

P³² 標識チフス菌によるマウス生体内 分布に関する実験的研究

岡山大学医学部微生物学教室 (指導: 村上 栄教授)

中 島 忠 厚

〔昭和 34 年 7 月 20 日受稿〕

目 次

I. 序 言	緒 論
II. その 1. 基礎実験	実験材料及び実験方法
緒 論	実験成績
実験材料及び実験方法	小括及び考按
実験成績	IV. 結 論
小括及び考按	文 献
III. その 2. マウス生体内分布に関する実験	

I. 序 言

伝染病を理解するためには、宿主と寄生体との相関関係をあらゆる角度より検討把握することにある。かかる伝染病の成立を決定するものは、宿主の体内に入つてそこに第一次病巣を作るための侵入力、或いは感染力であり、この病巣から進展して、更に特有の病巣を呈する発症力である。この 2 者を決する条件は菌側からいえば毒力であり、宿主側からいえば種属による感受性、個体差、免疫等であるが、これも一概にはいえず、菌量、感染経路によつて大いに左右される。

著者は発症力に関する菌の各臓器への移動定着増殖に関して、各種経路による差異、時間的推移を追究する事は伝染病の本態を理解する上に重要な問題と考へ、又免疫の原理に近づく所以と考へる。

かかる各臓器における病毒量の推移に関する実験は、細菌学のみならず、ウイルス、リケッチャ学に於いても、屢々行われている方法である。細菌学方面では、特に結核菌においてこの種の研究が多く、宿主体内における生存増殖及び死滅の経過を追究するため、動物臓器より、菌の培養を行うことにより決定している。1928年 Lurie²⁾ が家兎を用いた実験を嚆矢として、Wessels³⁾、Fenners 等⁴⁾⁵⁾、小川等⁶⁾⁷⁾、水之江等⁸⁾、加藤等⁹⁾ がラッテ、マウス、家兎等を宿主として、数多くの興味深い研究を発表し

ている。この外の病菌においても、サルモネラ属、スピロヘーター等に関する文献が散見される。乍然上記の如き宿主動物の臓器を homogenize して一定量を培養方法によつて、菌数決定を行う場合は完全無菌操作によらねばならず、又適当濃度に稀釈を行う必要があり非常に誤差を生じやすい。その上得られた結果は、生菌数のみの測定結果が得られ、増殖不能、若しくは死滅菌は無視される結果となる。特に免疫動物における菌の分布を追求する場合には、免疫反応の結果、菌が死の転機をとる場合が多く、かかる場合には生菌数測定は不可能に近くなる。かく考えると、最近生物学研究に利用され出した Radioisotope を用いて菌を標識し、菌の行方を放射能を指標として、各臓器につき検索する場合は、既存の実験成績とは更に広範な、又新しい知見が得られるものと思考する。

しかし各種細菌を P³² 或は、I¹³¹ 等で標識し生体内分布を観察した実験は割合に少く、Ely¹⁰⁾ による大腸菌、黄色ブドウ球菌を P³² により標識して白鼠について行つた実験、Hevesy¹¹⁾ の結核菌を P³² で標識して行つた実験、Peasson¹²⁾ による糸状菌を I¹³¹ で標識して行つた実験、本邦では山村¹³⁾ の結核菌を P³² で標識せるもの、倉光等の連鎖球菌と同じく P³² で標識せるものによる実験である。

著者は P³² を培養基内に添加し、P³² 標識チフス菌としたものを用いて生体内分布の追求が如何に実

菌数と併行し得るや否やの基礎的研究を行い、又更には色々な接種ルートによる各臓器への分布状態及び時間的消長を検討した。又被免疫マウスに於ける菌分布も追求を行い、些かの知見を得たので結果を報告し御批判を仰ぐ次第である。

II. その1. 基礎実験

緒 論

P³² を以て標識菌とした実験は既述の如く Ely¹⁰⁾, Hevesy¹¹⁾, 山村¹³⁾ 倉光等¹⁴⁾ の報告があるが、サルモネラ属の諸菌における P³² 使用の実験は、三橋等¹⁵⁾ が僅かに行っているに過ぎない。よつて著者の企図した実験に於いても如何にして P³² をラベルした場合が最も長く附帯するか、又生体内接種を行つた場合何時間までそれを示標として追跡可能かが大きな問題となつてくる。かかる目的を以て試験管内実験、臓器内生菌数測定方法と併行して基礎実験を行つた。

実験材料及び実験方法

1) 実験材料

供試細菌・ 当教室保存の Sal. 57 S を常法により継代し純化を計り供試した。

P³² : 英国原子力会社より輸入せるもので H₃PO₄ の化学的性状のもので使用前にあたり pH を 7.2 に修正して使用に供した

2) 実験方法

P³² 標識菌作製法 : 供試菌をあらかじめブイオン液体培地に、18時間培養、液体培地へ順応せしめた菌を P³² 120 μc/100 cc になる如く添加せるブイオン培地に接種し、3時間又は18時間 incubate して P³² でラベルした。18時間培養を行う場合は、接種菌量は、ブイオン 100 cc に対して 1 mg 程度としたが、3時間培養の場合は、培養時間中の増菌が少ないため、実験使用量等を考慮して、100 mg 程度を投入した。又静菌状態でラベルする場合は 1/1000 mol 磷酸緩衝液中に P³² を添加し、更に基質として glucose を加えて2時間呼吸を行わしめた。かかる操作を行つた後、遠心沈澱して集菌し、菌塊を冷生理的食塩水にて2~3回攪拌洗滌し、これを生理的食塩水に均一に浮遊せしめて供試した。

動物体内 P³² 分布測定法

P³² 標識菌を接種し、一定時間後にエーテル麻醉により屠殺し、解剖して、所定臓器を採り、秤量した後に、硫・硝酸法により湿性灰化を行い¹⁶⁾、Mg-

mixture による磷モリブデン酸アンモンの沈澱とし、G-M counter で放射能を測定した。

動物体内生菌分布測定法

上記の方法にて得られた各臓器の一定量を、カッター付ホモジナイザーで3~5分均等乳剤とし、その一定量をとつて階段稀釈後、寒天培地に混釈培養を行い、24時間、48時間後に、その集落数を計算した。

