

說 明

(一) “产气荚膜杆菌 α 毒素制备的研究”、“用碘消除炭疽芽胞沾染的一些問題”、“反細菌战工作中标本带腸道病原菌的研究”三文曾刊载于“中国人民解放军医学科学院院刊”1956年第一期。

(二) “志賀氏菌屬因子血清的試制及其实际应用”、“細菌性痢疾的早期診斷方法——粪便凝集反应的应用”二文曾刊载于“中国人民解放军医学科学院院刊”1956年第二期。

產氣莢膜桿菌 α 毒素製備的研究

黃翠芬 莊漢瀾

引 言

氣性壞疽爲複雜而嚴重的創傷性感染疾病，由於戰爭情況的特殊，對本病能自動或被動免疫、以作預防、是很重要的問題。鑑於破傷風類毒素預防效果的顯著，所以對氣性壞疽類毒素的製備，在第二次大戰期間和以後，都給以很大的注意。初時由於 α 毒素產量不高，不適於作類毒素製備之用，到戰爭末期，才研究成功。按 Logan 氏或 Adams 氏方法製備，能獲得高產量的 α 毒素。並對濃縮、提純、動物免疫等問題，都得到適當的解決，但那時戰爭結束，沒有能够進行人體免疫試驗，所以，直到現在，類毒素的免疫效果，沒有能够作最後結論。

氣性壞疽病原菌主要的在四種以上。其中要算產氣莢膜桿菌最常見；在 80—100% 病例中，都有發現。產氣莢膜桿菌能够產生多種致病性毒素，像 α 毒素（卵磷脂酶）， θ 毒素（溶血毒素）， K 毒素（膠原酶）等等。在人類和動物氣性壞疽病狀的觀察， α 毒素有顯著的致病性，有壞死作用、高度致死作用，和溶血作用。所以對研究本病的治療和預防問題時，首先注意 α 毒素的產生，和影響它產生的各種條件。

α 毒素的製備方法的研究，國外已有一定的成就，不過由於需要不大，所以進展還是緩慢，只在歷次戰爭前後，有較多的研究。在第二次世界大戰前，A 型產氣莢膜桿菌 α 毒素產量每毫升在 50 LD₅₀ 左右。

這是不能適用於製備類毒素的。到 1939 年和 1941 年，由於 Nagler 氏和 Seiffert, MacFarlane 氏等分別對 α 毒素的測定法作了研究，使用人血清和卵黃液反應進行的工作，已經能够迅速而準確的測定效價，加以當時對氣性壞疽自動、被動免疫方法的迫切需要，使 α 毒素製備的研究大大推進了一步。近年來比較成功的製備法有如下的情況：

1941 年 MacFarlane 氏等用 Evans 氏脾、去蛋白質的肉的提取物液和葡萄糖所製的培養基，獲得每毫升 100—200 LD₅₀ 的產毒量。1948 年，van Heyningen 氏試驗了大量產毒用的培養基，用鹼處理肉組織，然後用木瓜蛋白酶消化，可獲得每毫升 200—300 LD₅₀ 的產毒量。1945 年，Logan 氏等用酶消化牛心液，補充鹽類，維生素和糊精，產量每毫升可達 800—1,000 LD₅₀。氏等特別提出，糊精的應用遠較其他碳水化合物好。1945 年，Adams 和 Hendee 氏等用胰消化酪蛋白做基礎成分，產毒量每毫升爲 500—600 M.L.D.。後來氏等繼續研究，說明了以胰消化酪蛋白作爲基礎成分的培養基能有較高的產毒量。它的原因可能有如下的幾種：(1)促進毒素產生的成分存在於某些蛋白質，像酪蛋白和明膠的酶消化液中；(2)胰或胃粘膜含有促進毒素產生的成分；這成分或許和甘油

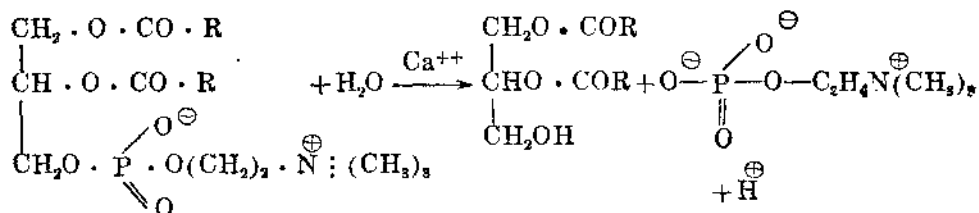
磷酸胆鹼有關。

近幾年來，我國有長春生物製品所使用冷藏牛肉和牛肝湯作基礎培養基（以下簡稱長春組織液），產毒量每毫升在 500 M.L.D.

實驗方法

產氣莢膜桿菌在普通厭氧培養基中很容易生長， α 毒素的產生也很迅速，隨着細菌的繁殖而漸增，當細菌繁殖停止時， α 毒素的產生也就停止。同時， α 毒素能在甲醛作用下成爲類毒素，能給它的特殊的抗體中和；這些性質，都充分說明了 α 毒素是一種外毒素。

Oakley 氏就產氣莢膜桿菌所產生的



1939 年 Nagler 氏和 Seiffert 氏分別報告了：當產氣莢膜桿菌的濾液同人血清混合時，產生混濁現象。後來在 1941 年，MacFarlane 氏也報告過類似的反應，但不用人血清，而採用卵黃液；稱做卵磷脂·卵黃球朊 (lecitho—vitellin) 懸液。產生混濁的原因，van Heyningen 氏認爲是由於從蛋黃卵磷脂中釋出游離脂肪（二酸甘油酯）的緣故，而這些脂肪懸液是由於卵磷脂的存在，才得以穩定的，當卵磷脂給分解了以後，均勻懸液也就從而破壞。這反應很敏感，少量的毒素也能準確的測出。利用卵黃懸液來測定 α 毒素活動的反應，稱做卵磷脂·卵黃球朊反應。

α 毒素的致死性和溶血性也很顯著。當注射毒素在小白鼠尾靜脈內後，能使動物致病。主要病徵爲食慾不振，捲伏不活

左右。經過本室研究後，產量略微提高；每毫升在 600 M.L.D. 左右。本法的優點，在於製備簡易，產毒量高。至於免疫效果怎樣，還待和其他製法比較後，才能確定。

毒素分型，共分做 A, B, C, D, E, 和 F 型六型。其中除 A 型和 F 型能使人類致病外，其餘各型所致的病都屬動物性疾病。但各型都產生 α 毒素，而 A 型菌產生得最多。1941 年 R.G. MacFarlane 氏證實 α 毒素就是卵磷脂酶 C，當 Ca^{++} 或 Mg^{++} 存在時，能分解卵磷脂成磷酸胆鹼和二酸甘油酯。反應如下：

動。一般在 24 小時內，可引起死亡。肛門附近有血尿現象。假如不死亡，就迅速恢復健康。由於這樣， α 毒素對小白鼠的致死作用也可作爲毒素效價測定的指標。

α 毒素活動最適宜的氫離子濃度負對數值 (pH) 爲 6.8—7.6。 Ca^{++} 的存在能加速反應。抗 α 毒素血清、磷酸鹽、枸橼酸鹽、草酸鹽都能抑制它的活動。放置室溫中，和在光線照射下，容易給破壞。振盪也可使成非活動性；以上這些性質，在進行試驗時，都是應該注意的。

本室測定 α 毒素效價的方法如下：

卵磷脂·卵黃球朊懸液 取新鮮雞蛋一個，用乙醇給外殼消毒。在雞蛋兩端各破一小孔，去蛋清，把蛋黃傾入玻璃珠瓶中，打碎，加入含 0.005 M 醋酸鈣的生理食鹽液 400 毫升，搖勻。加入 20 克白陶土，

