

P³² 標識チフス菌に依るマウス生体内分布に関する 実験的研究（補遺）特に長時間追跡に就いて

岡山大学医学部微生物学教室（指導：村上 栄教授）

中 島 忠 厚
茎 田 芳 明
神 内 義 数
田 中 種 徳
金 政 泰 弘

〔昭和 34 年 8 月 11 日受稿〕

目 次

I. 序 言	IV. 吟 味
II. 実験材料及び実験方法	V. 結 論
III. 実験成績	VI. 文 献

I. 序 言

伝染病の成立を決定づける因子としては、病原体の宿主との相関関係に於ける侵入力であり、次にこれに続いて来る発症力である。

発症力を決定する条件は病原体の各臓器への移動、定着、増殖力である。この病原体の各臓器への分布を検索する事は指し当つての重要な問題となつて居り、各種の病原体に就いて研究がなされている。特に全身感染をもつてその特徴とするチフス症においては興味ある問題である。

菌の生体内分布を研究するにあつて、それを方法論的に分ければ、組織学的に顕微鏡による方法、各臓器に於ける生菌数測定方法更に最近では Radioisotope を指標とする追跡実験等である。特に Radioisotope による方法は現今その利用度が増し、この方面の研究に於てもそれによる新発見が続々報告されている。サルモネラ菌属をこの方法で追跡した例は、僅かに三橋等¹⁾の実験チフス症の研究に見られ、又教室中島²⁾によつて、Sal. 57S を P³²をもつてラベルし、マウス体内に於ける各臓器への分布に関する詳細な実験に接し得るのみである。中島は P³² ラベルチフス菌における追跡の基礎的実験を行い、6～8 時間迄はかなり菌と P³² が常同する事を結論し、死菌又は免疫された動物体内ではこれより長く追跡しうる事を推論している。しかし

著者等は P³² ラベルチフス菌を用いてマウス体内における分布を取って長時間追跡を行つて、次の如き成績を得た。

II. 実験材料及び実験方法

供試； 教室保存の Sal. 57S を用いた。

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 pH 7.2 に修正を行つた。

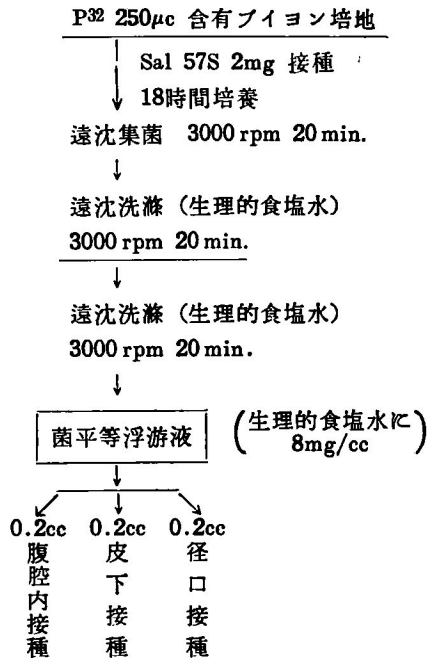
マウス； 体重 15 g 前後のかなり一定せるものを選び使用した。免疫を行う場合には Sal. 57S の 0.5 mg/cc (食塩水) 浮游液を 0.3 cc 宛腹腔内注射を行い、4 日間隔で 4 回注射を行つた後、20 日後供試した。

対照群実験法；

上記菌液浮游液と同じカウントを有する (G-M 各計測) P³² 稀釈液を 0.2 cc 各種接種法により注射する。

P³² 量測定法； 処定時間後マウス (1 実験例 3 匹) を屠殺解剖を行い、肺、肝、脾、腎を摘出し生理的食塩水で洗滌後秤量した。しかる後に一定量をキエルダールコルベンにとり硫酸法による湿性灰化を行つてリンモリブデン酸アンモンの沈澱とせしめ G-M 管で計測した。

