THE SELECTION OF TEST MATERIALS AND THE REVISION OF THE COLLECTION'S METHOD OF MURINE LEPROSY BACILLUS FOR ITS METABOLIC INVESTIGATIONS

— For Basic Studies on Cultivation of the Human and Murine
Leprosy Bacilli (1) —

Shinji NISHIMURA, Tonetaro ITO, Tatsuo MORI and Kenji KOSAKA

*Department of Leprosy, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University*

The selection of laproma for test material of sufficiently active bacilli and a revision of Ito and Sonoda's collection method for a purer form of the bacillary emulsion were studied for the experiments of the metabolic investigation of murine leprosy bacillus.

The results are summarized below.

1) Leproma in the rat produced 2-3 months after the intratesticular inoculation is most suitable for collecting fresh, active and viable bacilli for metabolic experiments on the murine leprosy bacillus.

2) For testing the purity of the bacillary collection, tissue components without affinity for methylene blue should be detected by dyeing with Nile blue, while some tissue components not stained with Nile blue should be demonstrated by determining of adenosine monophosphatase activity.

3) The Nile blue staining tissue debris in the bacillary fraction can be removed by repeated washing and low speed centrifugation, while the minute particles which show adenosine monophosphatase activity can be taken away by treating with 1/8 N NaOH.

鼠癩菌の物質代謝実験における集菌 材料の吟味と集菌法の改良

— 癩菌，鼠癩菌の培養に関連した基礎的研究 (1) —

西村真二*・伊藤利根太郎*・森 龍男*・高坂健二*

癩菌の人工培養の困難さについてはここに多言を要するまでもないが、癩問題研究の上からは、菌培養という困難ではあるが基本的な実験を除外してしまつてはこの問題の徹底した解決は望めないと思う。

わが教室では過去における菌培養の業績¹⁻²⁻³⁾を慎重に検討し反省を行った結果、現在は培養に関する研究を基礎的方面に指向し、鼠癩菌を使って菌の物質代謝を追求している。

さてこの仕事で一番問題となるのは感染組織からの集菌法であつて、集めた菌の理想的な条件としては次のようなことが望ましい。

即ち、1) 菌が新鮮で活性が高いこと、2) 組織成分が完全に排除されていること、3) 分離操作によって必然的に起こる菌自体の物理的または化学的傷害が少いこと、4) 集菌量が高率であることなどである。

癩菌、鼠癩菌を用いる実験のため、最近諸家が行つた集菌方法について見るに、Hanks⁴⁾は蔗糖および塩化カリ溶液を用いた彼自身の方法によって集菌したが、1～

* 大阪大学微生物病研究所癩研究部
(1961年8月20日受稿)

2パーセントの組織成分の混在は避けられなかったと述べている。中村⁶⁾は Hanks 法は感染した睪丸組織より菌を分離するには適しているが、感染皮下鼠癰腫を材料としたときには組織成分の混入が多くて不適当だと述べ、彼は鼠癰組織乳剤を0.1パーセントの Trypsin で処理することによって組織成分を消化し除去することに成功している。Lew and Carpenter⁶⁾も加熱した人癰結節および鼠癰結節乳剤に Trypsin を作用させて消化し、組織成分の除去に成功している。著者の1人伊藤⁷⁻⁸⁾は園田と共に中村の方法にならって Trypsinで組織成分を除き、高速遠沈(10,000r.p.m)を繰返し洗滌することにより純粋な菌を多量に集め得たと報じ、更に菌の Catalase 活性が集菌材料である鼠癰腫の新鮮か或は陳旧かによって著しい差のあることを警告した。

今回著者等は、若い活性の強い菌を得るため集菌材料を吟味する上の指標を得ようとして、接種後種々なる時期の睪丸鼠癰腫より菌を集めてそれらの呼吸、その他の生物学的活性を測定してこれが癰腫の陳旧度との関係を明かにし、また一方ではさきに発表した伊藤、園田の方法で集めた菌の純粋度について再検討を行ない、この方法では排除困難であった微量の組織細胞成分をも完全に除去し得る方法を考案し、従来の集菌法を改良してほぼ理想に近い方法を得たのでここにそれらの実験成績を報告する。