搖勻靜置。離心沉澱，在消毒布氏漏斗(含薄層石棉紙漿)過濾，保存在冰箱中。在1—2週內適用；時間過久，脂質析出，將影響反應結果。

卵磷脂·卵黃球朊反應 用生理食鹽液使 α 毒素成各種稀釋度，分置小試管中，各0.5毫升。加入卵黃懸液，每管各裝1毫升，搖勻，放置在37°C水浴箱中，經15分鐘。取出，每管加1%枸橼酸1.5毫升，使反應停止進行(枸橼酸離子使 Ca^{++} 電離度減低，有抑制L.V.反應的作用；用來代替抗 α 毒素血清)用Dr. B. Lange氏No. IV. 光電比色計(綠色濾板)測定透光率，來表示毒素含量。每次透光率讀度同小白鼠最小致死量作對照，來決定毒素效價。

小白鼠最小致死量測定 最小致死量的定義是：就小白鼠尾靜脈內注射17—20克，能使小白鼠在72小時內半數以上死亡的最小毒素量，為一個最小致死量。方法是：把 α 毒素用生理食鹽液稀釋成各種不同的稀釋度。把小白鼠分成若干組，每組六只，每組注射在尾靜脈內一種稀釋度的 α 毒素0.5毫升，觀察72小時。小白鼠一般在兩天內就發病，或是死亡。假如有典型的症狀和血尿而至死亡，就可作為陽性結果。

全氮測定 微量凱氏法。

氮含量測定 用Sörenson氏和van

Slyke氏法。

鐵含量測定 用硫氰酸法，使亞鐵氧化成高鐵，同硫氰酸鹽作用後，產生紅色；用比色法測定鐵含量。

鈣含量測定 用草酸鹽使鈣沉澱。處理後，用高錳酸鉀滴定。

按表一結果，我們對那批 α 毒素效價的測定，依18%的透光率相當於1M.L.D.計算，就可測知原 α 毒素的滴度為每毫升200M.L.D.。

我們又曾把含 α 毒素的培養基加溫煮沸半小時，取0.5毫升作小白鼠尾靜脈注射，結果、沒有症狀出現，也沒有死亡。所以每次 α 毒素的測定並不另作對照組，只檢查動物死亡有無血尿症狀，就作統計。

培養基 用長春生物製品所的組織液做基礎培養基。製法如下：取屠場新鮮宰殺的牛肉和牛肝，放在滅菌容器中，在4—10°C冰箱中貯存七晝夜。取出，剔去肌膜的脂肪。用碎肉機把肉攪碎，加入5倍的蒸餾水，在室溫(15—20°C)中浸一小時。再加熱80度，浸30分鐘並經煮沸15分鐘。用脫脂棉過濾。用70%牛肉湯，30%牛肝湯，1%蛋白胨，0.5%的食鹽配製成培養基，分裝，再在120度滅菌30分鐘，就可應用。滅菌後的氫離子濃度負對數值應該是7.6—7.8。這樣配製的組織液，總氮量為167.3毫克%；氮氮量為66.98毫克% (van Slyke法)，或是60.34毫克% (Sörenson法)；總固體量為3.26克%。

菌種 乾燥保存。使用前，接種在燉肉培養基，通過鴿子幾代(在250—300克體重的鴿子作胸肌注射)，來增毒。作產毒試驗時，用8—10小時的細菌培養物。接種量用0.1毫升/10毫升的培養基。

產毒溫度 35—37°C。

產毒時間 7—10小時。

毒素效價測定 用上述的方法。

表一 卵磷脂·卵黃球朊試驗同小白鼠最小致死量的關係

項別 毒濃稀釋度	組別	鼠數 (只)	死亡數 (只)	生存數 (只)	透光率 %	最小致 死量
1:60.....	1	6	6	0	28.0	1M.L.D.
1:50.....	2	6	6	0	23.0	
1:100...	3	6	4	2	18.0	
1:120..	4	6	2	4	14.2	

影響 α 毒素產生的因素

(一) 碳水化合物對 α 毒素產生的影響

碳水化合物是細菌生長所需的主要碳源，影響產毒量很大。曾經比較各種醣類（像單醣、雙醣、多醣等）和不同的濃度（像0.5%、1%、2%、3%等）對 α 毒素產生的影響。單醣像葡萄糖，能助細菌迅速繁殖， α 毒素產生量在7小時左右就達到最高峯，但維持時間不久，就迅速下降。測計它的氫離子濃度負對數值，知道培養基產酸較快、較多，可能由於過酸，而影響 α 毒素的產生，或加速 α 毒素的破壞。雙醣像蔗糖、乳糖、麥芽糖等，產毒情況還好，但不如多醣糊精。按 Logan 氏和 Adams 氏的經驗，最合適的炭水化合物是不溶於水的糊精。我們曾經加以比較，不溶於水的糊精的產毒量確實比普通糊精稍高。但不溶於水的糊精是從普通糊精提取，提取率大約為40—50%。這樣，從經濟觀點計算，採用不溶性糊精，意義並不太大，應另外研究