実験成績

a) 試験管内実験

細菌を P³² でラベルする場合には、色々の方法が考えられる。例えば

① 静菌状態で P³² 添加磷酸緩衝液中に浮遊せしめ、1~2時間 incubate してラベルする方法、この場合 glucose 等適当に基質を加える事がある。

② 培養菌を処定量集め、これを P³² を添加したブイオン等の液体培地に投入し、2~3時間の短時間再培養を行いラベルする方法¹⁴⁾。

③ 初めより P³² 加ブイオン培地等に接種し18時間培養を行う方法等がある。

何れの方法も一長一短があるが、これらについて優劣を決定する意味で、比較実験を行つた。先づ生理的食塩水にて、洗滌する場合の P³² の上清への移行状態を実験し、表1に示す成績を得た。但し実

表1 各培養法による洗滌時 P³² 游出量の比較

ラベル方法	洗滌回	1	2	3	4
静菌状態 ラベル (2時間)		207	110	64	35
培養状態 ラベル (3時間)		215	58	29	12
培養状態 ラベル (18時間)		145	62	12	3

菌量・100 mg

験は常温にて行つた。

洗滌に使用した菌は一試料につき 100 mg (湿菌量)、数字は上清側に移行した P³² 量を示す。但しラベル時菌液より集菌直後の菌体内 P³² を 1,000 とす。

第1回洗滌上清の count 数が非常に多いのはラベル時溶媒の残存と菌体周囲に附着していたものの游出と考えられる。各ラベル方法の差異に洗滌回数を増すに従つて著明である。静菌状態にてラベルした場合は回数を重ねても、上清への移行 count 数の減少する場合が少く、他に比して非常に多い

count を示している。特に実験を常温で行つたために竹原¹⁶⁾ の実験に比して大量の游出をみている。培養状態ラベルは静菌の場合に比して2回洗滌より減少しており、回を重ねるに従つて Contamination 程度の価にまで達する。

培養3時間と、培養18時間を比較する場合は、後者の方が P³² の游出が少ない成績を得た。

次に P³² ラベル菌を 37°C にて incubate した場

合の P³² 游出実験を行つた。集菌後2回洗滌を行つた菌を供試し、又著者の企図する実験が動物体内実験であるため、浮游溶媒には健康家兎血清を生理的食塩水にて5倍稀釈せるものを用いた。

供試細菌は18時間培養ラベル菌と、3時間培養ラベル菌の両者のみとし、何れも生菌と死菌 (60°C 30分処理) の場合とを検討した

(血清は死菌処理後添加す)。

表 2 Incubate 時における P³² 游出実験

ラベル方法	Incubate 時間		元の菌体内量	死菌処理	1 時間	3 時間	6 時間	10 時間
	生死菌							
培養状態ラベル菌 18 時間	生菌		351 (100%)		45 (13%)	72 (21%)	111 (31%)	129 (37%)
	死菌		351	108 【243】 (100%)	121 【3】 (1%)	130 【12】 (5%)	139 【31】 (13%)	150 【42】 (17%)
培養状態ラベル菌 3 時間	生菌		354 (100%)		113 (32%)	133 (38%)	145 (41%)	174 (46%)
	死菌		354	144 【210】 (100%)	149 【5】 (2%)	160 【16】 (8%)	173 【29】 (14%)	172 【28】 (13%)

([]) は死菌処理にて游出せる count 数を差引いたもの 【 】 は死菌処理後の菌体内量

洗滌菌を 10 mg/cc になる如くし、三角コルペンに分注して、37°C のフラン器内に静置せしめ、30分毎に振盪を行つた。時間的に一定量を取り出し、高速遠心沈澱を行つて、上清中の P³² count 数を計測し、元の菌体内 count 数に対する比率を求めた。

なお死菌処理の場合は処理時に、上清中に移行する P³² が相当量あるため、成績には死菌処理後の菌体内 count 数に対する処理法の上清移行の count 数の比率を求めた。

18時間培養と、3時間培養を比較する場合、前者の方が、後者に比して游出の速度が遅い事が分り、incubate 6時間で、18時間生菌は31%、3時間生菌は41%の値を得た。

又生死菌を比較する場合は、死菌処理によつて元の P³² 量の 1/3 程度が速かに失われるが、その後の游出は生菌に比べて非常に緩徐であり、10時間で13~17%程度の游出のみであつた。

以上の実験成績より18時間培養ラベル菌 > 3時間培養ラベル菌 > 静菌状態ラベル菌の順に游離し難い

事が判つた。これ等の原因は P³² の入り込む場所が問題になつて来る。よつてこれ等のラベル方法によつて P³² の Incorporation の様相を、Schneider 法により酸溶性磷、脂質磷、核酸+蛋白磷に分けて検討した。生理的食塩水にて2回洗滌せるものを供試して分割を行い、各分割への Incorporation を%にて示した。

表3に示す如く、静菌状態のものは、殆んどが酸

表 3 P³² ラベル条件による各磷分割への P³² Incorporation

	酸溶性磷	脂質磷	核酸及び蛋白磷
18 時間 培養ラベル菌	36%	10%	54%
3 時間 培養ラベル菌	53%	9%	38%
静菌状態ラベル菌 (基質 glucose)	83%	10%	7%

溶性磷であり、脂質磷以下は20%以下であつた。培養状態にてラベルした菌は、核酸及び蛋白磷への incorporate が著明に増大しており、特に18時間培

養のものは50%以上がこの分劃に入っている事が判明した。

b) 動物体内実験

試験管内実験による P^{32} 游離の検討の結果より、 P^{32} ラベル菌を使用する場合は18時間培養ラベル菌が最も適当と認められるので、これを供試菌としてマウスを用いて生体内実験を試みた。a) に於けると同様の方法にて P^{32} のラベルを行つた。標識後3回洗滌して、マウスに接種し時間的に屠殺後、各臓器における P^{32} 量の測定と、生菌数測定とを併行して行い両者を比較検討して追跡可能域を想定せんとした。菌接種ルートは、腹腔内及び尾静脈内の2法を選び、実験臓器は肺、肝、脾、腎を選んだ。成績は P^{32} count 数は臓器単位重量当りの count

数に換算し、生菌数は 10^{-5} 希釈の価をそのまま単位重量当りの数に換算し、同一実験例毎に比較し得るようにして図示した。

腹腔内接種における成績は、図1に示す如くである。肺についてみると、 P^{32} count 数は4~5時間を頂点として緩やかな曲線をたどり、一方菌数の方は6時間頃までは count 数曲線と平行するが、その後は急速に上昇曲線をたどっている。肝に於いては P^{32} count 数は3時間までは増加し、その後は増減があまりなく定常状態を維持している。菌数はこれに反して5時間以後急激に減少している。脾においては P^{32} 量は3時間まで急上昇して、その後は長時間に亘つて僅かずつ増加した結果が得られ、菌数は前二者の臓器より傾向を異にし、3時間目にピーク

