非密封放射性同位元素の安全取扱い (Ⅲ)

微生物実験†

高橋 甫

東北大学農学部

仙台市堤通雨宮町1の1

微生物を用いる RI 実験もその安全取扱いに関しては化学実験、あるいは生化学実験ととくにことなる点は少ない。ここでは RI を用いるうえでの一般的な安全取扱いに関する注意は十分心得ているものとして、微生物を用いるうえできに注意すべき事項について述べる。微生物を用いる RI 実験はほとんどがトレーサー実験で、取り扱う核種は ^{14}C と ^3H が他の核種に比べ圧倒的に多く、また取り扱う化合物も有機化合物が多いので、本稿ではこれらの取扱いに限定して述べるが、他の軟β線核種を用いる場合もこれに準じて取り扱うことができる。 ^{32}P のような硬β線核種またはγ線核種を取り扱う場合は被ばくに注意を要するが、これについては別の講座を参照されたい。

^{14}C または ^3H でラベルされた微生物、その代謝生産物などはすべて生体物質で、これらが取扱者の体内にはいった場合容易に組織などにとりこまれ、内部被ばくの危険がある。軟β線核種は外部被ばくに関しては危険はないが、吸いこむこと、飲みこむことがおこらないようきに注意をはらう必要がある。

1. 実験をはじめる前に

非密封のラベル化合物を用いて実験を行なえば、どのように注意をはらってもある程度の汚染をおこすことはさけられない。したがってまずその実験にラベル化合物を用いることの必要性について十分の考察が必要である。ラベル化合物を利用する理由は他の方法では検出が困難であるか、または他の方法で実験することが時間的または経済的に困難であることにある。盲目的にラベル化合物を利用することはさけ、その必要性を明確に意識することが大切である。つぎに留意すべき点は無意味な実験をできるだけさけることである。つまり、実験の結果得られるであろう情報が最大となるような綿密な実験計画をたてる必要がある。とくに初心者には RI 実験について不必要におそれたり、あるいは逆にまったく無神経であったりする場合が多

いので、実験をはじめる前に実験計画、実施の方法、廃棄物の処理などについて経験者と十分に討論することが必要である。自己流に行なうことは時に実験の結果をまったくあやまらせたり、重大な汚染をひきおこす場合がある。

2. ラベル化合物を用いる微生物の培養

微生物実験が化学実験と最もことなる点は、微生物をラベル化合物の存在下に培養することが必要な場合がある点であろう。これにはたとえばラベルしたアミノ酸を用いて短時間にタンパク質へのとりこみを見るといった簡単な実験から、ラベルした先駆体を用いて比較的長時間培養を行なって菌体をラベルし、それから特定の物質を調製して、これをのちの実験に使用するというやや複雑な実験までが含まれる。いずれにしろ微生物を対象とした実験であるから微生物学的な純粋さ、つまり雑菌の汚染防止には十分の注意が必要である。使用する微生物の濃度が十分大きく、かつ反応を2～3時間以内に終る場合はとくに無菌操作を必要としない。ただし、長時間にわたる実験または微生物のいちじるしい生育を伴う実験では、無菌操作を行なって培養終了まで微生物的な純粋さを保持する必要がある。

一般に生合成速度の測定などの場合には μCi オーダーのラベル化合物が使用され、ラベルした基質を微生物合成する場合には時に mCi オーダーのラベル化合物が用いられる。

2.1 使用ガラス器具などに対する注意

たとえば mCi オーダーの ^{14}C または ^3H を使用し

† Safe Handling of Unsealed Radioisotopes (Ⅲ) Microbiological Experiment, Hajime TAKAHASHI: Faculty of Agriculture, Tohoku University, Sendai.

たガラス器具、遠心チューブ、ピペットなどの器具はよく洗浄してもかなりの放射能汚染が残ることがあり、これらを μCi オーダーのトレサー実験に使用するとおぼろげ汚染により実験の結果が信用できない場合がおこる。とくにフラスコ類、ピペット類のように開口部の小さいものは ^{14}C による汚染も GM 管式のサーベイメーターでは発見が困難であり、 ^3H による汚染はこの形式のサーベイメーターでは検出できない。したがって使用器具を高、中、低レベル用と分別しておくことが必要である。このレベルをどこに設定するかは実験の内容によってもこととなるが、容器中にはいる放射能が $50\mu\text{Ci}$ 以下が低レベル、 $50\sim 500\mu\text{Ci}$ が中レベル、 $500\mu\text{Ci}$ 以上が高レベルとするのがふつうの微生物実験の基準であろう。

