475	青	11	0.004	0.16	緑
4	0.035	0.43	青	12	0.0025	0.13	黄緑
5	0.03	0.42	青	13	0.0015	0.11	黄
6	0.025	0.40	青	14	0.0005	0.10	黄
7	0.02	0.33	青	15	0.000	0.09	無色
8	0.015	0.32	青				

第 2 図 蛋白（ゲラチン溶液）に対する T B P 反応 (PH4.8)



4. 検体の量の検討

a) 点滴反応の場合

検体 1 滴 (約 0.05cc) に適当な酸液 1 滴を加え、T B P 溶液 1 ~ 2 滴を加える。今 PH6.6 の検体 1 滴に  $\frac{1}{2}$ N 酢酸 1 滴を加えると PH3.6 となり適当でない。又 PH7.8 のもの (例: 10% クエン酸ソーダ) は PH4.6 となる。

b) 検体 0.5cc をとる場合

PH6.6 の液 0.5cc +  $\frac{1}{2}$ N 酢酸 2 滴 → PH3.0

PH7.8 の液 0.5cc +  $\frac{1}{2}$ N 酢酸 2 滴 → PH4.8

この場合も PH が低すぎて適当でない。

c) 検体 2cc をとる場合

この場合は検体が多量であるから PH が高い場合は酸液を適宜加えて PH5.0 ~ 5.5 に調節出来る。

又市販アンプルの場合は次のように PH がほぼ調節されてあるから、これを 2cc とつて PH を調節することは容易である。

第 6 表

品名	最大 PH	最小 PH	平均 PH	調査本数
20 % ブドウ糖	5.8	4.1	4.8	150
ザルソプロカ糖	5.2	4.8	5.1	50
20 % 果糖	4.2	4.0	4.1	20

5. 抽出試験の可否検討

後述の市販アンプルの試験成績に見られる如く、同一製品番号、同一包装のものは、T B P 反応の陰陽性の点から言えば何れも同一判定を下し得るが、勿論吸光係数は一本ずつ異り、次表の如く

変動が見られる。即ち10%クエン酸ソーダ注射液（東洋製薬昭和19年9月製品）5ccをとり、TBP溶液0.05ccを加え更に $\frac{1}{2}$ N酢酸0.1ccを加える。液性はPH5.2となり、これを光電比色計にかけて吸光係数を測定した。

第 7 表

番 号	吸 光 係 数	番 号	吸 光 係 数
No. 1	0.55	No. 6	0.47
2	0.51	7	0.43
3	0.52	8	0.53
4	0.53	9	0.49
5	0.56	10	0.50

又稀には同一包装10本の中1本のみが反応陽性で他が陰性の場合があるが、これは熔閉不良であつたり、アンプル自身の不良の故であつて注射液原液の故ではない。

## 6. 確 認 の 限 界

ゲラチン溶液で行つた場合の確認濃度は0.0005%、即ち5rであつたが、肉眼で見た場合はその色調で判定することは困難であり、又光電比色計を使用する場合でも単に吸光係数が0.2以上のときは陽性という判定はなし得ない。

## 7. 人 体 發 熱 の 問 題

市販アンプル試験の結果、実際に人体發熱を起したものは次の二種であつた（SS病院における臨床実験による）。

第 8 表

品 名	製 造 者	製 品 番 号	PH	T B P 反 応
10% チトラート	東洋製薬	昭和19年9月 1.006	6.8	++ 吸光係数 0.43
同 上	同 上	昭和20年1月 不 明	7.8	++ 吸光係数 0.65

