BIOCHEMICAL STUDIES OF THE MURINE LEPROSY BACILLUS (Part 2)
ON THE RESPIRATORY METABOLISM OF THE MURINE
LEPROSY BACILLUS

Tonetaro ITO

(Leprosy Section, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University)

Ryuzo SONODA

(Department of Dermatology, Osaka University Medical School)

This paper deals with the influences of many substrates known as nutritious elements or accelerating substances and of organ and murine leproma extracts of rats upon the respiration of the murine leprosy bacillus which had been treated with trypsin and centrifuged.

The results obtained are below:

1) Seventeen substrates, such as glycelin, succinate and vitamin B₁₂, did not accelerate the respiration of the bacillus in single addition. When liver or testis extract inactivated 60°C 30 min. was combined with succinate, the respiration is accelerated.

2) Untreated murine serum prevented the respiration. Liver extract, when inactivated, produced no influence. Testis extract showed acceleration of which intensity was stronger when untreated than when inactivated. Acceleration was observed when extracts of murine leproma in liver, testis or subcutaneous tissue were applied. In these extracts inactivation produced more intense acceleration than untreated.

Attention should be paid to the fact that extracts of various organs and murine leproma accelerate the respiration of the murine leprosy bacillus.

鼠癩菌の生物化学的研究

第2報 鼠癩菌の呼吸に関する研究

大阪大学微生物病研究所癩研究部 (主任: 西村真二博士)

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6月10日受稿)

緒 言

私どもは先の第一報において、感染組織から鼠癩菌を

純粹にしかも生のまま出来るだけ収量多くとり出せる方法につき研究した結果、トリプシン前処置遠沈集菌法が最もすぐれていることを報告した。今回はこの方法によ

つて集めた菌を使用して、鼠癩菌が如何なる物質代謝を営むかをしらべる手はじめに、先ず菌の呼吸について、如何なるメヂウムがこれを阻止し或は旺盛ならしめるかについて実験を行うことにした。用いた基質は諸種の細菌培地として既に知られた栄養素、及び発育促進物質を単独或は複合の形で用い、又鼠癩菌に対してはホモであるラットの各臓器から抽出した成分に就ても行つた。以下にその成績を述べたい。

実験材料及び方法

供試菌：実験に際しては毎回、熊本株鼠癩菌のラット接種後約5カ月の畢丸鼠癩腫または皮下鼠癩腫を3四分とり出し、トリプシン前処置遠沈集菌法によつて得た菌

体を蒸溜水菌浮游液として用いた。

基質：各基質の作成法、濃度は表1の通りである。

緩衝液： $1/5$ M 磷酸緩衝液 pH 7.2 を用いた。

計測実施法：鼠癩菌の呼吸はワールブルグ検圧計を用いて直接法で計測した。ワールブルグ検圧計容器の各1個には、菌体 600 mg (湿潤菌) を蒸溜水 1.2 cc で浮游せしめた菌液及び 磷酸緩衝液 0.5 cc を主室に、20 % KOH 0.2 cc を副室に、そうして各基質は側室に入れた。各実験に際しては同一材料、同一条件の実験対照を用意した。実験操作は可及的無菌的に行つたが雑菌による影響を避けるために盛夏の候を避け、気温 $9^{\circ}\text{C} \sim 19^{\circ}\text{C}$ 、気圧 758 mmHg $\sim$ 770 mmHg、水温 37°C の条件下に検圧計振盪2時間値を観察した。

第1表 基質の作成法及び使用濃度

基 質	作 成 法	菌液に対する濃度
生理的食塩水	薬局法滅菌食塩水	10 %
グリセリン	$1/10$ M グリセリン	5 %
可溶性澱粉	0.1 % 可溶性澱粉溜水液	5 %
グルコース	$1/10$ M グルコース	5 %
ポリタミン	3.3 % ポリタミン	5 %
コハク酸	$1/10$ M コハク酸	5 %
クエン酸ソーダ	$1/10$ M クエン酸ソーダ	5 %
α -ケトグルタル酸	$1/10$ M α -ケトグルタル酸	5 %
アスパラギン	$1/10$ M アスパラギン	5 %
アスパラギン酸	$1/10$ M アスパラギン酸	10 %
グルタミン	$1/10$ M グルタミン	5 %
グルタミン酸ソーダ	$1/10$ M グルタミン酸ソーダ	5 %
Tween 80	0.5 % Tween 80	5 %
A T P	500 mg % A T P	10 %
硫酸マグネシウム	$1/100$ M Mg SO_4	5 %
VB ₁₂	0.5 γ VB ₁₂	5 %
葉 酸	1 mg 葉酸	5 %
ラット肝抽出液	ラット肝に $1/5$ M 磷酸緩衝液 pH 7.2 を5倍加え乳剤とし、 60°C 30分非働化 10000 rpm 20分遠沈上清を使用	5 %
酵母浮游液	オリエンタライースト製パン酵母に磷酸緩衝液を3倍加えて浮游液とし、 60°C 30分非働化	10 %
酵母抽出液	同上を 10,000 rpm 20分遠沈し、上清を使用	10 %

