

I³²による実験的 日本脳炎に関する研究

第 二 篇

脳内病毒接種マウス脳及び肝に於ける核酸代謝の

Schmidt & Thanhauser 法による研究

岡山大学医学部平木内科教室 (主任: 平木 潔教授)

長 田 高 寿

〔昭和30年4月15日受稿〕

目 次

| | |
|-------------------|--|
| 第一章 緒 言 | |
| 第二章 実験材料並に実験方法 | |
| I P ³² | |
| II 実験動物 | |
| III 日本脳炎病毒 | |

| | |
|----------------|--|
| IV 実験方法 | |
| 第三章 実験成績及びその吟味 | |
| 第四章 総括並に考按 | |
| 第五章 結 論 | |
| 主要文献 | |

第一章 緒 言

1911年以来 von Hevesy²⁵⁾ は Rutherford の示唆にもとずき Radium D を含んだ硫化鉛やクロム鉛より Radium D の放射能の強さを測定することにより鉛の検出及び定量を手段とする法を案出し、近代放射能生物学の基礎を確立した。

Christiansen 及び Hevesy¹⁸⁾ 等は1924年放射能性鉛 RaE, 或は放射性鉛 RaD を動物に投与し、その吸収、排泄を系統的に追及している。これは実に放射性同位元素が始めて動物の物質代謝に応用された記念すべき研究であつた。

而して1930年すでに Hevesy²⁶⁾等は動物の腫瘍組織に於ける放射性鉛の分布を究明している。

かかる Hevesy 一門の放射性同位元素に於ける研究は Aschoff 門下の Schoenheimer⁴¹⁾ によつて受け継がれ重水素及び重窒素を用いて研究せる脂酸及びアミノ酸代謝に於ける Hevesy の賞讃措く能わざる業績として成し遂げられたのである。

而して1934年 Joliot, Irene Curie 夫妻等

が α 粒子を以て或種の原子核を衝撃することにより恰も天然の放射性物質と同様に電子(即ち β 線)等を放出する同位元素を人工的に発見し、以来人工放射性同位元素は種々の組織に直接放射性治療、即ち Laurence³¹⁾の所謂, selective irradiation を加え得る途を開き、又人体内で行われている多数の複雑な反応についての tracer research を容易にせしめた。

顧みれば、ラジウム及びレントゲン線が発見せられてより50年余を経過せるが、それ等が医学に革命的進歩を与え来つた今日、今また人工放射能同位元素も原子力工業の生んだ Uranium pile により大量にその生産が可能となるに及んで医学及び生物学の分野に於いて劃期的なる発展をもたらさんとしつゝある。

特に放射性同位元素による tracer research は放射性同位元素を通常の元素と共に少量即ちtracer doseに於いて生体に投与するとそれが発する放射線によつてその物質の所在を探知、追跡出来、而もその探知方法が従来の化学分析に比し極めて簡易で且つ鋭敏であるために広く人体或は動物体内に於ける或物質の移動乃至代謝の追及に大いに利用されつゝある。

すでに Stanley⁴³⁾ も指摘せる如く、最近10数年間に於けるウィールス研究の飛躍的な発展は多くの異つた科学部門の協力によつて得られた輝かしき成果の一つであり、化学及び物理学特に放射能生物学の果たした役割は大なるものがあつた。ウィールスに放射性同位元素の用いられたのは Stanley⁴²⁾ により実験されたタバコモザイクウィールスがそのはじめであるが以来、Cohen²⁰⁾, Evans²²⁾, Putnam³⁵⁾ 等のバクテリオファージに於ける応用、又 Libby 及び Madison³²⁾ 等の放射性タバコモザイクウィールスのマウス体内分布に関する研究、Graham 及び Mc-Clelland²⁴⁾ のインフルエンザウィールスの核酸割分に於ける P³² の分布に関する研究及び Rafelson³⁶⁾ 等の Theiler GD VII ウィールスの P³² の吸収実験等幾多の業績がある。

而して堀田¹⁴⁾等は、デング熱ウィールスに感染せるマウスに P³² を与え時を遂うて臓器を採り出しその中に含まれる放射能を各割分で検討した結果、ウィールス感染動物体内に於ける燐特に核酸燐の代謝に著るしい変動のあることを報告している。

私⁷⁾はさきに放射性同位元素 P³² を tracer として日本脳炎罹患マウス臓器に於ける燐代謝を Schneider 法⁴⁰⁾ に従い実験し、ウィールス罹患マウス群の脳及び肝に於ける核酸及び燐蛋白割分中の P³² 活性度の増大を認め、ウィールスにより宿主細胞の核酸を中心とせる物質に激しき変動の起こることを観察したが、続いて同様に P³² による tracer research を Schmidt & Jhanhauser 法³⁹⁾ にもとずいて行い、ウィールス感染時に於ける宿主細胞の複雑なる物質代謝様相を P³² を中心として追及し、更に解明せんと企図して以下の実験を行つた次第である。

第二章 実験材料並に実験方法

I P³²

使用せる P³² は米国 Oak Ridge 国立研究所より配布されたもので濃度 8.11±10% mc/ml, 極めて弱い硝酸中に P³²O₄ の型で

存し、その radiochemical purity は 99.9% 以上という性状のものを生理的食塩水で稀釈して用いた。

II 実験動物

体重10g の幼若健康マウスを小麦、煮干、野菜などすべて同一飼料にて飼育せるものを用いた。

III 日本脳炎病毒

昭和27年当内科教室にて分離固定せる岡山52B株¹²⁾を用いた。

IV 実験方法

前編と同様に新鮮な病毒罹患マウス脳を乳剤となし、之を pH 7.6 のグイオンにて10倍に稀釈し、遠心沈澱(毎分3000回転、15分間)その上清0.03ccを多数のマウス脳内に接種した。

その後時を遂うて潜伏期並びに発症期に於いて一定数のマウスを無選択的にとり出して P³² 10 μ c をマウス腹腔内に投与した。

このマウスを更に二群に分ち、一群は P³² 注射6時間後、他の一群は24時間後に頸動脈切断にて失血死せしめ夫々、脳及び肝を採取した。

対照として健康マウス脳乳剤を脳内接種、全く同様の処理を行つた。

採取せる脳及び肝は生理的食塩水で充分洗滌後、濾紙上にて水分を除き血液成分を出来るだけ除去した。

而して採取せる脳及び肝の一定量を正確に秤量し Schmidt & Thanhauser 法³⁹⁾ に従い

① D. N. A 割分

② R. N. A 及び燐蛋白割分

にそれぞれ分つた。

即ち一定量の組織に20容の氷冷7%トリクロール醋酸(TCA)を加えホモゼナイズし、これを Bühner ロートで濾過したのち残渣を氷冷1% TCA で充分洗滌、次いでアルコールエーテルで洗う。

続いて残渣を30容のアルコールエーテル混液(3:1)に懸濁し数分間沸騰せしめる。冷却後残渣をエーテルで乾燥させ還流冷却器をつけたフラスコ中でメタノールクロロフォル

