

P³² 標識菌による抗酸性菌の病原性に関する研究 (第1報)

国立療養所 刀根山病院 (院長 渡辺三郎)

山村好弘・谷 淳吉・寺井武雄

(受付 昭和30年9月26日)

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の研究に応用せられ、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たすようになってきている。

さきに山村らは、放射性同位元素 P³² を磷酸塩 (Na₂HPO₄) の形で培地に加え、抗酸性菌を培養して、P³² 標識菌を得ることに成功し¹⁾²⁾、その加熱死菌を家兎の腸間膜静脈および耳静脈より注入し、その体内分布を測定することにより、結核アレルギー反応の研究を行つた³⁾。また山村らは P³² 標識抗酸性菌を同様に、家兎の耳静脈より注入し、体内の各臓器における分布と放射能の消失速度を測定し、生菌、死菌共に病原性菌は臓器より緩やかに消失し、非病原性菌は速やかに消失することを認めている⁴⁾⁵⁾。

一方、生田らにより、Acetoin の代謝を測定する一つの方法として、マウスの全身を電気 mixer で homogenize して測定する方法が考案せられた⁶⁾ので、われわれもこの方法を応用して、P³² 標識抗酸性菌をマウスの尾の脈より注入し、P³² がマウスの全身および肝より消失する割合を測定した。その結果病原性菌と非病原性菌とに消失の速さに差異を認めたので、ここに報告する。

第2章 実験材料

1) 使用した菌はすべて本院保存中の人型結核菌 H₃₇Rv 株、BCG、および鳥型菌竹尾株を用いた。培地は Sauton 培地に P³² を磷酸塩の形で培地 1cc に 10~20μc の割に加えたものを使用した。P³² の放射能がこれらの菌の発育、生菌単位におよぼす影響を観察するために Sauton 培地に種々の量の P³² を添加し、人型結核菌 H₃₇Rv 株を培養して、その14日目培養菌の生菌単位を測定した。第1表に示す如く、Sauton 培地への P³² の添加は、培地 1cc に 30μc 迄は生菌単位、発育速度とも、何等の差異も認めなかつた。しかし培地 1cc に 40μc の添加では著明な発育の阻害を認めた。BCG、鳥型菌竹尾株で

第1表 種々の量の P³² を添加した Sauton 培地に培養した人型結核菌 H₃₇Rv 株14日目培養菌の湿菌量 1mg の生菌単位

P ³² の量	対照(P ³² なし)	10μc/cc	20μc/cc	30μc/cc
生菌単位	2.4×10 ⁶	1.8×10 ⁶	5.6×10 ⁶	3.1×10 ⁶

※ 40μc/cc では著明な発育阻害を認め

も培地 1cc に 30μc 迄はほぼ同様な結果を認めた。

したがつて、実験には P³² を培地 1cc に 10~20μc 添加の Sauton 培地を使用した。この培地に前述の菌を培養して発育が最高に達した時、これを濾取し、洗液に P³² の放射能がなくなる迄蒸溜水で洗滌し、菌体に附着した水分を濾紙に吸着せしめて秤量した後、ガラス玉入りコルベにて磨砕し、均等なる生菌浮游液を調整した。また同時にその菌液を恒温槽の中で、60°C 1時間加熱して死菌浮游液を作成し、実験に使用した。

2) 使用動物としては生後 6~8 週の体重 15~20g のマウスの純系 NA-8 株 (大阪純系試験動物研究所より購入) の雄を用いた。

第3章 実験方法

1) 前述の生菌浮游液 (菌量は湿量 0.25 mg) をマウスの尾静脈より注入し、一定日数毎にマウスにエーテルを吸入せしめて屠殺し、全身および肝よりの P³² の放射能の消失の割合を測定した。全身および肝に含まれる P³² の測定は次の如く行つた。すなわち体重の10倍量の蒸溜水を加えた後、電気 mixer で全身を homogenize し、ガーゼで濾過し、毛、歯、尾等を除去した後、ピペットで 30cc を取り、これを赤外線ランプで乾燥した。また肝は開腹して、摘出した。この各々を湿式灰化法³⁾⁷⁾によつて磷モリブデン酸アンモンの結晶として沈澱させた後一定容器に濾取し、その放射能を Geiger-Müller の Counter (神戸工業株式会社製) で測定した。

