

# 代謝活性，無細胞培養液を用いての 鼠ライ菌培養の試み

京都大学結核胸部疾患研究所細菌血清学部（主任教授 上坂一郎）

大 岩 弘 治

（受付 昭和42年7月18日）

## 緒 言

Armauer Hansen<sup>1)</sup> がライ病巣に微生物を初めて見出し，報告したのは1874年であった。これは Robert Koch による結核菌発見より8年も前の事である。そして6年を経て再び Hansen は染色によってこの菌を再確認した。それより1年前 Neisser<sup>2)</sup> は Hansen のもとを訪れ，多数のライ病巣を観察して，初めてライは微生物によって起り，伝染性疾患であるととらえた。そして Neisser は，この菌を生体外で増殖させようと試み，又動物に接種して発症させようとしたが，いずれも失敗した。それ以来90数年を経た今日に於ても，尚上記2問題は完全には解決されていない。

一方，Stefansky<sup>3)</sup> は1903年，鼠に皮膚病変を起こす抗酸性菌を見出した。この菌はライ菌に似ており，培養する事が出来ない。彼はこの菌を鼠ライ菌 *Bacillus der Rattenlepra* と名づけた。このライ菌，鼠ライ菌の培養をめぐる，長年にわたり多くの研究者達が，培地組成の改良，培養方法の工夫を続けて来たが，未だ無細胞下で確実に増殖させ，継代し得る方法は見出されていない<sup>4,5)</sup>。

それ故，長年この問題を研究し続けて来た Hanks<sup>6)</sup> はこれ等の菌を *Mycobacterium intracellularis* と呼び，細胞内でしか増殖し得ない菌であると述べ，又我が国の戸田<sup>7)</sup> も，ついには生細胞なくしてライ菌，鼠ライ菌の増殖なしと嘆息し，Bergey's Manual<sup>8)</sup> には living culture media 以外には増殖し得ない菌であると

書かれるに至ったのも無理からぬことである。

又これ等を支持するかの如く，鼠ライ菌の生化学的研究に於ても，通常の基礎代謝物質の利用不能<sup>9)</sup>，チトクローム系の欠如<sup>10)</sup>，不完全な TCA cycle<sup>11)</sup> 等が示された。これ等の所見はライ菌，鼠ライ菌が絶体寄生性微生物であるとの印象を，益々強めるものである。

一方，組織培養或は細胞培養による鼠ライ菌の培養は Zinsser 等<sup>12)</sup> が始めた頃より，かなりの期待が持たれていたが，最近になって Rees 等<sup>13)</sup>，Chang 等<sup>14)</sup> によって培養細胞内での菌の増殖を確認し，更に継代にも成功した事が報告せられた。

以上の事柄は何を意味するのであろうか。細胞内で増殖するに拘らず，細胞外で増殖し得ないのは何故であろうか。いや，それよりも人ライ菌，鼠ライ菌は，一体如何にしてその生存，増殖に必要なエネルギーを得ているのであろうか。そこで著者は，一応鼠ライ菌はいかなる培養組成を組合せても，これらが static である限り，即ち dead media である限りは，増殖出来ないものと仮定した。そして細胞培養と無細胞培養の中間的な方法を試みた。それは(1)培養液中に細胞内代謝系を活性のまま（但し無細胞で）持込むこと，(2)この代謝活性は 37°C に於て減弱する故に，毎日新鮮な培養液を作ること，(3)鼠ライ菌を，silicone-coated slide に吸着させ，このスライドを毎日新鮮な培養液に入れ換え続けて行くこと——この様にして in vitro で細胞内環境に近い状態を継続的に再現し，そ