I 鼠癰腫の陳旧度と菌の生物学的活性

接種後2カ月乃至5カ月のラット睪丸鼠癰腫から得た菌を材料とし、呼吸、Hydrogen Transfer Capacity (HTC), Catalase 活性および Peroxidase 活性を測定した。

実験方法

1) 供試菌：鼠癰菌熊本株をラット睪丸内に接種し、2カ月目、3カ月目、4カ月目及び5カ月目に各々睪丸を切除し、各時期の睪丸から伊藤、園田⁷⁾の方法によって集菌した。なお睪丸内に乾酪化病巣が有りや否やについては特に注意を払った。

2) 呼吸：菌の呼吸は Warburg 検圧法によって、菌の内部呼吸を下記の条件で測定した。

主室：菌浮游液1.5ml (湿菌150mg含有)

0.2M pH7.2 phosphate buffer 0.5ml

副室：20% KOH 0.2ml

水槽温度：37.5°C

3) HTC：菌のHTCは Thunberg 管を用い嫌氣的に下記の条件で37°C、3時間反応させ、還元された一

Triphenyl Formazan を醋酸エチル 5ml で抽出、分光々度計で定量して求めた。

菌浮游液：1.0ml (湿菌50mg含有)

0.2M phosphate buffer：1.0ml

$\frac{1}{1000}$ M ラウリン酸：1.0ml

$\frac{1}{1000}$ M Triphenyltetrazolium chloride：1.0ml

4) Catalase 活性：Catalase 活性は Warburg 検圧法によって下記の条件で測定した。

主室：菌浮游液 1.5ml (湿菌50mg含有)

0.3M pH6.8 phosphata buffer 0.5ml

側室：0.075M H_2O_2 1.0ml

水槽温度：37.5°C

5) Peroxidase 活性：Peroxidase活性はHedgecock, Faucher (1958)⁹⁾の変法を用いて下記の条件で測定した。

菌浮游液：1.0ml (湿菌50mg含有)

0.1M pH6.8 phosphate buffer：1.0ml

1% H_2O_2 ：0.5ml

0.1% Pyrogallol：2.5ml

以上を混和 37.5°C の水槽中で15分間振盪後50% H_2SO_4 0.15ml, 20% Vitamin C 0.1ml を加えて反応を停止、Ether 3ml で2回抽出し、日立光電分光々度計を用い(Filter43),生成された pur purogallin 量を測定した。

実験成績

1) 呼吸およびHTC

鼠癰菌の内部呼吸は表1に示す如く、接種後2カ月目の睪丸より集めた菌と3カ月目睪丸より集めた菌では著明な差が認められないが、4カ月目睪丸より集めた菌では明らかに低値を示し、2カ月目の菌に比し約 $\frac{3}{5}$ で、5カ月目睪丸より集めた菌は2カ月目の菌に比し約 $\frac{1}{2}$ の値を示した。特に乾酪化の著明であった睪丸から集めた例では、2カ月目の菌の $\frac{1}{3}$ 以下の値を示したものもあった。

HTCも表1に示す如く、呼吸の場合とはほぼ同様の傾向が認められて2カ月目の菌と3カ月目の菌では大差がないが、4カ月目の菌は明らかに低値を示し2カ月目の菌の約 $\frac{7}{10}$ 、5カ月目の菌では約 $\frac{1}{2}$ であった。また乾酪化の著明な睪丸から集菌した例では2カ月目の菌の $\frac{1}{3}$ 以下のものもあった。

2) Catalase 活性および Peroxidase 活性

Catalase 活性は表1に示す如く、個々の成績間にはかなりの差が認められたが、5カ月目の菌および乾酪化した睪丸から集菌した菌では明らかに低値を示し、2カ月目の菌の約 $\frac{1}{3}$ の値を示したものもあった。Peroxidase 活性は表2に示す如く Catalase 活性ほど著明な差は認め