なおこの場合、全身の homogenize した液 30cc からの磷モリブデン酸アンモンの沈澱の乾燥重量は約 220mg であり、肝はその大小に応じ KH₂PO₄ の溶液を carrier

として加え、沈澱量が 100 mg 前後となるように補正した。そして各々に概当する沈澱量のために生ずるところの P³² の放射能の自己吸収 (self-absorption) をあらかじめ測定して実験の際の自己吸収の補正の値とした。

同時にマウス全身の homogenate を 2% の苛性ソーダ溶液で処理した後、小川氏培地を使用して定量培養を行い、全身に存在する生菌単位を測定した。

2) 同様の方法により上記標識抗酸性菌の 60°C 1 時間加熱死菌浮游液 (菌量は湿量 0.5 mg) をマウスの尾静脈より注入し、一定日数毎に屠殺しその全身および肝よりの P³² の消失の割合を測定した。

また別に、この 60°C 1 時間加熱死菌浮游液 (菌量は湿量 0.5 mg) を腹腔内に注入し、同様の方法で、全身よりの P³² の消失の割合を測定した。

P³² の消失の割合をあらわすために測定された放射能 (count Per minute で表わす、以下 c. p. m. と略記) を沈澱の自己吸収と、P³² の自然減衰値を計算により補正した後、注入した菌量の放射能 (c. p. m.) に対する百分比として表わした。すなわち次の如き式で表現した。

全身の場合

$$\left(\frac{\text{自然減衰値, 沈澱の自己吸収を補正した全身 homogenate の10\%溶液 30cc の c.p.m.}}{\text{マウスの体重 (g) \times 10}} \right) \times \frac{30}{30} \div (\text{注入菌の c.p.m.}) \times 100\%$$

肝の場合

$$\left(\frac{\text{自然減衰値, 沈澱の自己吸収を補正した肝の c.p.m.}}{\text{c.p.m.}} \right) \div (\text{注入菌の c.p.m.}) \times 100\%$$

第4章 実験成績

1) P³² 標識生菌を注入した場合

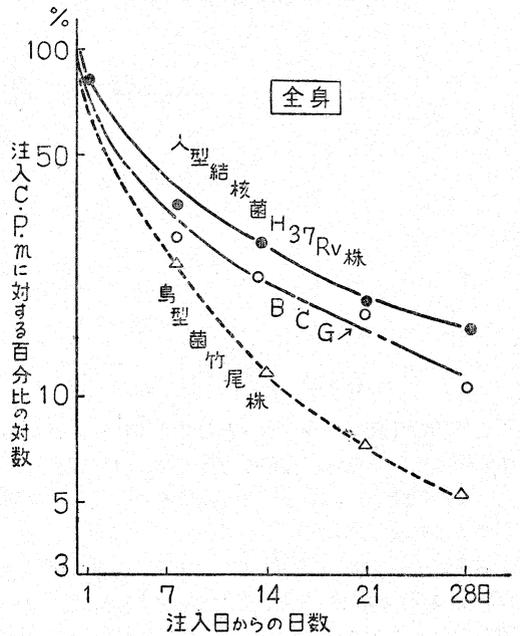
第2表に示すような人型結核菌 H₃₇Rv 株, BCG, および鳥型菌竹尾株の生菌 0.25mg (湿量) をマウスの尾静脈より注入し、1週毎に4匹づつ屠殺し注入後4週迄 P³² の消失の割合を測定した。なお肝は注入後24~48時を経過して注入した菌が臓器に固着した時の値を、実験開始時の値とした。その際の放射能の消失の割合を図示するために、横軸に注入した時からの日数を、縦軸に注入放射能 (c. p. m.) に対する百分比の対数をとって図示すると第1図および第2図の如くである。

