鼠 癩 菌 の 集 菌 法

森 龍 男・高 坂 健 二・伊藤 利根太郎・西 村 真 二

大阪大学微生物病研究所癩研究部

[受付：2月6日・1961年]

緒 言

鼠癩菌の純培養が出来ない現在、鼠癩菌の物質代謝及び菌体成分の研究を行うためには感染組織より集菌をしなければならない。そのときに注意しなければならないことは、集めた菌の中に組織成分が混在していないこと、雑菌の混入がないこと、分離操作によつて菌自体に与える傷害が少いこと、ならびに集菌の率が高いことなどである。

以上の条件を考慮して最近行われた諸家の方法についてみるに、Hanks¹⁾は蔗糖及び塩化カリ溶液を用いた彼自身の方法によつて集菌したが、1～2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し、中村²⁾は、Hanks法は感染率丸組織より菌を分離するには適しているが、感染皮下鼠癩腫を用いては組織成分の混入が多く不適当であると報告している。そして彼は鼠癩組織乳剤に1パーセントトリプシン処理を行い、組織成分を消化除去することに成功し、この方法³⁾によつてえた純粋な鼠癩菌を材料として菌体成分の研究を行っている。Lew and Carpenter⁴⁾も加熱人癩組織及び鼠癩組織乳剤にトリプシン処理を行い組織成分を徐くことに成功している。伊藤及び園田⁵⁾は中村の方法²⁾にならつて組織成分をトリプシンで消化したのち高速遠沈(10,000 rpm)を繰返し洗滌することにより純粋な菌を多量に集めえたことを報告した。

わが研究室ではその後、伊藤及び園田⁵⁾の方法によつて集めた菌の純粋度について再検討の必要が生じたため、組織成分検出法として従来より用いられていた Ziehl-Neelsen 染色法のほかに、Ziehl-Nile blue 染色法および Adenosine mononucleotidase (AMPase) 活性を測定する方法とを用いた。著者等は、Ziehl-Neelsen 染色法では染め出すことの出来なかつた組織成分が純粋と見られた集菌画分中になかなか多量に残存していることを Ziehl-Nile blue 染色法により証明し、なお Ziehl-Nile blue 染色法によつても染め出すことの出来なかつた組織成分

を集菌画分の AMPase を測定することにより証明した。そこで著者等は Nile blue に可染性の組織成分を低速遠沈を繰返すことにより、AMPase 活性を示す組織成分を¹⁾規定苛性ソーダで処理することにより夫々除くことが出来た。以後の生化学的実験及び菌体成分の研究にはこの方法によつてえられた菌体画分を用いたので、その方法を簡単に報告する。

実験方法

材料：鼠癩菌熊本株のラット接種後4カ月の皮下及び率丸鼠癩腫を用いた。

Adenosine triphosphate (ATP) は Schwarz Bioresearch 製品を、

Adenosine monophosphate (AMP) は和光純薬製品を Nile blue 及びトリプシンは Merk 製品を用いた。

他の試薬は市販のものを用いた。

集菌法：表 I 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)の割合に混じた染色液で30秒間後染色し後、水洗する方法。

AMPase 及び ATPase の測定法：酵素液(鼠癩菌或いは組織の懸濁液) 0.5ml, M/10 Tris 緩衝液 pH 7.0 0.2 ml, MgCl₂ 0.01 M 0.1ml, KCl 0.15M 0.1ml, 基質 6 μ mol 0.1ml, 全量 1 ml とし 37°C に60分間解置し、遊離した無機磷を Lowry and Lopez⁶⁾の方法により定量した。3パーセント過塩素酸 0.5 ml を加え遠沈除蛋白し、上清に 0.1規定醋酸ソーダを 5 ml 加え pH を 4.0 附近にし、ビタミン C の 1パーセント水溶液を 1 ml, 及び 1パーセントのモリブデン酸アンモニウム 0.05規定硫

MORI Tatsuo, KOSAKA Kenji, ITO Tonetaro & NISHIMURA Shinji: Collection Method of Murine Leprosy Bacilli. Department of Leprosy, Research Institute for Microbial Diseases, Osaka University. —Jap. J. of Bact., 16(9)808-813; 1961.