獲取不溶性糊精的來源。此外，長春組織液產毒培養基採用糖稀*，作為炭源，效果也好；由於這樣，也進行了仿製，用來比較。結果，見圖一和圖二。

由圖二，可見糖稀和不溶性糊精產毒效果都相當良好，並且差別不大。至於含糖濃度對產毒的影響，見圖三和圖四。

在各試驗中，糖濃度高的（如3%）並不能特別增加 α 毒素產量，但維持高產毒量的時間能較長，往往維持3—5小時後才下降；這對毒素收穫時間的掌握，是較為有

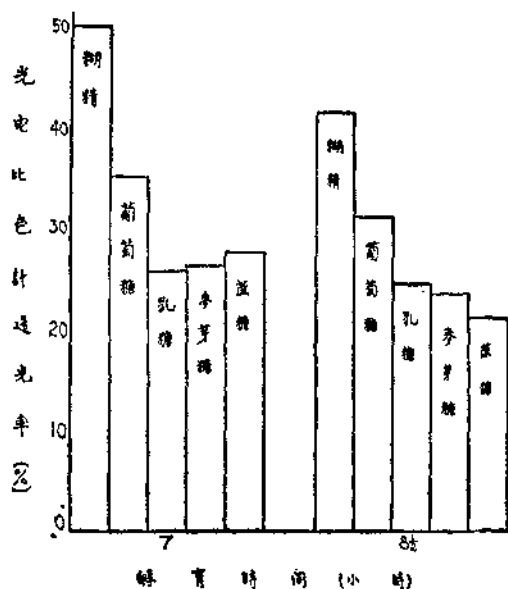
* 稍加改良的長春生物製品所稱糖稀製法：

(1) 水洗糯米，用新鮮水泡浸一夜，煮熟。
(2) 糖化——按糯米100克，加麥芽粉5克的比例混合，放在37°C 孵溫箱中8—9小時。

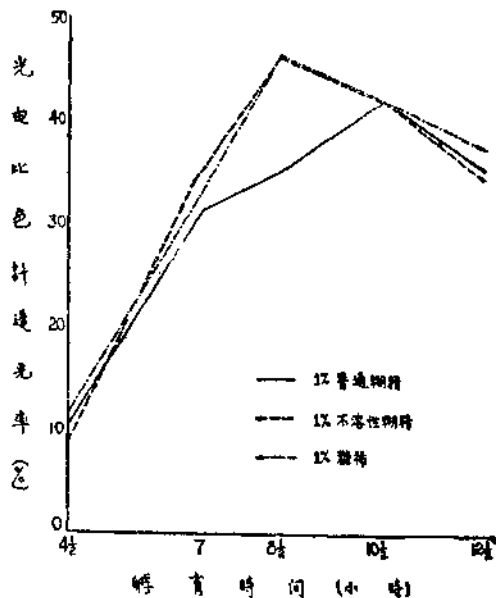
(3) 糖化液過濾，用紗布壓榨。

(4) 濾液放在蒸發皿中，在水浴上蒸發到黏稠。

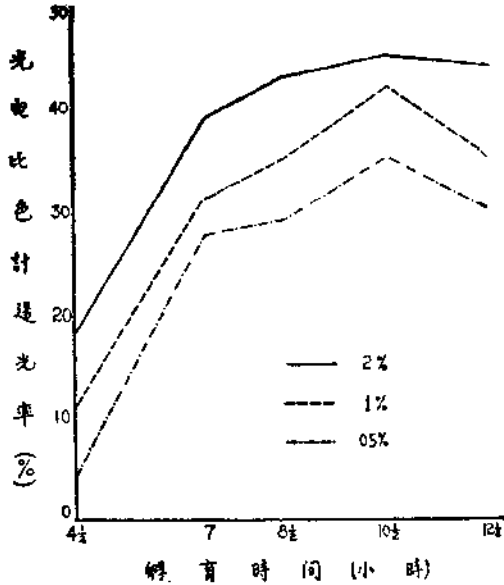
麥芽粉的製備：選擇帶皮大麥，洗淨，用冷水泡浸，泡過的大麥除去水分，放在事前給水泡濕的草袋上，另再蓋一層濕草袋，放在室溫中發芽，待出芽到原麥粒長度1.5—2倍左右的時候，收集麥芽，吹乾，磨成了粉待用。



圖一 各種不同的碳水化合物對 α 毒素產生的影響(毒素稀釋度:1:20)。



圖二 普通糊精、不溶性糊精、糖稀對 α 毒素產生的影響(毒素稀釋度同圖一)



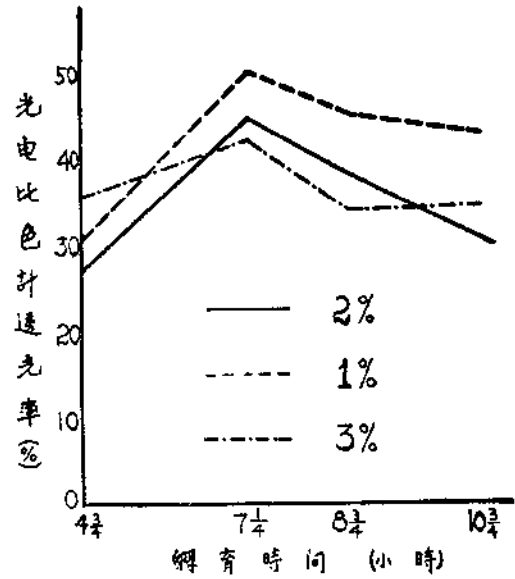
圖三 濃度不同的糊精對 α 毒素產生的影響

利的。至於高濃度糖同低濃度糖產毒情況的差別，可能由於下述原因的影響：(1) α 毒素不斷破壞，同時也不斷形成，兩者狀態平衡；(2) Вышепан 和 Краскова 認為 α 毒素的破壞，是由於培養基中產生厭氧酶（蛋白分解酶，Анаэробиназ）的緣故，糖濃度高，可能對這種酶的作用不利，因而保護 α 毒素，不易迅速被分解；(3) α 毒素在產生過程中，也不斷形成類毒素，但類毒素不能用測定毒素的方法來顯示。總之， α 毒素在產生過程中，怎樣會迅速遭受破壞，是值得研究的問題。

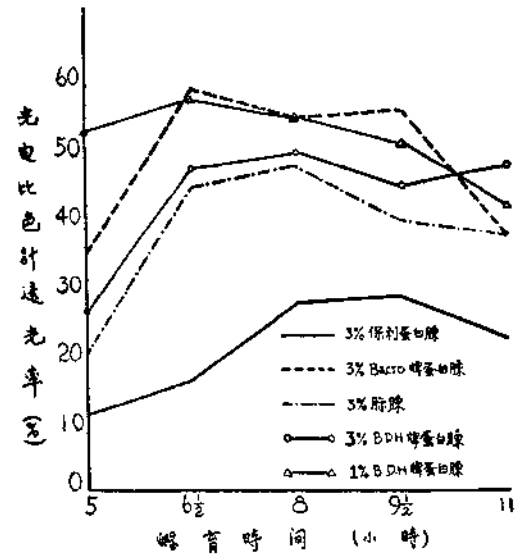
鑒於以上試驗的結果，在實際產毒試驗中，我們都採用 1% 普通糊精。

(二) 陳的選擇

陳（蛋白陳）為產毒培養基中的主要氮源，容易給細菌利用，影響產毒量也大。按長春組織液培養基中，採用保利蛋白陳，產毒量始終不易提高。所以我室選擇其他蛋白陳同它比較，產毒情況就有了改進。曾經比較 Bacto 牌蛋白陳、豚·陳、B. D. H. 牌蛋白陳和保利蛋白陳四種，結果見圖五。



圖四 濃度不同的糖稀對 α 毒素產生的影響



圖五 各種不同蛋白陳對 α 毒素產生的影響

在上述試驗時，陳的濃度採用 3%，使它同保利蛋白陳原來用量相比較，但在以後的試驗中，都採用 1% 的濃度，產毒量不受影響。

(三) 肉渣的處理

厭氧性菌的生長，需要供給適合的厭氧環境，在大量製造毒素的情況下，使用厭

氧缸等,方法是不方便的。由於這樣,只有採用加入肉渣的方法,比較簡便。但這個方法的缺點是增加蛋白質含量,在將來提純的過程中,會比較麻煩的。

培養基加入肉渣,經滅菌處理後,氫離子濃度負對數值下降很厲害,並且每次各管的情況又不一致,在比較性的研究試驗中,氫離子濃度負對數值的控制特別感到困難。由於這樣,怎樣處理肉渣,就成了急需解決的問題。

心肌粉的處理 首先試用氫氧化鈉來處理:加稀釋鹼溶液到肉渣中,泡浸,加熱煮沸,用冷水沖洗。其次,再用鹼泡浸,再用冷水沖洗,到洗液不呈酸性反應為止。然後烘乾。使用時,放置培養基中。滅菌後測定培養基氫離子濃度負對數值的改變,發現並無改進。

後來參考 Logan 氏牛心肌脫脂的方法,用有機溶劑脫脂。照這樣的方法製得的肉渣,氫離子濃度負對數值較穩定,產

毒量也良好。方法是把除去表層脂肪的牛心攪碎,加95%乙醇(1:3),放置四小時,然後去掉乙醇,泡浸在1:1乙醇乙醚混合液(1:3)中,四小時後除去液體,吹乾。再經磨碎,就可應用。