ム混液 (1:1) の30容とともに30分間沸騰せしめた。再び冷却後濾過し、残渣をエーテルで乾燥せしめこれを試験管に移した。これにn-苛性カリの一定量を加えゴム栓で密栓して37°Cに15分間放置し、組織を完全に溶解せしめてのち0.2容の6N-HClと1容の5% TCAを加えて沈澱をおこさせた。この沈澱は全D.N.Aを含み、R.N.A及び燐蛋白の分解物はすべて濾液中に含まれている。故にこの沈澱及び濾液のそれぞれ全部を湿式灰化した。即ち第一編で詳述せる方法に於いて、燐マグネシウムアンモニウムとして沈澱せしめて約1時間放置せる後、その沈澱を吸引濾過により Counting cup にとる。これをアセトンにて一度洗滌後デシケーター内で完全に乾燥せしめ、カウンターにかける。

カウンターは神戸工業製ガイガー、ミューラー計数管、高圧電源装置、増幅器及びスクリーナー等を用いた。

而して脳では対照群ウィールス接種群とも5例について、肝ではそれぞれ3例についてその計数値を求めた。測定には一試料につき2分間宛5回の計数結果を平均し、その1分当り換算値から予め測定せる自然係数を減じたものを以て計数値となした。なお計数の際には出来るだけ試料と計数管との幾何学的条件が同一になる様に努めた。

第三章 実験成績及びその吟味

各試料の計測に際して注意を要するのは、荒木等¹⁾もいう如く Counting cup 内の試料の厚さ、試料と計数管との距離、計数管の窓が材料に対して張る立体角等の幾何学的条件を一定にし、計数の際に於ける P³² のβ線の自己吸収、及び空気中での吸収を同一条件にせねばならないことである。

而して放射性物質の崩壊は確率の法則によつて放射能測定時の計数値の度数分布は平均値 m の周囲に Poisson の分布をなしその際には \sqrt{m} なる標準誤差が入つて来る。また試料の放射能測定には自然計数を試料測定時の計数値より差し引かねばならないから実際の放射能の強さ N_{net} は $N_{net} = N_s - N_o \pm \sqrt{N_s + N_o}$ 但し N_s は試料測定時の計数、 N_o は自然計数とする。

この式によつて明らかなることは自然計数 N_o が大きい程 N_{net} の確実さが減少するということである。測らんとする放射能の強さが充分強いときには自然計数の影響は小さいが、微弱なる放射能の場合にはこの影響は考慮される様になる。

以上の点に留意しつゝ慎重に実験結果の吟味検討を行つた。

対照群及びウィールス接種群の各例についての脳0.5g各割分当りのG-M計数値を第1表及び第2表に示した。

第I表 脳0.5g各割分当G-M計数値 (潜伏期)

| 試料 | P ³² 注入後 6 時間 | | | | P ³² 注入後 24 時間 | | | |
|-----|--------------------------|---------------|---------|---------------|---------------------------|---------------|---------|---------------|
| | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | |
| | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 |
| I | 10 | 49 | 10 | 51 | 39 | 231 | 22 | 218 |
| II | 10 | 53 | 8 | 53 | 37 | 225 | 19 | 229 |
| III | 9 | 45 | 7 | 66 | 35 | 235 | 23 | 214 |
| IV | 8 | 52 | 9 | 49 | 35 | 221 | 19 | 225 |
| V | 8 | 57 | 7 | 66 | 40 | 238 | 21 | 213 |
| 平均 | 9 | 49.2 | 8.2 | 57 | 37.2 | 230.1 | 20.8 | 219.8 |

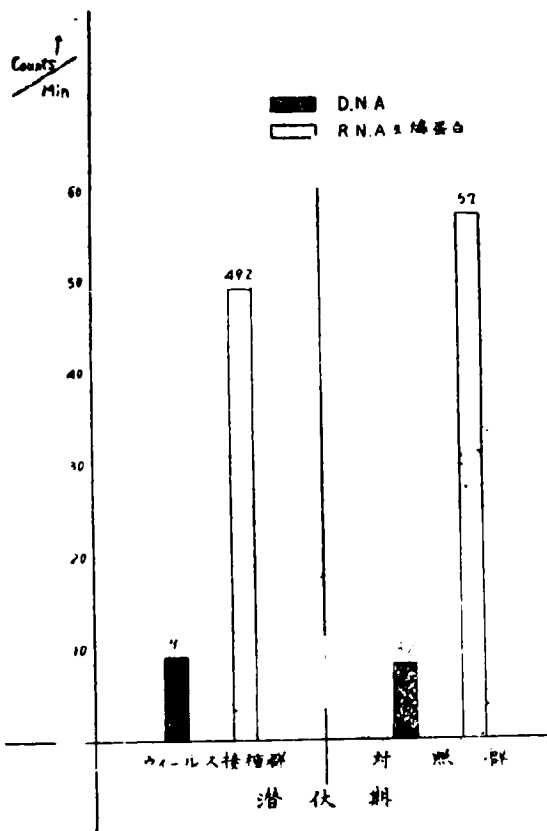
而して各試料の計測値の平均値を求め、それについて先ず潜伏期に於ける P³² 注射6

時間後の脳0.5g各割分当G-M計数平均値を第1図に表示した。

第II表 脳0.5g各劃分当G-M計数値 (発症期)

| 試料 | P32 注入後 6 時間 | | | | P32 注入後 24 時間 | | | |
|-----|--------------|----------------|---------|----------------|---------------|----------------|---------|----------------|
| | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | |
| | D. N. A | R. N. A 及び 燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び 燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び 燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び 燐蛋白 |
| I | 16 | 51 | 8 | 50 | 42 | 227 | 20 | 210 |
| II | 15 | 64 | 6 | 57 | 43 | 218 | 18 | 195 |
| III | 17 | 61 | 6 | 47 | 48 | 238 | 17 | 208 |
| IV | 15 | 55 | 7 | 53 | 44 | 221 | 19 | 202 |
| V | 17 | 62 | 7 | 48 | 44 | 235 | 20 | 194 |
| 平均 | 16 | 58.6 | 6.8 | 51 | 44.2 | 227.8 | 18.8 | 201.8 |

第1図 脳 0.5g 各劃分当 G-M 計数平均値 P32 注射 6 時間



二つの試料の平均値に差があるか否かを検定するためには各試料を足場として母分散が等しいか否かを調べねばならぬ。母分散 σ_1^2 , σ_2^2 の正規母集団からの無作為標本であるとき、不偏分散を u_1^2 , u_2^2 とすると、 $\sigma_1 = \sigma_2$ の仮説の下に於いて $F = \frac{u_1^2}{u_2^2}$ によつて定義された F は自由度 $n_1 = N_1 - 1$, $n_2 = N_2 - 1$ なる F 分布をなしている。但し N_1 及び N_2 はそれぞれの標本の実験例数である。さて潜伏期、P32 注

