

# P<sup>32</sup> 標識結核菌の調製とその応用

国立療養所刀根山病院(院長 渡辺三郎博士)

吉 田 敏 郎

(昭和 28 年 12 月 16 日受付)

## 第 1 章 緒 言

近年同位元素がトレーサーとして生物学、ならびに医学上の研究に応用され、生物体内の物質の交換<sup>1,2)</sup>、物質代謝機構の究明<sup>1,2)</sup>、生理的・病理的現象の動的な観察等<sup>1,2)</sup>、従来の方法では容易に解決し得なかつた研究面に新分野を開拓するのに大きな役割を果すようになってきている。

最近われわれは科学技術行政協議会並びに厚生省の厚意により、放射性同位元素 P<sup>32</sup> を入手することができたので、次のような実験を行った。

〔I〕放射性同位元素 P<sup>32</sup> を磷酸塩(Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) の形で培地に加え、人型結核菌(青山B株)を培養して、P<sup>32</sup> 標識結核菌を得ることに成功し<sup>3)</sup>、この標識菌を用いて結核の実験アレルギー反応の研究を行った。

〔II〕Radio-activity の高い標識菌を得るために、鳥型結核菌(竹尾株)を用いて、菌の P<sup>32</sup> 摂取と培地の磷酸塩量との関係を検討した<sup>4)</sup>。

## 第 2 章 P<sup>32</sup> 標識結核菌による結核の実験的アレルギー反応の研究

### 1 実験方法

600 $\mu$ c の P<sup>32</sup> を含んだ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> を用いたキルヒナー氏無蛋白培地 (150cc) に人型結核菌(青山B株)を 16 日間培養、120°C 30分間滅菌、菌体を濾取し、洗液に P<sup>32</sup> の Radio-activity がなくなるまで蒸溜水にて水洗し、濾紙にて充分菌体の水分を除去し、この菌を乳鉢にて 20 分間磨砕し、生理的食塩水を用いて、均等な死菌浮游液 (湿潤菌にて 50mg/cc) を調製する。対照として使用する異物懸濁液は P<sup>32</sup> を含んだ磷酸塩緩衝液 (pH7.0) にモリブデン酸アンモニウム試薬 (市販モリブデン酸アンモニウム 2.5g, 硝酸アンモニウム 20g, 25% 硝酸溶液 80cc) を加え、水浴上 60°C, 30分加温し、微細な磷モリブデン酸アンモニウム結晶 ((NH<sub>4</sub>)<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>·12MoO<sub>3</sub>·2HNO<sub>3</sub>·H<sub>2</sub>O) を作り、これを生理的食塩水を用いて懸濁液として使用した。

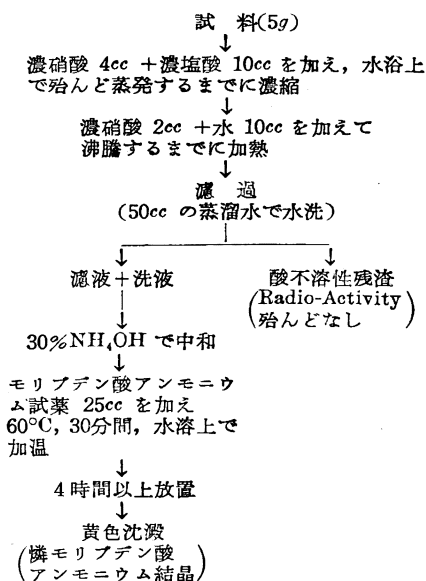
家兔の感染は人型結核菌 (Frankfurt 株) 10mg を大腿皮下に注射し、3 週間後、ツベルクリン反応を陽転せしめた。

死菌浮游液及び磷モリブデン酸アンモニウム懸濁液の一定量を結核感染家兔 (人型結核菌 Frankfurt 株感染) 及び健常家兔の耳静脈及び腸間膜静脈よりそれぞれ注射した。腸間膜静脈内への注射は家兔を仰臥位に固定して開腹を行い、小腸を引出して、その腸間膜静脈内に注射す