肉渣脫脂與否對產毒量影響的比較見圖六。

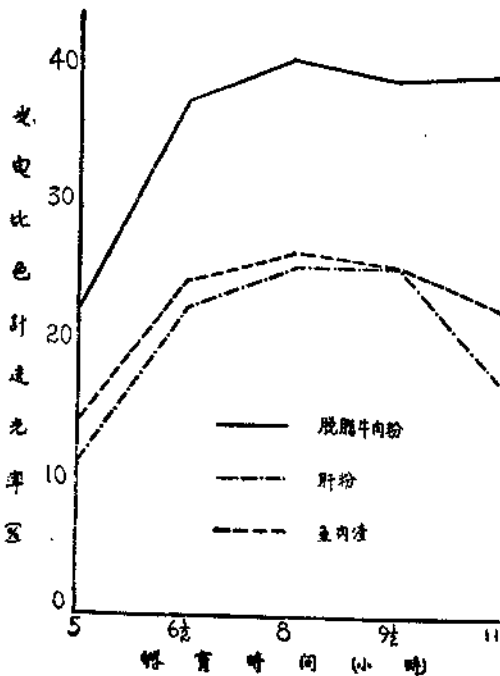
肝粉的處理 切肝成小塊,用自來水沖洗二小時,除去血水,用N/20氫氧化鈉煮10',再用清水洗四次。氫離子濃度負對數值為7.8。烘乾,磨粉待用。

(四) 胰臟提取物液對 α 毒素產生的影響

Adams 氏在對產毒培養基配製的研究中,指出胰臟提取物液含有增加 α 毒素產生的成分。所以在長春組織液中,我們也加入用乙醇提取的胰液,觀察產毒結果:但未能發現毒素產量有顯著的增加。可能肉組織在冷藏過程中,由於自溶作用,釋出有效成分,促進毒素的增加,所以當再加入胰臟提取物液時,並沒有特殊影響。

(五) 冷藏組織液同新鮮組織液產毒量的比較

按長春組織液的製備,強調肉組織經冷藏後,可增加產毒量。我們在多次試驗中,大部分結果也這樣(七次試驗,其中六次的結果,都是冷藏組織產毒量較高,只有一次,是冷藏組織和新鮮組織產毒量相同)。這說明了新鮮肉或肝經過七晝夜4-10°C的冷藏後,產毒量比不冷藏的新鮮組織液好。Rogers 氏曾經在1946年指出:冷藏肉組織由於自溶作用,產生氨基葡萄糖,因而增加毒素產量。我們曾經對冷藏組織液和新鮮組織液進行了初步分析,結果見表二。就兩種配製物比較,總氮量、氮氣量、鐵含量和固體總含量方面都略有不同。是否由於這些因素引起產毒量的不同,



圖六 肉渣對 α 毒素產生的影響

表二 冷藏組織液同新鮮組織液成分的比較

組 別	總 氮 量 毫克/毫升	氮 氮 量 毫 克 / 毫 升		鐵 含 量 微克/毫升	α 毒 素 量 最小致死量/毫升	固 體 總 量 克 %
		van Slyke 氏 法	Sorèson 氏 法			
冷藏組織液·····	1.638	0.6698	0.6034	5	320	3.26
新鮮組織液·····	1.397	0.62	0.53	3	200	2.2

還須作深入一步的研究,才能確定。

(六) 培養基中鐵含量對 α 毒素產生的影響

根據 Mueller 氏的去鐵方法,在培養基中加入 1% 氯化鈣,加熱,有白色沉澱產生用濾紙過濾,去沉澱後,取上清液,用 α 聯氮笨 (α, α' —dipyridyl) 法測定它的鐵含量,直到培養基上清液產生的色澤同蒸餾水對照起來能够相仿,就表示培養基中鐵質已經除去。然後在去鐵後的培養基中,加入不同量的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 溶液,來比較鐵含量對 α 毒素產生的影響。據比較結果,初步印象是鐵含量對毒素產生的影響不大。在含鐵量極小的情況下,細菌仍能活潑地生長,產氣很多。當含鐵量較高,達 300 微克/升時,產毒量才有較明顯的下降。檢查文獻上的報道,各作者對鐵的影響,沒有能够獲得一致的見解。例如 Tamura (田村) 氏認為合適的鐵量為 200–250 微克/升, van Heyningen 認為合適的鐵量為 1000 微克/升,而 Baskina 却認為 400 微克/升為合適。可能由於去鐵的方法不同,因而結果也不同。在我們的實驗中,當作去鐵處理時,有不少漿狀沉澱形成,而使去鐵後的培養基的產毒量比沒有去鐵前的產毒量低。可能是在去鐵時處理沉澱,連同把部分有效成分除去之故。所以在確定鐵含量對產毒的影響,或尋求合適的鐵含量時,在方法上,還須作進一步的研究。

下列表三為鐵含量對 α 毒素產生的影響的結果:

表三 不同的鐵含量對 α 毒素產生的影響

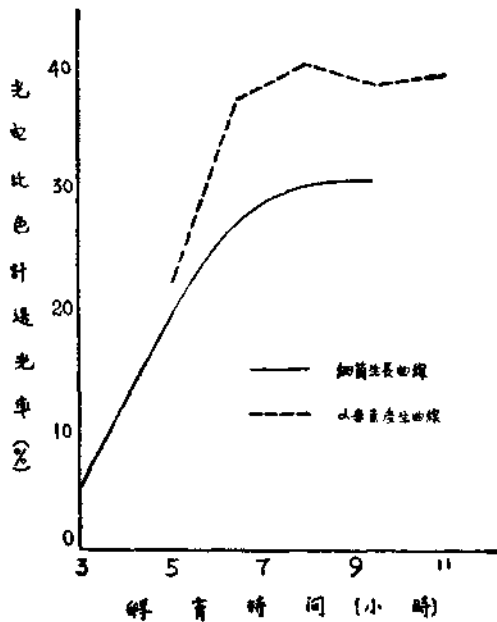
加入的 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 量(微克/升)	鐵 含 量 (微克/升)	α 毒 素 產 量 (光電比色計透光率)
0	0	59.2%
600	125	58.0%
1,000	200	43.5%
1,500	300	24.0%
2,000	400	29.5%
2,500	500	27.8%
3,000	600	28.6%
3,500	700	23.8%
4,000	800	29.8%

(七) α 毒素的產生同細菌孵育時間的關係

α 毒素產生迅速,是它的特點。常常耽 7—10 小時,就達最高峯;過後,產量就下降。肉眼觀察,當細菌繁殖最旺盛,產氣量最旺盛時,也就是 α 毒素產量最高的時候。維持了幾小時後,細菌生長能力就開始減退,培養基混濁度不再增加,產氣量逐漸減少,同時產毒量也開始下降。由於這樣,曾經用培養細菌液混濁度測定的方法來觀察,發現混濁度的增長,同 α 毒素的產生的情況是一致的。由於毒素產量下降很快,所以在毒素收穫時間的掌握上,應該密切注意,以便減少損失。

產氣莢膜桿菌的生長曲線同 α 毒素的產生之間的情況見圖七。

至於決定 α 毒素收穫的時間,曾經考慮把氫離子濃度負對數值的改變作指標。因為當細菌開始繁殖時,氫離子濃度負對數值就下降(向酸性方向移動)。在最初幾小時內,每小時大約下降 0.2。當細菌繁殖



圖七 細菌生長同 α 毒素產生的關係

最旺盛，也就是產毒量開始激增時，氫離子濃度負對數值改變顯著，一小時內下降可達 0.5—1 左右。一般毒素產量達最高峯時，氫離子濃度負對數值大約在 5.5—6.5 之間。當酸度再繼續增加時， α 毒素含量便開始下降。但因氫離子濃度負對數值改變

討

本文曾經對產生 α 毒素的基礎培養基各成分，像蛋白陳、碳水化合物、肉渣等，加以研究，並對產毒過程的各種條件，像時間、菌種的處理、毒素的收集等，分別作了試驗。因此，對 α 毒素產生的條件，得到了一些了解。在以上各種因素固定後， α 毒素的產量確實在一個時期內維持相當高，而且穩定。但當這項工作停止了半年後，再進行試驗時（當然也可能由於這一系列的試驗進行時，室溫太高的緣故，目前沒有能够確定原因），就沒有能够獲得同前的結果（產毒量只能在 300 M.L.D./ml 左右）。可見還有些影響產毒的因素，我們沒有能