射後 6 時間に於ける脳 D. N. A をウィールス接種群と対照群で比較するに、前者を x 母集団、後者を y 母集団とすると

$$\bar{x} (\text{標本平均}) = 9, \bar{y} = 8.2$$

$$u_1^2 = \frac{1}{N_1 - 1} \sum_{i=1}^{N_1} (x_i - \bar{x})^2 = 1$$

$$u_2^2 = \frac{1}{N_2 - 1} \sum_{i=1}^{N_2} (y_i - \bar{y})^2 = 1.7$$

故に $F = 1.7$

而して 5% の F 分布表は $n_1 = n_2 = 4$ で $F(0.05) = 6.39$ であるから母分散が等しいという仮説は捨てられない。故に $\sigma_1 = \sigma_2$ とみなして t-分布を利用し、平均値の差を考察すると

$$t = \frac{\bar{x} - \bar{y}}{\omega \sqrt{\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2}}} \quad \text{に於いて } N_1 = N_2 = 5$$

$$\omega^2 = \frac{(N_1 - 1)u_1^2 + (N_2 - 1)u_2^2}{N_1 + N_2 - 2} =$$

$$\frac{\sum_{i=1}^{N_1} (x_i - \bar{x})^2 + \sum_{i=1}^{N_2} (y_i - \bar{y})^2}{N_1 + N_2 - 2} = 1.35 \quad \omega = 1.162$$

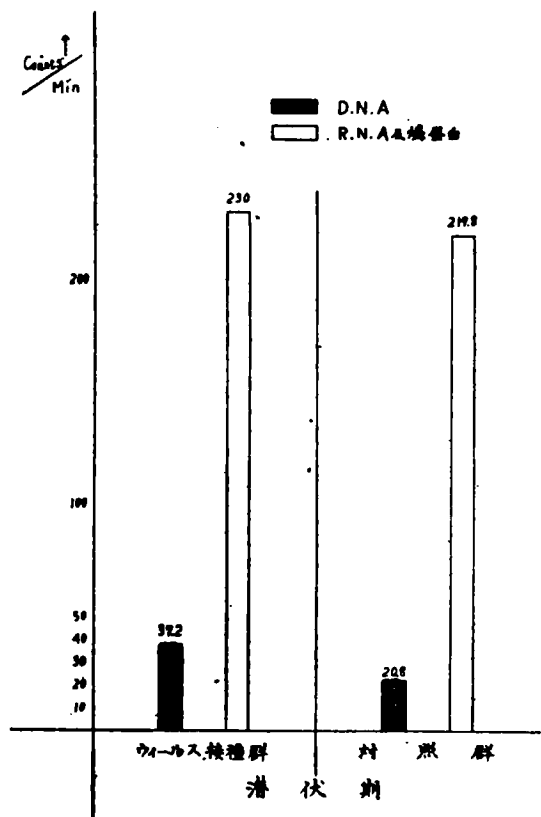
故に $t = 1.0$ となり自由度 $n = N_1 + N_2 - 2 = 8$ に対する t の値は $\alpha = 0.01$ で 3.555 であるから危険率 1% の有意水準で差があるとは認められない。

次に同様に脳 R. N. A の両者を比較するとこの場合は $F = 2.8$ で母分散が等しいという仮説は否定出来ない。次に $t = 1.8$ で自由度 8 に対する t の 1% 値は 3.555 であるから両者の間に危険率 1% の有意水準で差は認め

られない。

次に潜伏期で P³² 注射後 24 時間に於ける脳 0.5g 各割分当 G-M 計数平均値を第 2 図に示した。

第 2 図 脳 0.5g 各割分当 G-M 計数平均値 P³² 注射後 32 時間



この時期に於けるウィールス接種群と対照群の D.N.A 割分の試料を比較するに $F = 1.1$ で母分散が等しいという仮説は捨てられない。

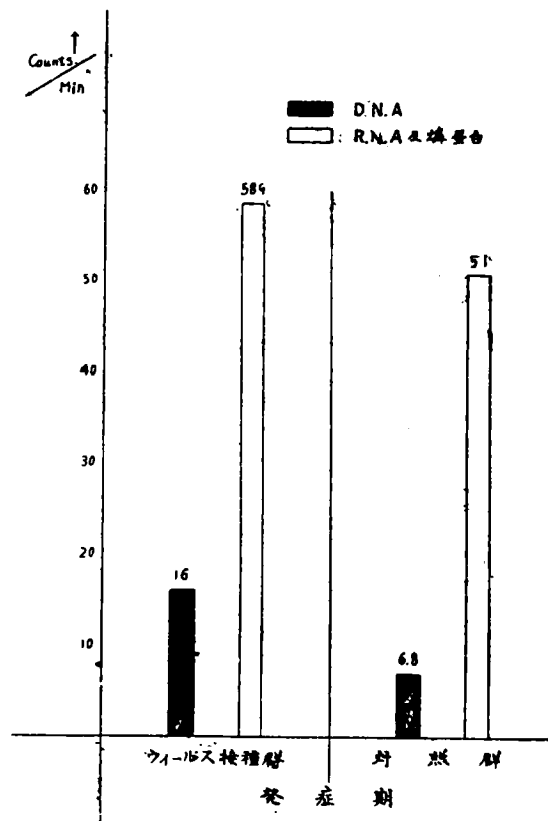
次に $t = 4.0$ で自由度 8 に対する t の 1% 値 3.555 に比較すると僅かに有意の差を示した。しかしこの場合、放射能測定時の計数値に関して N_s は N_o に対して充分大でないから誤差 $\sqrt{N_s + N_o}$ を充分考慮に入れねばならぬ故を以て明確に有意の差があるとは断定出来ない。

次いでウィールス接種群と対照群の R.N.A 及び燐蛋白割分の試料を比較するに $F = 1.0$ で $F_{1,8}(0.05) = 6.39$ であるから母分散が等しいという仮説は棄却を免かれる。而して