P32 標識菌作製法及びマウス接種法

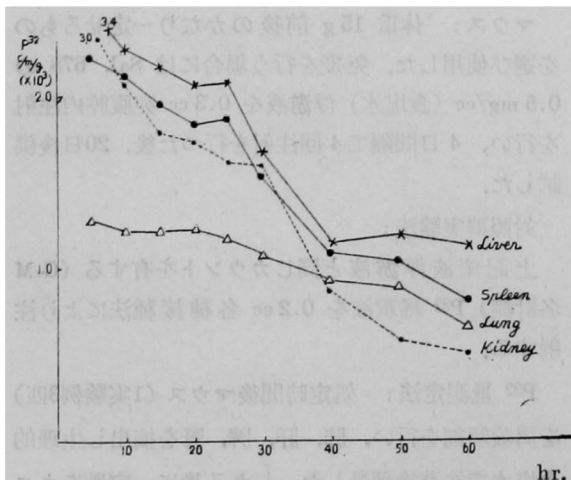


III. 実験成績

成績の表し方としては計測後のカウント数を各臓器の単位重量当りに換算し、図示した。

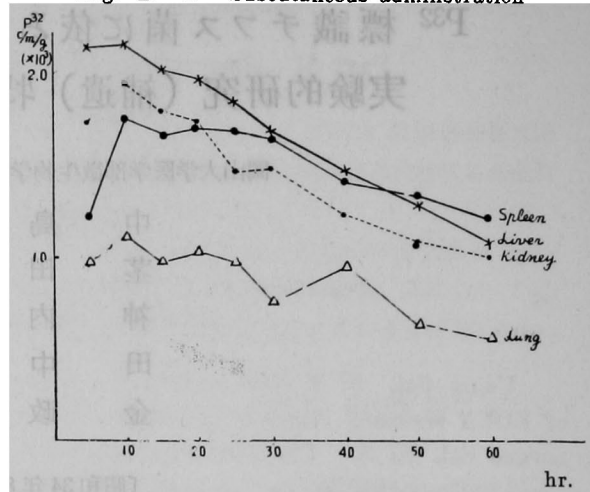
A) P32 のみ注射した実験成績腹腔内注射を行った場合は5時間ですでに最高値に達しその後徐々に減少の傾向をたどる。全経過から見て肝に最も P32 incorporate が大きく、脾がこれに続き、肺、腎においては少なかった。(図1)

Fig. 1. P32-Intraperitoneal administration



皮下注射の場合は腹腔内注射に比して短時間の内に少々低値を示すが、著明な差ではない。特長としては10時間に於て最高値を示す傾向がある程度である。臓器別では肝、脾に多く、腎がこれに続いていく。(図2)

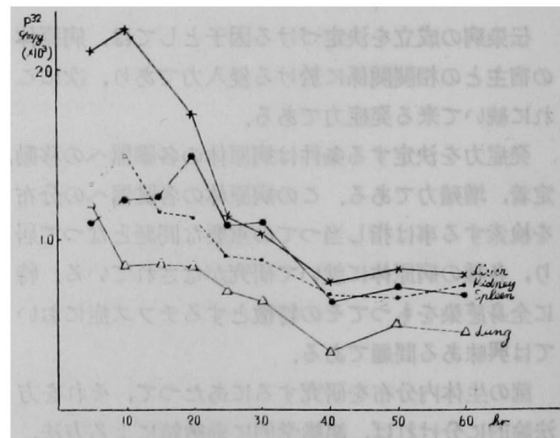
Fig. 2. P32-Subcutaneous administration



経口接種に於いては注入法の拙劣さによるものか、かなり個体差のあるとき成績を得た。各臓器に於ける最高値は臓器毎で見ると5~20時間の内に現れる。

長時間では肝、脾、腎が略々同程度の P32 incorporation を示した。(図3)

Fig. 3. P32-oral administration



B) 正常マウスに於ける P32 標識 Sal. 57S 接種の実験成績

腹腔内接種の場合、5時間で最高値を示しその後徐々に減少を示すが、この特長としては脾における P32 incorporation が最高であり、この傾向は60時間後においてもこの傾向を維持している。(図4)