この図より明らかなように生菌を P³² で標識して注入

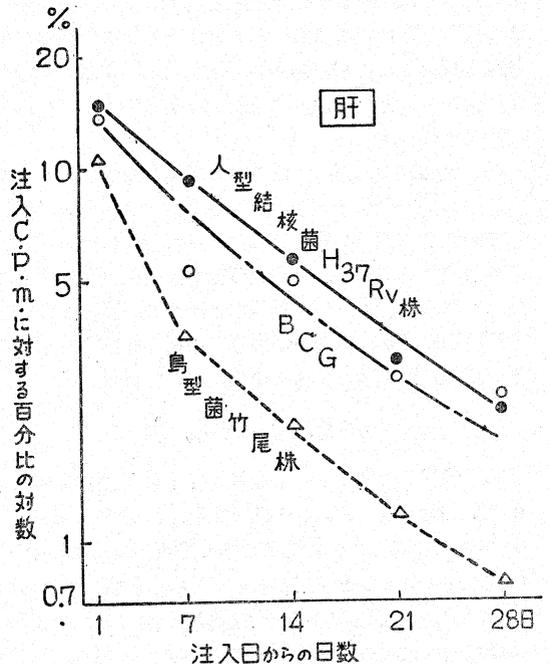
第2表 マウスの尾静脈より注入した各種抗酸性菌 0.25 mg (湿菌量) の生菌単位と c.p.m.

菌 株	培養日数	生菌単位	注入 c.p.m.
人型結核菌 H ₃₇ Rv 株	14日	14.1 × 10 ⁵	2460
BCG	16日	12.0 × 10 ⁵	3450
鳥型菌竹尾株	4日	6.8 × 10 ⁵	9750

第1図 P³² 標識抗酸性菌をマウスの尾静脈より注入した場合の全身よりの P³² 消失の割合



第2図 P³² 標識抗酸性菌をマウスの尾静脈より注入した場合の肝よりの P³² の消失の割合



した場合、人型結核菌 H₃₇Rv 株は全身および肝とも、P³² の消失速度が最も緩やかで、BCGがこれにつき、鳥型菌竹尾株は最も速やかである。

なおこの際人型結核菌 H₃₇Rv 株および BCG の全身の生菌単位は第3表の如くであつた。なお鳥型菌竹尾株

第3表 マウスの尾静脈から P³² 標識菌 (湿菌量 0.25 mg) を注入した場合の各週毎における全身の生菌単位

	注入量	1 日	1 週	2 週	3 週	4 週
人型結核菌 H ₃₇ Rv 株	14.1×10 ⁵	32.4×10 ⁵	69.5×10 ⁵	32.5×10 ⁴		26.3×10 ⁵
BCG	18.0×10 ⁵	6.6×10 ⁴	2.7×10 ⁴		7.35×10 ⁴	

は苛性ソーダ処理によりかなり生菌単位の減少を認めたので生菌単位の測定は行わなかつた。第3表に示された人型結核菌 H₃₇Rv 株および BCG の生菌単位の推移は加藤⁸⁾²¹⁾らに、P³² で標識されないこれらの菌株を用いて同様の方法で、マウスの全身を homogenize する法を使用し、全身の生菌単位を追跡した結果とは一致する。したがってこの程度の P³² の標識では、上述の菌株では菌力の強弱に変動がないように思われる。