第1表 鼠癩腫の経過と集めた菌の呼吸,
HTC及び Catalase 活性

接種後 月数	呼 吸		H T C		Catalase	
	O ₂ - uptake μl/2h	集 菌 材 乾酪化	還 元 TTC 10 ⁻⁹ mol	集 菌 材 乾酪化	O ₂ release μl/5min	集 菌 材 乾酪化
2 カ月	57.9	-	10.1	-	215	-
	53.3	-	9.6	-	185	-
	47.5	-	9.0	-	165	-
3 カ月	52.6	-	10.2	-	208	-
	51.8	-	9.4	-	175	-
	46.5	-	8.5	-	160	-
4 カ月	38.4	-	7.4	-	212	-
	34.8	-	6.6	-	105	-
	32.1	-	6.5	-	70	++
	20.3	++	3.8	++	64	++
5 カ月	29.8	-	5.5	-	142	-
	27.5	-	4.3	-	131	-
	26.7	+	4.1	+	119	-
	16.0	+++	3.0	+++	62	++

第2表 鼠癩腫の経過と集めた菌の
Peroxidase 活性

Peroxidase		
接 種 後 月 数	Purpulogalin μg/ml	集菌材料 乾 酪 化
2 カ月	64	-
3 カ月	81	-
4 カ月	45	-
	37	++
5 カ月	43	-
死 菌	13	

られなかったが、5カ月目の菌および乾酪化畢丸から集菌した菌では2カ月目の菌の約 $\frac{1}{2}$ の値であった。

以上の成績が示す如く、接種後4カ月以上経過し、乾酪化の著明な病巣部から集めた菌は生物学的活性が著しく低下していることが明らかになった。

II 鼠癩菌集菌法の改良

改良の要点を述べると、感染組織を Trypsin で消化し遠心沈澱したものでは、Ziehl-Methylen blue 染色で菌のみが染まり組織沈渣は染まらないので一見純粋に菌のみが染められたと思われる。しかしこれを Ziehl-Nile

blueで染めると組織成分がなおかなり多く含まれていることに気付いた。そこでこの Nile blue に染まる脂質の除去法として菌の凝集性を利し、低速遠沈法を繰返すことによりほぼ純粋に集菌できた。その上更に菌体に附着せる微少の細胞成分を、Adenosin monophosphatase を指標としてこれを測定することによって検出し、そしてこれが除去方法には $\frac{1}{8}$ 規定苛性ソーダ液で処理することにより生化学的実験に使用し得る純粋菌を得たのである。

以下その実験法と成績について述べる。

実 験 方 法

材料：鼠癩菌熊本株をラットへ接種4カ月の皮下に生じた鼠癩腫および畢丸鼠癩腫を用いた。

Adenosine triphosphate (ATP) は Schwarz

Bioresearch 製品を

Adenosine monophosphate (AMP) は和光純薬製品を

Nile blue 及び Trypsin は Merck 製品を使用した。

他の試薬は一般市販のものをを用いた。

集菌法：表3参照

染色法：Ziehl-Nile blue 染色法、Ziehl 氏液にて1分間加熱染色後、1パーセント塩酸アルコールで脱色、水洗後 Nile blue 飽和水溶液と95パーセントエタノールを(2:1 V/V)の割に混じた染色液で30秒間後染色、水洗する方法。

AMPase, ATPase の測定法：酵素液(鼠癩菌或は組織の懸濁液) 0.5ml, M/10 Tris 緩衝液 pH7.0 0.2ml, MgCl₂ 0.01M 0.1ml, KCl 0.15M 0.1ml, 基質6μmol 0.1ml, 全量1mlとし、37°Cに60分間 incubateし、遊離した無機磷を Lowry and Lopez¹⁰⁾の方法により定量した。3%過塩素酸0.5mlを加え遠沈除蛋白し、上清に0.1規定醋酸ソーダを5ml加えpHを4.0附近にし、VitamineCの1%水溶液を1ml、および1%モリブデン酸アンモニウムの0.05規定硫酸溶液を1ml加え、pH4.0の醋酸緩衝液を加えて全量を10mlとして室温に10分間放置し発色せしめた後700mμにて比色定量した。

実験のたびごとに Blank および無機磷の対照をとった。乾燥重量は比濁計の Optical Density より計算した。比色計および比濁計は Coleman Junior を用いた。