$t = 2.31$ であるから危険率 0.01% で有意の差を示さない。

次に発症期の P³² 注射後 6 時間に於ける脳 0.5g 各割分当りの G-M 計数平均値を第 3 図に示した。

第 3 図 脳 0.5g 各割分当 G-M 計数平均値 P³² 注射後 6 時間

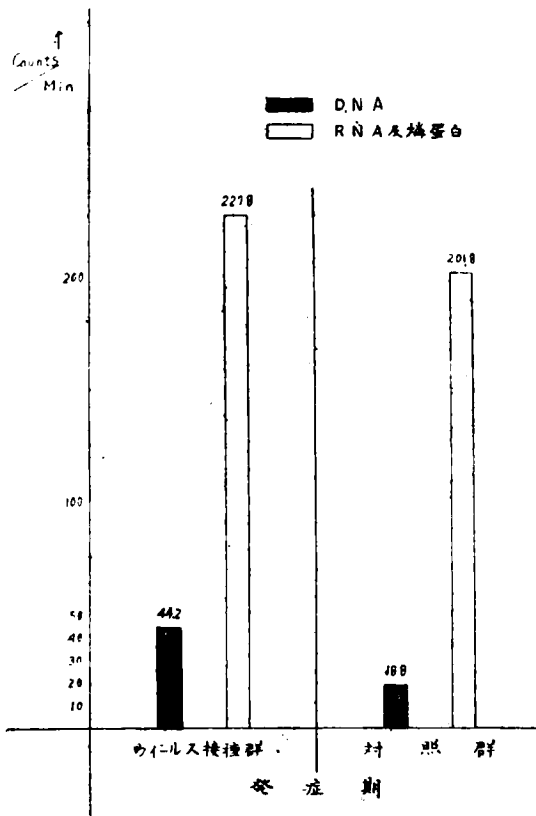


この時期に於けるウィールス接種群と対照群の D.N.A 割分を比較するに、この場合 $F = 1.42$ であるから母分散が等しいという仮説が成立する。而して $t = 17.9$ であるから 1% 有意水準で明確に有意の差を示した。しかしながらこゝに於いても N_s は N_o に対して充分大でない為に highly significant とは断定出来ない。同様にこの時期に於ける R.N.A 及び燐蛋白割分の試料を比較すると $F = 1.8$ で母分散が等しいという仮説は棄却されない。而して $t = 2.53$ となり同一母集団からの標本であるという仮説は棄却されない。即ち有意の差が認められない。

次に発症期に於ける P³² 注射 24 時間後の脳 0.5g 各割分当りの G-M 計数平均値を

第4図に示した。

第4図 脳 0.5g 各劃分当 G-M 計数平均値 P³² 注射後24時間



こゝでウィールス接種群と対照群のD.N.A 劃分を比較すると、この場合 $F=2.1$ で母分散が等しいという仮説が成立する。而して $t=20.6$ でこの値は t' 分布表より自由度8 に対する1%有意水準3.555より遙かに大であるから、危険率1%で有意な差が認められた。この場合は $\sqrt{N_s + N_o}$ の誤差を考慮に入れても significant でウィールス接種群のD.N.A 劃分に於ける P³² 活性度の著明なる増大が認められた。

次に R.N.A 及び燐蛋白劃分に於いて両者を比較すると $F=1.45$ で母分散が等しいという仮説は棄却をまぬかれる。而して $t=5.15$ であるから1%有意水準3.555に比べ有意であつた。しかしながら、これも $\sqrt{N_s + N_o}$ の誤差を考えると明確には断定出来ないが、発症期 P³² 注入24時間後に於ける R.N.A 及び燐蛋白劃分の P³² 活性度はウィールス接種群に於いて D.N.A 劃分程ではないが稍々増大の傾向が認められた。

次に対照群及びウィールス接種群の各例についての肝 0.5g 各劃分当 G-M 計数値を第3表及び第4表に示した。

第III表 肝0.5g各劃分当G-M計数值 (潜伏期)

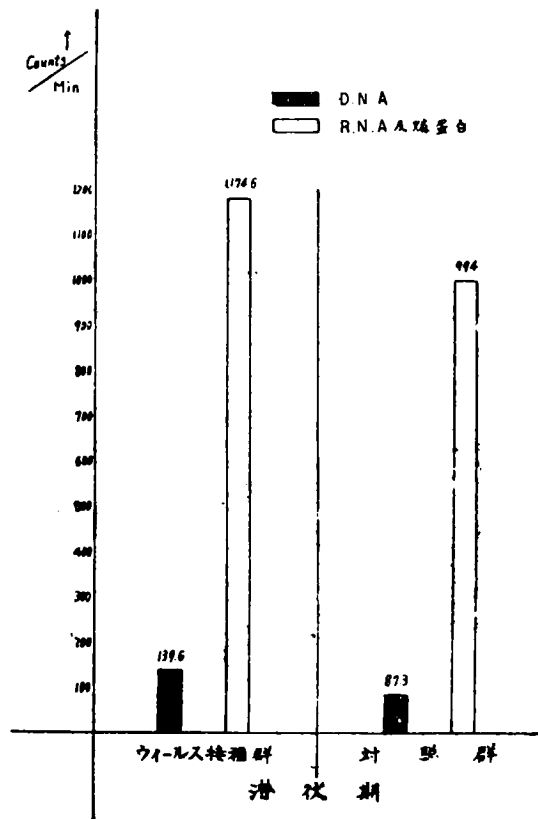
| 試料 | P ³² 注入後 6 時間 | | | | P ³² 注入後 24 時間 | | | |
|-----|--------------------------|---------------|---------|---------------|---------------------------|---------------|---------|---------------|
| | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | |
| | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 |
| I | 132 | 1213 | 86 | 988 | 149 | 785 | 94 | 733 |
| II | 147 | 1123 | 82 | 972 | 135 | 805 | 87 | 740 |
| III | 140 | 1188 | 94 | 1012 | 152 | 825 | 89 | 771 |
| 平均 | 139.6 | 1174.6 | 87.3 | 994 | 145.3 | 805 | 90 | 748.3 |

第IV表 肝0.5g各劃分当G-M計数值 (発症期)

| 試料 | P ³² 注入後 6 時間 | | | | P ³² 注入後 24 時間 | | | |
|-----|--------------------------|---------------|---------|---------------|---------------------------|---------------|---------|---------------|
| | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | | ウィールス接種群 | | 対 照 群 | |
| | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 | D. N. A | R. N. A 及び燐蛋白 |
| I | 127 | 1005 | 99 | 997 | 124 | 795 | 91 | 771 |
| II | 112 | 1062 | 92 | 1059 | 133 | 772 | 104 | 751 |
| III | 131 | 1085 | 89 | 1028 | 118 | 755 | 99 | 743 |
| 平均 | 123.3 | 1050.6 | 93.3 | 1028 | 125 | 774 | 98 | 755 |

而して脳に於ける場合と同様に各試料の計測値の平均値を求め、先ず潜伏期の P³² 注射6時間後に於ける肝 0.5g 各割分当 G-M 計数平均値を第5図に表示した。

第5図 肝 0.5g 各割分当 G-M 計数平均値 P³² 注射6時間



而して両者の平均値の差を t-分布で検定する前に脳の場合と同様、先ず分散の均斉性を調べなくてはならない。何故ならば分散の均斉性が示されていないときには t-分布による検定で有意的となつても、それは平均値の差の有意性を直ちに意味するとはいえないからである。

この場合 D.N.A 割分をウィルス接種群、対照群で検定すると分散比 $F = \frac{u_2^2}{u_1^2} = 1.5$

であり、この場合の5%のF表からの数値は $n_1=2, n_2=2$ に対して $F_2^2(0.05) = 19.0$ で u_1^2, u_2^2 が共に同一母集団の σ^2 の不偏評価量であるという仮定が成立する。次に $t = 9.39$ で自由度 $n = 3 + 3 - 2 = 4$ に対する t の 1%

