リポゾームの無細胞液体培地における 鼠らい菌増殖促進効果

中 村 昌 弘

(久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座)

(受付: 1981年9月21日, 特別掲載)

前報⁽¹⁾においてレシチンとコレステロールの無細胞液体培地における鼠らい菌増殖促進効果を述べた。当然のことながら, このことはレシチンが鼠らい菌体の合成に関与しての結果と想像される。従って, レシチンの効果を更に有効にするためには, よりよく鼠らい菌体にレシチンがとり込まれることが必要で, リポゾーム (liposome) の形にして与えるべきであろう。現に, 結核菌においてはすでにリポゾームの結核菌発育促進効果が Kondo & Kanai⁽²⁾によって報告されていて, これをもとにして Kato ら⁽³⁾は鼠らい菌の発育促進効果をのべている。

本報では, すでに開発した, 鼠らい菌が確実に増殖する ND-5 培地⁽⁴⁾をもとにして, これに, リポゾームを加え, その効果を検討すると共に, この培地の改良を企図したので, その結果を報告する。

材料と方法

鼠らい菌: 実験的に CsH マウスの皮下に接種して生じた鼠らい菌ハワイ株 (M-69, M-70) の鼠らい腫を用いた。無菌的に鼠らい腫を採取, ガラス・ホモジナイザーで細砕し, 0.1% 仔牛血清加 M/30 Sørensen buffer (pH 7.0) で菌浮遊液を作製した。使用に当っては適当に希釈した。

供試培地: ND-5 培地⁽⁴⁾を用いた。その処方下は下記のとおりである。

Dubos powder (榮研)	0.5g
Adenosin	1.0mg
Thymidin	2.0mg
Thioglycolate	1.0mg
Succinamide	21.0mg
Aq	32.0ml

以上を溶解後 pH 7.0 に補正し, オートクレーヴで滅

菌する。これを基礎培地とするが, リポゾームを添加するさいはこの基礎培地に加え, pH を補正, 滅菌する。

滅菌基礎培地に次の添加物を無菌的に加えて完全培地とする。

12.5% Sod. pyruvate	1.0ml
0.25% Ca-pantothenate	1.0ml
5 % α -ketoglutarate	1.0ml
0.3% L-cystein HCl	0.5ml
0.02% Hemin	1.0ml
0.03% NADH	0.5ml
Calf serum	5.0ml

添加物はすべて Millipore filter (Pore size $0.2\mu\text{m}$) で濾過滅菌したものである。ヘミンは 0.04% NaOH に溶解したものを用いた。

リポゾームの作り方: 次の 3 種のリポゾーム (LP) を試作した。

- LP (1), レシチン 80mg + コレステロール 10mg
- LP (2), レシチン 80mg + コレステロール 20mg
- LP (3), レシチン 80mg + コレステロール 40mg

レシチンとコレステロールを 2 ml のクロロホルムに溶解する。次いでこれに N_2 (窒素ガス) を吹き込んで, クロロホルムを除去する。油状になったレシチン・コレステロール混和物に 10ml の蒸留水を加え, 5 分間超音波菌体破壊装置 (海上電機 T-A-4280 型) sonicate し, homogenate にする。使用まで氷室に保存する。使用のさいはよく振盪して基礎培地に加える。

なお, 基礎培地にデキストラン (分子量 100,000 ~ 200,000) 82mg を加えた培地を供試することもあったが, このさいは NDD-5 培地⁽⁵⁾と命名した。

培養法: 調製された完全培地 (43 ml) に鼠らい菌液 0.2ml を接種し, よく混和し, 7 ml 宛, 中型試験管 (10.5 × 1.3cm) に分注, ゴム栓で密封して 30°C で培養

した。

増菌判定: Hanks の pin head 法⁽⁶⁾によって菌数をカウントした。

成 績

1. リポゾーム, レシチンおよびコレステロールの鼠らい菌増殖促進効果の比較

卵黄抽出レシチン(和光純薬)を用いて作製したリポゾームとレシチンおよびコレステロール単独添加の鼠らい菌増殖促進効果を比較した結果は表1のとおりである。リポゾームが特に培養期間が長くなった時レシチンおよびコレステロール単独より増菌促進効果を示した。

表1 リポゾーム, レシチンおよびコレステロールの鼠らい菌増殖促進効果の比較

添 加 物	添 加 量	培養期間(週)	
		2	8
—	—	22.2*	10.7
リポゾーム	レシチン0.02% コレステロール0.01%	25.5	26.5
レシチン	0.02%	13.4	14.5
コレステロール	0.01%	24.7	15.9