の中で菌を培養する方法である。

本実験は1961年から始めたのであるが、数々の試行錯誤の後、やっと次に述べる如き結果が得られたので報告する。

### 実験方法

使用菌株並に菌液の作成法：

鼠ライ菌熊本株をS系マウスの睪丸内に接種し、4乃至6ヶ月後に剖検し、睪丸或は肝臓に病変並びに多数の抗酸性菌を認めた場合に、菌液材料として使用した。

菌液の作り方は、Hanks<sup>15)</sup>、西村等<sup>16)</sup>が鼠ライ菌の生化学的活性の検討に用いたところの、宿主の細胞成分を出来るだけ排除し、菌を可能な限り純粹に得る方法に準じた。即ち病変組織を冷水で冷した Waring blender に入れ、0.2%トリプシンを含む pH 7.6 の磷酸バッファーを約10倍量加えて均等化し、37°C、2時間後静置、遠心、蒸溜水添加を行って洗滌した後、蒸溜水に再浮遊させたものを菌液として用いた。この装作は次に述べる silicone-coated slide への菌の吸着を完全にする為に必要な操作であって、病巣組織成分が少なければ少ない程、菌のスライドへの吸着は完全となるからである。

silicone-coated slide の作成法：

silicone-coated slide は選択的にミユバクテリウム並に類縁菌を強く吸着する性質を有する。この特性を利用する事によって初めて接種菌を、菌量の損失なしに毎日新鮮培養液に入れ換える事が可能となった。その作り方は東等<sup>17), 18)</sup>の方法に準じた。即ち清浄にしたスライド・ガラスを、dimethyl silicone (Dow. D. C. 200-500) を2%の割合でクロロフォルムに溶解した溶液にひたし、300°C 1時間焼きつけたものである。

培養液の組成並びに作り方：

基礎培養液の組成は第1表に示す如くであるが、これは直接、鼠ライ菌の培養を目的としたものではなく、細胞内代謝系の活性維持を主目的としたものである<sup>19)</sup>。

この基礎培養液に、結核菌に感受性の高い061系<sup>20)</sup>由来のH系健康マウスの生後20日乃至30日の、体重12g乃至15gのものをドライ・アイスで窒息死させ、手早く脳をとり出し、冷水で冷した Waring blender に基礎培養液と共に加えて均等化し、更に凍結融解を2度行い、細胞を完全に破壊し、1,000g 15分で核分画を落とし、更に Seitz 濾過器で濾過したものを使用した(第2表)。

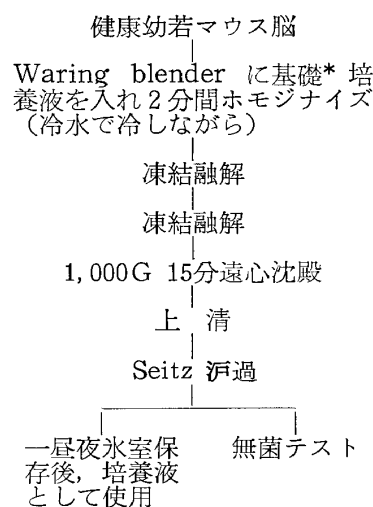
この濾液のコハク酸脱水素酵素<sup>21)</sup>、並びに乳酸脱水

第1表 基礎培養液組成

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	3.0
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.6
クエン酸鉄アンモン	0.4
クエン酸ソーダ	2.0
L-アスパラギン	2.0
L-グルタミン	1.0
グルタミン酸ソーダ	1.0
カザミノ酸	2.0
コハク酸	0.2
ブドー糖	10.0
蔗糖	76.0(0.25M)
酵母エキス	5.0
チトクロームC	20mg
ATP	200mg
蒸溜水	1000.0ml

pH 6.8 ペニシリン 10γ/ml 牛血清 10%

第2表 代謝活性培養液作成法



\* マウス6匹の脳を40mlの基礎培養液に加えた。

素酵素<sup>22)</sup>の活性を製作の各段階について検討したのが第3表であって、少くとも乳酸脱水素酵素に関しては、37°C、24時間でも尚活性が保持されている。

培養方法：

先に述べた鼠ライ菌菌液を、一般培地たる Brain-Heart Infusion 寒天培地、結核菌培地である Loewenstein-Jensen 卵培地、Kirchner 液体培養液に接種し、対照とした。

同時にこの菌液を silicone-coated slide に一滴おとし、これをしばらく静置した後、乾燥を待たずに、蒸溜水で洗って、先の代謝活性培養液に入れた。37°C