皮下接種においては最高値に達する時間が10~15時間で P32 のみの場合よりもやや遅れる傾向を示した。臓器別では、やはり脾において P32 が多く、肝がこれに続いている。(図5)

経口接種の場合は実験誤差的傾向が現れているが、最高値に達する時間が臓器により遅れること、及び P32 のみの注射に較べて P32 incorpora-

Fig. 4. P32-labeled Sal. 57 Intraperitoneal inoculation (Normal mice)

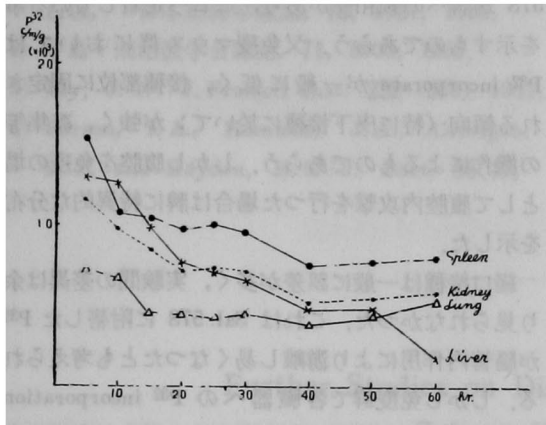


Fig. 5. P32-labeled Sal. 57 Subcutaneous inoculation (Normal mice)

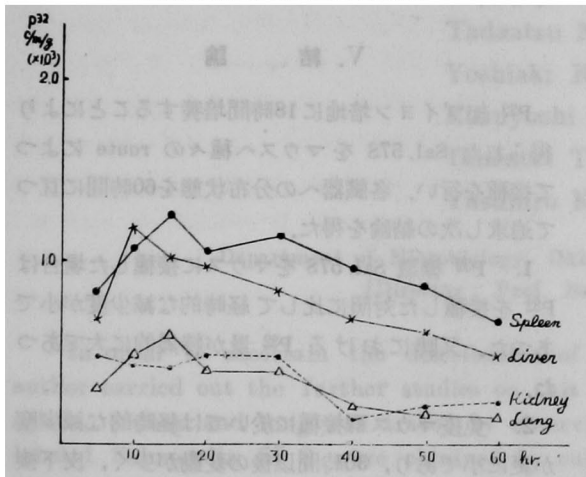
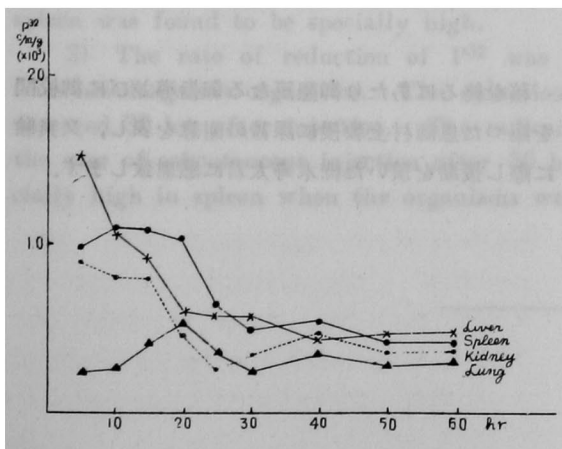


Fig. 6. P32-labeled Sal. 57 oral inoculation (Normal mice)



tion が全般的に低いのが特長であつた。(図6)

