Studies of Phosphorous Metabolism of leproma in Murine Leprosy

YOSHIYASU MATSUO, AKIRA MITO and MINORU HAIZUKA

Department of Bacteriology

(Hiroshima University School of Medicine)

The studies were carried out in regard to the phosphorous metabolism of leproma.

After intravenous injection of ^{32}P -orthophosphate, rats were killed at serial intervals and the subcutaneous leproma were resected. The rate of incorporation of ^{32}P into leproma was considerably rapid and increased consistently for the first 60 minutes, and relatively high levels of ^{32}P were maintained following 24 hours. The murine leprosy bacilli were collected. The ^{32}P was taken up by the bacilli somewhat delayed compared with leproma, but a parallel relationship was found between them.

The phosphorous fractions of leproma resected at serial intervals one hour after injection of ^{32}P were obtained by the Schneider's method. The ^{32}P was rapidly taken up by the acid-soluble fraction and the specific activity increased consistently for one hour. The incorporation of ^{32}P into the acid-insoluble fraction was significantly high in the phospholipid fraction in contrast to the low levels in the nucleic acid and phosphoprotein ones. The turn over rate of the phosphorous, however, was more active in the nucleic acid fraction than in others.

鼠癩レプローマの燐酸代謝

松 尾 吉 恭・三 戸 昭・灰 塚 実

広島大学医学部細菌学教室（主任 占部 薫 教授）

（受付 1964年3月2日）

レプローマは、その形成の mechanism についてはいまだ多くは知られていないにせよ、少なくとも増殖しつつある鼠らい菌の生育の場として、いわば living medium の機能を持ち、一方においては鼠らい菌に養素を供給し、鼠らい菌がその発育に必要なしながらも、みずからは合成できないような酵素系を与えることによって養素の利用をたすけ、他方においては鼠らい菌の metabolites の処理に貢献しているのではないかと考えられる。したがって、このレプローマの代謝機構を明らかにし、その生理、生化学的諸性状を究明することは、鼠らい菌とレプローマの相互関係を分析するうえに、さらにひいてはらい菌培養のいとぐちを捉えるうえに少なからず貢献するところがあるであろう。

そのような見地からして、われわれは先ずレプローマの燐酸代謝を ^{32}P -燐酸を用いて検討してみたので——これによってその代謝のすべてを論ずるにはなお程遠いが——以下えられた知見を報告する。

実験方法

1. 供試動物：鼠らい菌久留米42号株を皮下に接種され約4ヵ月後の、腹壁皮下に軟化していない growing state のレプローマをもつラット。

2. Isotope：The Radiochemical Centre（英）製の ^{32}P -orthophosphate を生理食塩水に溶解し、その0.2 mc を上のラットの尾静脈内に正確に注射した。——実験要領の細部については実験の各条下で述べる——。

3. 放射能測定：東芝製 Geiger-Müller Counter で型の如く測定した。

4. 燐酸分画：Schneider¹⁾法によって酸溶性燐酸画分と酸不溶性燐酸画分とにわけ、後者はさらに燐脂質画分、核酸画分および蛋白画分に分画した。なお、各画分の燐の定量は Fiske-Subbarow²⁾法によった。

実験成績

(1) レプローマの ^{32}P -燐酸のとりこみ

^{32}P の0.2mc を前記のラットの尾静脈内に注射（0.5 ~ 0.95 $\mu\text{c/g}$ ）後表1に示した経過時間に各3匹ずつを断

Fig. 1. Incorporation of ^{32}P -phosphate into leproma

Table 1 Incorporation of ^{32}P -phosphate into leproma

No. of animal	Radioactivity as cpm per 10mg of leproma						
	※ 0.5	1	2	4	6	12	24
1	492.2	1002.1	1053.0	928.9	818.4	800.0	728.9
2	510.5	1042.0	978.0	919.8	842.6	833.2	749.8
3	498.1	1016.0	1024.2	916.5	824.4	829.0	744.0

※ Time in hours

Table 2 Incorporation of ^{32}P -phosphate into cellular fractions of leproma

Time in minutes	Radioactivity as cpm per 10mg of leproma			
	Acid-soluble fraction	Acid-insoluble fraction		
		Lipid fraction	Nucleic acid fraction	Protein fraction
20	141.6 (59.7)※	55.3 (23.3)	31.5 (13.3)	8.8 (3.7)
40	615.2 (69.1)	131.9 (16.4)	40.7 (5.1)	15.2 (1.9)
60	628.1 (76.6)	180.9 (19.9)	75.2 (8.3)	20.6 (2.3)

※ ( ): Percentage distribution of radioactivity in cellular fraction

頭層殺し、直ちに凍結下でレプロームをとりだし、型の如く硝酸による湿性灰化をおこなった。各 sample の 0.2ml を stainless planchette に入れ、乾燥後放射能を測定し、レプローム 10mg 当りの cpm として表わした (表 1, 図 1)。