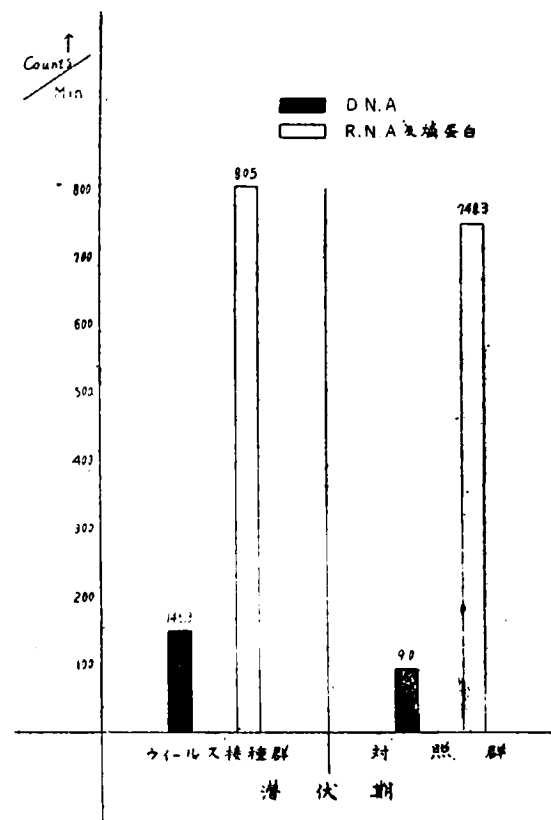
の値は 4.604 であるから母平均が等しいという仮説は 1%以下の危険率で否定された。

しかしながらこれは $\sqrt{N_s + N_o}$ の誤差を考慮に入れると辛うじて有意の差があるといえよう。

次に R.N.A 及び磷蛋白割分をウィルス接種群と対照群で比較するにこの場合は $F = 4.88$ であるから母分散が等しいという仮説は否定出来ない。而して $t = 6.2$ であるから危険率 1%で有意の差を示した。この場合は $\sqrt{N_s + N_o}$ の誤差を考慮に入れても尚、有意の差が認められる。

次に潜伏期、P³² 注射24時間後に於ける肝 0.5g 各割分当りの G-M 計数平均値を第6図に表示した。

第6図 肝 0.5g 各割分当 G-M 計数平均値 P³² 注射後24時間



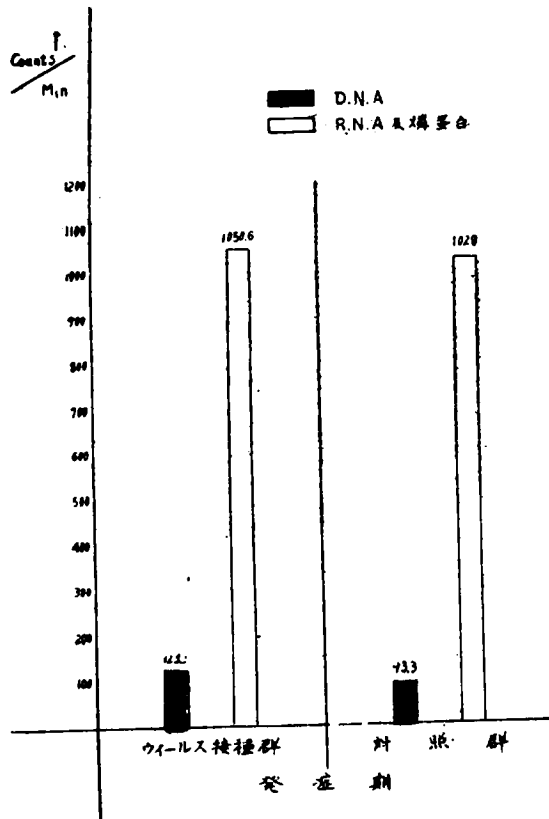
ウィルス接種群と対照群の D.N.A 割分の平均値を比較するに $F = 6.33$ で母分散が等しいという仮説は棄却出来ない、次に $t = 13.6$ で自由度 $t_{0.01} = 4.604$ に比べ甚しく有意である、しかもこの場合に於いては、

$\sqrt{N_s + N_o}$ の誤差を考慮に入れても尚, significant である,

次に R. N. A 及び燐蛋白劃分の両者を比較するに $F=1.08$ で母分散が等しいという仮説は否定出来ない. 而して $t=3.4$ であるからこの場合, ウィールス接種群と対照群の間の R. N. A 及び燐蛋白劃分に於ける G-M 計数值は有意の差を示さない.

発症期に於ける P^{32} 注入 6 時間後の 0.5g 各劃分当 G-M 計数平均値を第 7 図に示した.

第 7 図 肝 0.5g 各劃分当 G-M 計数平均値 P^{32} 注射後 6 時間



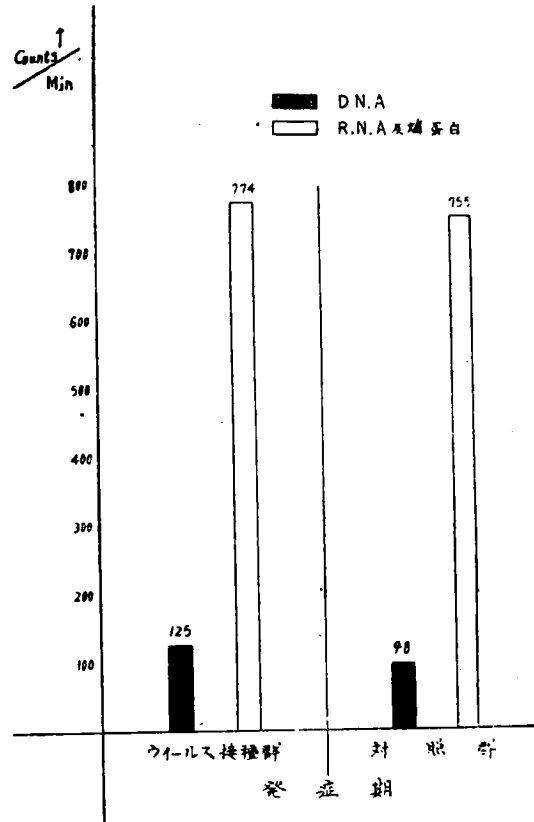
この場合に於けるウィールス接種群と対照群の D. N. A 劃分の平均値を比較すると $F=3.8$ で母分散が等しいという仮説は否定出来ない. 次に $t=4.617$ で自由度 4 に対する t の 1% 値は 4.604 であるから辛うじて有意となる. しかし $\sqrt{N_s + N_o}$ の誤差を考慮に入れると明確な有意の差があるとは断定出来ないがウィールス接種群の D. N. A 劃分の P^{32} 活性度は稍々増大の傾向が認められた.

次に R. N. A 及び燐蛋白劃分を両者に於

いて比較するに $F=1.75$ で母分散が等しいという仮説は棄てられない. 而して $t=0.75$ であるから危険率 1% で有意の差は見出し得なかつた.

最後に発症期, P^{32} 注入 24 時間後の肝 0.5g 各劃分当 G-M 計数平均値を第 8 図に表示した.