* 増菌率: “O” time の菌数に対する増加倍数

2. リポゾーム添加量の検討

LP (3) を用いて添加量の比較を行った。リポゾーム添加の方法は LP (3) を NDD-5 培地 43ml に 0.6ml, 0.8ml および 1.0ml に加えた。0.6ml の添加で培地の若干の濁濁が見られるが, 0.8ml の添加では明瞭な濁濁と共に沈澱も認められた。1.0ml では更にその程度が増した。このような添加によりレシチンとコレステロールの添加量は 0.6ml 添加の場合, それぞれ 0.012%, 0.006%, 0.8ml 添加では 0.016% と 0.008%, 1.0ml 添加では 0.02% と 0.01% となった。この培地に濁濁と沈澱を生ずる原因はコレステロールの量に比例しているものと思われる。

これらの培地における鼠らい菌の増殖曲線は図1のとおりである。即ち LP(3) 0.6ml の添加が最も効果的に増殖を促進した。しかし, その他の添加いずれも無添加の NDD-5 培地より優れていた。

3. リポゾーム作製のさいのレシチンの種類の検討

リポゾームを作製するさいのレシチンの由来を異にした場合の効果を検討した。検討したものは egg, soy bean, bovine liver および bovine brain より抽出され

図1 リポゾームの添加量の検討
○—○ NDD-5培地, ●—● リポゾーム0.6ml 添加, ■—■ 0.8ml 添加, □—□ 1.0ml 添加/43 ml NDD-5 培地

図2 リポゾーム作製のさいのレシチンの種類の検討

○—○ egg, ■—■ soy bean □—□ liver, ●—● brain lecithin, +コレステロール

たレシチンを用いた。コレステロールとの混合の割合はレシチン:コレステロール比が2:1の割合とした。得

られた成績は図2のとおりで, egg lecithin が最もよく, 次いで soy bean lecithin, bovine liver lecithin, bovine brain lecithin の順であった。

4. デキストラン添加の影響

ND-5 培地 43ml に LP (3) 0.8ml を加えたものと NDD-5 培地に同様に加えたものとの比較を行って, リポゾームの効果がデキストランに影響をうけるか否かを検討した。その結果はデキストランの添加培地即ち NDD-5+リポゾーム培地の方が ND-5+リポゾーム培地よりやや鼠らい菌の増殖を促進した。しかしその効果は顕著ではなかった。

5. レシチン・コレステロール比の検討

リポゾームを作製するさいのレシチンとコレステロールの量の検討を行った。レシチン80mg に対してコレステロールを10mg, 20mg および40mg にしてリポゾームを作り, 方法のところで述べた如くそれぞれ LP(1), LP(2) および LP(3) とした。基礎培地への添加量はいずれも0.6ml とした。これらの培地における鼠らい菌の増殖率は表2のとおりである。培養2週では LP(3) がはるかにすぐれていたが, 培養日数が進むにつれて, 差が少なくなった。従って, 培地の濁濁度の最も少ない LP(1) を完全培地43ml に0.6ml 加えるのが最適と判断された。しかし, ともかくリポゾームの添加培地では無添加培地の約2倍以上の増菌が確実に認められた。

表 2 リポゾーム作製のさいのレシチン, コレステロール比の鼠らい菌増殖に及ぼす影響

liposome 組成		培 養 期 間 (週)		
lecithin	cholesterol	2	4	6
—	—	6.9*	7.5	5.5
80mg	10mg	5.0	10.4	16.8
80mg	20mg	4.3	22.3	11.7
80mg	40mg	18.1	11.9	16.2

10ml 当り。

* 増菌率: “O” time の菌数に対する増加倍数

考 察

本報では前報(1)のレシチンとコレステロールの鼠らい菌増殖促進効果をもとにして, リポゾームを作製し, リポゾームがレシチンおよびコレステロールよりも増菌促進効果が優れているか否かを検討した。その結果, 明かにリポゾームが他の二者より効果的であることを証明した。この事実は Kondo & Kanai(2)の人型および牛型結

核菌増殖促進作用の結果と一致して, 鼠らい菌が一般抗酸菌と甚しく異なるものでないことを確認したことにもなった。Kondo & Kanai(2)はこのさい lecithin-cholesterol liposome の結核菌増殖促進作用はこの中のレシチンが栄養源としての役割を果しているだろうと示唆している。

Kato(7)は人らい菌培養実験において, コレステロールの人らい菌増殖促進効果を認め, レシチンにはその効果の確証を述べていないが, これは人らい菌培養系が未だ皆目確立していない現在, 何とも討議の場所がない。