表 1 および図 1 にみられるように、レプロームの ^{32}P のとりこみは、はじめかなりすみやかに直線的に増量して、注射後 1 時間にしてほぼ最高に達したのち 6 時間後までわずかながら下降線を辿ったが、その後は 24 時間後まではほぼ一定量のかなりの ^{32}P を保持していることがわかった。

(2) レプロームの 磷酸画分の ^{32}P -磷酸のとりこみ

^{32}P の 0.2mc 注射 (0.6~0.9 $\mu\text{c/g}$) してから 20 分、40 分および 60 分後に各 3 匹ずつを屠殺、直ちに凍結してすばやくレプロームをとり出し、Schneider 法で磷酸の分画をおこなった。 ^{32}P の放射能はレプローム 10mg 当りの各磷酸画分の cpm で表わした (表 2, 図 2)。

表 2 および図 2 に示したように、 ^{32}P の注射 20 分後における酸溶性磷酸画分の ^{32}P のとりこみは、酸不溶性磷酸画分のそれに比してわずかに多いという程度にすぎなかったが、40 分後にはとりこみの絶対量および%ともにいちじるしく増加して酸不溶性画分のほぼ 2 倍の値を示すに至り、60 分後にもなお若干の増量がみられた。

他方、酸不溶性磷酸画分のうちでは ^{32}P のとりこみの絶対量は磷脂質画分にもっとも多く、ついで核酸画分の順となり、蛋白画分のそれはもっとも低いという結果を示した。

なお、さらに仔細に検討してみると、酸溶性画分のとりこみでは 20 分後から 40 分後には絶対量として約 4.4 倍の急激な増量がみられたのに対して、脂質、核酸および蛋白各画分におけるその増加はそれぞれほぼ 2.4, 1.3 および 1.7 倍ということになり、これらにあっては ^{32}P のとりこみ量のはるかに少ないばかりでなく、とりこみの

Fig. 2. Incorporation of ^{32}P -phosphate into cellular fractions of leproma

速度もより緩徐であることがうかがわれた。

次に、上記各 sample の磷の定量を Fiske-Subbarow 法によりおこない、各磷酸画分の磷 10 γ 当りの cpm で表わすと表 3 および図 3 のようになった。

すなわち、酸溶性画分では注射されて 60 分後まではほぼ直線的、かつ急速に ^{32}P のくみいれ (同化) がみとめられ、この成績の限りでは ^{32}P の移出は明らかでなかった。脂質画分においては 40 分後までの ^{32}P のくみいれはむしろ低調であったが、40 分から 60 分にかけてはかなりの促進がみられた。他方、核酸画分では 40 分後まではむしろ脂質画分のそれよりも ^{32}P のくみいれの速度は速かったが、60 分後には低下した (図 2 参照)。蛋白画分における ^{32}P のくみいれは終始低調であった。

核酸画分におけるこのような成績よりすると、この画

Table 3. Incorporation of ^{32}P -phosphate into phosphorous in cellular fractions of leproma

Time in minutes	Radioactivity as cpm per 10 γ of phosphorous			
	Acid-soluble fraction	Acid-insoluble fraction		
		Lipid fraction	Nucleic acid fraction	Protein fraction
20	694.1	121.0	143.7	50.0
40	894.0	135.8	262.6	63.9
60	1481.8	355.2	208.9	86.9

Fig. 3. Incorporation of ^{32}P -phosphate into phosphorous in cellular fractions of leproma

分にとりこまれた ^{32}P は60分後には1部移出される, すなわち異化がおこなわれたものと考えられ, したがってレプロームにおける磷酸代謝は上記の諸成績よりすれば一般にさほど active とはいえないように思われるが, 核酸画分においては他の画分におけるよりも, 多少ともよりすみやかな P の代謝回転がおこなわれているのではないだろうか。

(3) レプローマ中の鼠らい菌の ^{32}P -磷酸のとりこみ

^{32}P の0.2mcを注射(0.5~0.8 $\mu\text{C/g}$)してから30分, 60分および90分後に前出と同様に3匹ずつのラットを処理し, とり出したレプローマの1部については型の如く硝酸による湿性灰化のち放射能を測定し, レプローマ5mg当りのcpmで表わした。他方, のこりの大部分のレ

Table 4. Incorporation of ^{32}P -phosphate into leproma and leprosy bacilli

Time in minutes	Radioactivity as cpm per	
	5 mg of leproma	1 mg of leprosy bacilli
30	391.5	21.0
60	495.0	132.0
90	541.2	178.0

Fig. 4. Incorporation of ^{32}P -phosphate into leproma and leprosy bacilli

プローマについては森ら³⁾の方法にしたがって鼠らい菌の集菌をおこなった。このさい集菌鼠らい菌の sample における菌体以外の ^{32}P の contamination をさけるため, 集菌後さらに1%HClによる洗浄をくりかえし, 洗液中に全く放射能をみとめないことをたしかめたのち型の如く処理して放射能を測定し, 鼠らい菌の乾燥菌量mg当りのcpmで表わした(表4, 図4)。