第 8 図 肝 0.5g 各劃分当 G-M 計数平均値 P^{32} 注射後 24 時間



この時期に於けるウィールス接種群と対照群の両者の D. N. A 劃分を比較検討するに, この場合は $F=1.33$ で母分散が等しいという仮説が成立する. 次いで $t=4.50$ であり, これは自由度 4 に対する 1% 有意水準 4.604 より小であるため, 有意な差が認められない.

次いで R. N. A 及び燐蛋白劃分を両者で比較すると $F=1.93$ で母分散 σ^2 が同じであるという仮定が成立する. 而して $t=1.33$ でこれは自由度 4 に対する有意水準より小であるため仮説は棄却されない. 即ちウィールス接種群及び対照群に於ける R. N. A 及び燐蛋白劃分に有意の差は認められなかつた.

第四章 総括並びに考按

以上詳述せる実験成績を総括すれば次の如くである。

I. ウィールス接種群及び対照群の脳に於ける D. N. A 劃分の Counts per minute per 0.5 gram of tissue, 即ち P³² 活性度を比較すると潜伏期, P³² 注射後 6 時間に於いては全くその差を認め得なかつたが, P³² 注射後 24 時間に於けるウィールス接種群の P³² 活性度は稍々増大が認められた。而して発症期に於いては P³² 注射 6 時間後, 24 時間後共にウィールス接種群は対照群に比べ増大が認められた。

II. 次に脳に於けるウィールス接種群と対照群の R. N. A 及び燐蛋白劃分は D. N. A 劃分に比しその活性度は大であつた。しかし潜伏期に於ける両者を比較した場合には P³² 注入 6 時間, 24 時間後とも有意の差は認められなかつた。発症期に於いては P³² 注入 6 時間後では有意の差は認められないが, P³² 注入 24 時間後ではウィールス接種群に稍々増大の傾向が認められた。

III. 肝に於けるウィールス接種群と対照群の D. N. A 劃分の P³² 活性度を比較するに、既に潜伏期, P³² 注射後 6 時間に於いて両者の間に有意の差が認められた。

即ちウィールス接種群に於いて, D. N. A 劃分の P³² 活性度の増大が認められたのである。

潜伏期 P³² 注入 24 時間後に於いても明らかに有意的な P³² 活性度の増大をウィールス接種群の D. N. A 劃分で認めた。

次いで発症期に於いても P³² 注射 6 時間後のウィールス接種群で, D. N. A 劃分の P³² 活性度に増大の傾向が認められたが, P³² 注入 24 時間後では両者の間に特筆すべき差は見出し得なかつた。

IV. 次に肝に於けるウィールス接種群と対照群の R. N. A 及び燐蛋白劃分は D. N. A 劃分に比するとその活性度は大である。而して両者を比較検討するに潜伏期 P³² 注入 6 時

間後に於いてはウィールス接種群の P³² 活性度は対照群に比し増大が認められた。しかるに P³² 注入 24 時間後に於いてはその差は認められず同様に発症期に於いても両者の間に有意の差は見出し得なかつた。

××× ×××

さて第一編に於いても述べたる如く, ウィールス感染に伴つて宿主細胞の核酸に著しき変動の生ずることはすでに Hydén²⁸⁾ が紫外線顕微鏡撮影の所見により詳細に観察せるところである。

而もウィールスは Knight³⁰⁾ の分類によつても明らかなる如くその化学組成は, 植物ウィールスに於いては, R. N. A と蛋白のみからなる簡単な核蛋白であるが, 動物ウィールス, 細菌ウィールスの多くは蛋白及び D. N. A の他にリピドその他を含む複雑なる複合体である。

このようにウィールスの核酸の量及び種類は各ウィールスで異つたものであるが今日まで得られたウィールスの中で核酸が必ず含まれているという事実は決して軽視出来ない問題であらう。

而してウィールス感染組織に於ける核酸代謝に於いて如何なる種類の核酸が関係するかは, 江上等⁴⁾ も述べたる如く, ウィールスの核酸はウィールスの種類ごとに特異性があると信ぜられるが故に極めて興味ある課題である。

これに関して Cohen²⁰⁾ はウィールス増殖の際に於ける宿主細胞の新陳代謝を, P³² を用いて研究し数々の重要な結果を観察した。即ち大腸菌ウィールス T₂ バクテリオファージは Cohen¹⁹⁾ によると 37% の D. N. A を含むといわれるが, 彼はこの T₂ r⁺ 感染の大腸菌について実験し, 感染後 7 分に於いて D. N. A の増加が開始され, この D. N. A の合成率は未感染菌体のその約 4 倍であり, 感染菌体では蛋白総合含水炭素のわずかの増加が認められるが, R. N. A の著明な増加は認められない, しかるに一方未感染菌体では

R. N. A は D. N. A の 3 倍以上あると述べている。

T₆ r⁺による同様な結果も Putnam³⁵⁾によつて最近報告されている。

更に Rafelson³⁶⁾等はマウスの脳組織に Theiler's GD VII ウィールスを接種すると、正常組織より活潑に P³² をとりこむようになることを試験管内で確めている。而してこの P³² の摂取量の増加は感染組織中の R. N. A 合成の活潑になつたことに基くと考察している。

Saenz³⁸⁾もインフルエンザウィールスの孵化卵組織について同様な結果を観察し、本邦に於いても木村¹⁰⁾のデング熱ウィールスに於ける研究によりその感染の極期に於いて、P³² は R. N. A にもつとも多くとり込まれることが報告されている。

以上の諸実験はウィールス感染組織内に於いて各ウィールスに特有なる核酸が、著るしい変動を起こすことを同位元素という新しい手段を駆使することにより、その解明を試みた先人諸家の特筆すべき業績の一端である。

されば日本脳炎ウィールス感染時の宿主細胞の代謝には如何なる種類の核酸が関係しているのであらうか。

すでに私⁷⁾は第一編に於いて日本脳炎ウイルス脳内接種マウスの脳及び肝を Schneider⁴⁰⁾法により各割分にち、その P³² 活性度を測定し脳及び肝の発症期に於ける核酸及び燐蛋白割分の P³² 活性度の増大を認め、就中肝にてはすでに潜伏期に於いて核酸及び燐蛋白割分の P³² 活性度の増大を認めた。

即ち脳に於いては日本脳炎の脳脊髄期、肝に於いては所謂内臓期にそれぞれ一致して核酸及び燐蛋白割分の著るしい変動が惹起されるのを推察した。

而して今回は Schmidt & Thanhauser³⁹⁾法に於いて上記の実験成績を検討し、ウィールス接種群の脳の D. N. A 割分に特に烈しい変動が起こることを推察したのである。

最近の文献をたずねるに、市川²⁾に於いては日本脳炎ウィールスをマウスに接種後、時

間置きに各種染色法を施したるマウス脳の病理組織学的検索を行い、感染末期の核内に於ける D. N. A の異常増殖を認め、核内に於けるウィールスの寄生を想像している。

又、小沢⁸⁾も日本脳炎罹患マウス脳を Feulgen 染色及び Pyronin, methyl 緑染色で核酸消長を経時的に観察し、神経細胞核内 D. N. A は 48 時間より漸増し、仁附属染色質として仁に接して増加する特異的所見を認めている。