を有する曲線を示し、5時間辺りで激減しその後再び菌数は増加する結果が得られた。

腎においては P^{32} count 数は3時間にピークを有しており、その後は減少して一定の値を保っている。

次に尾静脈内接種の場合に於ける成績は図2に示す如くである。腹腔内接種の場合に比して、1時間値以後の変動が少ないのは、接種ルートが静脈内であるため1時間値（これを実験例の最初にしてある）において既に定常状態に達しているためと考えられる。 P^{32} count 数についてみると、1時間より8時間に至る間は大した変動がなく、長時間観察すると肝を除いては徐々に減少する結果が得られた。菌数は何れの臓器においても1時間でかなりの高値を示し、その後4~6時間でやや減少した後に徐々に増加する傾向を示した。

以上の成績でマウス生体内に接種した場合各臓器における生菌数が一時減少し、後速かに増加する成績を得たため、全身ホモジナイズ法によつて生菌数の推移を検討した。腹腔内、静脈内共に 5 mg/cc 菌液 0.1 cc を

図1 P^{32} 標識菌腹腔内接種に於ける P^{32} count 数と生菌数の推移

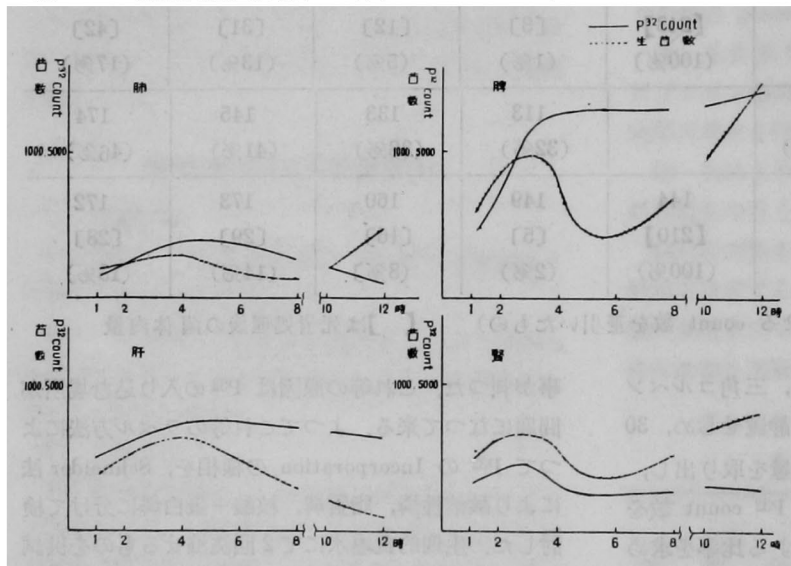
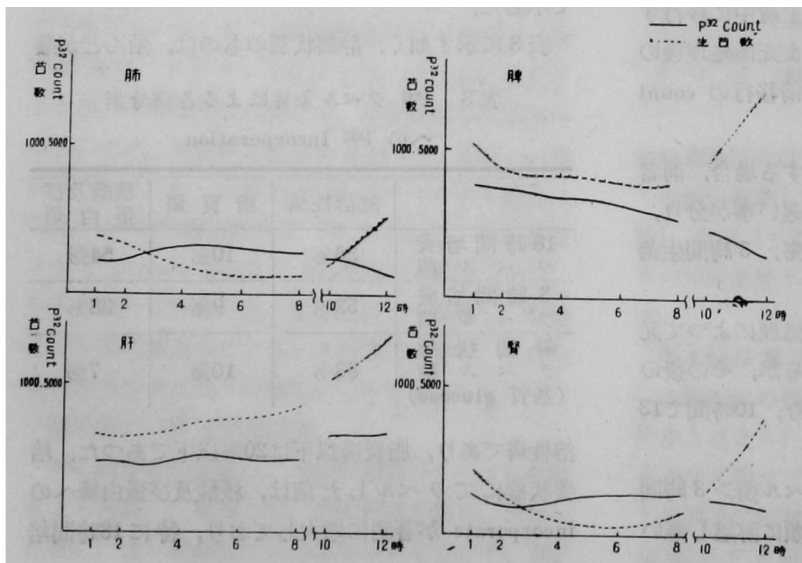


図2 P^{32} 標識菌静脈内接種に於ける P^{32} count 数と生菌数の推移



接種した。

全身ホモジナイズを行う関係で、マウスは幼弱なものを選んで行つたため、他の実験の場合とは幾分異なる危惧はあるが、下記の如き成績を得た。

表3 マウス全身内における生菌数の推移

	直後	1時間	2時間	4時間	6時間	12時間
腹腔内接種	++	++	++	+	++	+++
静脈内接種	++	++	+	+	++	++

即ち4時間前後で、生菌数の減少を来し、6時間以後において、急激な増加を認めた。次に基礎的対照としてP³²のみ(1匹について1μc)を注射し各臓器へのIncorporationを単位重量当りで図示した(図3, 4)。

図3 P³²のみ腹腔内注射に於ける各臓器への分布

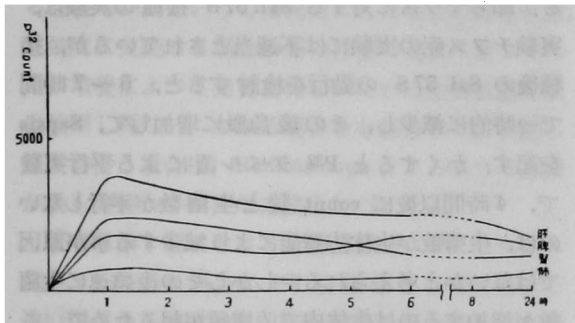
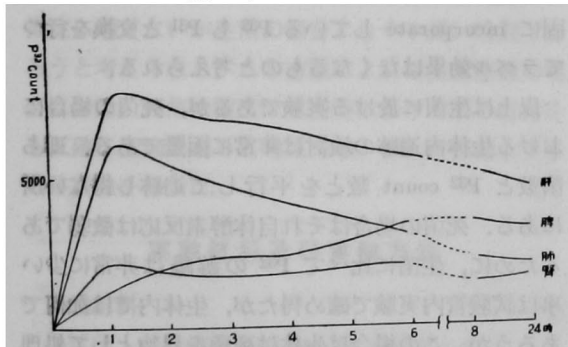


