BIOCHEMICAL INVESTIGATIONS OF MURINE LEPROSY BACILLI

(I) Collection of Murine Leprosy Bacilli from Infected Tissue

Tonetaro ITO

Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University

Ryuzo SONODA

Department of Dermatology, Osaka University Medical School

Various methods for collecting murine leprosy bacilli in pure form and in high concentration were tried and evaluated by comparative tests in rats. The following methods were tested (a) centrifugation (b) pretreatment with trypsin and then centrifugation and (c) pretreatment with trypsin followed by the Hanks concentration method. The following results were obtained.

The yield was 13% with (a), 21% with (b) and 11% with (c). In other words, the method of pretreatment with 0.1% trypsin for 1 hour at 37°C (b method) gave the best results. It was found that the activity of the bacilli was not affected by this treatment.

鼠癩菌の生物化学的研究

第1報 感染組織よりの鼠癩菌の集菌に関する研究

大阪大学微生物病研究所癩研究部

伊藤利根太郎

大阪大学医学部皮膚科教室 (主任: 藤浪得二教授)

園田龍三

(昭和32年4月20日 受稿)

緒言

人癩菌及び鼠癩菌の生物化学的研究は依然として未開拓のまま残されている。その最も大きい理由は、此等の菌が試験管内で純粋培養できないことによるものであるが、そのほかにも、鼠癩菌では生体内で増殖した菌を感染組織から生のまま純粋に分離蒐集することが甚だ困難であったことによる。

かくして生物化学的研究の不振は、癩菌、鼠癩菌の生態に何等の新知見を加えることができないで、それがまた試験管内培養法の進歩を一層おくらせているものと考えられる。

本題で述べようとする報告は主として鼠癩菌の物質代謝及び酵素系に関する所見であるが、本篇では先づ感染組織から鼠癩菌を生のまま分離、蒐集する方法についてわれわれの考案とその実験成績を述べようと思う。

実験方法

材料: 熊本株鼠癩菌のラット接種後約3カ月の皮下鼠癩腫及び睪丸を用いた。

集菌法: 鼠癩腫を生塩水乳剤としてそのまま遠心沈澱法で分離する方法と、これをトリプシンで前処置した後遠心沈澱法により集菌する方法を考案し、更に Hanks⁽¹⁾ がミトコンドリア分離法に倣って実施せる方法にトリプシンを作用せしめたいわば Hanks 変法 (中村氏報告による) ともいうべき方法の3つについて数次に亘つて実験し、最後に同一材料を以てその成績を比較した。

a) 遠心沈澱集菌法

1) 鼠癩腫を鉢で出来るだけ細切し、生理的食塩水を約10倍の割合に加え、ホモジナイザーにて数分間磨砕し乳剤とする。

2) 2500 R. P. M. 10分間遠心沈澱にて先づ粗大組織

を除去する。

3) 上清を 10,000 R. P. M. 20 分間遠心沈澱。

4) 沈澱を蒸留水で 10,000 R. P. M. 20 分間遠心沈澱法にて3回洗滌し、残余組織成分を除去する。

5) 最終沈澱を蒸留水で再浮游する。

b) トリプシン前処置遠沈集菌法

1) 鼠癩腫を鉢で出来るだけ細切し、生理的食塩水を約10倍の割合に加え、更にホモジナイザーにて数分間磨砕し乳剤とする。

2) 2000 R. P. M. 5 分間遠心沈澱にて先づ粗大組織を除去する。

3) 0.2% トリプシン (バイエル1級試薬) 溶液を等量加えて (終末濃度: 0.1%トリプシン), 孵卵器内に 37°C 1時間放置する。

4) 再び, 2000 R. P. M. 5 分間遠心沈澱にて粗大組織を除去する。

5) 上清を 10,000 R. P. M. 20 分間遠心沈澱。

6) 沈澱を蒸留水で 10,000 R. P. M. 20 分間遠心沈澱法にて3回洗滌する。

7) 最終沈澱を蒸留水で再浮游する。

c) Hanks 氏変法

Hanks はミトコンドリア分離法⁽²⁾に倣つて鼠癩菌を無障礙に集め、これによって物質代謝の研究を行つている。⁽³⁾⁽⁴⁾ われわれは, Hanks 氏原法が集菌量の点で著しく劣つてゐることを知つたので, 更にトリプシンで前処置する中村氏の方法を併用した。

1) 鼠癩腫を鉢で出来るだけ細切し、生理的食塩水を約10倍の割合に加え、ホモジナイザーにて数分間磨砕し乳剤とする。

2) 2000 R. P. M. 5 分間遠心沈澱にて粗大組織を除去する。

3) 0.2%トリプシン溶液を等量加えて(終末濃度: 0.1%トリプシン), 孵卵器内に 37°C 1時間放置する。

4) 0.4M サツカロース (13.6%) を等量加えてサツカロースの終末濃度を 0.2 M (6.8%) とする。

5) 之を 4:5 の比で 0.3M (10.2%) サツカロースの上に静かに重ね, 4500 R. P. M. 10 分間遠心沈澱。

6) その沈澱をよく混ぜて, 0.2 M サツカロースを加えて 12 cc に再浮游す。そして 1.5 M KCl (11%) の 15 cc 上に静かに重ねて 4500 R. P. M. 10 分間遠心沈澱。