ラウリン酸脱水素酵素活性の測定法：酵素液(鼠癩菌の懸濁液) 0.5ml, M/10 Tris 緩衝液 pH7.0, 0.4

ml, M_{10} 磷酸緩衝液 pH7.0 0.1ml, Sodium Laurylate 0.5ml 5×10^{-6} mol 0.6% Tween 水溶液, Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 0.5ml 5×10^{-5} mol, 全量 2ml とし, Thunberg 管にて嫌氣的条件下 37°C に 6 時間 incubate する。形成された Formazan を醋酸エチルの 5ml に抽出し, $480m\mu$ にて Beckmann 光電分光光度計にて比色定量した。

BCG: ソートン培地に培養 2 週間目の菌体(対照菌)を用いた。

実験成績

伊藤および園田の方法⁷⁾にて集めた菌体画分の塗沫標本を Ziehl-Methylene blue 染色すると, 図 I に見られるように Methylene blue に青く染まる部分がなく菌ばかりのように見えたが, Ziehl-Nile blue 染色をする と図 II に見られるように Nile blue に青く染まる部分が

なおかなりの量見出された。しかるに $900 \times g$ にて遠沈洗滌を繰返してえられた菌体画分では, 図 III に見られるやうに Methylene blue には勿論, 図 IV に見られるやうに Nile blue にても青く染まる部分は認められなかった。

Ziehl-Nile blue 染色法によって殆ど青く深まる部分がみられない菌体画分の ATPase および AMPase 活性を測定すると表 4 の無処理の欄に示す如くかなり強い活性を示した。しかしこの ATPase および AMPase 活性を示す成分は微量に混在する組織成分によるものではないかと考え, 健常ラットの睪丸を表 5 に示す集菌法と同様に操作して, 微量の組織成分を得た。この組織成分は集菌操作のときに菌体画分の中に混入してくる成分であるが, 非常に強い ATPase および AMPase 活性を示した。そこで純培養した BCG を対照として組織成分に由来する ATPase および AMPase を失活せしめるが, 菌のそれらは失活せしめない試薬を検索した。

第 3 表 鼠癩菌の改良集菌法

40g の Leproma に 80ml の蒸留水を加え, 3 分間 Waring blender にて Homogenize する

西村，伊藤，森，高坂論文附図

図 I
高速遠心により集めた菌体
Ziehl-Neelsen 染色
緑色フィルター(560m μ)を
用いて撮影

図 II
高速遠心により集めた菌体
Ziehl-Nile blue 染色
緑色フィルター(560 m μ)を
用いて撮影

図 III
低速遠心により集めた菌体
Ziehl-Neelsen 染色
緑色フィルター(560m μ)を
用いて撮影

図 IV
低速遠心により集めた菌体
Ziehl-Nile blue 染色
緑色フィルター(560 m μ)を
用いて撮影

第4表 試薬処理した組織成分の
ATPase, AMPase 活性

組織成分	基質	乾燥重量 mg	遊離無機磷 μg/mg,hr
無 処 理	ATP	0.48	30
	AMP	0.48	226
Sodium des- oxy- cholate 処 理	ATP	0.34	12
	AMP	0.34	0
N/4NaOH 処 理	ATP	0.15	0
	AMP	0.15	0
N/8NaOH 処 理	ATP	0.15	0
	AMP	0.15	0

第5表 試薬処理した BCG の ATPase,
AMPase 活性

BCG	基質	乾燥重量 mg	遊離無機磷 μg/mg, hr
無 処 理	ATP	1.58	13
	AMP	1.58	6
Sodium des- oxy- cholate 処 理	ATP	1.46	9
	AMP	1.46	5
N/4NaOH 処 理	ATP	1.40	13
	AMP	1.40	7
N/8NaOH 処 理	ATP	1.42	13
	AMP	1.42	7

第6表 感染組織より集菌した鼠癩菌体画
分の ATPase, AMPase 活性

鼠 癩 菌体画分	基 質	乾燥重量 mg	遊離無機磷 μg/mg, hr
無 処 理	ATP	1.9	8
	AMP	1.9	15
N/8NaOH 処 理	ATP	1.7	0
	AMP	1.7	0

第7表 N/8NaOH 処理菌と非処理菌との
Lauric acid dehydrogenase 活性

鼠 癩 菌体画分	基 質	乾燥重量 mg	Formazan mol/mg,hr
無 処 理	—	7.15	4×10^{-9}
	Sodium Laurate	7.15	23×10^{-9}
N/8NaOH 処 理	—	7.07	4×10^{-9}
	Sodium Laurate	7.07	23×10^{-9}