図4 P³²のみ静脈内注射に於ける各臓器への分布



腹腔内注射の場合は1時間ですでに高い値を示し、count数は肝、腎、脾、肺の順であり、P³²ラベル菌接種の場合とはやや趣きを異にした。又静脈内注射の場合は菌接種の場合と同様1時間で高値を示ししかしP³² count数は肝、肺において高く、脾、肺は低く同程度の値を示した。

小 括 及 び 考 按

既述の如く、細菌をRadioisotopeで標識して、これをもつて細菌の体内分布を追求する場合には、

如何にしてラベルし、如何なる時間までこれを指標として追い得るかが問題となる。かかる点を解決するために、著者は上記の如き実験を行つた次第である。

すでに今までに単細胞のものをRadioisotopeでラベルし追跡する実験は、各人によりその目的に従つて色々の方法が用いられている。例えば、循環血液量の測定に血球標識を行う方法が好んで用いられているが、Nylin¹⁷⁾、小林等¹⁸⁾、笹本等¹⁹⁾は、採血後の血液を試験管内にてP³²を投入して、37°Cで2時間振盪して、ラベルする方法を応用している。そしてかかる方法でラベルした血球を、体内に注入した場合、Nylinは、60分までは流血中での放射能が一定であるといい、笹本等は、5~10分後からは一つの指数曲線をなして減少すると述べている。非常に短時間しか追跡可能でないのであるが、流血量測定ではこれで充分目的が達せられる。P³²以外のFe⁵⁵、Fe⁵⁹、Cr⁵¹等も同様な方法で試みられているが²⁰⁾、Sterling²¹⁾は特に遊離しがたいのはCr⁵¹であると報告している。他の方法としてはP³²、Fe⁵⁵、Cr⁵⁹等を生体内流血中に注入して、一定時間的にラベルされた赤血球を採血して供試する方法も行われ、この方がより結合が強固であると報告した例もある。

細菌における実験報告としては、Ely¹⁰⁾がP³²含有培地培養法による大腸菌、黄色ブドウ球菌のラベルを行い追跡を行う場合6~7時間の追求が可能であろうと述べている。又Person¹²⁾はI¹³¹を以て48時間から120時間の培養を行い、糸状菌その他の菌をラベルして、犬における実験で注射後30分より14時間について検索を行い、菌は大体4時間以内にI¹³¹を離すものの如く報告している。又Hevesy¹¹⁾、本邦では山村等¹³⁾が、結核菌の感染経路、体内分布の研究において、培地にP³²を入れ長時間培養を行つてラベルした菌につき、4週間追跡を行つている。又倉光等¹⁴⁾は3時間培養によりP³²をラベルした緑膿菌、溶連菌で基礎的実験を行い、生体内では6時間後にはP³²がかなり遊離するために、それ以後は菌分布と相違すると報告している。

著者の試験管内実験における成績を検討してみると、ラベルする方法により遊離する程度がかなり異なっている。常温下における生理的食塩水による洗滌によつて、上清中に移行するP³²量が、第1回洗滌では何れのラベル法によつてもかなり多い。これは集菌直後であるために、培養の残余と菌表面に附

着している P^{32} によるものと考えられ、その後洗滌回数を増すに従つて上清に移行する P^{32} は元の菌体内 P^{32} 量 (第1回洗滌以後を指す) よりすると静菌状態ラベル菌では $\frac{1}{3}$ が遊離している事になり、18時間培養ラベル菌は最も游出量が少い。これは Schneider 法による磷分劃実験成績で、静菌状態ラベル菌では、酸溶性磷が80%以上を占めており、この中には無機磷、不安定な磷化合物等が含まれるためにこれが遊離すると考えられ、追跡実験には不相当と考えられる。

次に培養ラベル菌を用いて、incubate 時において游出する P^{32} 量の比較実験を行つた。生菌においては長時間 incubate を行えば徐々に遊離してゆく。洗滌後の菌であれば、かなり安定な磷化合物として P^{32} は含まれるのであるから、物理的に水溶液中の磷と交換される事はないが、生菌では酵素反応が行われるために、菌体外の磷と交換が行われて P^{32} は菌体外に游出してゆく。これに反して死菌においては酵素反応が営まれないために試験管内実験では、 P^{32} 游出量が非常に少いと考えられ、著者の得た成績でもこれを証する事が出来る。

然し死菌処理によつて、菌体内にラベルされた P^{32} が大量放出されているために、使用前に更に遠沈して再浮遊せしめて使用する必要がある。死菌に於ても少量の游出がみられるのは死菌処理により分離した磷や、一部酵素反応が残存するためであろうと考えられる。

著者の得た成績より、生菌、死菌何れの場合にも18時間培養ラベル菌の方が P^{32} の游出は少い事が判り、Schneider 法による各磷分劃への P^{32} incorporation は18時間培養ラベル菌は、核酸磷、蛋白磷へ大量に incorporation しているために、かかる成績が得られたと思考する。3時間培養ラベル菌を用いた例は、倉光が供試菌中の死菌の数を可及的少なくするためには3時間培養の方が良好なことを述べている。

然し P^{32} の結合状態からいえば、18時間培養の方が強力であり 著者は今後の実験は18時間培養ラベル菌のみを使用した。次にマウス生体内実験で、基本的対照として P^{32} のみを注射した実験と P^{32} ラベル菌を接種した場合とでは各臓器への P^{32} incorporation は様相を異にしていた。即ち P^{32} のみを注射した場合は腹腔内、静脈内何れの場合も肝に最も多く、これに反して P^{32} ラベル菌の場合は脾に最も多く、又 P^{32} のみ腹腔内注射をした場合は、

各臓器への incorporation が急増している所などより、 P^{32} ラベル菌は特異な移動をなし、追跡的效果は充分あると考えられる。

次にこの追跡的效果を時間的に検討してみた。腹腔内接種の場合を見ると、いづれの臓器においても両者が平行して増加するのは、4時間頃までであり、その後菌は一時的に減少し、その後急速に増加する。これに反して P^{32} 量は磷含有量の多い肝、脾等においては徐々に増加する結果が得られている。静脈内接種においても、これと大体類似した成績が得られ P^{32} count 数と、生菌数が平行するのは、4時間頃までであつた。

生菌数の測定結果で、4時間を過ぎる頃から一次的に減少して、その後7~8時間頃より急激に増加しているが、この傾向はマウス全身ホモジナイズ法による菌数測定によつても同様の成績が得られている。即ちマウスに対する Sal. 57 S 接種の実験は、実験チフス症の実験には不相当とされているが、接種後の Sal. 57 S の動行を検討すると、5~7時間で一時的に減少し、その後急激に増加して、Sepsis を起す。かくすると P^{32} ラベル菌による平行実験で、4時間以後に count 数と生菌数が平行しないのは、生菌数が生体防禦能により減少する事が原因ではないかと考えられる。しかしその後急速に生菌数が増加するのは生体内で菌増殖が起るためで、これ以後になると増殖のための代謝回転が盛んで、強固に incorporate している P^{32} も P^{31} と交換を行つてラベル効果はなくなるものと考えられる。