P32 標識菌接種の場合の長時間観察では、P32 の

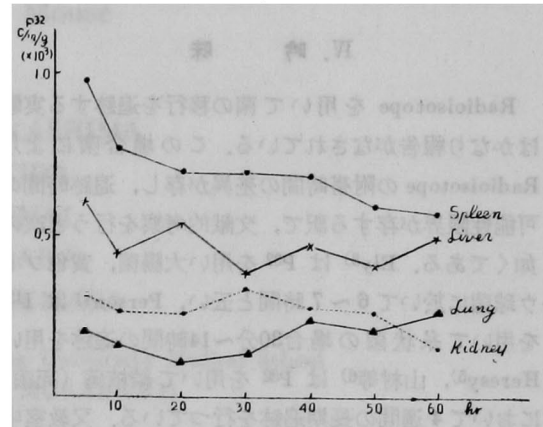
みの注射と比較して経時的な減少度がやや緩徐であつた。

C) 免疫マウスに於ける P32 標識 Sal. 57S 接種の実験成績

免疫マウス群に於ける実験は何れの場合も P32 incorporation が低く、図表に於ける縦軸は他の場合の2倍尺で示した。

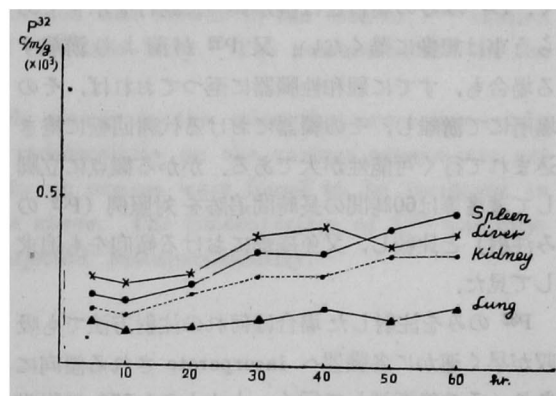
腹腔内接種においては最高値に至る時間は他と大差ないが、その後の P32 の減少度が緩徐である。臓器別では脾における P32 incorporation が著明に大であり、肝がこれに続く P32 量を示した。(図7)

Fig. 7. P32-labeled Sal. 57 Intraperitoneal inoculation (Immune mice)



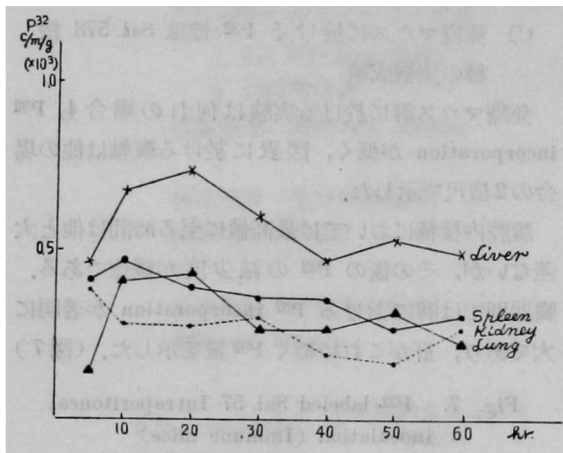
皮下接種に於いては最高値に達する事なく経時的に漸増する成績を得た。臓器別では大差がなく、脾、肝、腎においてやや大であつた。(図8)

Fig. 8 P32-labeled Sal. 57 Subcutaneous inoculation (Immune mice)



経口接種においても最高値に達する時間が長く、10~20時間であり、その後の P32 量の推移に於ても減少が少なかつた。(図9)

Fig. 9. P^{32} -labeled Sal. 57 oral inoculation
(Immune mice)



IV. 吟 味

Radioisotope を用いて菌の移行を追跡する実験はかなり報告がなされている。この場合菌により Radioisotope の附帯時間の差異が存し、追跡時間の可能性限界が存する訳で、文献的考察を行うと次の如くである。Ely³⁾ は P^{32} を用い大腸菌、黄色ブドウ球菌に於いて6~7時間と云い、Person⁴⁾ は I131 を用いて糸状菌の場合30分~14時間の追跡を用い Heresy⁵⁾、山村等⁶⁾ は P^{32} を用いて結核菌(死菌)において4週間の長期追跡を行つている。又教室中島²⁾ は Sal. 57S について精細な実験を行つて P^{32} を指標として追跡する場合は8時間以内が妥当であると述べている。

しかし P^{32} が短時間内はチフス菌と帯同し順次 P^{32} は遊離しつつあるが、全部が遊離する事はなく、 P^{32} のみの場合とは些か異つた動行を示すであらう事は想像に難くない。又 P^{32} が菌より遊離する場合も、すでに親和性臓器に至つておれば、その場所にて遊離し、その臓器における代謝回転に巻き込まれて行く可能性が大である。かかる観点に立脚して著者等は60時間の長時間追跡を対照例(P^{32} のみ注射)と比較し、又免疫群における傾向をも追求して見た。