表4および図4に示したように、レプローマの ^{32}P のとりこみは今回もまた前出の図1および表1に示した成績とほぼ同様の傾向を示したが、他方鼠らい菌の ^{32}P のとりこみは時間的にレプローマのそれよりはややおくれるようであって、30分後のとりこみはきわめて少量であった。ただし、60分後および90分後には増量し、しかもその増加の傾向はレプローマのそれとかなり平行するようであった。

なお、本実験にさいしての鼠らい菌の収量はレプローマ1g当り乾燥菌量として約2mgであったので、レプローマ中の菌の ^{32}P のとりこみはレプローマのそれのほぼ300~1,800分の1ということになった。

考 察

レプローマにおいては ^{32}P -磷酸はかなりすみやかにとりこまれるものようであって、1時間後にはほぼ最高の値を示し、ついでわずかず減少したが、24時間後にもかなりの量が保たれていることがわかった。 ^{32}P が生体内でかなり長い間保たれることはすでに木林⁴⁾、栗田⁵⁾、中塚⁶⁾その他によってみとめられているけれども、木林のマウスの各臓器における ^{32}P の消長についての所見や、栗田口のウサギの血清内での消長をみた成績によると、一旦とりこまれた ^{32}P 量も短時間内に急激に減少し、その後は比較的低い値を持続するものようであるが、今回のわれわれの成績によるとレプローマにあってはそのような急激な減少はみられなかった。これはレプローマにおける ^{32}P の代謝回転がより緩徐であるためであろうか。

次に、酸溶性 ^{32}P -磷酸画分についてみると、この画分においては ^{32}P のとりこみ量には著明な増加がみられた。すなわち、注射後40分では ^{32}P の絶対量が20分値の約4.4倍に達し、またこの画分の総 ^{32}P 量に対する比放射能は注射後60分まで直線的な増加を示した。したがって、この画分では酸不溶性 ^{32}P -磷酸画分中のどの画分よりも ^{32}P の ^{32}P 合成への利用がすみやかであって、60分以内ではその分解、いかえれば ^{32}P のこの画分からの代謝回転はきわめて低調であるようにみうけられた。ただし、このことは酸溶性画分全般としての成績であって、今回はその細画分についての ^{32}P の動態は全くうかがうことができなかった。したがって、この画分の代謝についてはさらに検討を加える必要がある。

レプローマの ^{32}P -脂質画分の ^{32}P のとりこみは酸溶性画分のそれに比較するとおくれておこり、またその量もより少なかったが、酸不溶性画分の他の画分にくらべると

よりすみやかであった。しかしながら ^{32}P の代謝は60分以内ではいまだ明らかでなかった。これに対して核酸画分の ^{32}P のとりこみの絶対量は脂質画分のそれよりも少なかったが、この画分の ^{32}P 量に対する比放射能についてみると40分まではむしろ大で、60分では逆に減少した。このことは ^{32}P が脂質画分においてよりも核酸画分において、よりすみやかにくみいれられるが同時にまたよりすみやかにでてゆくことを示している。すなわち、核酸画分における ^{32}P の代謝回転は active であるとはいえないまでも、他の ^{32}P -画分にくらべると多少ともよりすみやかにおこなわれているといえよう。蛋白画分の ^{32}P のとりこみはもっとも少なく、いほどの変化はみられなかった。この画分では ^{32}P の代謝回転はほとんどおこなわれていないものように考えられる。

次に、鼠らい菌の ^{32}P のとりこみについてであるが、森⁷⁾は *in vitro* で菌体内にわずかながら ^{32}P がとりこまれ、かつ D-Ribose その他の基質の添加がこれを促進することをみている。われわれはレプローマ中の鼠らい菌が明らかに ^{32}P をとりこむことをみとめたが、そのとりこみはレプローマよりもおくれ、かつ絶対量も多いとはいえなかった。

結

レプローマおよび鼠らい菌の ^{32}P -磷酸のとりこみを追究した結果次の所見をえた。

1. レプローマの ^{32}P のとりこみはすみやかであって24時間後まで比較的少量を持続した。
2. レプローマの ^{32}P -磷酸画分の ^{32}P の代謝回転は一般に緩徐のようにみうけられたが、核酸画分ではややすみやかであった。
3. レプローマ中の鼠らい菌の ^{32}P のとりこみはレプローマよりもおくれ、かつより低かった。

〔恩師占部教授の御指導、御校閲を鳴謝する〕

文 献

- 1) Schneider, W. C. : J. Biol. Chem., 161, 293, 1945
- 2) Fiske, C. H. & Subbarow, Y. : J. Biol. Chem., 66, 375, 1925
- 3) 森竜男・高坂健二・伊藤利根太郎・西村真二：日本細菌学雑誌, 16, 808, 昭36
- 4) 木林由勝：日本細菌学雑誌, 13, 372, 昭33
- 5) 栗田口重美：日本細菌学雑誌, 13, 398, 昭33
- 6) 中塚正行・荒谷春恵・松本順三・板橋守・藤堂昭：J. Antibiotics, Ser. B, 8, 349, 1955
- 7) 森竜男：長島紀要, 6, 6, 昭37