以上は生菌に於ける実験であるが、死菌の場合における生体内追跡の検討は非常に困難である。即ち菌数と P^{32} count 数とを平行して追跡し得ない所にある。死菌の場合はそれ自体酵素反応は微弱であるために、生菌に比べて P^{32} の遊離は非常に少い事は試験管内実験で確め得たが、生体内では如何であろうか。この場合は生体は死菌を異物として処理し、その後に生体側の酵素が働いて P^{32} の遊離が増加するであろうが、菌体が高分子物質で出来ているために、高等動物の細胞でそう簡単には分解して下る事はないと考えられ、結局生体内に於いても死菌の場合は、生菌よりも長時間追跡可能なのではないかと思考する。山村等¹³⁾ の結核菌による実験ではかかる想定に基いて死菌を用いて追跡を行つていゝ。免疫動物に当該菌を接種した場合 (免疫の場を攻撃の場で幾分異なる) には、短時間の内に生菌数は減少を来たすが、この場合の菌は酵素反応は失われ

ないが、その後の増殖はみられず、正常動物に生菌を接種した場合と同様、或はそれ以上追跡可能でないかと考える。

以上より P³² で Sal. 57S をラベルして、生体内追跡を行う場合は、培養基内に P³² を添加し、18時間培養後によりラベルすれば、接種後6時間頃までは追跡し得るのではないかと推定する。

Ⅲ. その2. マウス生体内分布に関する実験

緒 論

細菌感染における各臓器への侵入の様相は、今までの方法としては、各臓器のホモジナイズ法による生菌数測定による以外は適当な方法がなかった。然しこの方法では高希釈を行うために非常な誤差を生ずる惧れがあり、この方法ではかなり制約を受けざるを得ない。というのは死菌にした場合の分布状態、又強度に免疫せる場合の菌の行方の追求に至つては菌が培養によつて発育し得ないために生菌数測定法は使用し得ない。かかる場合をも包含して広範囲の実験を行う場合は、Radioisotope によるラベル方法が最も簡便かつ確実な方法となつてくる。

著者は第1編における基礎実験で、P³² でチフス菌をラベルした場合に P³² を指標として何時まで追いつけるかを検討した。即ち接種の場合は5~6時間追跡しうることが判つた。又死菌にせる場合には推定に過ぎないが生菌の場合よりやや長い時間であろうと考えられる。この方法によれば生菌接種の場合は勿論、死菌接種又は免疫時における菌の行方をも正確に把握出来ると考えられ、P³² を指標とする追跡実験を行つた。

実験材料及び実験方法

実験材料

供試菌： 教室保存の Sal. 57 を供試した。

P³²： 英国原子力会社より輸入せるもので H₃PO₄ の化学的性状のもので使用前に当り pH 7.2 に修正を行つて使用した。

実験方法

P³² 標識菌作製法： 予め供試細菌をブイオン培地に培養を行い、液体培地に馴化せしめたものを Stamm として用い、P³² を 50 μc/100 cc になる如く含有せるブイオン培地に接種し、18時間培養を行う。これを遠心沈澱法によつて集菌し、その後生理的食塩水により3回洗滌を行い、最後に 5 mg/cc

(静脈内接種用としては 15 mg/cc と高濃度にした) になる如く生理的食塩水に均等浮游液を作つた。又死菌を得るには、かかる浮游液を試験管に入れ、Wasserbad を用いて 60°C 30分の加熱操作を行い、その後一度遠心沈澱して再び元の量の生理的食塩水に浮游せしめた。マウスへの接種量は何れも1匹当り菌にして 1.5 mg とした。

マウス免疫群の作り方： マウス腹腔内接種を行つて数代動物通過をせしめた菌を普通寒天培地に18時間培養せるものを集菌後使用した。先づ生理的食塩水に 0.5 mg/cc なる如く浮游せしめ、60°C 20分加熱処理を行つて死菌とせしめ、この菌液 0.3 cc を実験に供試するマウス腹腔内に接種し、この操作を4日目毎に6回行つて免疫を行つた。

マウス各臓器における P³² 測定法： 規定時間後マウス(実験例には2~3匹を用いて生物誤差を少なくした)をエーテル麻酔死せしめ、解剖を行い肺、肝、脾、腎を摘出した。

摘出後適量の生理的食塩水です早く洗滌し、濾紙上で余分の水分を除いた上湿量を秤量した。しかる後臓器はキュエルダールコルベンに入れ、硫硝酸法による湿性灰化を行つて、Mg-mixture による磷モリブデン酸アンモンの沈澱を作り、GM 計数管で P³² count 数測定を行つた。

実験成績

各臓器に含まれる P³² を計測するに当つては試料採取時に湿量を正確に秤量しておき、P³² count 数計測後、単位重量当りの count 数/3 min. に換算し、なお接種菌液中の P³² count 数を2万としてそれに対する P³² count 数に換算して図示し各実験例相互間の比較を便利ならしめた。接種後の屠殺時間は1時間、2時間、3時間、4時間、6時間、8時間を選んだ。

a) 正常マウスにおける実験成績

18時間培養法による P³² ラベル Sal. 57S を正常マウスに腹腔内、尾静脈内、皮下、経口接種を行い、時間的に各臓器への P³² 移行状態を検索した。

腹腔内接種を行つた場合は図5に示す如く各臓器とも徐々に count 数の増加を認めた。大体3時間まで徐々に増加を来し、その後は非常に緩徐であつた。最も多い臓器は脾であり、次で肝の順であつた。尾静脈内に接種した場合は、図6に示す如く1時間値において、殆んど最高値を呈するに至る。特に腹腔内接種の場合に incorporate が小であつた肺にお

図5 P³² 標識菌腹腔内接種に於ける各臓器への分布 (正常マウス)