表 I 鼠癩菌の集菌法

酸溶液を 1 ml 加え, 全量を 10ml として室温に 10 分間放置し発色せしめた後 700 mμ にて比色定量した。実験のたぐびに Blank 及び無機磷の対照をとつた。酵素の乾燥重量は比濁計の吸光度より計算した。比色計及び比濁計は 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 pH 7.0, 0.4ml, M/10 磷酸緩衝液 pH 7.0, 0.1ml, ラウリン酸ソーダ 5×10^{-6} mol 0.6% Tween 水溶液 0.5ml, Triphenyl tetrazolium chloride (TTC) 5×10^{-5} mol 0.5ml, 全量 2 ml

第 I 図 高速遠沈により集めた菌体
Ziehl-Neelsen 染色，倍率約 4000 倍
緑色フィルター (560 m μ) を用いて撮影

第 II 図 高速遠沈により集めた菌体
Ziehl-Nile blue 染色，倍率約 4000 倍
緑色フィルター (560m μ) を用いて撮影

第 III 図 低速遠沈により集めた菌体
Ziehl-Neelsen 染色，倍率約 4000 倍
緑色フィルター (560m μ) を用いて撮影

第 IV 図 低速遠沈により集めた菌体
Ziehl-Nile blue 染色，倍率約 4000 倍
緑色フィルター (560m μ) を用いて撮影

とし、Thunberg 管にて嫌氣的条件下に 37°C に 6 時間孵置す。形成された Formazane を 5 ml の醋酸エチルに抽出し、Beckmann 光電分光光度計を用い 480m μ にて比色定量した。

BCG: ソートン培地に培養 2 週間目の菌体を用いた。

実験成績

伊藤及び園田の方法⁵⁾にて集菌した菌体画分の塗抹標本を Ziehl-Neelsen 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 に見られるように Methylene blue には勿論、図 IV に見られるように Nile blue にても青く染まる部分は認められなかつた。

Ziehl-Nile blue 染色法によつて ATPase 及び AMPase 活性を測定すると表 IV 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 及び 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、健常ラットの睾丸を表 I 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 及び 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 及び 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。1 規定硫酸は組織成分の ATPase 及び AMPase を完全に失活せしめるが、BCG の ATPase 及び AMPase も同様に完全に失活せしめるので不適當であり、Sodium chol-

表 II 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 μ g/mg, hr
無 処 理	ATP	0.48	30
	AMP	0.48	226
Sodium desoxy- cholate 処 理	ATP	0.34	12
	AMP	0.34	0
N/4 NaOH 処 理	ATP	0.15	0
	AMP	0.15	0
N/8 NaOH 処 理	ATP	0.15	0
	AMP	0.15	0

表 III 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 μ g/mg, hr
無 処 理	ATP	1.53	13
	AMP	1.58	6
Sodium desoxy- cholate 処 理	ATP	1.46	9
	AMP	1.46	5
N/4 NaOH 処 理	ATP	1.40	13
	AMP	1.40	7
N/8 NaOH 処 理	ATP	1.42	13
	AMP	1.42	7

表 IV 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 μ g/mg, hr
無 処 理	ATP	1.9	8
	AMP	1.9	15
N/8 NaOH 処 理	ATP	1.7	0
	AMP	1.7	0

ate は組織成分の ATPase 及び AMPase を完全に失活せしめないでやはり不適當であつた。表 II 及び表 III に示す如く Sodium Desoxycholate の 10^{-2} M 水溶液に室温で 60 分間処理する方法及び $1/10$ 規定苛性ソーダ或いは $1/10$ 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 $1/10$ 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 IV に示す如く集菌された菌体画分の無処理群と $1/10$ 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つた。