的範圍不够敏銳和恆定，所以對收穫時間的決定，應該在不同時間內採取標本，並隨時作卵磷脂酶活力測定，用作指標。

(八) α 毒素的收集

本研究對 ' α 毒素應該怎樣除菌收集，以供製備類毒素之用' 一個問題，曾經作了一系列的試驗。由於 α 毒素的性質容易遭受破壞，使收集操作上增加許多困難。首先試用濾菌器的方法。用賽氏濾菌器過濾， α 毒素幾全部喪失。假如用 Sintered 玻璃板濾菌器，那末 α 毒素損失約 $\frac{1}{2}$ — $\frac{1}{3}$ 。假如用皮氏過濾器，那末收效却最好，損失也不大；但過濾速度太慢，不適合大規模生產之用。後來試用離心沉澱的方法，在低溫離心沉澱器中進行。試行比較速度不同的影響，在每分鐘 2,000 轉，3,000 轉，5,000 轉，7,000 轉的情況中各離心半小時，效果良好；不論採用何種速度，都不致影響毒素含量。但這樣離心後，不能保證全部細菌能沉澱除去。可是，用甲醛處理，製成類毒素後，經過細菌培養檢驗，沒有發現有活菌。這樣，希望離心沉澱法能供實際應用。

論

够掌握。

在產毒過程中，有兩個問題是特別需要解決的。首先是菌種處理問題。Logan 氏等認為通過鴿子的肌傳代，可以增加 α 毒素產生的能力。在我們的試驗中，通過鴿子傳代，只能維持產生 α 毒素的能力在一定水平，而不能顯著提高。有時在鴿子病變的觀察上，有毒力增加的印象，但把那菌種進行試管試驗時， α 毒素的產量並沒有太大的改變。因此，論究應該怎樣處理和保存菌種，特別是應該考慮用定向變異的方法處理，來提高產毒量，是有很大的實際意義的。另一方面， α 毒素迅速遭受破壞的現

象,是生產中一個重大問題。Вышепан 氏等提出,是蛋白分解酶、起破壞作用所致。因此,亟應考慮怎樣防止這種破壞作用的發生。就目前來說,我們希望通過降低培養溫度,使細菌生長速度減低,因而 α 毒素的形成可以有較充分的時間;這樣,便可採取透析袋培養產毒的方法。一方面可獲得純度較高的毒素製品,一方面可使毒素和培養基其他代謝產物及早分離。由於改變培養溫度和培養方法,希望對 α 毒素的純度、產量、破壞等問題得到一些改進。

在文獻的報告中,有不少高產量 α 毒素的製備方法;像 Logan 氏法, Adams 氏法等等。經過我們反覆仿製,始終沒有能夠達到文獻記載的產毒量,只能獲得 200—300 M.L.D./ml 左右。那兩種培養基有個共同優點,就是所含高分子蛋白量較低,用來製備生物製品,是很合適的。但我們考慮長春組織液的研究,有一定的意義。一方面由於長春組織液能產生較多的 α 毒素量,是一個良好的條件;另一方面,也考慮到氣性壞疽病的特點,是在肌的部分發生,當細菌繁殖後,產生毒素,而引起症狀。

結 論

總結本文的研究,可獲得如下的結論:

(1) α 毒素的測定應該同時進行,卵磷脂酶活力測定和小白鼠最小致死量測定二法,以便比對。同時,卵磷脂酶活力測定法是按我系改良的方法進行的,較為迅速準確。

(2) α 毒素的產生,以採用 1% 糊精, 1% B.D.H. 牌蛋白陳,脫脂肉渣為合適。

(3) 冷藏組織液所產生的 α 毒素比新鮮組織液多。

到現在為止,各地的研究中,雖然認為 α 毒素是主要的致病因素,但單純解決抗 α 毒素的問題,對整個疾病的發展,還沒有能夠控制。因此,可以考慮,除 α 毒素外,還可能有其他致病因素沒有被發現。由於組織液成分和肌成分相近似,所以能產生的致病物質也可能近似。這樣,在選擇產毒培養基,來作免疫製品時,應該把免疫效果做標準,而不應該把產毒量的高低做最後標準。由於以上的想法,我們認為長春組織液的研究,還應該再加以深入的探討。

此外,當我們比較各種培養基的產毒情況時,發現各種培養基產毒的種類,也各有不同。例如 Adams 氏培養基光電比色計透光率和小白鼠最小致死量的關係為 22—25%~1 M.L.D.,而組織液則為 13—18%~1 M.L.D.;這就是組織液所含的致死毒素和 Adams 氏液的不同。經過初步分析,組織液所含 θ 毒素量較多,但還沒有能下結論。不過,通過這一現象,更促使我們相信,在選擇培養基作產毒用時,須詳細比較各種培養基產毒的情況,和免疫的效果,才能決定。

(4) 鐵的含量對 α 毒素產生的影響並不太大,但當含量超過 200 微克/升以後,那末產毒量要下降。

(5) α 毒素的產生,隨細菌的繁殖而增加。當細菌繁殖停止時,產毒量也停止上升。一般說來,細菌孵育後,大約經過 7—10 小時, α 毒素產毒量就達到最高峯。

(6) α 毒素的收集,最好採用離心沉澱的方法,一方面、節省時間,另一方面、可減少損失。

誌謝 本研究的進行,得到馬恩賢同志的不少技術協助,並經常得到楊叔雅教授的關心指導,一併誌謝。

主 要 參 考 文 獻

- (1) M. H. Adams and E. D. Hendee: Methods for the production of the α and θ toxins of *Clostridium welchii*. *J. of Immunol.* **51**: 249—256, 1945.
- (2) M. H. Adams, E. D. Hendee, A. M. Pappenheimer: Factors involved in production of *Clostridium welchii* α toxin. *J. experl med.* **85**: 701, 1947.
- (3) Е. Д. Вышепан, Т. В. Краскова: О роли протеолитических ферментов *Bac. Perfringens* (типа А) в инактивации образуемого этими бактериями α -токсина (лецитиназы С) *Биохимия* **12**: 202, 1954.
- (4) van Heyningen, W. E.: The biochemistry of gas gangrene toxins I. Estimation of the α -toxin of *Clostridium welchii* Type A. *Biochem. J.* **35**: 1246—1256, 1941.
- (5) M. A. Logan, A. A. Tytell, I. S. Danielson, A. M. Grimer: Production of *Cl. perfringens* α -toxin. *J. of Immunol.* **51**: 317—328, 1945.
- (6) R. G. MacFarlane, C. L. Oakley, C. G. Anderson: Hemolysis and the production of opalescence in serum and lecitho-vitellin by the α -toxin of *Cl. welchii* *J. Path. Bact.* **52**: 105, 1941.
- (7) R. G. MacFarlane and B. C. J. G. Knight: The biochemistry of bacterial toxins I. The lecithinase activity of *Cl. welchii* toxin. *Biochem. J.* **35**: 884—902, 1941.
- (8) F. P. O. Nagler: A reaction between the lethal toxin of *Cl. welchii* (type A) and human serum. *Brit. J. Experl. Path.* **20**: 473, 1939.
- (9) J. T. Tamura, A. A. Tytell, M. J. Boyd, M. A. Logan: Production of *Cl. welchii* toxin in peptone free medium. *Proc. Soc. Experl. Biol. Med.* **47**: 281, 1941.
- (10) A. W. Taylor and J. Stewart: The toxin produced by *Cl. welchii* in a simple medium. *J. of Path. and Bact.* **53**: 87, 1941.
- (11) 長春生物製品所: 產氣莢膜桿菌 α 毒素的製備法, 1955年