2) P³² 標識死菌を注入した場合

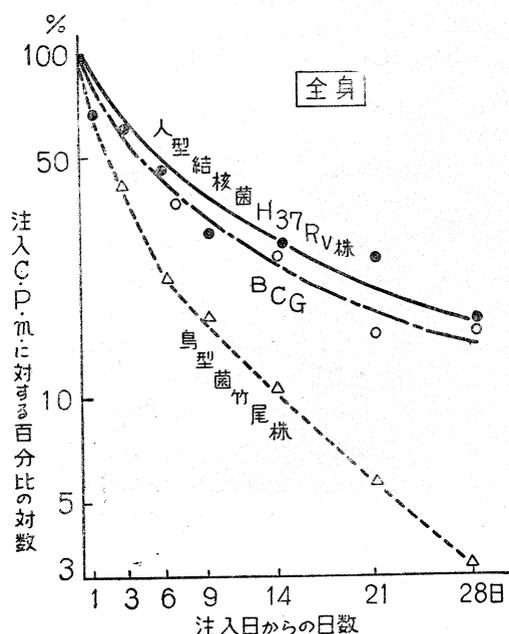
イ) 尾静脈より注入した場合

第4表 マウスの尾静脈より注入した各種抗酸性菌 60°C 1 時間加熱死菌 0.5 mg 湿菌量の培養日数と c.p.m.

菌 株	培養日数	注 入 c.p.m.
人型結核菌 H ₃₇ Rv 株	18日	3420
BCG	14日	10500
鳥型菌竹尾株	4日	12100

第4表に示すような条件の人型結核菌 H₃₇Rv 株、BCG、鳥型菌竹尾株の60°C 1時間加熱死菌の湿量 0.5 mg をマウスの尾静脈より注入し菌体および菌体成分の体内からの消失の

第3図 P³² 標識抗酸性菌の 60°C 1 時間加熱死菌をマウスの尾静脈より注入した場合の全身からの P³² 消失の割合



割合を、P³² の放射能をトレーサーとして、3~5日毎に4匹づつ屠殺し、注入後4週迄測定した。なお肝は生菌の場合と同様に、注入後24~48時間の値を実験開始時の値と

した。

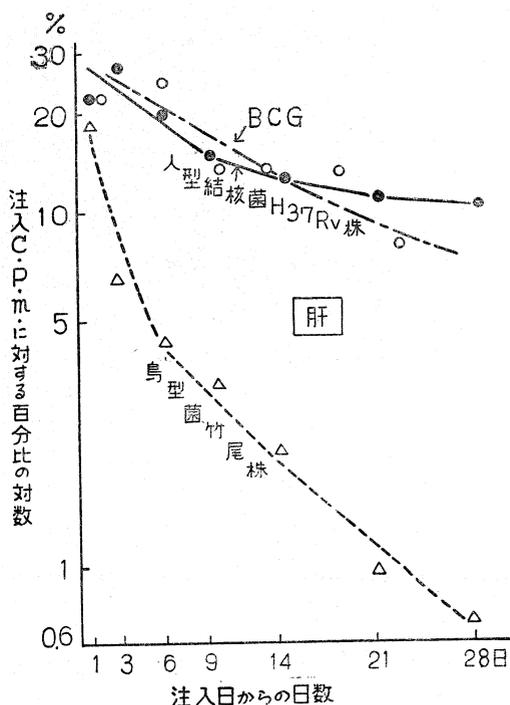
前述の方法により図示すると第3図および第4図の如くである。すなわち加熱死菌を注入した場合も、人型結核菌 H₃₇Rv 株は鳥型菌竹尾株に比べ全身および肝よりの P³² の消失は緩やかであり、特に肝で、その差は大である。また BCG は全身よりの P³² の消失の割合は人型結核菌 H₃₇Rv 株に比べて、やや速かであるが、鳥型菌竹尾株に比べて、はるかに緩やかである。

このことは死菌でも生体内で鳥型菌竹尾株は人型結核菌 H₃₇Rv 株や BCG よりも速やかに処理されることを示している。また BCG と人型結核菌 H₃₇Rv 株の間には大きな差は認められないが、BCGの方が、若干早く処理されるようである。