1 規定硫酸は組織成分の ATPase および AMPase を完全に失活せしめるが, BCG の ATPase および AMPase も同様に完全に失活せしめるので不適當であり, Sodium cholate は組織成分の ATPase 及び AMPase を完全に失活せしめないのではやはり不適當であった。表4および表5に示す如く Sodium Desoxycholate の 10^{-2} M 水溶液に室温で一時間処理する方法および $1/4$ 規定苛性ソーダ或は $1/8$ 規定苛性ソーダに室温で10分間処理する方法がやや適当な成績を示した。菌に対する障害の最も少いと考えられる $1/8$ 規定苛性ソーダに室温で10分間処理した後、蒸留水で2回遠沈洗滌する方法を選び、表6に示す如く集菌された菌体画分の無処理群と $1/8$ 規定アルカリ処理群とにおいて各々の ATPase 及び AMPase 活性を測定した。無処理の菌体画分にはなおかなり強い活性を認めたが、アルカリ処理の菌体画分には全然活性を認めなかった。

為政および堤¹¹⁾は鼠癩菌によるラウリン酸の脱水素酵素を TTC の還元により観察しているので、著者は鼠癩菌をアルカリ処理することによりラウリン酸脱水素酵素が失活するか否かを測定した。表7に見られるようにアルカリ処理した菌体画分と無処理の菌体画分との間にラウリン酸脱水素酵素活性の差は認められなかった。

考 察

(I) 形態学的にチール氏フクシンで染色したスミアについて見ても、新鮮な Leproma 中の菌は、細胞質が平等に濃く染み、菌も長大であるが陳旧な硬化した Leproma や乾酪化した病巣から得た菌では細胞質が不平等に染み、短小で連鎖球菌状または顆粒状型をなすものが比較的多い。菌の生物学的活性が新鮮な Leproma から得た菌に強く、4カ月以上を経過した睪丸癩腫殊に乾酪化した病巣から得た菌において極めて低かったことは、上記の形態学的所見とよく一致している。それ故に、物質代謝の実験に供する菌は少くとも睪丸接種2〜3カ月の新鮮な鼠癩腫を材料として集菌しなければならぬ。

(II) 低速遠沈により大きな組織塊を除いた上清中には組織細胞のミトコンドリア、マイクロゾームおよびその他の組織残渣が含まれている。これらのものはリポ蛋白質を多量に含む有形体であるため、Trypsin 消化によって完全に消化溶解することは出来ないと考えられる。Trypsin 消化したのち $10,000 \times g$ にて遠沈集菌する伊藤および園田⁷⁾の方法では、えられた菌体画分中にミトコンドリアが混入してくる。この混入したミトコンドリアは恐らく Trypsin 消化を受けて methylene blue に親

和性の部分が破壊されたため、これに染まらなくなったのであろうが、Nile blue は lipid に親和性があるので Trypsin に消化されない部分を青く染めることが出来たのであろう。

感染組織粥を 900×g にて遠沈し、粗大な組織残渣を除いた上清を更に 900×g にて遠沈集菌するには次のような鼠癩菌の性質が利用された。即ち初めの組織粥の遠沈上清は組織蛋白の溶液であるため鼠癩菌はよく分散していて、900×g の遠沈によつては沈降しにくい、12,000×g の遠沈によつて集菌し、沈渣を蒸留水に懸濁すると、菌は蛋白溶液系より水溶液系へ移される。水溶液に懸濁された鼠癩菌は菌自体で凝集する性質があるので十分に凝集せしめれば、この菌塊は 900×g にて容易に沈降する。それ故にこの方法で洗滌を繰返すと殆んどの細胞成分は除かれるのであるが、菌の凝集のときに一緒についてくる細胞成分がなお微量混在している。この AMPase 活性を示す微量の成分は規定苛性ソーダにて洗滌することにより大部分除かれ、なお混在する一部分もアルカリのために破壊される。

かくしてえられた菌体画分はほぼ完全に純粋であるが、Trypsin 処理或はアルカリ処理により失活する酵素もあると考えられるので、実験の目的により Trypsin 処理或はアルカリ処理を省略して集菌する必要があると思う。この方法は収量の点に幾分犠牲が払われなければならない。