用碘消除炭疽芽胞污染的一些問題

馬賢凱 楊叔雅

炭疽桿菌對人、畜都有強烈的致病作用，又能形成對自然條件中各種理化因素有強大耐力的芽胞，從而長期保持着它的毒性^(1,2,3)。因此，不論在實驗室進行炭疽的研究，或是同畜牧有關的各業，舉凡被炭疽菌污染物件的消毒，就成為有關人命安全，並影響國民經濟的一個問題了。在消毒學的書上，提到炭疽芽胞的消毒，乃是一項特殊的問題，很多常用的殺菌劑，例如石碳酸、來沙爾、以及這類的藥品，在炭疽病的消毒應用上，是不可靠，和不適用的⁽⁴⁾。有人報道：70%的乙醇和5%的石碳酸，在25°C三天，也不能殺死炭疽芽胞⁽⁵⁾。我們的試驗也曾獲得類似的結果。因此，認為有必要尋找一種能迅速可靠地殺滅炭疽芽胞的藥劑。

在文獻上，我國陳華粹、謝少文二氏曾經報道過：碘對炭疽菌具有強大的殺菌作用⁽⁶⁾；在很高的稀釋度(1:12,800—1:25,600)同時在很短的時間內(10分鐘)，能殺死它們。他們曾經進行過用十株炭疽菌的芽胞作試驗；並指出在實驗室中，可使用1:2,500的稀釋碘液消除各種被炭疽菌污染，而不能即刻用高溫消毒的物件（玻片、吸管等）的污染。又，他們並提出了一個饒有興趣的現象：便是炭疽菌的芽胞比了繁殖體，對碘更為敏感；在他們的試驗中，二者相差達2—8倍。這在歷來細菌芽胞同繁殖體對消毒藥劑耐力的關係上，是一個反常的現象。本文是繼上述報道後，進一步試驗用碘作殺炭疽桿菌試驗中所遇到的一些問題的報道。

材 料 和 方 法

(一)消毒試劑

碘液是用10克的碘和10克的碘化鉀溶解在100毫升70%的酒精，所配製成10%碘酒存置在深褐色，有磨砂玻璃瓶塞的玻璃瓶內——這是原液。在使用時，從原液取出定量的碘酒，用水稀釋100倍，即成1:1,000的碘液。其它稀釋度，以此類推。

(二)菌液

(1)芽胞懸液

把炭疽菌株接種在羅氏瓶內的普通瓊脂平面上，置在37°C中，培養5—7天。待

它充分形成了芽胞(塗片檢查平均80%為芽胞時)，就用無菌鹽液洗下，在80°C水浴中加熱半小時，來殺死繁殖體；並用傾碟數菌法計算其中活芽胞的數目。這種芽胞懸液置在冰箱中，作為原液(濃度大約為每毫升含活芽胞二億)。已知這種芽胞懸液在上述條件下可保持半年，活菌數和毒性都不變；使用時，用無菌生理鹽液稀釋十倍。

(2)繁殖體·芽胞混合懸液

18小時瓊脂面培養物用生理鹽液洗下，使成五千萬到一億的濃度，立即使用。

(三)試驗方法

在單獨試驗某一藥劑的殺菌作用時，用 18×180 毫米的無菌玻璃管加入 4 毫升已知濃度的該項試劑，然後用毛細吸管加入芽胞或菌懸液，立刻搖勻。從加菌之時起，用計時錶計算時間，在 5 分鐘、10 分鐘、30 分鐘從玻璃管中吸出 0.1 毫升，種入含 5 毫升的普通肉湯管中，置在 37°C 中培養，觀察是否有細菌或典型炭疽菌的絮狀生

長，經過 48 小時。在試驗有機物對試劑殺菌作用的影響時所用的試驗方法，為在試管底部先加 2 毫升有機物的懸液，再加 5 滴菌液，最後加 2 毫升雙倍於試驗稀釋濃度的試劑。從加試劑時候起，開始計算時間。每過 5 分鐘、10 分鐘、30 分鐘，按上述試驗方法，取樣品 0.1 毫升，接種肉湯，觀察並記錄 48 小時的培育結果*。

實驗結果

(一) 碘液對純炭疽芽胞懸液和繁殖體·芽胞混合懸液的殺菌作用

我們曾經試驗了實驗室中 9 株不同來源的典型炭疽桿菌芽胞懸液對碘的敏感性。結果：1:4,000 倍稀釋的碘液對實驗所用濃度（即每毫升中最後含 90 萬至 100 萬）的活芽胞懸液經過 10 分鐘接觸後，都沒有發現細菌生長。以後又試驗各種稀釋度的

碘液對三株強毒炭疽菌的殺菌作用，經過十多次的試驗，結果大致相同：用 1:10,000

* 曾同時比較用硫代硫酸鈉中和碘的作用和不用硫代硫酸鈉中和，直接種肉湯二法的結果（中和用量為每毫升 1/1,000 碘液中加入 0.1N 硫代硫酸鈉 0.1 毫升，稀釋度不同的碘液以此類推）。兩種試驗方法在稀釋度不同的試劑和作用時間不同所得的結果完全一致。說明 5 毫升肉湯能完全中和在接種時帶入的少量試劑的殺菌作用（或抑制作用）。因此，在以後大部分的試驗中，就省略了硫代硫酸鈉中和的一段操作。

表一 稀釋度不同的碘液對三株強毒炭疽菌芽胞混合懸液的作用

試劑稀釋度	使用量	菌液量	作用時間			
			2—5 分	10 分	30 分	20 小時
1:1,000.....	4 毫升	0.2 毫升*	—	—	—	—
1:2,000.....	4 毫升	0.2 毫升	—	—	—	—
1:4,000.....	4 毫升	0.2 毫升	(±)	—	—	—
1:8,000.....	4 毫升	0.2 毫升	+	—	—	—
1:16,000.....	4 毫升	0.2 毫升	+	+	—	—
1:32,000.....	4 毫升	0.2 毫升	+	+	+	—

* 0.2 毫升內含 A_2, A_4, A_{16} 三株強毒炭疽菌芽胞混合懸液，總數大約有 360 萬至 400 萬個活芽胞。

— 48 小時肉湯培養物內沒有細菌生長。

± 在 48 小時內，肉湯培養物中有炭疽菌生長。

± 表示可疑。

表二 稀釋度不同的碘液對三株強毒炭疽菌的繁殖體和芽胞混合懸液的作用

試劑稀釋度	使用量	菌液量	作用時間			
			2—5 分	10 分	30 分	20 小時
1:1,000(碘).....	4 毫升	0.2 毫升*	—	—	—	—
1:4,000.....	4 毫升	0.2 毫升	+	—	—	—
1:10,000.....	4 毫升	0.2 毫升	+	—	—	—
1:20,000.....	4 毫升	0.2 毫升	+	—	—	—