更に教室方円¹³⁾も日本脳炎ウィールス接種マウスの感染極期に於ける脳の D. N. A の定量的増加を観察している。

一方米国の Beard¹⁷⁾は西部馬脳炎ウィールスの定量的分析値に於いて R. N. A を認め上記諸家の成績とは一致していない。

翻つて私の実験成績を以上諸家の観察と比較検討する。私の実験によれば日本脳炎感染組織に於いて潜伏期ではすでに肝に於いて、又発症期にては脳に於いて、それぞれ核酸代謝の亢進に伴つて P³² 活性度の増大が観察され、宿主細胞の特に D. N. A 割分に激しき変動の起ることが観察されたのである。

即ち日本脳炎感染により、就中脳に於いては市川等の想像せる如く核内ウィールス寄生によつてそれ運動的平衡状態にあつた核内 D. N. A の平衡が破れ激しき変動の起ることが想像されるのである。

抑々、生体に投与せられた放射性燐は特定の細胞及び組織によつて急速且選択的に吸収される。Reinhard³⁷⁾は細胞の放射性の選択的吸収は主として次の三要素によつて左右されると述べている。即ち

- ①組織内の交換可能の形にある燐の総量
- ②組織による燐排出速度
- ③新組織形成の速度

であるとしている。

Friedell²³⁾も放射性燐の吸収率は組織の新陳代謝活性度並びにその成長率の如何によると報じ、Tuttle 及び Lawrence⁴⁴⁾も白血病浸潤のあるマウスの肝、脾、リンパ腺などの核蛋白及び酸可溶性燐に於ける放射性燐の吸放

が健常マウスのそれに比し数倍の増加ありしを観察し、更に Jones²⁹⁾は、放射性磷は腫瘍組織と健常組織に凡そ 2:1 の割合に分布するとの所見を発表している。

而して Marshak³³⁾も又、急速に増殖せる細胞の核は通常の細胞の核より以上に P³² を吸収するという。

されば病的状態にあり、急速に新陳代謝の行われる、例えばウィールス感染組織などの核には P³² が入り易いことは、上記諸家の観察により容易に推察されるところである。

一方静止核内には P³² の入り難いことが既に報ぜられている²¹⁾。即ち静止核内の D. N. A は極めて安定せる動的平衡状態にあるのである。これが日本脳炎ウィールス感染により核内 D. N. A の動的平衡状態が破れ、従つてこの割合に入る P³² も増大したものと推察される所以である。

要之、私の実験成績は前編に於いて提示せる成績と全く一致し、而も市川、小沢の成績と一方は病理組織学的、他方は機能学的とその観察の面こそ異なれ互いに矛盾なく相補い合うものであると解される。

更に宇野³⁾は日本脳炎患者の脳脊髄液中の核酸を定量し、有熱時に於いて、D. N. A, R. N. A 共に高値を示し、D. N. A は体温下降時も猶高く、平熱になると減少すると述べている。而してこの成績は高熱期に神経組織に於ける滲出性病変による主として血管周囲細胞の崩壊並びにウィールスそのもの増加に関係があると考察している。こゝに於いて以上の成績を私の実験結果と比較するとき早速なる結論は断定し難いが甚だ興味ある事実と思われる。

私の実験成績をみるに、肝に於いてはすでに潜伏期、P³² 注入後 6 時間でウィールス接種群の D. N. A 割合、R. N. A 及び磷蛋白割合の P³² 活性度の増大が認められ、その 24 時間後に於いても D. N. A 割合の P³² 活性度が増加し、更に発症期 P³² 注入 6 時間後に於いても D. N. A 割合の P³² 活性度が増加している。

即ち前編に於ける実験成績とは同様に緒方教授⁵⁾等の所謂内臓期に既にウィールス接種群の肝に於ける核酸割合 P³² 活性度の増大が観察された。これは又、小川⁶⁾等の日本脳炎ウィールス接種マウスに於いて、内臓相は脳脊髄相に先行して現われるという病理組織学的観察と合わせ考えても、日本脳炎の病期的観察に有力なる一証左を与えたものであると信ずる。

しかしながら第一編でも述べた如く、以上の成績を吟味する上に於ては P³² の放射する β 線の核酸代謝に及ぼす影響を検討せねばならない。X 線或いは P³² の β 線が核酸代謝に影響を与えるという事実はすでに諸家¹⁵⁾⁹⁾¹¹⁾²¹⁾の報告によるところであるが、一方 Hevesy²⁷⁾は通常指示剤に用いる元素では、放射性をもつ元素と、もたない元素との間の差異は極めて小さいか、或は全く無視出来るといつてゐる。しかし Barnett¹⁶⁾によれば放射性同位元素は著るしい生理的影響をもつかも知れないから、これを用いた生理的研究は充分注意すべきであるという。

Mullins²⁴⁾も Na²⁴ が tracer として用いられたとき、その放射能がある程度以上強いときはその β 放射性が生理現象に影響を及ぼすと述べている。しかしこの効果をあらわす程度の Na²⁴ の量は通常の tracer dose に比べ遙かに多い量である。Lawrence⁴⁵⁾はマウスに tracer dose と therapeutic dose とを用いて比較し、マウス臓器にとり入れられる P³² の量を測定し P³² の大量を用いたときの放射線の影響を検討しているが、物質代謝研究の結果の解釈に於いて放射性元素が大量或は少量用いられたかを知らねばならぬことを強調している。

これら諸家の論述するところを通覧する上に於いて、私の用いた量についても充分 P³² 自身の β Radiation を検討さるべきであるが、対照群との明らかなる差は一応の傾向を知る上に於て有意的であると信ずる。

以上私は第一編に引続き日本脳炎罹患マウス臓器脳及び肝に於ける核酸代謝を P³² を

用いて追求し、前編で得たウィールス接種群の核酸劃分に於ける P^{32} 活性度の増大を確認すると共に、ウィールス接種群の主として D. N. A 劃分に激しき変動の起ることを、その P^{32} 活性度の増大により推察したのである。

第五章 結 論

私は前編の Schneider 法に引続き P^{32} を tracer として日本脳炎ウィールス感染組織脳及び肝に於ける核酸代謝を Schmidt & Thanhauser 法により検討し次の結果を得た。

I. 脳に於いては発症期 P^{32} 注入 6 時間後の D. N. A 劃分で、対照群に比しウィールス接種群の P^{32} 活性度の増大を認め、 P^{32} 注入 24 時間後では D. N. A 劃分に於ける P^{32} 活性度の明らかに有意的な増大を認め、又 R. N. A 劃分に於いても増大の傾向が認めら

れた。

以上の結果より発症期に於けるウィールス接種群の主として D. N. A 劃分に激しき変動の起ることが推察された。

II. 肝に於いてはウィールス接種群はすでに潜伏期、即ち内臓相で P^{32} 注入 6 時間後の D. N. A 劃分、R. N. A 及び燐蛋白劃分に於いて P^{32} 活性度の増大を示し、 P^{32} 注入 24 時間後にも D. N. A 劃分の P^{32} 活性度の有意的な増大を認め、更に発症期 P^{32} 注入 6 時間後の D. N. A 劃分に於いてウィールス接種群に於ける P^{32} 活性度の増大の傾向を認めた。