第3表 マウス脳, 肝ホモジネート並びに涙液の酵素活性度

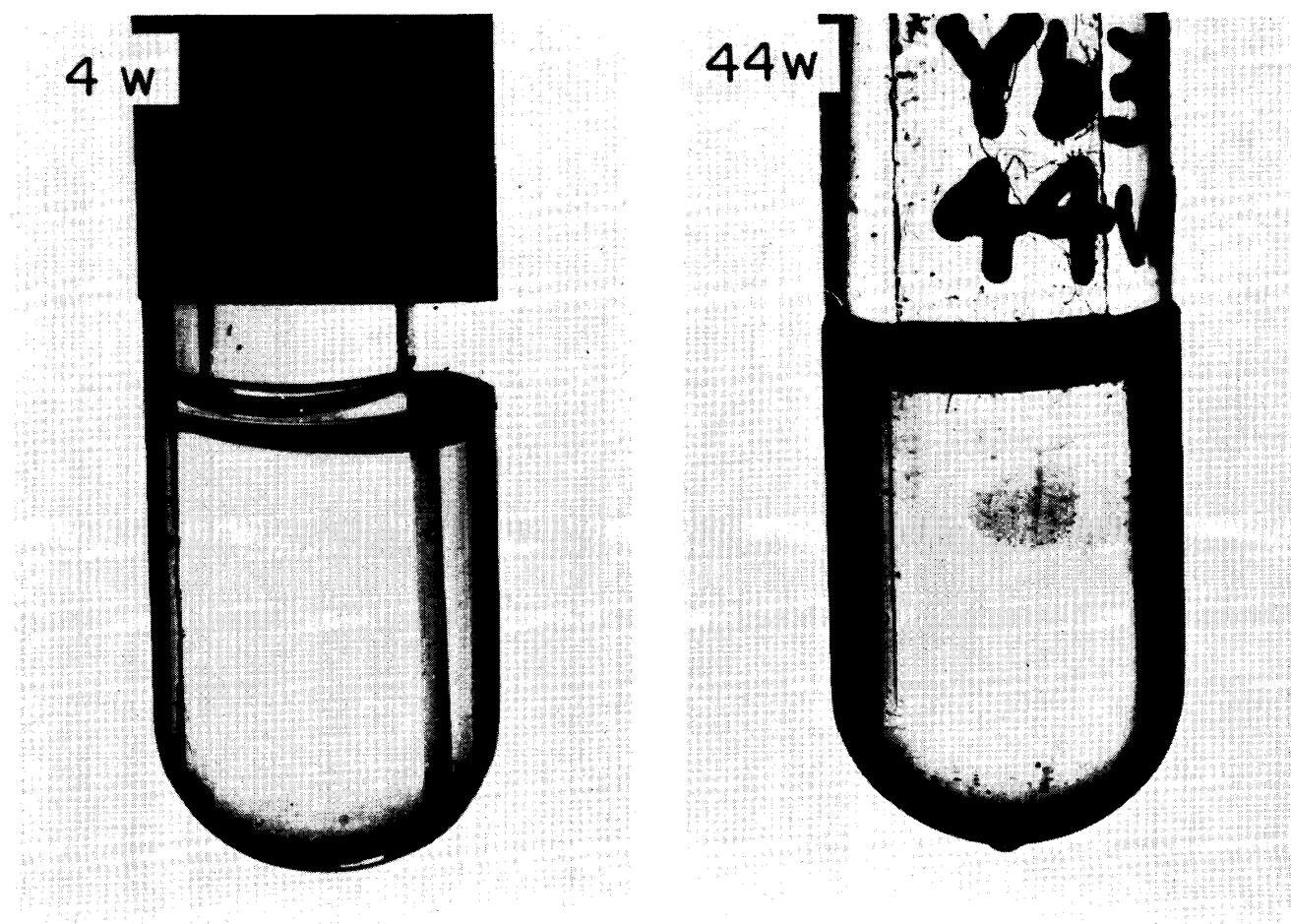
		ホモジネート	凍結融解後	1,000G 15分 遠心沈殿上清	Seitz 涙液	37°C 1昼夜後 の涙液
肝	コハク酸脱水素酵素※	+++	++	++	++	+
	乳酸脱水素酵素*	++	++	++	++	+
脳	コハク酸脱水素酵素※	+++	++	±	±	-
	乳酸脱水素酵素*	++	++	++	++	+