為政及び堤⁷⁾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 V 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つた。

考 按

低速遠沈により大きな組織塊を除いた上清中には組織のミトコンドリア、マイクロソーム及びその他の組織の

表 V N/8 NaOH 処理菌と非処理菌との
ラウリン酸脱水素酵素活性

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

切片が含まれている。組織のミトコンドリア及びマイクロソームはリポ蛋白質を多量に含む有形体であるため、トリプシン消化によつて完全に消化溶解することは出来ないと考えられる。トリプシン消化したのち 10,000 rpm にて遠沈集菌する伊藤及び園田⁹⁾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トリプシン消化を受けているため、恐らく Methylene blue に親和性の部分が破壊され、Methylene blue に染まらなくなり見落されたのであろう。ところが Lipin に親和性のある Nile blue は Methylene blue にそまらなくなった組織成分、即ちトリプシンに抵抗性の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 にて遠沈分離し、粗大な組織成分を除いた上清から 900×g にて遠沈し集菌すれば、当然組織成分の混入は少なくてすむわけであるが、それには次のような単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単癩菌は概ね分散していて、900×g の遠沈によつては沈降しにくい。が、12,000×g にて遠沈洗滌することにより単癩菌は蛋白溶液より水溶液に移される。水溶液に懸濁された単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。この方法にて殆んど組織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組織成分がなお微量混在している。この AMPase 活性を示す微量の組織成分は 1/6 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なお一層に純粋になるが、トリプシン処理或い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、その目的によりトリプシン処理或いはアルカリ処理を抄略して集菌する必要があると思う。

集菌した菌体画分は今後生化学的実験や菌体成分の研

究に用いられるので、出来るだけ純粋でなければならぬため、収量の点は若干犠牲にしなければならなかった。

Gessler 等^{8,9)}は Freon 112(C Cl₂F-C Cl₂F)及び Genetron 226 (C F₂Cl-C Cl₂F) 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 Daifron S III (C Cl₂F-C ClF₂) を用い感染皮下及び睾丸単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。

結 語

1) 集菌した菌体画分中の組織成分の混在を検出する方法として、Riehl-Nile blue 染色法及び Adenosine mononucleotidase 活性を測定する方法を用い、従来より用いられた Ziehl-Feelsen 染色法によつて証明することが出来なかつた染色法によつて証明することが出来なかつた組織成分を Ziehl-Nile blue 染色法により検出し、Ziehl-Nile blue 染色法によつて証明することが出来なかつた組織成分を Adenosine mononucleotidase 活性を測定する方法により検出することが出来た。

2) Nile blue に可染性の組織成分は低速遠心沈澱を繰返すことにより殆んど除去することが出来、Adenosine mononucleotidase 活性を示す組織成分は 1/6 規定苛性ソーダで処理することにより、完全に除去することが出来た。

文 献

- 1) Hanks, J. H.: Measurement of the hydrogen transfer capacity of mycobacteria. J. Bact. 62, 521-528 (1951)
- 2) 中村: 鼠癩菌の菌体成分に関する研究, レブラ, 25, 2, 83-88 (1956)
- 3) 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, M. J. 3, 133 (1956)
- 4) Lew, J. and Carpenter, C. M.: The separation of M. leprae from tissues by enzyme digestion. Am. Rev. Tuberc. 74, 152 (1956)
- 5) 伊藤, 園田: 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, 3, 141-143 (1957)
- 6) Lowry, O. H. and Lopez, J. A.: The determination of inorganic phosphate in the presence of

- labile phosphate esters. J. Biol. Chem. 162, 421 (1946)
- 7) Tamemasa, O. and Tsutsumi, S. : On the metabolism of mycobacteria. I. Dehydrogenase activities of mycobacterium leprae murium. Japan. J. Exper. Med. 28, 183-197 (1958)
- 8) 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)
- 9) 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)