III. 以上の実験結果は第一編に於いて観察せられた Schneider 法による実験結果と略々同一の傾向にあることを確認した。

拙筆するに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜りし恩師平木教授に深甚の謝意を表す。

主 要 文 献

- 1) 荒木他 4 名：新医学，6 卷，855 頁，昭 26.
- 2) 市川：医学と生物学，16 卷，267 頁，昭 25.
- 3) 宇野：環境医学研究所年報，3 号，38 頁，昭 27.
- 4) 江上，柴谷：核酸，昭 28.
- 5) 緒方，高木：日本医学及び健康保険，3269 号，5 頁，昭 17.
- 6) 小川：第三回日本ウィールス学会発表.
- 7) 長田：日本内科学会雑誌，44 卷，17 頁，昭 30.
- 8) 小沢：日本体質学雑誌，18 卷，100 頁，昭 28.
- 9) 小田：細胞核病理学雑誌，1 卷，281 頁，昭 29.
- 10) 木村，堀田：日本細菌学雑誌，8 卷，109 頁，昭 28.
- 11) 佐藤他 2 名：細胞核病理学雑誌，2 卷，63 頁，昭 29.
- 12) 平木他 3 名：岡山医学会雑誌，65 卷，5 頁，昭 28.
- 13) 方円：第 29 回日本伝染病学会発表.
- 14) 堀田他 2 名：Virus，2 卷，26 頁，1952.
- 15) Ahlström, L. V., Euler, H., Hevesy, G., Ark. Kemi. Min. Geol., A21, No. 6, 1945.
- 16) Barnett, A., Phys. Rev., Vol. 56, P. 963, 1939.
- 17) Beard, J. W., Physiol. Rev. Vol. 28, P. 349, 1948.
- 18) Christian, J. A., Hevesy, G., and Lemholt, S., C. R. Acad. Sci., Vol. 179, P. 241, 1924.
- 19) Cohen, S. S., J. exp. Med., Vol. 84, P. 511, 1946.
- 20) Cohen, S. S., J. Biol. Chem., Vol. 174, P. 295, 1948.
- 21) Euler, H., and Hevesy, G., Ark. Kemi. Min. Geol., A17, No. 30, 1944.
- 22) Evans, E. A., Jr., : Bacteriol. Review, Vol. 14, P. 210, 1950.
- 23) Friedell, H. L., and Storsali, J. P., ; J. Clin. Invest., Vol. 28, P. 1308, 1949.
- 24) Grahm, A. F. and McClelland, L., : Nature, Vol. 163, P. 949, 1949.
- 25) Hevesy, G., and Paneth, F., : Z. anorg. Chem., Jg. 82, S. 322. 1913.
- 26) Hevesy, G. and Wagner, O. H., : Arch. exp. Path., Vol. 149, P. 336, 1930.
- 27) Hevesy, G., Phys. Rev. Vol. 57, P. 240, 1940.
- 28) Hydén, H., : Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. Vol. 12, P. 104, 1947.
- 29) Jones, H. B., Chaikoff, I. L., and Lawrence,

- J. H., *Am. J. Cancer*, Vol. 40, P. 243, 1940.
- 30) Knight, C. A., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, Vol. 12, P. 115, 1947.
- 31) Lawrence, J. H., *J. A. M. A.*, Vol. 134, No. 3, P. 219, 1947.
- 32) Libby, R. L., and Madison, C. R., *J. Immunol.*, Vol. 55, P. 15, 1947.
- 33) Marshak, A., *Science*, Vol. 92, P. 460, 1940.
- 34) Mullins, L. I., *Phys. Rev.*, Vol. 56, P. 1244, 1939.
- 35) Putnam, F. W., and Kozloff, L. M., *Science*, Vol. 108, P. 386, 1948.
- 36) Rafelson, M. E., Tr., Winzler, R. J., Pearson, H. E., *J. Biol. Chem.*, Vol. 181, P. 583, 1949.
- 37) Reinhard, E. H., Moore, C. V., Bierbaum, O. S., Moore, S., *J. Lab. & Clin. Med.*, Vol. 31, P. 107, 1946.
- 38) Saenz, A. C., and Taylor, R. M., *J. Imm.*, Vol. 63, P. 331, 1949.
- 39) Schmidt & Thanhauser *J. Biol. Chem.*, Vol. 161, P. 83, 1945.
- 40) Schneider, W. C., *J. Biol. Chem.*, Vol. 161, P. 293, 1945.
- 41) Schoenheimer, R., and Rittenberg, D., *J. Biol. Chem.*, Vol. 111, P. 163, 1935.
- 42) Stanley, W. M., *J. gen. Physiol.*, Vol. 25, P. 881, 1942.
- 43) Stanley, W. M., *Am. Sci.*, Vol. 36, P. 59, 1948.
- 44) Tuttle, L. W., Erf, L. A., Lawrence, J. H., *J. Clin. Invest.*, Vol. 20, P. 57, 1941.
- 45) Tuttle, L. W., Erf, L. A., Lawrence, J. H., *J. Clin. Invest.*, Vol. 20, P. 577, 1941.

Department of Internal Medicine, Okayama University, Medical School
(Director · Prof. Dr. K. Hiraki)

EXPERIMENTAL STUDIES ON JAPANESE B ENCEPHALITIS WITH THE RADIOACTIVE P³²

2. INVESTIGATION OF NUCLEIC ACID METABOLISM BY SCHMIDT & THANHAUSER'S METHOD IN THE ORGANS, BRAIN AND LIVER, OF MICE INFECTED WITH JAPANESE B ENCEPHALITIS VIRUS.

By

Takahisa Osada

In the previous paper by the same author the nucleic acid metabolism in some organs which was infected by Japanese B Encephalitis was studied by Schneider's method. Some detailed study by Schmidt & Thanhauser's method on this problem was further undertaken and is going to be reported here.

P³² was used as the tracer throughout this investigation and was injected intraperitoneally into the mice at the acme stage of infection.

After the time intervals of 6 and 24 hours were collected certain quantities of brain,

which were then fractionated by Schmidt & Thanhauser's method into DNA- and RNA-fractions

These nucleic acid fractions were investigated on their P^{32} contents.

By comparing the results with those obtained from the control references made by treating the healthy mice with P^{32} in the same way, an increase in P^{32} -activity was recognized at the DNA-fraction of the brain, this indicating the fact that, when mouse is infected with the virus, the DNA-fraction of the brain suffers a marked change.

Similar investigation was also carried out at the incubation period.

In this case, however, an increase in the P^{32} -activity was observed at the DNA and RNA-fraction of the liver collected from the mice infected with the virus. It is fully interesting that this increase in P^{32} -activity shows intimate accordance with the visceral phase of the disease.