※\* コハク酸脱水素酵素活性は検圧法(21)で, 乳酸脱水素酵素活性は Thunberg 法(22)で測定

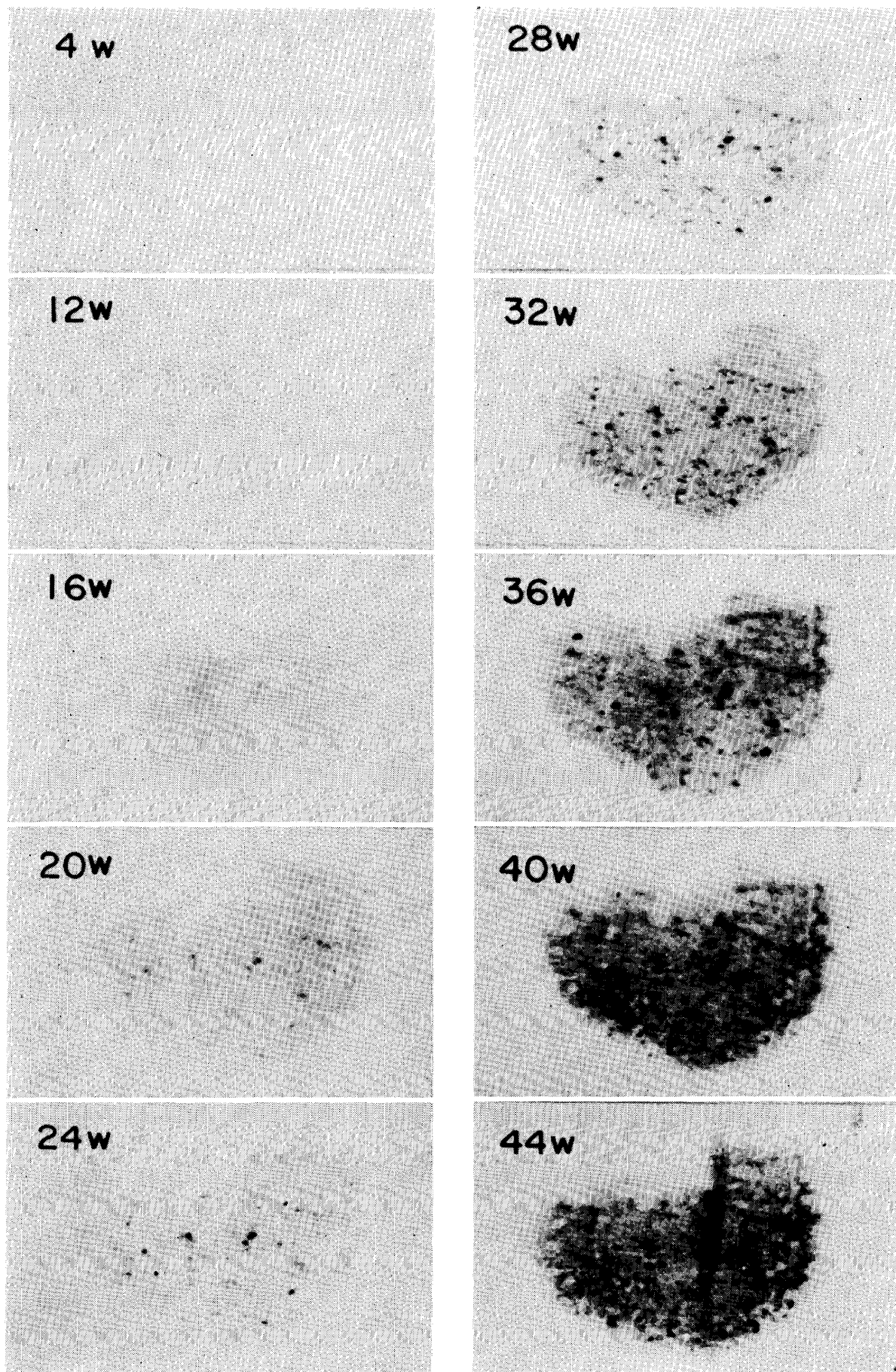
に一昼夜培養した後, このスライドを取り出し, 更に新たに作成した同培養液に入れ換える。この操作を週6回宛繰返し, 40週以上継続した。同時に脳涙液を加えない基礎培養液についても同様に, 週6回スライドを入れ換え, 同期間継続培養した。観察は拡大レンズ並びに肉眼で行い, 更に4週毎にスライド上の変化を接写撮影で追求した。