ロ) 腹腔内に注入した場合

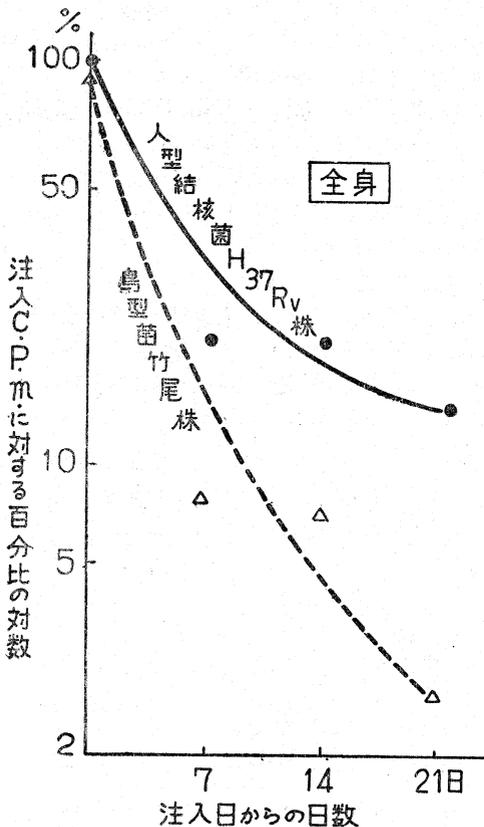
上述の人型結核菌 H₃₇Rv 株鳥型菌竹尾株の60°C 1時間加熱死菌の湿量 0.5mg を、マウスの腹腔内に注入し、1週毎に2匹づつ屠殺して注入後3週迄全身よりの P³² の消失の割合を測定した。

第4図 P³² 標識抗酸性菌の 60°C 1 時間加熱死菌をマウスの尾静脈より注入した場合の肝からの P³² の消失の割合



その結果を第5図に示すと、この場合も人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株は鳥型菌竹尾株に比べ、体内よりの消失は、はるかに緩やかである。しかしながらこの場合は静脈内に注入した場合に比べ、その消失の割合が、おのおのマウスの個体により、かなりの差があることが認められるので、注入された2つの菌株の消失の割合を比較するには、静脈内に注入した場合に比べ実験の正確さからいつて、誤差が大きいように思われる。

第5図 P^{32} 標識抗酸性菌の $60^{\circ}C$ 1時間加熱死菌をマウスの腹腔内に注入した場合の全身よりの P^{32} の消失の割合



第5章 考 察

結核菌を実験的に動物体内に感染せしめて、その臓器内の増殖力を観察した実験は、Lurie,⁹⁾ Wessels¹⁰⁾ によつて行われたが、最近 Pierce および Dubos^らによつてマウスを用いて、種々の毒力水準を有する抗酸性菌を体内に導入して、その生菌単位を測定し¹¹⁾、この方法を用いて、弱毒菌の接種や、結核菌の菌体成分の注入によつて生ずる所の免疫力の測定を行つている¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾。わが国においても同様な方法で、小川¹⁵⁾、阿部¹⁶⁾¹⁷⁾、橋本¹⁸⁾¹⁹⁾²⁰⁾、加藤²¹⁾らによつて、結核菌の菌力、結核における免疫および化学療法剤の効果の判定に関する研究が行われている。そしてこの場合、いずれも強毒菌株を感

染せしめた場合は、マウスの体内の生菌単位は、一定の日数後には高い値を示し、弱毒株は低い値を示すことが観察されている。

われわれは P^{32} 標識菌の調製に成功し、これらの菌がこの実験に使用した程度の標識ではその菌力および生菌単位において、 P^{32} で標識されない菌とほとんど差異を認めないことを観察した。そしてこれらの生菌をマウスの尾静脈より注入し、体内および肝からの P^{32} の消失の割合を測定して、マウスに対して毒力株である人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株、弱毒株である BCG および無毒株であると考えられている鳥型菌竹尾株の間に、前述のような差を認めた、このことは、注入された生菌の、生体内での処理による P^{32} の体外への排泄、体内での菌体自身の P^{32} の turn-over、またこの turn-over された P^{32} が生体内に捕捉されるということ、また菌の増殖分裂による菌体内 P^{32} の分割等種々の複雑な要素が考えられる。しかし上述のような差異を認めたということは、弱毒株程速かに生体内で処理されて体外に排泄されるが故に、弱毒株中の P^{32} も速かに体外に排泄せられるが、強毒株ではこの逆であるということのために、または強毒株より turn-over された P^{32} を含む割合の中に、体内で処理排泄され難いものが存するというの為に生じたのではないかと考えられる。しかしながら、この点については、今後なお充分検討を要するものと考えられる。