ることによつて行つた。注射して一定時間後、すなわち 30 分、24 時間、96 時間後に瀉血により被実験家兔を屠殺、肺臓・肝臓・脾臓・腎臓・脳・血液を取り出し、第 1 表の如く湿式灰化<sup>5)</sup>を行つて、P を磷モリブデン酸アンモニウム結晶とした。この結晶を一定容器——市販ストレプトマイシン容器の蓋 (径 2.1 cm アルミニウム製) に小穴を開きニユツエの代用として用いた——に濾取し、一定距離 (この場合 2cm) を置いてその Radio-Activity を Geiger-Müller Counter で測定し、P<sup>32</sup> の動物体内における分布、従つて P<sup>32</sup> 標識結核菌及び P<sup>32</sup> 含有磷モリブデン酸アンモニウム結晶の体内分布を追跡した。

Geiger-Müller Counter は神戸工業株式会社製の放射能測定装置 (GM13L, PA-4H, SC-100) を使用した。

第 1 表 臓器の湿式灰化法



### 2 実験成績

1) 第 2 表に示す如く、P<sup>32</sup> 標識結核菌を耳静脈より注射した場合は注射後 30 分では主として肺臓に、次いで肝臓・心臓・脾臓・脳の順に、注射後 24 時間にも肺臓に最も多く、次いで肝臓・脾臓・心臓・脳の順に分布し、健常家兔と結核感染家兔との間には大差が認められない。

2) P<sup>32</sup> 標識結核菌を腸間膜静脈より注射した場合は第 2 表に示す如く、注射後 30 分では大部分は肝臓に、次いで腎臓・肺臓・心臓・脾臓・脳の順に、注射後 24 時間、96 時間も同様に肝臓に最も多く、次いで腎臓・肺臓・心

第 2 表 P<sup>32</sup> 標識結核菌(青山 B 株)死菌を注射せる場合

人型菌(青山 B 株) P<sup>32</sup> 含有キルヒナー氏無蛋白培地 16 日間培養, 菌量は乾燥菌量を以つて表わす  
各臓器の cpm は測定距離 2cm にて測定, 臓器全体としての cpm を示す

菌量 mg	P <sup>32</sup> 標識結核菌 計数		注射時 射後 部位 M.D.	動物 体重	肺		肝		脾		腎		心		脳		血液		
	cpm	M.D.			W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.
28.5	39,858	2	耳 静脈 30分	K. TB.	2,150 <sup>g</sup> 2,130	9.7 <sup>g</sup> 9.7	11,223 12,842	43.0 <sup>g</sup> 42.2	1,075 1,139	0.4 <sup>g</sup> 1.7	28 60	8.2+7.8 <sup>g</sup> 6.2+6.0	—	9.0 <sup>g</sup> 4.7	52 44	5.7 <sup>g</sup> 6.7	16 8	1 <sup>cc</sup> 1	19 18
28.5	39,858	2	耳 静脈 24 時間	K. TB.	2,310 2,230	13.7 13.7	9,480 10,933	46.5 46.0	1,834 1,500	1.2 1.2	137 101	7.0+6.5 5.2+5.5	108 90	8.5 5.0	41 30	5.7 7.0	21 21	1 1	41 41
41.4	40,689	2	腸静 脈間 膜脈 30分	K. TB.	2,550 2,420	8.7 11.0	150 158	55.5 50.0	7,470 7,880	0.7 1.0	21 26	8.5+8.0 5.7+5.2	591 365	6.0 5.2	02 102	6.2 6.2	50 50	1 1	4 7
59.4	64,875	2	腸静 脈間 膜脈 20 時間	K. TB.	2,740 2,450	9.2 14.0	145 526	62.0 50.0	13,454 15,720	0.6 1.5	59 35	8.7+8.2 7.0+7.0	321 462	7.7 7.5	66 105	6.7 7.5	13 30	1 —	9 —
41.4	40,689	2	腸静 脈間 膜脈 96 時間	K. TB.	2,450 2,900	8.2 10.2	83 55	52.2 75.5	5,972 4,107	0.4 1.7	8 42	8.0+8.0 6.5+7.0	125 113	4.2 6.2	39 36	6.2 6.3	15 18	1 1	8 9