### 実験成績

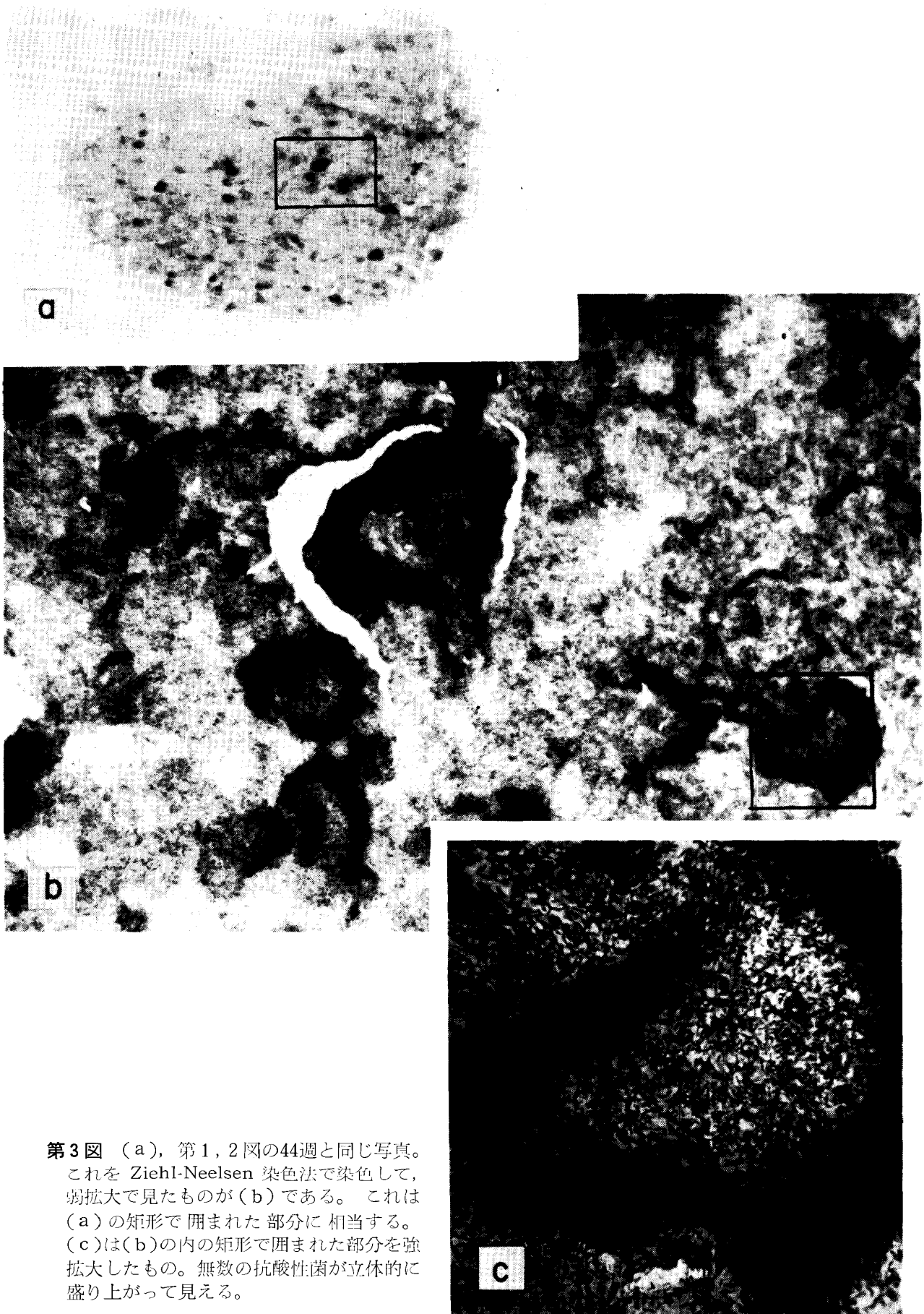
対照として用いた Brain-Heart Infusion 寒天培地, Loewenstein-Jensen 卵培地, Kirchner 液体培養液に菌液を接種したものは, すべて如何なる菌の集落をも作らなかった。又鼠ライ菌を吸着させたスライドを基礎培養液 (脳涙