次に上記 P^{32} 標識菌の $60^{\circ}C$ 1時間加熱死菌をマウスに注入した場合、毒力株である人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株と、弱毒株である鳥型菌竹尾株の間には、 P^{32} の体内よりの消失速度に同様な差異を認め、鳥型菌竹尾株、BCG、人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株の順に、体内よりの消失が速やかであつた。このことは毒力株が、菌体自身が体内で処理され難いのか、あるいは菌体は処理されても、その菌体成分の中に、体内から処理排泄され難いものがあるのではないかと考えられる。

先に Martin²²⁾ らにより、生体外にとり出された白血球が、毒力株のためにその遊走を阻害され、無毒株では全く阻害されないことが報告されており、Allgöwer²³⁾ らによつて、死菌においてもこの現象が認められている。また Bloch^らにより、有毒結核菌より“Cord factor”の抽出が行われ、このものが白血球の遊走を阻害するという²⁴⁾、およびこのものの少量の注射によつてマウスは死亡するという²⁵⁾²⁶⁾²⁷⁾が見出されている。また同様なマウスの致死物質が Spitznagel²⁸⁾ らにより、有毒結核菌より抽出されている。このような事実から、死菌でも当然生体内において、毒力株は無毒株に比べ、体内で処理排泄され難いことが考えられる。本実験は P^{32} をトレーサーとして、体内よりの消失を定量的に測定することにより、生体内で、結核菌の毒力株と無毒株との間には、生体内の処理排泄速度に差のあるこ

とを認めたのである。また人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株と BCG の間には少量の差しか認められなかつたということは、BCG からマウスを致死せしめる有毒物質が抽出せられていること²⁴⁾や、人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株と BCG の間の毒力の差は、定量的なものであつて、定性的なものではないという説等を考え合せると、興味ある成績である。

上のような事実から、結核菌の毒力株は無毒株に比べ、生体内で処理されにくい菌体成分を有するようになるので、各菌体成分を抽出して、そのものの体内排泄の割合について追跡中である。

またこの実験では、 P^{32} で菌を標識して追跡を行つて、 P^{32} の消失だけから、注入菌体の処理排泄速度を推定することは、かなり危険なように思われるのでさらに C^{14} 又は S^{35} 標識菌で追跡して、確認する必要があるのではないかと考える。

第 6 章 結 論

1) われわれは、 P^{32} を加えた Sauton 培地に抗性酸菌を培養することにより、 P^{32} 標識菌を調製することに成功した。そして、これらの菌は P^{32} を Sauton 培地に、培地 1 cc に付、20 μ c 迄添加する程度では、添加しない培地に培養した菌に比べ、生菌単位、發育速度、およびマウスの体内における菌の増殖力にほとんど差異を認めなかつた。

2) 前述の P^{32} 標識抗酸性菌の生菌 0.25 mg (湿量) をマウスの尾静脈より注入し、その全身および肝よりの P^{32} 消失の割合を測定すると、人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株は最も緩やかに消失し、BCG がこれに次ぎ、鳥型菌竹尾株が最も速やかに消失することを認めた。

3) 次に前述の、 P^{32} 標識抗酸性菌の 60°C 1 時間加熱死菌 0.5 mg (湿量) を、同様にマウスの尾静脈及び腹腔内に注入して、 P^{32} をトレーサーとして、その菌体または菌体成分の、体内および肝よりの P^{32} の消失の割合を測定すると、鳥型菌竹尾株は最も速やかに消失し、BCG がこれにつき、人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株は最も緩やかであつた。そして人型結核菌 $H_{37}Rv$ 株と BCG とでは著明な差を認めなかつた。