cpm=counts per minute 1 分間の計数, M.D.: 測定距離, K.: 健康家兔, T.B.: 結核感染家兔, W.: 臓器全重量

第 3 表 肺臓を強く局所アレルギー化した場合 P<sup>32</sup> 標識結核菌(青山 B 株)死菌を注射せる場合

人型菌(青山 B 株) P<sup>32</sup> 含有キルヒナー氏無蛋白培地 16 日間培養, 菌量は乾燥菌量を以つて表わす  
各臓器の cpm は測定距離 1cm にて測定, 臓器全体としての cpm を示す

菌量 mg	P <sup>32</sup> 標識結核菌 計数		注射時 射後 部位 M.D.	動物 体重	肺		肝		脾		腎		心		脳		血液		
	cpm	M.D.			W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.	cpm	W.
16.9	1,905	1	耳 静脈 30分	K. TB.	2,800 <sup>g</sup> 2,400	9.7 <sup>g</sup> 14.3	266 300	60.7 <sup>g</sup> 61.7	24 25	0.7 <sup>g</sup> 2.2	0 3	5.2+6.2 <sup>g</sup> 9.0+8.5	16 15	5.5 <sup>g</sup> 5.2	3 9	9.7 <sup>g</sup> 8.6	0 0	1 <sup>cc</sup> 1	8 0
16.9	1,905	1	耳 静脈 24 時間	K. TB.	2,300 2,100	11.4 19.4	45 85	46.5 59.5	5 6	1.2 5.2	2 4	6.5+6.2 5.7+5.7	0 4	5.7 5.5	1 0	7.2 8.5	0 0	1 1	0 1
81.6	20,856	1	耳 静脈 30分	K. TB.	2,550 1,900	18.2 22.9	1,625 2,148	53.5 62.0	551 161	5.7 4.0	19 7	7.2+7.2 5.7+5.7	37 84	6.0 4.7	8 18	10.0 7.8	0 2	1 1	11 36
81.6	20,856	1	耳 静脈 24 時間	K. TB.	2,100 2,000	18.0 22.7	1,722 1,477	46.0 69.5	419 493	2.7 2.5	21 35	7.7+7.2 6.7+8.0	27 50	4.5 6.0	4 14	8.0 10.0	4 5	1 1	13 1

cpm=counts per minute 1 分間の計数, M.D.: 測定距離, K.: 健康家兔, T.B.: 結核感染家兔, W.: 臓器全重量

臓・脳の順に分布しており、この場合も、健常家兎と結核感染家兎の間に大差は認められない。

3) 更に家兎の耳静脈より人型結核菌(青山B株)生菌 10mg を注射、更に一週間を置いて、同様に生菌 10mg を注射した。このような前処置を施した後、3週間後ツベルクリン反応が陽転した時に、P<sup>32</sup> 標識結核菌を耳静脈より注射した場合、第3表に示す如く、注射後 30分も、24時間も P<sup>32</sup> は大部分肺臓に分布しておりしかも健常家兎と肺臓を強くアレルギー化したと考えられる結核感染家兎(青山B株)との間に有意の差は認められない。更に二次抗原として用いられた菌量が少量の場合も多量の場合も第3表に示す如く、同様な結果を得ている。

4) P<sup>32</sup> 標識燐モリブデン酸アンモニウムの微細結晶を家兎の耳静脈及び腸間膜静脈より注射した場合は第4表に示す如く、腸間膜静脈に注射した場合は肝臓及び腎臓にやや多いが、一般には肝臓・肺臓・腎臓に多く捕捉せられており、注射後 30分も24時間も同様な傾向を示している。しかも、この場合も健常家兎と結核感染家兎(人型 Frankfurt 株感染)との間に大差は認められない。