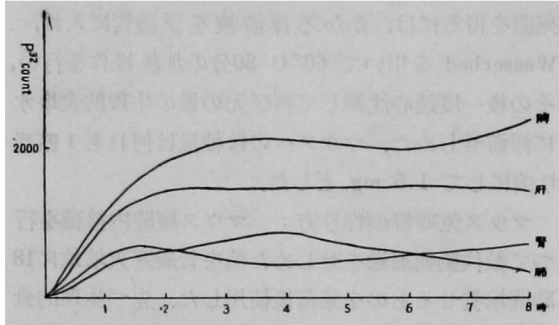
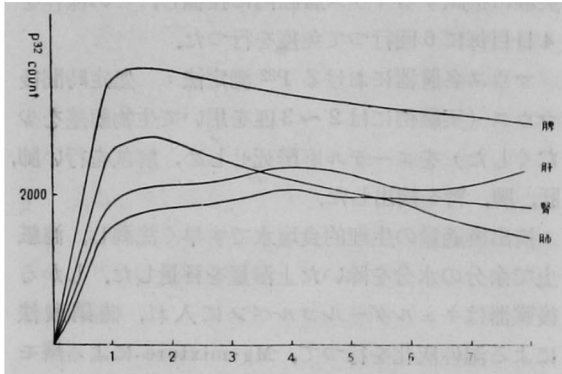


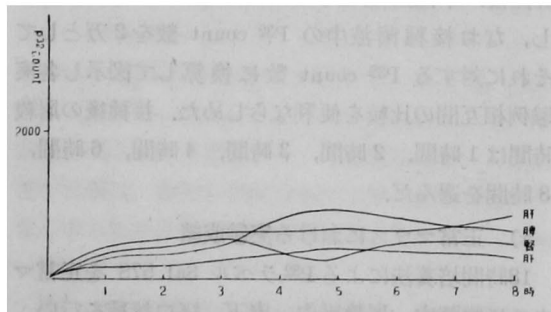
図6 P³² 標識菌静脈内接種に於ける各臓器への分布 (正常マウス)



いて、1時間値が高くその後徐々に減少する。腎においても count 数は肝と同程度の値を示している。

次に P³² ラベル Sal. 57S の皮下接種法を行つた (図7)。即ち 7.5 mg/cc の液を調整し、0.2 cc を

図7 P³² 標識菌皮下接種に於ける各臓器への分布 (正常マウス)



正常マウスの腹部皮下に接種した。この場合は各臓器への P³² の incorporate が非常に低く、数時間に亘つて徐々に増加す。なお皮下接種を行つた部位を小窓を開けた鉛板を通して、局部的に G-M 管で計測を行つてみると、数時間後も大部分が残留している成績が得られ、各臓器への到達は非常に困難であるようである。

以上は P³² ラベル Sal. 57S は、生菌のままて接

種を行つたのであるが、次に 60°C 30分を加熱処理を行つて、死菌とせしめたものの接種実験を行つた。生菌の場合におけると同じく、菌液を調整し加熱を行つた後、1回遠心沈殿により游出 P³² を除き、再浮遊せしめたものを接種した。

腹腔内接種における成績は、図8に示す如くであるが、何れの臓器においても、生菌接種の場合に比して低値を示している。しかも各臓器における P³² 量の増加がやや遅れて4~5時間でお増加する成績を得た。臓器別にみると脾が最も多く、8時間まで常に増加する傾向を示し、次が肝であつた。静脈内接種を行つた場合は、各臓器共に1時間で高値を示し、生菌接種の場合と大差のない P³² incorporate を示し、1時間値の価が殆んど変化なく持続する。腎のみにおいては、4時間頃まで徐々に増加する成績が得られた。

図8 P³² 標識死菌腹腔内接種に於ける各臓器への分布 (正常マウス)

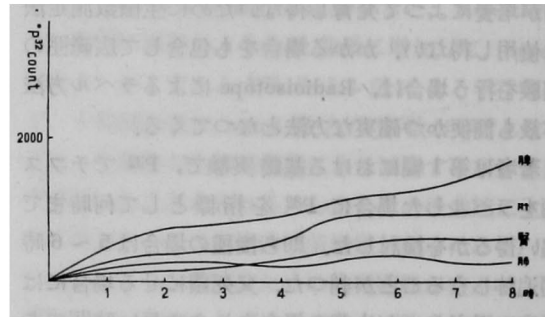
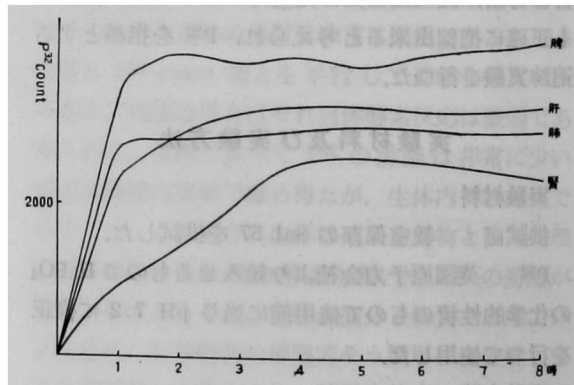


図9 P³² 標識死菌静脈内接種に於ける各臓器への分布 (正常マウス)



b) 免疫マウスにおける実験成績

実験方法にて述べた如く、腹腔を免疫の場として、死菌免疫を行い免疫後約2週間飼育したマウスを実験動物として、供試前に免疫群より無選択的に取り出し、血清の少量を採取し凝集反応を試みた。その成績は次の如くであつた。

表4 凝集反応成績

血清 希釈度	50×	100×	200×	400×	600×	1200×	2400×
判定	++	++	++	+	±	-	-

かかる免疫群に Sal. 57S (P³² ラベル) の腹腔内接種によつて攻撃を行つた。各臓器における P³² の count 数は、図10に示す如くであつた。

脾に最も多い分布状態が認められたが、正常マウスにおける成績に比して各臓器共 P³² 量は少く、最高値に達するまでにかかなりの時間を要している。

図10 P³² 標識菌腹腔内接種に於ける各臓器への分布 (免疫マウス)

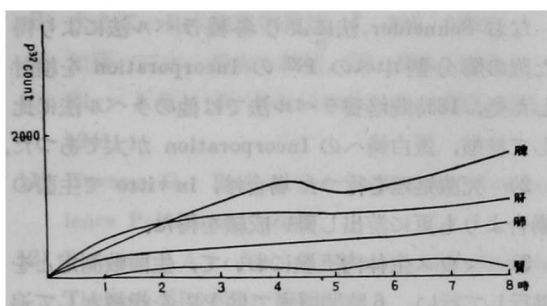
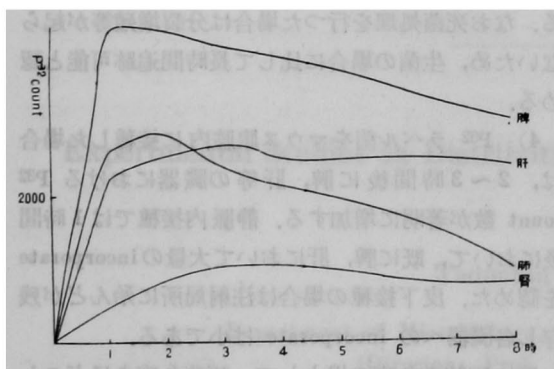