P^{32} のみを注射した場合は何れの注射方法でも吸収が早く速に各臓器へ incorporate される傾向にあり、その後漸減して行く、しかし Sal. 57S に附帯せる場合は各臓器の incorporate が量的にも速度的にもやや劣り、しかもその後の減少度が緩徐であり、 P^{32} が菌を帯同している(正確な追跡実験が可能な程の割合でないかも知れぬ)か、又定着臓器の代謝

回転に巻き込まれたものと考えられる。特長として脾における P^{32} incorporation が大なる事も、Sal. 57S が脾への親和性があり、ここへ定着している事を示すものであらう。又免疫マウス群においては P^{32} incorporate が一般に低く、接種部位に固定される傾向(特に皮下接種に於いて)が強く、凝集等の機作によるものであらう。しかし腹腔を免疫の場合として腹腔内攻撃を行つた場合は脾に特異的な分布を示した。

経口接種は一般に誤差が多く、実験間の差異は余り見られなかつた。これは Sal. 57S に附帯した P^{32} が腸管内作用により遊離し易くなつたとも考えられる。しかし免疫群で各臓器への P^{32} incorporation が低い事は、Sal. 57S の腸管よりの侵入が免疫による障壁によつて全く閉ざされたのではなからうかと考える。

V. 結 論

P^{32} 加ブイオン培地に18時間培養することにより得られた Sal. 57S をマウスへ種々の route によつて接種を行い、各臓器への分布状態を60時間に亘つて追求し次の結論を得た。

1. P^{32} 標識 Sal. 57S をマウスに接種した場合は P^{32} を接種した対照に比して経時的な減少度が小であつた。又脾における P^{32} 量が特異的に大であつた。

2. 免疫マウス群接種に於いては経時的な減少度が更に小であり、30時間以後の変動が少く、皮下接種の場合は逆に徐々に増加する結果を得た。腹腔内攻撃を行つた場合は脾における Incorporation が特に大であつた。

稿を終るにあたり御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜つた恩師村上教授に深甚の謝意を表し、又実験に際し援助を頂いた柿木寿太君に感謝致します。

文 献

- | | |
|--|---|
| 1) 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. | 397, 1948. |
| 2) 中島 : 岡山医学会雑誌, 71 , 5900, 1959. | 5) Hevesy, G.: Radioactive Indicators. Interscience Publishers, 1948. |
| 3) Ely, J. O.: J. Frankli Inst. 232 (385) 1941. | 6) 山村, 吉田, 菩提寺, 永菅 : Radioisotopes, 1 , |
| 4) Parson, I. A., Hammer, J. A., Corrigan,
K. E. and Hayden, H. S.: J. Bact. 56 (4), | 39, 1952. |

Further Studies on Distribution of P³² Labeled
Salmonella in Mouse

By

Tadaatsu NAKASHIMA

Yoshiaki KUKIDA

Kazuyoshi JINNAI

Tanenori TANAKA

Yasuhiro KANEMASA

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

In order to ascertain the distribution of bacteria introduced into an animal body, the author carried out the further studies on this subject. The movement of bacteria into liver, spleen, kidney and lung was traced by observing the radioactivity of P³² up to 60 hrs. P³² labeled Salmonella 57 S were obtained by culturing the organism in bouillon media for 18 hrs to which P³² was added, and were injected into body of mouse through various pathways. The following results were obtained.

1) The rate of reduction of P³² in various organs was slower in the case of P³² labeled Sal. 57 S than in the case of direct injection of P³² into body. The amount of P³² in the spleen was found to be specially high.

2) The rate of reduction of P³² was much slower in the mice that were previously immunized against organisms. The reduction of radioactivity on the various organs was not observed 30 hrs after injection. The radioactivity on organs were found to be increased in the case of subcutaneous injection after 30 hrs as above. The concentration of P³² was especially high in spleen when the organisms were injected intraperitoneally.