2.2 放射性揮発化合物が生成しない培養

たとえば ^{32}P -リン酸を用いて核酸などへのとりこみを測定する場合とか、 ^{32}P -核酸を調製する場合がこれに属する。このような培養は外部被ばくに対する注意を除けば最も簡単であって、培養容器としてモノ式の振とうチューブ、三角フラスコ、坂口フラスコなど任意の容器が使用できる。これらを恒温水槽中で振とうする装置や、卓上型の空気浴の振とう機を利用するとよい。取扱い上注意を要するのは容器の破損防止であって、容器の固定金具にゆるみはないか、振とうにより容器どうしが接触しないか、金具とガラス壁の間に緩衝用のつめもの（たとえばゴム）を入れる必要があるか、振とう中に容器が傾いて内容物が流出しないかなどに細心の注意をはらう必要がある。培養容器の破損を考慮すると、汚染を広げない意味で水槽中で培養するほうがよい。

低レベルの ^3H -化合物を用いて、とりこみ実験を行なうような場合、好気性微生物では ^3H が水素ガスとして揮発してくることは考えられない。しかし実際には ^3H -化合物の代謝分解により培養液の水が一部トリチウム化されるのがふつうである。しかし使用した ^3H -化合物の比放射能に比べると、水の比放射能は非常に希釈されるので、低レベルの実験では水の蒸発による汚染についてはそれほど気を使う必要はない。フード中に設置した振とう機により培養することができる。

2.3 放射性揮発化合物が生成する培養

たとえば ^{14}C でラベルした有機化合物を添加して培養する場合がこれにあたる。このように $^{14}\text{CO}_2$ の

発生する可能性のある実験は密閉系で行なう必要がある。生合成速度の測定の場合のように、反応系が小さくかつ反応時間も短いときは、ワールブルグ検圧計の容器またはツンベルグ管が培養容器として利用できる。反応時に振とうが必要な場合は前者が適している。いずれの場合も、主室に培養系を入れ、副室または側室に $^{14}\text{CO}_2$ 吸収用のアルカリ（たとえば $20\% \text{KOH}$ ）を添加する。培養の開始はラベル物質の添加によるのがふつうで、添加後ただちに密栓すればよい。発生した $^{14}\text{CO}_2$ を正確に測定する必要のある場合、培養の停止は培養液を酸性として行なうのがよい。ワールブルグ検圧計容器の場合、側室に培養停止用の酸を入れておけば容易にこれを行なうことができるし、ツンベルグ管の場合も反応開始時に管内をやや減圧にしておけば、排気用のチューブを通して管内に酸を注入できる。このように酸性として培養を停止したときは、室温に30分も放置すれば $^{14}\text{CO}_2$ の吸収はほぼ定量的である。実験の目的により、酸性にして培養を停止することが不可能の場合、加熱、冷却、薬剤の添加等により培養を止めるが、この場合 $^{14}\text{CO}_2$ の吸収は完全でない場合がある。また液体シンチレーション法による測定のため、吸収剤として有機アミンのアルコール溶液を直接微生物培養系に用いることは、揮発性のアルコールのため具合がわるい。一度カ性アルカリに吸収させたのち、 $^{14}\text{CO}_2$ を有機性吸収剤に移すほうがよい。いずれにしろ吸収された $^{14}\text{CO}_2$ を計数すれば、その実験で得られる情報はそれだけ多くなる。

培養時間が長いときは、完全な密閉系で培養することが困難な場合がある。たとえば好気的な微生物では酸素が不足して正常な代謝を示さない可能性もある。また放出される $^{14}\text{CO}_2$ に関して情報は不要であるが、多数の試料について比較する場合などには、ワールブルグ検圧計の容器やツンベルグ管を使用することは実際的でない場合もある。このような場合は半密閉系としてたとえばモノ式の振とう機水槽をフード内に持ち込み、これにプラスチック製の覆をかけ、覆につけたチューブからアルカリ吸収塔をへてアスピレーターで吸引しながら培養するとよい。要は発生する $^{14}\text{CO}_2$ がトラップされればよいので、覆は手作りもできよう。またこの装置はそのまま ^3H -化合物を用いた中レベルの培養にも使用できるが、この場合にはトラップを水冷するとよい（ ^3H -化合物のみを用いるときはトラップはアルカリである必要はなく水でよい。ただし水槽からの蒸発もありトラップ中の水の容量が増えることに注意がいる）。

ラベルした先駆体を用いて標識化合物を調製するときは、一般に使用するラベル化合物の放射能も多く、また培養時間も長期間必要とする場合がある。このような場合に安全取扱上留意すべき点は、培養系の大きさをできるだけ小さくし、使用するラベル化合物の比放射能を大きくすることである。培養系が小さいほど発生する $^{14}\text{CO}_2$ のトラップが容易であるし、結局汚染を少なくする結果になる。培養後の処理に化学量が必要であれば、無標識の菌体あるいは担体を加えて処理すればよい。密閉系を使用した一例として筆者ら¹⁾がクロレラを用い $^{14}\text{CO}_2$ からラベル化合物の調製に用いた装置を図1に示した。Aは培養液100mlを入れた三角フラスコで、これを5l容のデシケーターB内に針金で固定してある。Cは $^{14}\text{CO}_2$ の発生装置で500mg(約2.5mM)の $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ を入れ、側室中の80%乳酸5mlで $^{14}\text{CO}_2$ を発生させるものである。DはCのかわりにコックbにつなぐことのできる気相中の $^{14}\text{CO}_2$ を測定するチェンバー(アルカリをしめさせた口紙を入れる)である。Fは培養液中に入れた回転子を回転させるマグネティックスターラーで、Gは光源の