図11 P³² 標識菌静脈内接種に於ける各臓器への分布 (免疫マウス)



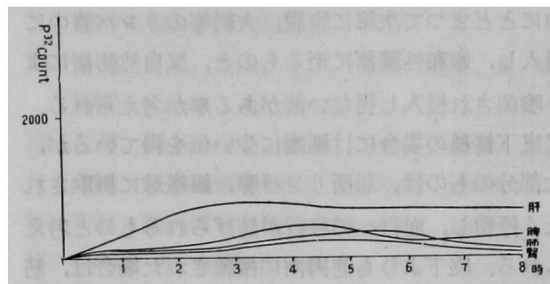
静脈内接種の場合は、他の実験の場合と同じく1時間目で非常に高い値を示している。

脾における count 数は最も多く、次が肺、肝の順であるが、肺における count 数はその後漸減する傾向を示した。又腎における count 数は、正常マウス群における場合よりも低い値が得られた。

皮下接種を行つた場合は、正常マウス群における実験成績と同じく、何れも低い count 数を得、肝において僅かに高い成績を得たが正常マウス群における成績と有意の差は認められなかつた。

なお、これら免疫マウス群において、各臓器における生菌数測定を試みたが、腹腔内接種においては、

図12 P³² 標識菌皮下接種に於ける各臓器への分布 (免疫マウス)



全く生菌数を認めず、尾静脈内接種において、肝に僅かに生菌を認めたのみであつた。

小括及び考按

感染症を理解する上において、菌の感染から発症に至るまでの菌の動行を探索する事は重要な事であり、更に免疫の場、攻撃の場の組合せによつて菌の分布状態を追求する事は、免疫学を理解する上においても、極めて重要な事である。しかしながら、著者の企図したような腸内細菌の感染において実験的に challenge する場を、腹腔内、静脈内、皮下等の経路を選ぶことは、実際的には稀有の事実であり適当とは考えられない。しかし、経口投与された菌も腸粘膜より侵入し、リンパ管を通つて脾、肝リンパ管等の親和性のある臓器に侵入して行き全身感染を起すに至る。腹腔内に接種された場合、又静脈内接種においても、前者とは幾分異なる様相を呈するが、最終的には親和性臓器内の網内系細胞内に侵入して定着する。然し腹腔内接種、静脈内接種は経口接種に比して極めて定量的な実験が行い得る利点がある。又免疫を腹腔を場として行つて、攻撃の経路を異にした場合の差異の研究をも併せ行い、免疫機序の一端を窺うために腹腔内、静脈内、皮下の接種法を採用して実験を行つた。又マウスに対して Sal. 57S を選んだのは著者の実験が基礎的なものであり、可及的誤差を少なくするために大量菌の接種を可能ならしめる事、又接種後の菌が腸炎菌等に比して増殖等の変動が少ない点があるために採用した。

著者の得た実験成績よりすると、3経路による攻撃で、各臓器への分布状態は、静脈内接種は1時間後において著明な増加を認める。

静脈内に接種された菌は、敗血症の状態で全身をまわり、親和性臓器、殊に脾、肝等の網内系細胞に異物として接種され定着するものと考えられる。

腹腔内接種の場合は静脈内接種に比して、各臓器

への分布が少く、又時間的にもかなり遅れる。これは接種経路の点から考えても明かな事であり、腹腔内にとどまつて次第に腹膜、大網等のリンパ管中に侵入し、親和性臓器に至るものと、又自然防衛により喰菌され侵入し得ない菌がある事が考えられる。又皮下接種の場合には極端に低い価を得ているが、大部分のものは、局所リンパ腺、組織球に摂取され永く停留し、血行への移行が妨げられるものと考えられる。皮下よりも筋肉内に接種された場合は、筋肉の収縮により、リンパ流の速度が大なるために、皮下の場合よりも各臓器への侵入が速かであり、皮下はもつとも各臓器への侵入が少く遅いことを、安東等²²⁾も報告している。

次に免疫マウス群における実験成績であるが、攻撃を腹腔内に選んだ場合は、正常マウス群におけるよりも非常に低い価が得られ、静脈内接種の場合は正常マウス群における成績と著差はなく、親和性臓器殊に脾、肝にやや高値を示したのみである。

腹部を免疫の場として大量の死菌免疫を行う場合は菌量も多く、又停滞が長いために(著者の死菌接種実験においても推察する事が出来た)腹腔内に炎症性変化が生じ、ひきつづいて抗体産生が惹起されて高度の局所免疫が成立する。三橋²³⁾はチフス症の実験において、防衛機構を便宜的に、非游走細胞、液性因子等による第一次防衛機構と、網内系、液性因子による第二次防衛機構とに分けて考えている。そして腹腔内に死菌免疫を行つた場合は、第一次の防衛機構が腹腔において強く成立し、ついでこれより弱い第二次防衛機構が成立すると述べている。よつてこの説により著者の実験を考察すると、腹腔内へ攻撃を行つた場合は抗体の作用と相俟つて、体側、臓器側腹膜、大網及び浸出する細胞等によつて菌は喰菌されて、腹腔から他の臓器への侵入を妨げられるものと考えられる。この防衛を突破した菌(著者の場合大量をもつて攻撃しているため)は全身をまわり、第二次防衛機構により、脾、肝等に定着すると考えられる。

次に静脈内を攻撃の場とした場合は、主として弱い第二次防衛機構によるために、正常マウス菌と同様に親和性臓器に一応侵入し、防衛にあづかる網内系とか、Sinus 中の浮游細胞等に捕獲されて、脾、肝ことに脾において初期より高値を示す成績を得たものと思ふ。

IV. 結 論

P₃₂ を用いて Sal. 57S をラベルし、放射能を指標として追跡する場合の基礎的実験、並びにマウス体内における追跡実験を行い次の如き成績を得た。

1) P₃₂ を用いて、Sal. 57S をラベルするに際し静菌状態ラベル法、3時間培養ラベル法、18時間培養ラベル法の3法を行い、P₃₂ と菌体の結合状態を観察した。ラベルした菌体の洗滌及び Incubation による P₃₂ の離脱は in vitro においては静菌状態ラベル法が最も大であり、3時間培養ラベル法がこれに次ぎ、18時間培養ラベル法は最も離脱が行われ難い。