試薬はすべて1級試薬品を使用

実験成績

鼠癩菌の各メヂウムに於ける呼吸を測定する前に、一応磷酸緩衝液中に於ける呼吸商を計測し、これを Gray⁽¹⁾ の行つた成績と比較したところ、我等の成績は R Q 0.62 を示し、Gray⁽¹⁾ の 0.7 と近似した値で他の Mycobacteria の場合とも類似した。次に各単独基質について述べる。

I 単独基質による影響

成績は表2の如く、大部分の基質は鼠癩菌の呼吸に対して無影響であつた。が、栄養素と考えられる物質中

$1/10$ M アスパラギンを菌液に対し5%の濃度に用いたもののみ明らかに鼠癩菌の呼吸を促進した。即ち、常に対照に較べて2時間以内に約30%の呼吸増加を示した。此の際の至適 pH は 7.8 $\sim$ 8.2 であつた。猶此の際発生せるアンモニアを Conway 定量法で検出することが出来た。然るに一方アスパラギン酸は呼吸に無影響であつた。此の実験の詳細は後報に譲る。

一方発育促進物質とみられる基質においては何れも無影響であつた。次に酵母浮游液は呼吸を促進したが、その抽出液は呼吸を促進しなかつた。

第2表 単独基質の鼠癩菌の呼吸に及ぼす影響

基 質	酸素消費量	対 照	基質添加	判 定	※鳥型結核菌 の呼吸に及ぼ す影響
生理的食塩水		38.7 μ l	38.5 μ l	無影響	—
グリセリン		45.2	45.2	"	促 進
可溶性澱粉		44.9	43.7	"	—
グルコーゼ		40.5	40.4	"	促 進
ポリタミン		39.7	40.3	"	—
コハク酸		50.1	50.0	"	促 進
クエン酸ソーダ		39.8	39.3	"	無影響
α -ケトグルタル酸		60.3	60.1	"	促 進
アスパラギン		57.3	75.5	促 進	—
アスパラギン酸		54.1	53.2	無影響	無影響
グルタミン		52.7	50.9	"	—
グルタミン酸ソーダ		48.5	48.6	"	促 進
Tween 80		46.8	46.0	"	—
VB ₁₂		53.2	52.4	"	—
葉 酸		43.4	43.1	"	—
酵母抽出液		49.6	49.9	"	—
酵母浮遊液		45.3	66.1	促 進	—

※山村結核菌の生化学(1955)による。

II 複合基質による影響

複合基質の呼吸に及ぼす影響は表3の通りである。即ち、一般 *Mycobacteria* の炭素源として知られたグリセリンは、単独基質の形では前項の如く呼吸に対し無影響であつたので、500 mg % アデノシン三リン酸 (A T P)、0.5 % Tween 80、5 % ラット肝抽出液 (非働化)、10 % 酵母抽出液 及び 10 % 酵母浮遊液 (共に非働化) を加えて複合基質として用いたがこの場合も促進しなかつた。他の炭素源としての可溶性澱粉及びグルコーゼにラット肝抽出液を加え複合の形とした場合も亦無影響であつ

た。然るに TCA-cycle (トリカルボン酸サイクル) に関与する有機酸中のコハク酸は単独では呼吸を促進しないが、ラット肝抽出液 (非働化)、ラット睾丸抽出液 (非働化) を 5 % の濃度に加えて複合基質とした場合明らかに鼠癩菌の呼吸を促進した。即ち、対照に比べて2時間以内に約 25 % の呼吸増加があつた。此の場合モルモットの肝抽出液を加えた基質も亦呼吸を促進した。