3 考 按

実験成績よりすると、結核菌(死菌)を耳静脈より注射した場合、その大部分は肺臓に捕捉せられ、腸間膜静脈より注射した場合、その大部分は肝臓に捕捉せられていることから、注射せられた結核菌(死菌)は機械的に最初の毛細管において捕捉せられるものと考えられる。しかも健常家兎と結核感染家兎との間に大差が認められないことから、従来から考えられているように、抗原抗体反応による抗原すなわち結核菌の捕捉が強く惹起するものとは考えられない。

次に P<sup>32</sup> 標識燐モリブデン酸アンモニウム微細結晶を家兎の耳静脈及び腸間膜静脈より注射した場合は結核菌の場合と異なり、異物処理器官たる肝臓・腎臓・肺臓に多く捕捉せられるものと考えられる。

従つて、注射せられた結核菌又は燐モリブデン酸アンモニウム微細結晶の体内分布を主として規制するものは、注射せられた物質の大きさや表面活性等の物理化学的条件であつて Rössle 以来強く主張せられて来ている『抗原抗体反応による抗原の局在化』は、上の実験条件におけるような結核の実験的アレルギー反応においては余り著明でなく、むしろ物理化学的要因によつて捕捉せられた抗原を中心として、その後『抗体の局在化』が起り、次々に抗原抗体反応を惹起して行くのではないかと考えられる。

第3章 鳥型結核菌の P<sup>32</sup> 摂取と培地燐酸塩量との関係

1 実験方法

添加無機燐酸量をそれぞれ通常量 (7g/l) 及びその

第4表 P<sup>32</sup> 含有燐モリブデン酸アンモニウム結晶を注射せる場合

各臓器の epm は測定距離 2cm にて測定、臓器全体としての epm を示す。異物重量は乾燥せる時の重量を示す

P <sup>32</sup> 含有燐モリブデン酸アンモニウム結晶	重量 mg	計数 epm	M.D.	注射部位	注射時 後で 実の間	動物		肺		肝		脾		腎		心		脳		血液	
						W.	epm	W.	epm	W.	epm	W.	epm	W.	epm	W.	epm	W.	epm	W.	epm
37.8	4,860	8,811	20	耳静脈	30分	K.	2,350 <sup>7</sup>	8.5 <sup>9</sup>	8,172	49.5 <sup>9</sup>	8,009	1.0 <sup>9</sup>	419	8.0+8.7 <sup>9</sup>	8,286	6.7 <sup>9</sup>	1,755	5.7 <sup>9</sup>	103	1 <sup>cc</sup>	568
						T.B.	1,900	10.7	7,428	37.5	12,037	1.7	491	6.7+7.0	9,300	5.7	1,580	6.5	174	1	501
35.7	4,860	4,860	20	耳静脈	24時間	K.	2,430	10.0	2,056	43.5	7,934	1.5	321	6.5+7.0	4,678	6.5	731	6.2	57	1	70
						T.B.	1,970	9.0	1,701	40.0	5,736	0.7	197	5.0+5.0	5,236	5.5	759	5.5	75	1	64
35.7	4,860	4,860	20	腸間膜静脈	30分	K.	2,150	9.7	848	44.5	1,259	0.7	128	7.2+7.2	2,622	6.0	545	6.0	121	1	444
						T.B.	2,100	8.2	770	45.0	1,218	0.9	235	5.7+5.5	2,069	5.7	850	5.5	140	1	362
35.7	4,860	4,860	20	腸間膜静脈	24時間	K.	2,000	9.5	399	40.5	878	0.5	130	6.2+6.5	781	5.5	488	5.7	156	1	124
						T.B.	2,250	8.5	719	42.0	2,114	0.7	188	7.0+7.0	2,519	5.5	1,126	6.0	155	1	131

epm = counts per minute 1 分間の計数, M. D. : 測定距離, K. : 健常家兎, T.B. : 結核感染家兎, W. : 臓器全重量