なお Schneider 法により各種ラベル法により得た菌の磷分割中への P₃₂ の Incorporation を検討した処、18時間培養ラベル法では他のラベル法に比して核酸、蛋白磷への Incorporation が大であつた。

2) 死菌処理を行つた場合は、in vitro で生菌の場合よりも更に游出し難い成績を得た。

3) マウス生体内実験において、生菌数測定とを併行して行い、6時間頃までは P₃₂ を指標として追跡し得ることを認めた。その後は菌の分裂増殖力が盛んになるために、P₃₂ が游出するものと考えられる。なお死菌処理を行つた場合は分裂増殖等が起らないため、生菌の場合に比して長時間追跡可能と認める。

4) P₃₂ ラベル菌をマウス腹腔内に接種した場合は、2~3時間後に脾、肝等の臓器における P₃₂ count 数が著明に増加する。静脈内接種では1時間後において、既に脾、肝において大量の incorporate を認めた。皮下接種の場合は注射局所に殆んどが残存し各臓器への incorporate は小である。

5) 腹腔を免疫の場として、死菌免疫をほどとした免疫群に対して、腹腔内攻撃を行つた場合は各臓器への侵入が強く妨げられる。静脈内攻撃を行つた場合は、正常マウス群に対するものと有意の差は認められず、脾において僅かに多い incorporate を認めた。

稿を終るにあたり、御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師村上教授に衷心より感謝すると共に、実験にあつて援助を頂いた柿木寿太氏に謝意を表します。

文 献

- 1) Oershow, J.: *Z. Immun.*, **98**, 174, 1940.
- 2) Lurie, M. B.: *J. exp. med.*, **48**, 155, 1928.
- 3) Wessels, C. C.: *Am. Rev. Tuberc.*, **43**, 459, 1941.
- 4) Fenner, F.: *Am. Rev. Tuberc.*, **64**, 353, 1951.
- 5) Fenner, F. & Leach, R. H.: *Am. Rev. Tuberc.*, **68**, 321, 342, 1953.
- 6) 小川, 工藤, 高倉, 岩崎, 橋本, 村瀬: *結核*, **25**, 647, 1950.
- 7) 小川: *結核*, **25**, 302, 1950.
- 8) 水之江: *日本細菌学雑誌*, **7**, 195, 1952.
- 9) 加藤, 三木, 松永: *結核*, **30**, 638, 1955.
- 10) Ely, J. O.: *J. Franklin Inst.*, **232**, 385, 1941.
- 11) Hevesy, G.: *Radioactive Indicators*. Interscience Publishers, 1948.
- 12) Person, I. A.: *Am. J. Roent. and Radium Therapy* **61**, 836, 1949.
- 13) 山村, 吉田, 菩提寺, 永管: 第6回厚生省医務局研究発表会, 1951.
- 14) 倉光, 沢地, 秋山, 木下, 手島: *医療*, **6**, 496, 1952.
- 15) 三橋, 川上, 山口, 永井, 今村, 小此木, 深井, 石塚: *日本細菌学雑誌*, **13**, 1037, 1958.
- 16) 竹原: *岡山医学会雑誌*, **70**, 4267, 1958.
- 17) Nylin, G. & Hedlund, S.: *Am. Heart J.*, **37**, 543, 1949.
- 18) 小林, 中西, 小林: *アイソトープ研究利用総覧*, **217**, 1956.
- 19) 笹本, 細野: *アイソトープ研究利用総覧*, **221**, 1956.
- 20) Hahn, P. E., Balfour, W. M., Ross, J. F., Bale, W. F. & Whipple, G. H., *Science* **93**, 87, 1941.
- 21) Sterling, K. & Gray, S.: *J. Clin. Invest.*, **29**, 16, 1950.
- 22) 安東: *感染と免疫*, **248**.
- 23) 三橋, 川上, 山口, 永井, 今村, 小此木, 深井, *日本細菌学雑誌*, **13**, 1081, 1958.

Experimental Studies on Distribution of P³² Labeled Salmonella in Mouse.

By

Tadaatsu NAKASHIMA

Department of Microbiology, Okayama University Medical School
(Director: Prof. Dr. Sakae MURAKAMI)

In order to ascertain the distribution of the bacteria introduced into an animal body by tracing radioactivity of radioisotope labeled organism, the author studied the properties of P³² labeled S₂₁. 57 S and the distribution of radioactivity in mouse that imply the presence of the organism. The following results were obtained.

1) To obtain an appropriate organism for the investigation, the author observed the stability of bound radioactivity on the cells that were obtained by three different labeling methods. i. e. on resting cells, on 3 hrs cultured cells and on 18 hrs cultured cells respectively. Concerning to dissociation of radioactivity from labeled cells by repeated washing or incubation of the cells, it was noticed in vitro that the labeling on resting cells was most labile, then came next the labeling on 3 hrs cultured cells, but that on 18 hrs cultured cells was most stable. Moreover, the study of P³² incorporation into phosphorus fractions of the cells by Schneider's method showed the marked incorporation of P³² into nucleic acid and protein fractions by the labeling on 18 hrs cultured cells compared with other labelings.

2) The radioactivity of labeled cells was observed to be stable in vitro compared with

living cells, when the labeled cell was killed by application of heat.

3) From the observation of interrelation between the presence of living cells and the radioactivity in the body of mouse, it could be said that the presence of bacteria could be traced out by detection of radioactivity within 6 hrs after injection and that the situation became to be disturbed beyond that time possibly owing to the dissociation of P^{32} from the organisms caused by metabolism and divisions of the cells. While in the case of killed organism the situation was remained undisturbed for a fairly long time than in the case of living cells for absence of metabolism and division of the cells.

4) When the labeled organism was injected intraperitoneally into mouse, it was observed the marked accumulation of radioactivity on spleen and liver of the animal 2—3 hrs after the injection. In the case of intravenous injection, a conspicuous accumulation was occurred even 1 hr after the injection. However, by subcutaneous injection the radioactivity did not spread out into the body and remained the site of injection for a fairly long time.

5) In the study on a group of previously immunized mouse by a intraperitoneal injection of killed organisms, a wide distribution of radioactivity into the body of animals was inhibited by the intraperitoneal challenge of the labeled cells. While, the distribution was almost the same as the control group excepting slightly increased accumulation of radioactivity into the spleen by the intravenous challenge of the labeled cells.