* 0.2 毫升內含 A_2, A_4, A_{16} 三種強毒炭疽菌繁殖體和芽胞的總數量大約有 360 萬個（用傾碟法計數）。

至 1:16,000 倍稀釋的碘液在 30 分鐘內,能殺死三種菌株芽胞的混合懸液。見表一。

此外,我們也曾試驗了碘液對炭疽菌繁殖體和芽胞混合懸液的作用。結果見表二。

從表二,可見碘液對炭疽菌的繁殖體和芽胞的殺菌作用沒有顯著的差異。

(二)有機物質對碘殺菌作用的影響

● 由於在自然條件下,特別是在細菌生

表三 各種有機物在碘對炭疽芽胞懸液殺菌作用中所具有的影響

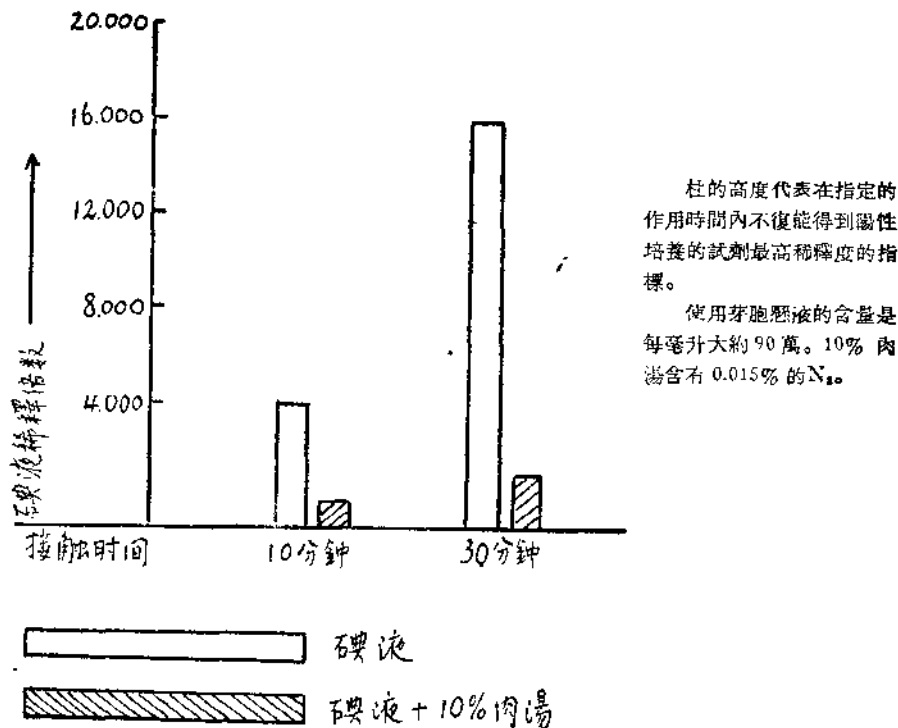
試 驗 物 (有 機 物 質)	成 分	用 量	菌 液 量*	1:1,000 碘液 用量(毫升)**	作 用 時 間			
					5 分	30 分	20 小時	48 小時
家兔晝夜大小便混合懸液.....	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	+	+	+	+
血清(宰牛).....	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	+	+	+	+
普通肉湯△.....	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	+	+	+	+
液體石臘.....	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	+	+	-	-
2%酵母浸出液和細胞混合懸液△△	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	+	-	-	-
0.1 N NH ₄ OH.....	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	-	-	-	-
無菌生理鹽液(對照).....	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	-	-	-	-
蒸餾水(對照).....	2 毫升	0.25 毫 升	2	2	-	-	-	-

* 係 A₂, A₄, A₁₀ 三種強毒炭疽的混合芽胞懸液 0.25 毫升內含 400 至 500 萬活芽胞。

** 在上述試驗中, 1:1,000 碘液同試驗物和菌液混合後, 碘的最後實際稀釋度為 1:2,129 (0.047%)。

△ 肉湯的總氮量為 1.56 毫克/毫升。

△△ 所含總氮量為 1.1 毫克/毫升。



長的環境中，必然伴有多量的有機物質，所以試驗各種有機物質對殺菌劑的影響，是有特別重大的實踐意義的。我們首先試驗了幾種在一般實驗條件下常遇到的有機物質對碘殺菌作用的影響。見表三。

結果：血清肉湯以及動物大小便等，凡含有多量蛋白質或蛋白分解產物的，對碘的殺菌作用都有很大的影響。在濃度較大時，能使 1:1,000 碘完全喪失殺菌作用。在碘液中加入少量的肉湯(10%)，也可使那稀釋的碘液的殺菌作用減少4—8倍。見圖一。

(三) 氫離子濃度負對數值(酸鹼度)對碘殺菌作用的影響

在試驗有機物對碘消毒作用的影響時，我們發現：假如在肉湯或動物大小便中加入少量鹽酸，那末這些有機物對碘消毒的阻擾作用就大大地減弱。見表四。因此，我們就進一步比較用酸把肉湯調節成不同的氫離子濃度負對數值(pH)，並試驗它對碘殺炭疽芽胞干擾作用的差異。這種同樣的試驗我們曾經就三株強毒炭疽菌分別進行。

各次實驗的結果雖然略有出入，並在使用稀釋度不同的碘和菌種和菌量不同時，這種差異便更大。但總的說來，在酸性環境中，碘的殺菌作用較強；即使有較多的有機物質存在(50%肉湯)，它的殺菌作用仍是不變。而在中性和鹼性環境中，有機

物對碘的殺菌作用却能引起很大的阻擾作用。在較稀的(1:2,000)碘液中，它的殺菌作用可因 50% 肉湯而完全喪失。見圖二。

至於碘殺菌作用在酸性環境中的加強是否由於酸本身的作用，爲了瞭解這一點，我們同時也用實驗中同批製成的 pH3 的肉湯做了對照，加入等濃度的芽胞懸液，經 96 小時後，從酸性(pH3)的肉湯中仍能培養出大量的炭疽桿菌。此外，又試驗 2% 純酸鹽對炭疽芽胞的影響；經 22 小時後，也培養得出大量的炭疽菌。

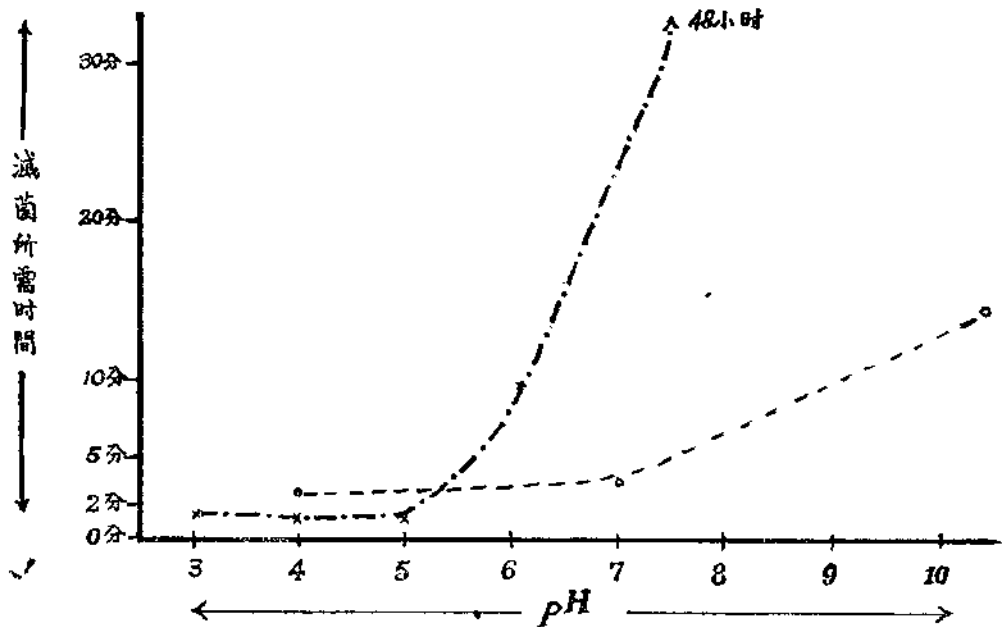
(四) 在大量有機物存在的環境中，用碘殺炭疽芽胞的嘗試

由於上述的一些實驗結果——少量的酸能够恢復碘在有機物存在的條件下的殺菌作用，我們曾經考慮到是否也有可能用碘來給患炭疽動物的籠子和排泄物消毒。我們曾經試驗了碘對‘家兔籠子內攪雜着剩餘飼料(麩皮、糠、青草等)和動物在四、五天中排出的大小便的垃圾’的消毒作用。試驗方法是：取垃圾·大小便混合物 20 毫升，加入不同量的鹽酸(10% HCl 0.3—1.5 毫升)。幾分鐘後，加入 30 毫升 1:1,000 的碘液。經離心沉澱後，取出 5 毫升上清液，加入一定量的炭疽芽胞。一小時以後，每一組吸出 1 毫升，用無菌鹽液稀釋後，作傾碟數菌。結果，在使用不同量的酸和碘液的各試驗組和只加入自來水作對照，在各組