鼠らい菌においては前報(1)記載の如く, レシチンの方がコレステロールよりも増殖促進効果が認められた。このことは Kondo & Kanai(2)の結核菌に対する作用と一致している。従って, リポゾームを作製するさい, レシチン, コレステロールの比が当然, 問題になるので, 本報ではこの点も検討した。また, レシチンの方に重点をおいて検討するにさいしては, レシチンの由来も問題になり, この点も検討したわけである。

小川卵黄培地(8)では卵黄以外に特に特異な成分は含まれていないのに, 鼠らい菌の大量接種さえ行えば, 集落が形成されるので, 卵黄の中に鼠らい菌を増殖させる秘密が隠されていることは確実である。その秘密として想像されるものはレシチンとコレステロールであろうから, 恐らく, この混合のリポゾームが液体培地においても有効な増殖源となるであろうことは予想に難くないところである。

尤も, 固形培地と液体培地とはその添加成分の代謝過程が可成り異なるものようであるので, 固形培地で認められた効果が直ちに液体培地に利用できるかどうか不明である。その逆も同様である。現に, 液体培地で鼠らい菌増殖に効果のある α -ケトグルタル酸が固形培地では全く無効である報告(9)もあり, また固形培地と液体培地では至適 pH が異なる経験ももっている。

結 論

脂質複合体, lecithin-cholesterol liposome の無細胞液体培地 (ND-5 または NDD-5 培地) における鼠らい菌増殖に及ぼす影響を検討して, 次の結果をえた。

1. リポゾームはレシチン或はコレステロール単独添加より, より良い鼠らい菌増殖促進効果を示した。
2. その添加量は1.4% (v/v) が至適であったが, これより増量しても顕著な促進効果はなかった。増量すると濁濁と沈澱が生じた。
3. リポゾーム作製に用いるレシチンのうち, 卵黄由

来レシチンが最も効果的に作用した。

4. レシチン・コレステロールの混合比は8:1が最適のようである。

謝 辞

この研究の一部は日米医学協会議らい専門部会研究費および笹川記念保健協力財団研究費によった。共に謝意を表す。終始、技術的援助をいただいた武田朋子技手に感謝の意を捧ぐる。

文 献

- 1) 中村昌弘：レシチンおよびコレステロールの無細胞液体培地における鼠らい菌の増殖促進効果。日本らい学会雑誌投稿中。
- 2) Kondo, E. & Kanai, K.: An attempt to cultivate mycobacteria in simple synthetic liquid medium containing lecithin-cholesterol liposomes. *Japan J. Med. Sci. Biol.*, **29**, 109-121 (1976).
- 3) Kato, L., Kim, S. L. & Ishaque, M.: In vitro cultivation of mycobacteria in cholesterol

lecithin media from lepromas of rats infected with *Mycobacterium lepraemurium*. *Intern. J. Leprosy* **46**, 176-285 (1978).

- 4) Nakamura, M.: A new cell-free liquid medium for rapidly culturing *Mycobacterium lepraemurium* (ND-5 medium). *Proc. Jap. Acad.*, **51**, 707-711 (1975).
- 5) Nakamura, M.: Growth stimulating effect of dextran on *M. lepraemurium* in vitro in cell free liquid medium. *Lep. Sci. Memo.*, Memo L-1110/1 (1980).
- 6) Hanks, J. H.: Microscopic counts of Mycobacteria conversion factors for pinhead methods. *Intern. J. Leprosy*, **36**, 76-77 (1968).
- 7) Kate, L.: Cholesterol, a factor which is required for growth of mycobacteria from leprous tissues. *Intern. J. Leprosy*, **46**, 133-143 (1978).
- 8) 小川辰次, 本村恵子：鼠らいに関する研究, 第一報, 鼠らい菌培養の試み。レブラ, **38**, 246-254 (1969).
- 9) 森 竜男：菌塊接種による鼠癩菌の継代培養。レブラ, **44**, 50-54 (1975).

Growth Stimulation of *Mycobacterium lepraemurium* by Liposome in Cell-free Liquid Medium

MASAHIRO NAKAMURA

Department of Microbiology, Kurume University
School of Medicine, Kurume 830

Effect of lipid complex, lecithin-cholesterol liposome, on the growth of *M. lepraemurium* in cell-free liquid medium (ND-5 and NDD-5) was studied, and the following results were obtained.

1. It was indicated that liposome was more effective than lecithin or cholesterol on growth stimulation of *M. lepraemurium*.
2. Optimal concentration of liposome was 1.4% (v/v). No significant stimulating effect was observed even if the dosis of liposome increased. If liposome increased, turbidity and sedimentation took place in the medium.
3. Among the sources of lecithin for preparation of liposome, egg lecithin showed the most effective function.
4. It was considered that the suitable ratio of lecithin and cholesterol mixture might be 8:1.