7) 最終沈澱を蒸留水で再浮游する。

上記各集菌法による集菌量の判定には最終沈澱を湿潤状態で化学天秤により秤量, 更に再浮游液の一定量をスライド塗抹 Ziehl-Neelsen 染色法を施して菌の多寡並に組織細片の有無を観察した。

実験成績

出発材料として熊本株接種3ヵ月後のラット皮下鼠癩腫計 6g を用い, 上記の如く磨砕生塩水乳剤としてこれを3等分したものにつき, それぞれの方法によつて集菌

表 1: 各集菌法による集菌量の比較

集菌法	癩腫重量	湿潤菌量	集菌%
a) 遠沈集菌法	2.0 g	0.26 g	13%
b) トリプシン前処置遠沈集菌法	2.0 g	0.42 g	21%
c) Hanks 氏変法	2.0 g	0.22 g	11%

Fig. I: トリプシン前処置遠沈集菌法により集めた鼠癩菌

Fig. II: Hanks 氏変法により集めた鼠癩菌

し、化学天秤で秤量した。収量は表1の如くである。

即ち湿潤のままで集量%は、a) 法は13%, b) 法は21%で最高を示し、c) 法は11%で最低であつた。

又菌の純粋度については Ziehl-Neelsen 染色塗抹標本によつてこれを顕微鏡的にしらべたところ、Fig. I, II, の如くいずれの方法においても組織細片は勿論他の組織成分らしきものを全く認めなかつた。

菌の活力に関しては、マウス皮下接種法によつて検したところ、いずれの場合も湿潤菌 1 mg (50倍乳剤約0.2 cc に相当) 接種で3ヵ月以内に発症した。

以上の成績が示すように、単なる強力遠沈法よりも、これを0.1%トリプシンで37°C 1時間処置する方法が収量を増す上により良好であつた。そしてトリプシン融解法を施しても Hanks 氏法の如くサツカローズ-KCl 溶液重層遠沈法では充分な収量を得る事ができなかった。

総括並に考按

われわれがこれから行おうとする鼠癩菌の生物化学的研究、特に物質代謝の実態で基礎的な最も重要な問題は、如何にすれば菌を組織内から少しも障碍することなく、しかも純粋に多量集め得るかということである。

ただ単に収量を増す点から云えば Dharmendra⁽⁵⁾ の考按せるクロロホルム集菌法など好都合であろうが、この方法は中村⁽⁶⁾も指摘せる通り活性が失われる故に問題にならない、他の有機溶媒による浮上分離法も亦同様である。

そこで活性を保存するため食塩水或は濃厚糖液による浮游液を作り、更にこれを遠心沈澱法によつて分離することにした。但しこの場合も菌体と組織成分の比重に著しい差がないため分離が困難で収量が尠い憾みがある。ここにおいて組織成分を融解しかつ菌の活性を失わせないトリプシン処置法を用いたのである。トリプシン処置集菌法については既に中村⁽⁷⁾がこれを考按発表しているので、それに基き0.1% 37°C 1時間法を援用した。ただ中村はトリプシン処置後 Hanks 法に準じて4500 R. P. M. 10分間遠沈法により集菌したが、著者等は強力遠沈法(10,000 R. P. M. 20分)によつて煩雑な操作を必要とせずにより多量の菌を得る事ができるようになつた。

さて菌の活力についてはマウス接種によつてこれを確認する方法をとり、湿潤菌 1 mg 量においてたしかに発症を認めたが、しかしホモジナイザーによる物理的作用、トリプシン消化による影響などが全然無視されてよいとは常識上からも考えられないので、この点については更に検討を加えねばならない。ただ或る程度活力を保持している菌を比較的簡単に多量蒐集できる方法としてわれわれの考按したトリプシン前処置強力遠沈集菌法が他の方法に較べて優れていたことを述べるに止めたい。

結 語

鼠癩腫から菌を生きたまま純粋に分離蒐集する方法として a) 遠心沈澱集菌法、b) トリプシン前処置遠沈集菌法、c) トリプシン前処置 Hanks 集菌法の3つを考按し、ラット皮下鼠癩腫を出発材料として比較実験したところ b) 法が最も良好な成績を示した。

おわりに御指導をいただいた皮膚科教室藤浪教授並に微研研研究部西村助教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Hanks, J. H.: Measurement of the hydrogen transfer capacity of Mycobacteria. J. Bact., 62 521 (1951)
- 2) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C. and Palade, G. E.: Cytochemical studies of mammalian tissues. J. Biol. Chem., 172 610 (1948)
- 3) Hanks, J. H.: The biological significance of the hydrogen transfer capacity of murine leprosy bacilli. J. Bact., 62 529 (1951)
- 4) Gray, C. T.: The respiratory metabolism of murine leprosy bacilli. J. Bact., 64 305 (1952)
- 5) Dharmendra: The Lepromin Test, A Review. Leprosy Review, Vol. 18, No. 4, 92 (1947)
- 6) 中 村: 鼠癩菌の菌体成分に関する研究。レブラ 25 2号 83 (1956)
- 7) Nakamura, M.: Attempts to approach to the Clarification of Chemical Composition of Mycobacterium leprae murium (Ⅲ) Chemical Composition of the Bacilli separated from the Subcutaneous Tissue of Rat infected with Mycobacterium leprae murium by Pre-treatment with Trypsin. Kurume, M. J. 3 133 (1956)