その他グルタミンにラット肝抽出液を加えたものでは無影響であつた。

第3表 複合基質の鼠癩菌の呼吸に及ぼす影響

基 質	酸素消費量	対 照	基質添加	判 定
グリセリン + A T P		37.8 μ l	38.0 μ l	無影響
" + Tween 80		58.9	58.6	"
" + ラット肝抽出液		39.4	39.5	"
" + 酵母抽出液		42.5	42.3	"
" + 酵母浮遊液		46.1	46.7	"
可溶性澱粉 + ラット肝抽出液		42.2	41.8	"
グルコーゼ + ラット肝抽出液		41.6	41.6	"
コハク酸 + 硫酸マグネシウム		48.0	48.3	"
" + 酵母抽出液		50.4	51.7	"
" + ラット肝抽出液		61.3	76.6	促 進
" + モルモット肝抽出液		60.7	76.5	促 進
" ラット睾丸抽出液		62.1	66.9	促 進
グルタミン + ラット肝抽出液		56.5	56.4	無影響

Ⅲ ラットの血清及び臓器抽出液による影響

動物血清が諸種抗酸菌の発育に好影響を与えることは周知のことであり、また鼠癩菌がラットの無細胞皮下組織液中において、スライド上に発育したという中村⁽²⁾、占部⁽³⁾らの報告は、血清中における発育素の存在を想像するに充分である。更に鼠癩菌がラットの肝及び睪丸内において旺盛な発育振りを示すること、及び最近われら⁽⁴⁾の行つたラット肝抽出液による鼠癩菌スライドカルチュアの成績は、これ等臓器中にある菌発育素の存在を否定し得ないし、又前項のコハク酸においてラット肝抽出液の示した役割は、そこに何等か促進物質の存在を示唆するものと考えられる。そこで先ずこれらの血清及び臓器抽出液単独の鼠癩菌呼吸作用に及ぼす影響をしらべた。その成績は以下のものであつた。

健康ラット血清：血清を生のまま15%の基質として用いた場合は明らかに鼠癩菌の呼吸を阻害した。即ち、呼吸は対照に比べて2時間以内に86%以下となつた。然るにこれを60°C 30分非働化した場合は20%を使用しても無影響であつた。

健康肝抽出液：抽出液の作り方は健康ラット肝2.5gに1/5M磷酸緩衝液pH7.2を2.5cc、蒸留水を2.5cc加えてホモゲナイザーで3分間乳剤とし、氷室内に1時間保存して肝成分を滲出せしめた後（非働化の場合は60°C 30分加熱）、10,000 rpm 20分間遠沈してその上清を

使用した。成績は生のまま10%の濃度で用いた場合明らかに鼠癩菌の呼吸を阻害した。即ち、呼吸は対照に比べて2時間以内に73%以下となつた。が、非働化せる場合は20%の濃度に用いても無影響であつた。これはあとで述べるように溶血した血液成分が阻害的に作用するものと思われる。

健康肝ミトコンドリア：Hogeboomのミトコンドリア分離法⁽⁵⁾を応用してラット肝を処理し、ミトコンドリア浮游液を作成した。これを15%の基質として用いたが呼吸には無影響であつた。

健康肝細胞成分：ラット肝乳剤を2000 rpm 5分間遠沈して粗大組織を除去し、上清を更に10,000 rpm 20分間遠沈し、その沈渣を3回蒸留水で洗滌し、最終沈渣を蒸留水浮游液とした。これを15%の基質として用いたが無影響かむしろやや阻害的であつた。

肝鼠癩腫抽出液：鼠癩菌熊本株を接種後約8ヶ月を経たラットの肝で、肉眼的には粟粒大の鼠癩結節が播種状に散布し肝の大部分は鼠癩腫で占められてたものである。敢てこの鼠癩肝を用いた理由は、健康肝組織に比べてこのものは既に鼠癩菌発育の場として好適な細胞或はその成分がより多く造成されているのではないかと想像したからである。抽出液作成法は健康肝抽出液の場合と同様にし、これを20%基質として用いたが、呼吸は1時間以内に、生の肝鼠癩腫抽出液では15%、60°C 30分非働

第4表 ラット血清及び臓器抽出液の呼吸に及ぼす影響

基 質	酸素消費量	対 照	基質添加	判 定
ラット血清		61.5 μ l	52.7 μ l	阻 害 (86%以下)
健康肝抽出液 (生)	78.9	57.5		阻 害 (73%以下)
健康肝抽出液 (60°C 30分非働化)	55.8	55.8		無 影 響
健康肝ミトコンドリア	63.8	63.8		〃
健康肝細胞成分	51.3	45.0		無影響か やや阻害
肝鼠癩腫抽出液 (生)	43.2	49.6		促 進 (15%)
肝鼠癩腫抽出液 (60°C 30分非働化)	49.0	64.0		促 進 (30%)
健康睪丸抽出液 (生)	53.4	71.4		促 進 (34%)
同 (60°C 30分非働化)	56.0	69.9		促 進 (25%)
同 (100°C 10分加熱)	66.6	74.0		促 進 (11%)
睪丸鼠癩腫抽出液 (生)	55.6	67.4		促 進 (21%)
同 (60°C 30分非働化)	46.8	72.0		促 進 (53%)
皮下鼠癩腫抽出液 (生)	95.9	115.6		促 進 (21%)
同 (60°C 30分非働化)	54.5	112.4		促 進 (206%)
鼠癩菌体抽出液 (生)	71.5	71.0		無 影 響