稿を終るにのぞみ、終始御指導と御校閲を賜つた大阪市立大学刀根山結核研究所山村雄一助教授に深謝する。また本実験に使用した P^{32} は厚生省医務局国立療養所課関誠一郎博士、および社団法人日本放射性同位元素協会の御厚意によつて入手した。記して謝意を表す。また院長渡辺三郎博士の御校閲を賜つたことに對し深く感謝する。

本論文の要旨は第 10 回日本結核病学会近畿地方会および第 30 回日本結核病学会総会において発表した。

文 献

- 1) 山村雄一・吉田敏郎・菩提寺幹人・永管徳子：Radio-Isotope, 1 : 39, 昭 27.
- 2) 山村雄一・吉田敏郎・菩提寺幹人・石上敏幸・中村滋：Radio-Isotope, 2 : 55, 昭 28.
- 3) 吉田敏郎：結核, 29 : 147, 昭 29.
- 4) 山村雄一・山村好弘・谷淳吉・寺井武雄・高啓一郎：Radio-Isotope, 3 : 22, 昭 29.
- 5) 山村雄一・山村好弘・谷淳吉・寺井武雄・高啓一郎：第 9 回日本結核病学会近畿地方会発表, 昭 29.
- 6) 生田重雄・奥山典生：第 2 回日本生化学会近畿地方会発表, 昭 29.
- 7) 高木誠司：定量分析の実験と計算, 1 : 230, 昭 25.
- 8) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝・山村好弘：第 10 回日本結核病学会近畿地方会発表, 昭 29.
- 9) Lurie, M.B.: J. Exp. Med., 48 : 155, 1928.
- 10) Wessels, C.C.: Am. Rev. Tuberc., 43 : 459, 1941.
- 11) Pierce, C. H., Dubos, R. J., and Schaefer, W. B.: J. Exp. Med., 97 : 189, 1953.
- 12) Dubos, R. J., Pierce, C. H., and Schaefer, W. B.: J. Exp. Med., 97 : 207, 1953.
- 13) Dubos, R. J., Schaefer, W. B., and Pierce, C. H.: J. Exp. Med., 97 : 221, 1953.
- 14) Weiss, D. W., and Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 101 : 313, 1955.
- 15) 小川辰次・工藤祐是・高倉廉・岩崎龍郎・橋本芳郎・村瀬貞男：結核, 25 : 647, 昭 25.
- 16) 阿倍逸夫：結核, 28 : 374, 昭 28.
- 17) 阿倍逸夫：結核, 28 : 423, 昭 28.
- 18) 橋本達一郎：吉田幸之助：結核, 29 : 221, 昭 29.
- 19) 橋本達一郎：結核, 30 : 237, 昭 30.
- 20) 橋本達一郎・関根修：結核, 29 : 383, 昭 29.
- 21) 加藤允彦・三木勝治・松永清輝：医学と生物学, 34 : 161, 昭 30.
- 22) Martin, S.P., Pierce, C. H., and Middlebrook, R. J.: J. Exp. Med., 91 : 381, 1950.
- 23) Allgöwer, M., and Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 59 : 562, 1949.
- 24) Bloch, H.: J. Exp. Med., 91 : 197, 1950.
- 25) Bloch, H., Sorkin, E., and Erlenmeyer, H.: Am. Rev. Tuberc., 67 : 629, 1953.
- 26) Noll, H., and Bloch, H.: Am. Rev. Tuberc., 67 : 828, 1953.
- 27) Asselineau, J., Bloch, H., and Lederer, E.: Am. Rev. Tuberc., 67 : 853, 1953.
- 28) Spitznagel, J.K., and Dubos, R. J. Exp. Med., 101 : 291, 1955.