Gessler 等¹²⁻¹³⁾ は Freon 112 ($\text{CCl}_2\text{F}-\text{CCl}_2\text{F}$) および Genetron 226 ($\text{CF}_2\text{Cl}-\text{CCl}_2\text{F}$) を用いウイルスを集めているが、これらの溶媒はウイルスに対する障害作用が非常に少いと報告されている。著者等も DaifronSⅢ ($\text{CCl}_2\text{FCCl}_2\text{F}$) を用い感染皮下および睪丸鼠癩腫から集菌を試みたが、組織成分の混入が多くて利用するまでに至らなかった。

緒 論

1) 鼠癩菌物質代謝の実験に使用する新鮮にして酵素活性の強い菌を得るためにはラット睪丸接種 2～3 カ月の Leproma が適当である。

2) 菌の純粋度を検定する方法として、Ziehl-Methylen blue で染色できなかった組織成分を Nile blue によつて検出し、Nile blue で証明できなかった組織細胞成分を、Adenosine mono-phosphatase を測定する方法で証明した。

3) 集菌画分中に混在せる Nile blue 可染物質は低速遠心で沈澱を繰返すことにより、Adenosine monophosphatase 活性を示す微量の細胞成分は $\frac{1}{6}$ 規定苛性ソ

ーダで処理することにより完全に除去できた。

(この論文の英文篇は谷村忠保教授古稀記念論文集に掲載された。)

文 献

- 1) 西村真二, 本多 一: 癩菌の培養に関する研究(其の1) 中村, 遠藤氏牛頸下腺Mucin培地による癩菌, 鼠癩菌の培養追試成績, レブラ, **18**, 109-116, (1949)
- 2) 西村真二, 本多 一: 癩菌の培養に関する研究(Ⅱ) 中村氏 Mucin 培養追試成績第2報, レブラ, **20**, 92-97 (1951)
- 3) 谷村忠保, 西村真二, 本多 一, 児玉正道: 癩菌の培養に関する研究(第3報) 鼠癩肉芽浸出液, ビタミン, 諸種の Amino 酸, Sphingomyelin 添加培地並に白鼠腹腔内における鼠癩菌, 癩菌培養実験, レブラ, **23**, 319-326 (1954)
- 4) Hanks, J. H.: Measurement of the hydrogen transfer capacity of MYCOBACTERIA. J. Bact. **62**: 521-528 (1951)
- 5) 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 pretreatment with trypsin. Kurume Med. J. **3**, 133-145 (1956)
- 6) Lew, J. and Carpenter, C. M.: The separation of *M. leprae* from tissues by enzyme digestion. Am. Rev. Tuberc. **74**, 152 (1956)
- 7) 伊藤利根太郎, 園田龍三: 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, レブラ, **26**, 141-143 (1957)
- 8) Tanimura, T., Ito, T. and Sonoda, R.: On the enzymic activities of murine leprosy bacillus. 谷村教授古稀記念論文集 (1961)
- 9) Hedgecock, L. W. and Faucher, I. O.: Retention of pyrogallol-peroxidative activity to isoniazid resistance *Mycobacterium tuberculosis*. Am. Rev. Tuberc., **75**, 670-694 (1957)
- 10) Lowry, O. H. and Lopez, J. A.: The determination of inorganic phosphate in the presence of labile phosphate esters. J. Biol. Chem. **162**, 421-428 (1946)
- 11) Tamemasa, O. and Tsutsumi, S.: On the metabolism of *Mycobacteria*. I. Dehydrogenase activi

- ties of *Mycobacterium leprae* murium. Japan. J. Exper. Med. 28, 183-197 (1958)
- 12) Gessler, A. E., Bender, C. E. and Parkinson, M. C.: A new and rapid method for isolating viruses by selective fluorocarbon deproteinization. The New York Academy of Science Ser. II, 18, No.8, 701-703 (1956)
- 13) Gessler, A. E., Bender, C. E. and Parkinson, M. C.: Animal viruses isolated by fluorocarbon emulsification. The New York Academy of Science Ser. II, 18, No.8 707-717 (1956)