化せるものでは30%と共に促進した。

健康睪丸抽出液：ラット睪丸を上述と同様の方法で処理した抽出液を20%の基質として用いたが、1時間以内に生の抽出液では34%、60°C 30分非働化せるものでは25%、100°C 10分加熱せるものでも11%と何れも呼吸を促進した。

睪丸鼠癩腫抽出液：鼠癩菌熊本株を接種後約8ヶ月のラット睪丸鼠癩腫を用いた。その理由は肝鼠癩腫と同様である。抽出は肝と同様にし、それを20%の基質として用いたが、1時間以内に生の抽出液では21%、60°C 30分非働化せるものでは53%と共に呼吸を促進した。

皮下鼠癩腫抽出液：鼠癩菌熊本株をラット接種後約8ヶ月の皮下鼠癩腫を上述の方法で処理し、その抽出液を20%の基質として用いたが、1時間以内に生の抽出液では21%、60°C 30分非働化せるものでは対照に化べて約200%の呼吸促進が見られた。

鼠癩菌々体抽出液：上述の実験で鼠癩腫抽出液が呼吸を促進したので、その促進物質が鼠癩腫抽出液中に当然含まれる菌体成分とどのような関係にあるかをみるために、鼠癩菌抽出液を作つてその影響をみた。菌体抽出液の作成法は菌体700 mg（湿潤菌）に $1/20$ M 磷酸緩衝液 pH 7.2 を14 cc 加えて、ミツクルの振盪器で硝子末を加えて1時間振盪後、10,000 rpm 20分間遠沈し、その上清を20%の基質として用いた。結果は鼠癩菌の呼吸に何らの影響を与えなかつた。

総括及び考按

トリブシン前処置集菌法によつて集めた鼠癩生菌が、抗酸菌の栄養素又は発育促進物質として既に知られた10数種の基質及びラット臓器抽出液、鼠癩腫抽出液によつて、菌の呼吸面にどのような影響を受けるかをみるために $1/5$ M 磷酸緩衝液 pH 7.2 を使用してワールブルグ検圧計を用い直接法によつて酸素消費量を測定したところ次のような成績を得た。

- 1) 基質を単独に用いた場合大部分のものは無影響であつたが、アスパラギンと酵母浮游液が呼吸を促進した。
- 2) 基質を複合の形で用いた場合も大部分が無影響であつた。殊にグリセリンは単独で呼吸を促進した酵母浮游液を添加しても影響を与えなかつた。しかしコハク酸はラットの肝、睪丸抽出液及びモルモットの肝抽出液を加えたことによつて著明に呼吸を促進した。
- 3) ラット臓器抽出液中健康血清及び健康肝抽出液は、活性のままでは却つて呼吸を阻害した。しかし非働性

にすると無影響であつた。睪丸抽出液は活性のまま及び60°C 30分、100°C 10分熱処理した場合、処理によつて%は低下したがなおいずれもが呼吸を促進した。

- 4) 肝鼠癩腫、睪丸鼠癩腫、皮下鼠癩腫の抽出液は、いずれも活性のまま呼吸を促進したが、これを60°C 30分非働化することによつて一層強く呼吸を促進した。

- 5) 鼠癩菌体抽出液は無影響であつた。

以上の成績を顧みるに、鼠癩菌の呼吸が、一般抗酸菌の物質代謝に炭素源としてよく利用されるグリセリンの単独はもち論、補助的物質を加え複合の形におかれた場合にも無影響に終つてゐることは、対照に掲げた同一基質に対する山村⁽⁶⁾の鳥型結核菌における成績と比較して鼠癩菌の外部基質の利用、即ち酵素作用による外部代謝の困難性を物語るものとして生物学的にも甚だ重要な特徴と言へるであろう。Hanks⁽⁷⁾は酵母抽出液の呼吸促進を報じているが、我等の成績は無影響であつた。却つて酵母浮游液の促進作用を認めた。しかしこの促進物質の本態はいまのところ全く不明である。又アスパラギンは単独で呼吸を促進し、その際に発生したアンモニアを定量し得たが、これも今後更に十分なる研究を行いたい。