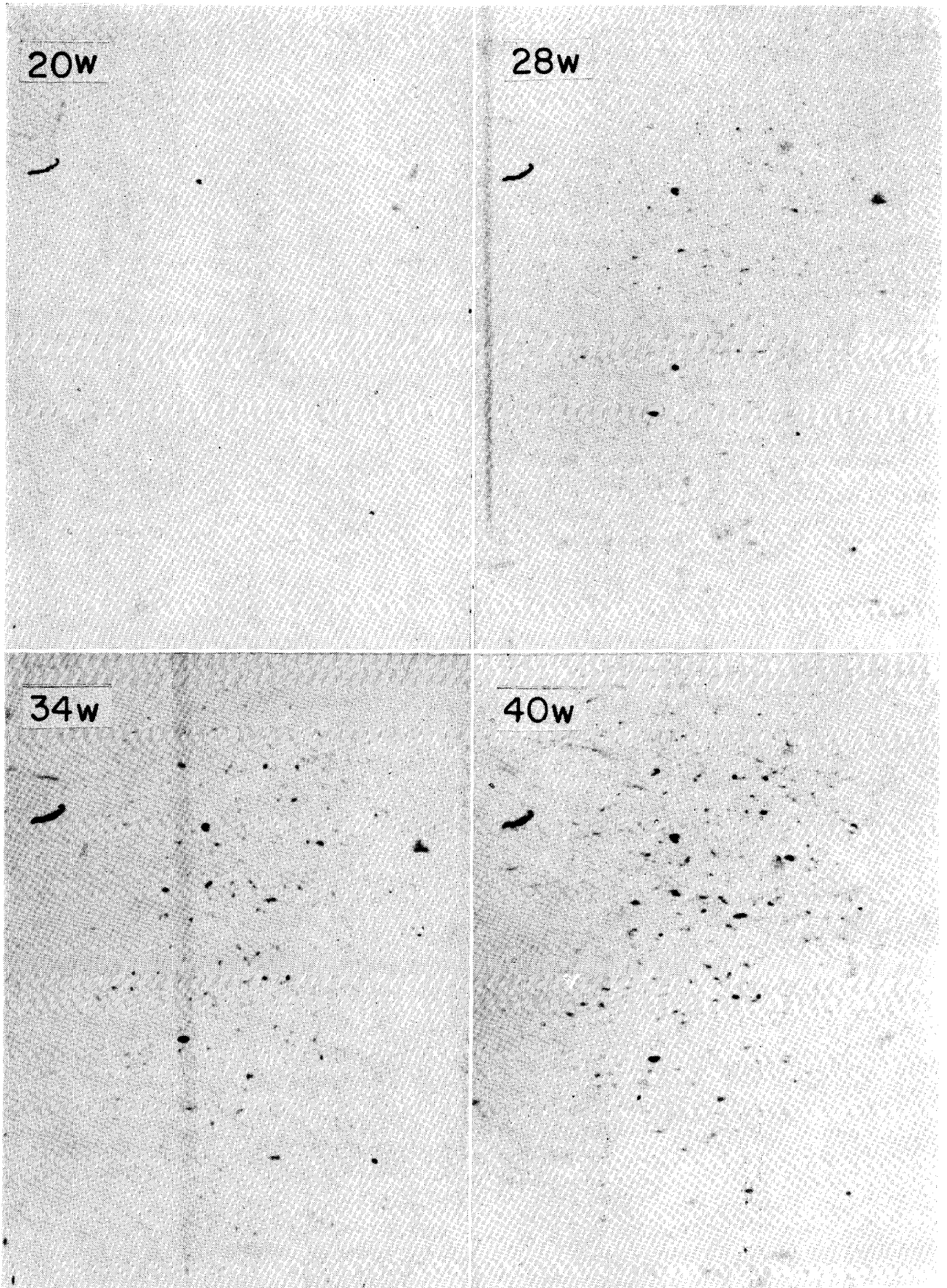
第1図 鼠ライ菌を吸着させた同一スライドの培養4週, 並びに44週後の写真。44週後では初めに菌液一滴を置いた場所に一致して, 肉眼的に, 象牙色の顆粒状斑点が見える。