図1 クロレラによる $^{14}\text{CO}_2$ 固定用培養装置

サークリン蛍光灯である。実際にはクロレラ接種した培養容器Aを固定し、装置全体を0.1気圧程度に減圧にしたのち、C中で $^{14}\text{CO}_2$ を発生させ、発泡の静まったところで、アルカリで洗浄した空気をコックcから送り、やや減圧の状態でコックbをしめ培養するものである。装置全体はフード中にしっかり固定して使用した。100mlの培養で $^{14}\text{CO}_2$ を50mCi(比放射能20mCi/mMC)まではクロレラの生育は順調で安全に培養が可能であった。培養の経過はチェンバーDで測定が可能で、培養後、アルカリトラップを通してデシケーターBを吸引し、ふたたびアルカリで洗浄した空気を満たして吸収する操作をくりかえし、残存する $^{14}\text{CO}_2$ を回収した。この装置は相当量の ^{14}C -有

機化合物を添加した好氣的培養にも使用できる(培養容器AとデシケーターBだけで)。このときはB内にアルカリを入れたビーカーを $^{14}\text{CO}_2$ 吸収用に用いる。

上のような完全な密閉系で培養を行なうことが困難な場合は、適当な培養容器に吸気管、排気管をつけ、排気管よりトラップを通して吸引しながら培養を行なうことも可能であるが、ゴム管による接続部分が多いので、ゴム管の固定に十分注意を要する。

以上主として $^{14}\text{CO}_2$ のアルカリによるトラップについて述べてきたが、アルカリ中にトラップされた $^{14}\text{CO}_2$ は容易に空中の CO_2 と交換することを忘れてはならない。使用していないときはトラップは密栓しておく必要がある。 $^{14}\text{CO}_2$ を吸収したアルカリは密栓できる容器にため、ある程度たまったら $\text{Ba}^{14}\text{CO}_3$ に変え、乾燥しておけば交換のおそれは少ない。

2.4 培養の停止

すでに加熱による停止、酸あるいは薬剤(多くは呼吸系の阻害剤)の添加による培養の停止についてはふれた。これらの処理は酵素タンパク質の変性または阻害する処理であるから、処理後代謝活動、ことに呼吸作用が続行する心配はない。しかし実験の目的によっては、これらの処理が不適当で、氷冷して反応を停止する場合もあるし、時には冷却することもない場合がある。このような場合、微生物の代謝が続行し、たとえば操作中 $^{14}\text{CO}_2$ が放出される場合もある。したがって、これらの操作はフード中で、かつ手早く行なう必要がある。

3. 予備実験

以上述べてきた密閉系での培養は、通常の培養とそのスケール、通気条件などがことなるため、生育の速度、代謝の様式などは通常の条件とことなる可能性がある。また本実験で使用するラベル化合物の化学量、比放射能の決定、すなわち培養系の大きさの決定にあたっては不確定な要素が多く、簡単には決定できない。したがってすべて予備実験を行なってその結果から最終的な培養のスケールを決定する必要がある。予備実験を行なうにあたっては、そのスケールについて一応の算出の基礎が必要であるが、これについては従来の経験、文献値、より一般的にはWangとWillisの著書²⁾が参考になろう。いずれにしても本実験のスケールは化学量的にも放射能的にもできるだけ小さくし、主目的とする計数試料があまりにホットで、これ

を希釈して一部を計数するといった実験にならないよう注意を要する。

4. む す び

RI を用いる微生物実験の内容は多岐にわたり、その安全取扱いについて一般論を述べることは困難である。したがって本稿ではラベル化合物を用いる培養法に限定して記したが、培養を停止し代謝活動を止めればあとは化学実験と同様の注意を払えばよい。RI 実験に限らずどのような実験も同じであるが、実験技術には“コツ”とか“カン”といったものがあり、これらを心得ているかどうかが実験の信頼度を定めること

が多い。このような“コツ”とか“カン”は自ら体得することもないわけではないが、多くは先人からの伝承である。本稿の最初にも述べたが先人の経験を学ぶことが安全取扱いの最も重要なステップである。

文 献

- 1) B. Maruo, H. Takahashi and T. Hattori:
J. Gen. Appl. Microbiol., **6**, 165 (1960)
- 2) C.H. Wang and D.L. Willis: *Radiotracer
Methodology in Biological Science*, Prentice-
Hall, Inc. (1965)