表四 少量鹽酸對肉湯、大小便干擾碘消毒作用的影響

試 驗 成 份	作 用 時 間			
	5 分	10 分	30 分	20 小 時
動物大小便 2 毫升+菌+碘液* 2 毫升	++++	+++	++	+
動物大小便 2 毫升+10% HCl 0.1 毫升+菌+碘液 2 毫升	+	—	—	—
肉湯 2 毫升+菌+碘液 2 毫升	++	+	+	+
肉湯 2 毫升+10% HCl 0.1 毫升+菌+碘液 2 毫升	—	—	—	—
生理鹽液 2 毫升+菌+碘液 2 毫升	—	—	—	—

* 沒有註明稀釋度的碘液，濃度都是 1:1,000。



圖二 氫離子濃度負對數值和肉湯(有機物)對碘殺菌作用的影響
 表五 碘液對動物糞子中垃圾加入少量酸以後的殺菌作用

試 驗	成 分		在 20°C 一小時後， 剩餘活菌數	在 37°C, 24 小時以後，取一白耳接種 平板培養的結果
	10% 的 HCl	1:1,000 的 碘		
垃圾 + 大小便混合物				
20 毫 升	0.3 毫 升	30 毫 升	30 萬/毫升	炭疽菌+++
20 毫 升	0.9 毫 升	30 毫 升	32 萬/毫升	炭疽菌+++
20 毫 升	1.5 毫 升	30 毫 升	36 萬/毫升	炭疽菌+++
20 毫 升	1.5 毫 升	—*	36 萬/毫升	炭疽菌+雜菌+++

* 在不加碘的組內，代以自來水 30 毫升，作為對照。

之間，在減少芽胞生存率上，沒有能夠看到顯著的差別；而在 37°C，經歷 24 小時以後，各組也都能培養出大量的炭疽桿菌。見表五：

此外，我們還看到在不加碘，僅加酸的對照中，培養結果除炭疽菌外，還能看到大

量雜菌（包括枯草桿菌和其它革蘭氏陽性桿菌、各種球菌和類白喉桿菌）。但在加入碘的各組中，我們所獲得的便是純炭疽培養。可見在實驗中所用碘量，雖不能殺死以後加入的炭疽芽胞，但却能殺死垃圾和大小便中絕大部份的雜菌。

討 論

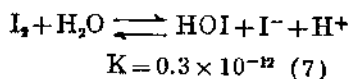
碘是大家熟悉的消毒劑，特別是它的 2—7% 酒精溶液。碘酒在臨床上，應用很廣。此外，從文獻上，也曾看到少數試用碘

作為飲水消毒劑的報道(8,9,10)。但是用稀的碘水溶液作為實驗室消毒劑，却極少見。我們試驗的結果證實了陳華粹氏等所

報道的很稀的碘水溶液能在很短的幾分鐘時間內殺死各種炭疽芽胞。而這些芽胞用5% 石碳酸和70% 乙醇，那末幾天也不能殺死(未報道的實驗材料)。上述的實驗結果對實驗室和獸醫工作人員在接觸到被炭疽菌污染的物件，以及進行緊急消毒措施方面，無疑地是有着很大的實用意義的。

在我們的實驗結果中，炭疽菌的繁殖體和芽胞對碘液的殺菌作用是同樣敏感的。這點和陳華粹氏等所報告的結果有所不同，分析這種實驗結果不同的原因，我們認為是在於兩地進行實驗中的繁殖體製備方法上的差別。我們試驗中的繁殖體是以瓊脂面上的培養物用無菌鹽液洗下來的，含有機物較少；而他們的試驗中所用的繁殖體是採用在大豆培養基中的懸液的，諒必含有機物較多。此外，在試驗時，他們的方法是1毫升碘液中加入0.1毫升菌液的，因此，估計可能相當於在試液中攪雜了大約10% 的肉湯；而在我們試驗10% 肉湯對碘液殺菌作用影響中，也看到碘液殺菌作用減少了大約4—8倍(圖一)。因此，我們認為陳華粹氏等觀察到繁殖體和芽胞在碘殺菌作用上有區別的原因，可能就是由於這少量的大豆培養基內所含的有機物起了作用，減少了同濃度碘液的殺菌力之故。

在我們的試驗中，看到有機物對碘的殺菌作用有着很大的影響。同時，也觀察到酸性環境能減少氮類有機物質對碘殺菌作用的影響。在文獻上，曾有碘在酸性環境中的殺菌作用較在鹼性環境中強^(9,10)的報道。有人解釋這種作用的差別，認為是由於碘在水中，是按下列公式進行水解的緣故：



因此，在較為鹼性的環境中，碘的水解平衡趨向於向公式右邊的方向移動，形成

更多的次碘酸。而次碘酸的殺菌作用只有等分子量元素碘的1/6⁽⁷⁾。此外，次碘酸更以 $3\text{HOI} \rightarrow \text{HIO}_3 + 2\text{H}^+ + 2\text{I}^-$ 的方式進行分解所產生的碘酸和碘化物，却完全不具殺菌作用。因而碘液的殺菌作用也就按分解程度而遞減。但是在文獻上，也有作者報道⁽⁹⁾：在他們的經驗中，氫離子濃度對數值對碘的殺菌作用沒有多大影響。至於酸性環境減少蛋白一類有機物質對碘殺菌的干擾作用的機能何在，我們不知道。推想起來，是會牽涉到幾方面的因素的。所以必須指出的，在我們的試驗有大量有機物存在條件下，即使加入一定量的酸(佔被消毒物0.3% 的濃鹽酸)，也不能恢復碘的殺菌作用。我們未發表的實驗材料，指出在給泥土中和夾雜多量垃圾和動物排泄物中的炭疽芽胞消毒時，等量的10% 甲醛水比較1:100 碘液強：前者能任一天內殺死上述條件下的炭疽芽胞；後者却是無效。

另外一點需要提出的，就是既然已知碘液的殺菌作用主要是在於溶液中的游離元素碘，而游離碘在水溶液中能產生一種很典型的橙黃顏色。游離碘的濃度和這顏色的深度成正比。又，碘的常見化合物和分解產物——像碘酸鹽和碘化物——一般是無色的，同時也是沒有殺菌作用的。因此，從理論上來講，在沒有其它有色物質干擾的條件下，一瓶碘液的殺菌作用，可以按它橙黃顏色的深淺來判斷它的強弱。在我們的實際工作中，也經常看到這種現象，例如在1:4,000 碘液中加入10% 的肉湯，那末液體顏色立即褪到和1:16,000 稀釋的碘液顏色相像；而二者殺菌效果也相等。又，假如在2 毫升1:1,000 的碘液中加入二滴2N NaOH，碘色就褪盡，而那液體的殺菌作用也完全喪失。也有個別例外情形：在0.01% 碘液中加入等克分子量的氫後，碘色雖然幾乎褪盡，但那種液體還保持一部