$1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ ,  $1/16$  量としたキルヒナー氏無蛋白培地 100 cc に,  $P^{32}$  を  $H_2P^{32}D_4$  として  $25\mu c$  添加し, これに鳥型結核菌(竹尾株)を接種, 培養 7 日後菌体をガラス・フィルターで濾取, 洗液に Radio-Activity がなくなるまで蒸留水で洗滌, 乾燥器で乾燥を行い, その乾燥菌約 100 mg について第 2 章において述べた方法に従つて Radio-Activity を計測した。また培地 1cc を同じく一定容器に取り乾燥, その Radio-Activity を計測した。

## 2. 実験成績及び考按

第 5 表に見られる如く, 培地の無機磷酸塩量が通常量及びその  $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ ,  $1/16$  量に減少するに従つて, 菌体に摂取される  $P^{32}$  の Radio-Activity は著明に増加し, 無機磷酸塩量が  $1/16$  量の場合が最も Radio-Activity が高く, これに伴つて, 培地に残存する  $P^{32}$  の Radio-Activity は減少する。しかも収獲菌量は殆んど変化を認めていない。以上の成績から貴重な  $P^{32}$  を節約するためには, 一定量の  $P^{32}$  を用いて高い Radio-Activity を示す標識菌を得るためには, 培地の無機磷酸塩量を増殖菌量を減少せしめない程度すなわち  $0.44g/l$  位に減少せしめるとよいと思われる。

第 5 表 鳥型結核菌(竹尾株)の  $P^{32}$  摂取と培地磷酸塩量との関係

キルヒナー氏無蛋白培地, 表面培養 7 日後  
測定距離: 2cm

培地の添加磷酸塩量	培地 1cc の cpm	乾燥菌 100 mg の cpm	集獲乾燥菌量
通常量 (7g/l)	2,987	2,884	623 mg
$1/2$ 量 (3.5g/l)	2,908	4,950	617
$1/4$ 量 (1.75g/l)	1,895	8,628	605
$1/8$ 量 (0.875g/l)	930	16,713	710
$1/16$ 量 (0.4375g/l)	582	23,069	519
対 称 (菌なし)	3,009		

但し cpm = counts per minute 1 分間の計数

## 第 4 章 結 論

1)  $P^{32}$  標識結核菌(青山 B 株)を家兎の耳静脈及び腸間膜静脈より注射した場合, 最初の毛細血管で大部分が捕捉せられることを認めた。すなわち, 前者の場合は肺臓に, 後者の場合は肝臓に大部分が捕捉されている。

2)  $P^{32}$  標識磷モリブデン酸アンモニウム微細結晶を家兎の耳静脈及び腸間膜静脈より注射した場合はいずれも異物処理器官たる肝臓・腎臓・肺臓等に多く捕捉せられている。

3) 1), 2)のいずれの場合も健常家兎と結核感染家兎との間に差を認めなかつた。

4) 培地の無機磷酸塩量を適当に減少せしめて, Radio-Activity の高い  $P^{32}$  標識鳥型結核菌を得た。

終りに御校閲を賜つた院長渡辺三郎博士に深謝し, また御指導と御校閲を戴いた山村雄一博士に厚く感謝する。

$P^{32}$  は厚生省医務局国立療養所課 関誠一郎博士および科学行政技術協議会の御厚意によつて入手した。記して謝意を表する。

## 文 献

- 1) Hevesy: Radio-active Indicator, 1948.
- 2) 湯浅: 放射性同位元素とその生物学医学への応用 1951.
- 3) 山村・吉田・菩提寺・永管: Radio-Isotope, 第 1 巻, 第 1 号, 1952.
- 4) 山村・吉田・菩提寺・石上・中村: Radio-Isotope, 第 2 巻, 第 1 号, 1953.
- 5) 高木: 定量分析の実験と計算, 第 1 巻, 1950.