第2図 第1図に示したと同じスライドの、4週毎の追跡写真。20週以後に拡大レンズで見え32週で肉眼的に見える。



第3図 (a), 第1, 2 図の44週と同じ写真。  
 これを Ziehl-Neelsen 染色法で染色して、  
 弱拡大で見たものが(b)である。これは  
 (a)の矩形で囲まれた部分に相当する。  
 (c)は(b)の内の矩形で囲まれた部分を強  
 拡大したもの。無数の抗酸性菌が立体的に  
 盛り上がって見える。



第4図 継代第2代のスライドの追跡写真。増殖速度は初代と変わらず、20週以後になって、初めて拡大レンズで見え、34週になって肉眼で見える様になる。

液を含まず)に週6回宛入れ換え44週間培養観察した場合には、肉眼的にも拡大レンズを用いても、スライド上に何等の変化もなく、44週後これに Ziehl-Neelsen 染色法を行ったところ、少数の抗酸性菌を認めるのみであった。

ところが、菌を吸着させたスライドを、その都度新たに作成した脳液を含む培養液に週6回宛入れ換えて培養していたところ、20週を過ぎた頃から、拡大レンズで、菌液を置いた部分に一致して僅かな曇りを認め、更に観察を続けたところ、34週頃より肉眼的にも象牙色の斑点を認めるに到った(第1・2図)。44週後、その内の一枚のスライドを取り出し、Ziehl-Neelsen 染色法で染色したのが第3図(b), (c)である。この染色所見から、それ迄の曇り、乃至は斑点状の顆粒群は全て抗酸性菌より成る集落である事が確認出来た。尚、この菌集落は立体的であり、スライド上に盛り上がっていた。

そこで同時に培養を行っていた他のスライド上の顆粒群をメスでかき取り、蒸留水で菌液を作り、これ等が抗酸性菌である事を確かめた後、初回同様に、Brain-Heart Infusion 寒天培地、Loewenstein-Jensen 卵培地、Kirchner 液体培養液に接種すると同時に、silicon-coated slide に吸着させ、初回と全く同様の培養方法を行った。その結果は、殆んど初回と同様であり、一般培地、結核菌培地には集落が形成せず、本培養法を行ったスライド上にのみ、24週後になって、曇りが認められ、30週を過ぎる頃より、肉眼的に象牙色の菌集落が認められる様になった(第4図)を過ぎて Ziehl-Neelsen 染色を行った所、初回同様多数の抗酸性菌よりなる集落が認められた。

本実験を始めて以来、数々の試行錯誤を重ねて来た事は冒頭にも述べたが、臓器ホモジネート、或は液の材料として、肝、脾、腎と次々に検討したが著者の行った方法では、少なくとも陽性の結果は得られず、いずれもスライド面に厚い膜が形成され、20週以前に抗酸性菌を認め得なくなった。

## 考 按

*in vitro* で細胞内の状態を出来るだけ再現する様に細胞液を含んだ培養液を用いて、鼠ライ菌の培養を試みた。又培養液自体が常に代謝活性である様に、その都度新鮮な臓器液を作成し、これに鼠ライ菌を吸着させたスライドを毎日(週6回)入れ換えて培養を続けた。

試みた臓器はH系マウスの肝、脾、腎、脳であったが、脳を除いた前3者はいずれも成功しなかった。脳ホモジネート(即ち Seitz 液過を行く以前の液)に於ても肉眼的に濁濁を示す程、細胞内顆粒を含んだものでは成功しなかった。