然るにザルソプロカ糖注において、TBP反応陽性のもので人体發熱を起さなかつたものがあつた。

ザルソプロカ糖（片上製薬）No.1021, PH4.8~5.0

TBP反応、肉眼：±（黄緑色）

吸光係数 PH5.0で0.46~0.50

これについては塩類誤差によるものと思われるが後述する。

## 8. 市 販 ア ン プ ル の 試 験 成 績

検体2ccをとり $\frac{1}{2}$ N酢酸1滴を加えてPH5.0~5.5に調節してTBP溶液1滴を滴下して反応を検した。

第 9 表

品 名	会 社 名	製 品 番 号	PH	T B P 反 応		検 査 本 数	備 考
				A	B		
20% ブドウ糖	参 松	891	5.7	—	—	10	反応欄のAはそのま まの判定、Bは $\frac{1}{2}$ に 濃縮した場合の判定
同 上	大 塚	190389	4.1	0.10	0.13	10	

同	上	中	外	1134	4.5	—	—	10	である。又反応欄の数字は光電比色計による吸光係数である。検査本数欄の数字は10本中10本共反応同様なるを示す。但しPH及び吸光係数は平均値である。
同	上	参	松	899	4.2	—	—	10	
同	上	片	上	1039	5.4	—	—	10	
同	上	新	星	2072	4.7	—	—	10	
同	上	大	塚	100395	4.2	—	—	10	
同	上	片	上	2534	4.3	—	—	10	
同	上	安	原	4250314	5.1	—	—	10	
同	上	参	松	CO969	5.6	—	—	10	
同	上	武	田	021TS3076	5.8	—	—	10	
同	上	宇	治	22.5.31	4.6	—	—	20	
同	上	陸軍衛材	不	明	4.1	—	—	20	
ザルソプロカ糖注	片	上	上	1032	5.0	—	—	10	
同	上	同	上	337	5.2	—	—	10	
同	上	同	上	350	5.1	—	—	10	
同	上	同	上	1021	5.0	±	0.46~0.5	10	
同	上	同	上	338	5.1	—	±	10	
V.B.プロカ糖注	中	外		1006	5.1	—	—	10	
20%果糖注	日本果糖			25004	4.0	—	—	10	

## 9. 鹽類誤差の問題

前述の如く、ザルソプロカ糖注において、吸光係数が大きくても人体発熱を起さぬ例があつたがこれを検討するため、同種の製品に故意にゲラチンを加えてその吸光係数を測定した。

即ちザルソ注(片上製, PH5.0) 4.5cc+0.005%ゲラチン溶液0.5ccをつくり、ゲラチン含有0.0005%のものとしPHを変動した。その結果は第10表の通りである。次にゲラチンを加えない同種製品のPHを変動してみると第11表の通りとなり、殆ど吸光係数に差異なく、むしろ小さくなつて見られた。

これは明らかに塩類誤差に基くものと思われるが、詳細については後日の検討にまきたい。

第 10 表

番号	PH	吸光係数	色調
No. 1	4.2	0.20	緑
2	4.6	0.23	青
3	5.0	0.48	青

第 11 表

番号	PH	吸光係数	色調
No. 1	3.8	0.15~0.22	黄緑
2	4.4	0.26	緑
3	4.6	0.25	緑
4	5.0	0.46~0.50	青

## 10. 結 論

TBP反応を再検討し次の結論を得た。

1. 蛋白によるTBP反応のずれを再検討し、その意外に小さいことを認めた。
2. 検体の量は2cc以上とることが必要である。
3. 検体のPHは5.0~5.5に調節して、肉眼による判定のみならず、比色計を使用して濃度を測定する必要がある。
4. 市販アンプルの抽出試験は10本中2本程度でよく、且つその試験成績は良好であつた。
5. 確認の限界はゼラチンに換算して5rであるが、人体発熱との関連性からみれば、2ccを検体

として測定する方法で十分な結果が得られる。

6. ザルプロ注の場合に見られた塩類誤差の問題については今後なお検討を要する。

終りにこの研究は昭和26年度文部省科学試験研究費によつたものであることを附記する。

#### 文 献

- 1) Feigl: "Qualitive Analyse Mit Hilfe von Tüpfelreaktion, 3Auflage, Leipzig." 1939
- 2) 石館, 坂口: 薬学雑誌 60, 12 (1940)
- 3) 小林, 浦口: 薬理学会誌 46, 2 (1950)