次に、TCA-cycle に関与するコハク酸は単独基質の場合は呼吸を促進しないが、肝抽出液、睪丸抽出液を加えて複合基質とした場合は明らかに呼吸を促進した。当然鼠癩菌も他の生物と同様に終末呼吸系として TCA-cycle が働いてゐると考えられるし、肝、睪丸抽出液中の作用物質についてもこの成績は多くの研究問題を我々に与えている。

ラットの血清及び臓器抽出液については可成り興味ある所見が得られた。即ち、活血清は呼吸を強く阻害し、活肝抽出液にもこの阻害作用を認めた。後者は抽出液の作成操作において肝灌流を行わずそのまま用いたので血液成分の残存せるためかと思われるが、又洗滌肝細胞液においても僅かに阻害がみられた点から考えて、生の体液中では菌の生活が抑圧されるのであろうことは疑う余地がない。既に Hanks⁽⁸⁾ も活血清にこの呼吸阻害作用のあることを報じ、注意を喚起している。而してこれらの阻害物質が60°C 30分加熱処理によつて除去されることも亦興味あることである。肝のミトコンドリアは無影響であつた。睪丸抽出液中には促進物質が含まれ、これが60°C 30分、100°C 10分の熱処理によつて逐次%は低下したがなお厳然として作用を現わしたことは括目すべき所見である。Gray は熱処理したラット睪丸抽出液は

呼吸を促進しなかつたと報告しているが、恐らく熱処理の方法の相異であろうと思われる。

次に興味あることは、肝、睪丸、皮下の癩腫抽出液が著しく呼吸を促進し、これを不活化した場合一層顕著であつたことである。この場合鼠癩腫抽出液中に 10,000 r pm 遠沈でも 尙極微量の生菌の存在が認められるが、実験対照の側室にも同一条件の抽出液を入れてあるので、この生菌による影響は無視しても良い。又破壊された菌体成分による影響もさきに述べた菌体抽出液の実験成績からみて考慮の余地がないものと思われる。この鼠癩腫抽出液はさきに西村⁽⁹⁾等が同様のアイデアを以て鼠癩菌の管内培地に用いたが遂に好ましい結果を得るに至らなかつたものである。今回の成績は明らかに鼠癩菌増殖組織中には呼吸作用を旺盛ならしむる物質の存在が確認されたわけで、今後、前記の睪丸抽出液と共にその成分の追及に期待がかけられる。

結 論

鼠癩菌の呼吸代謝に関する実験成績を報告した。鼠癩菌にグリセリン、コハク酸、V B₁₂ など 17 種の基質を単独に接触せしめても、これを利用して呼吸を促進させることは出来なかつた。このうちコハク酸は不活化肝抽出液、睪丸抽出液の添加によつて呼吸を促進した。活血清は却つて呼吸を阻害した。肝抽出液は活性では阻害したが、不活化したものでは無影響であつた。睪丸抽出液は単独でよく促進したが活性では強く、不活性では弱かつた。又肝、睪丸、皮下癩腫抽出液も同様に呼吸を促進したが、これは不活化において強かつた。

以上の臓器抽出液及び鼠癩腫抽出液中の呼吸促進物質の追究は今後の課題として期待される。

終りに御指導御校閲を賜つた藤浪教授、西村助教授に深謝の意を表します。

文 献

- 1) Clarke T. Gray: The Respiratory Metabolism of Murine Leprosy Bacilli. *J. of Bact.* 64 305 (1952)
- 2) 中村 (昌): 白鼠に於ける鼠癩菌の増殖態度 (その 3) 鼠癩菌の生体内 Slide culture 法の試み. *レブラ* 21, 234 (昭和27)
- 3) 占部, 松尾, 平本, 牛尾: 鼠癩菌の生体内培養に関する研究. *レブラ* 25 15 (昭和31)
- 4) 伊藤, 園田: 癩菌の培養に関する研究. *レブラ* 26 No. 4 学会抄録 (昭和32)
- 5) Hogeboom, G. H., Schneider, W. C., and Palade, G. E.: Cytochemical studies of mammalian tissues. *J. Biol. Chem.*, 172 619-635., (1948)
- 6) 山村: 結核菌の生化学 95 (1955)
- 7) Hanks, J. H.: The biological significance of the hydrogen transfer capacity of murine leprosy bacilli. *J. Bact.* 62 529-537., (1951)
- 8) Hanks and Gray: The application of metabolic studies to leprosy research. *Int. J. of Leprosy*, 22 147 (1954)
- 9) 谷村, 西村, 本多, 児玉: 癩菌の培養に関する研究 (第3報) *レブラ* 23 319 (昭和29)