この脳液を含む培養液で44週培養した抗酸性菌が、果して接種菌として用いた鼠ライ菌熊本株であるか否か? マウスへの復元接種は未だ行っていない。又培養も第2代目までではあるが、この増殖したと思はれる抗酸性菌は、一般培養基、結核菌培地には増殖を示さなかった事、この集落がスライド上で始めに菌液を滴下した部分に一致して出現した事、又第2回目の培養に於ても、第1回目と同様のきはめて遅い増殖速度を示した事等よりみて、本菌がもとの鼠ライ菌熊本株である事の可能性は、きはめて大きいと思はれる。

若し、この結果を認めるならば、初めに立てた仮設の如く、鼠ライ菌の増殖には、宿主細胞の代謝活性な酵素系が強く関与している事が考えられる。

## 結 論

silicone-coated slide に鼠ライ菌熊本株を吸着させ、新しく考案したマウスの脳液を含む新培養液に、このスライドを 37°C 24時間浸した後、取り出し、新しく作った同培養液に入れ換え、この操作を44週間繰返した。即ち本法により、入れ換え毎に菌量を失うことなく、毎日(正確には週6回)活性酵素を含む新鮮培養液に菌が接触出来る様に工夫した。30週を過ぎる頃から、肉眼的にも菌の増殖が認められた。このスライド上に増殖した菌は、抗酸性を示し、一般培地、結核菌培地には増殖を示さず、本法に

よる継代培養のみが可能であったが、その増殖速度は初回とほぼ同じであった。

(稿を終るに臨み、上坂一郎教授の御忠告と御激励に対し、又山岸悦子並に山田愼一両技官の長期間に亘る技術的援助に対して深甚の感謝の意を表します。)

文 献

- 1) Hansen, G.A.: Norsk. Mag. Laegevidensk., 3R., 4. Heft 9, 1. (1874)
- 2) Neisser, A.: Jber. schles. Ges. vateri. Kult. 57, 65. (1880)
- 3) Stefansky, W.K.: Zbl. Bakt., Abt. I, Org., 33, 481 (1903)
- 4) System of Bacteriology. vol. V. Acid-Fast Bacteria London. (1930).
- 5) 義江義雄: 最新医学, 12, 3, 17 (1957)
- 6) Hanks, J. H. and Gray, C.T.: Adv. in Tuberc. Research, VII, 1 (1956)
- 7) 戸田忠雄: 昭和29年文部省総合研究報告集録, 癩の研究, 癩菌の培養, 動物実験の研究, (代表者北村包彦)
- 8) Bergey's Manual of Determ. Bact.: 7th Ed., 697. U.S.A. (1957)
- 9) Gray, T.G.: J. Bact., 64, 305 (1952)
- 10) 日下喬史: レプラ, 32, 51 (1963)
- 11) 森竜男, 堂前嘉代子, 高坂健二: レプラ, 35, 190 (1966)
- 12) Zinsser, H. and Carey, E.G.: J. Am. Med. Assn., 58. 692 (1912)
- 13) Rees, R. J. W., and garbutt, E. W.: Brit. J. Expl. Pathol., 43, 221 (1962)
- 14) Chang, Y.T., Anderson, R.N. and Vaituzis, Z.: J. Bact., 93, 1119 (1967)
- 15) Hanks, J.H.: J. Bact., 62, 52 (1951)
- 16) 西村真二, 伊藤利根太郎, 森竜男, 高坂健二: レプラ, 30, 3, 151 (1961)
- 17) Higashi, K., Tsukuma, S. and Naito, M.: Am. Rev. Resp. Diseases, 85. 3, 392 (1962)
- 18) Tsukuma, S., Imoto, G. and Naito, M.: ibid., 91, 5, 758 (1965)
- 19) Hesselbach, M. L. and duBug, H. G.: Proc. Soc. Explt. Biol. Med., 83, 62, (1953)
- 20) Uesaka, I., and Oiwa, K.: Jap. Journ. Tuberc., 4, 64 (1956)
- 21) Schneider, W.C., and Potter, V.C.: J. Biol. Chem., 149, 217 (1943)
- 22) Bach, S.J., Dixon, M. and Zerfas, L.G.: Biochem., J., 40, 229 (1946)