



Title	鼠癩菌の培養におけるDiffusion Chamber法の応用
Author(s)	岸, 良治
Citation	大阪大学, 1972, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/30516
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名・(本籍)	岸 ^{きし} 良 ^{よし} 治 ^{はる}
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 2574 号
学位授与の日付	昭和47年3月25日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	鼠癩菌の培養におけるDiffusion Chamber法の応用
論文審査委員	(主査) 教授 伊藤 利根太郎
	(副査) 教授 堀 三津夫 教授 米田 正彦

論文内容の要旨

〔目的〕

癩菌および鼠癩菌はいまだその純培養法が確立されていないだけでなく、生体内細胞外増殖の有無もあきらかにされていない。また鼠癩菌は細胞培養法によって増殖させることが報告されているが、菌の増殖を長期間定量的に観察する方法は報告されていない。本研究は diffusion chamber 法を用いて、鼠癩菌の生体内細胞外増殖の有無を検討し、ついで diffusion chamber 法による鼠癩菌の in vivo および in vitro の細胞培養を行ない、鼠癩菌の増殖を長期間定量的に観察する方法を確立しようとしたものである。

〔方法ならびに成績〕

diffusion chamber (以下chamberと略す)：内径10mm、19mm、65mm、の三種類のchamberを用いた。chamberはプレキシガラスおよびアクリル樹脂のリングにType GS(pore size $0.22\mu \pm 0.02\mu$)のmillipore filterを両面より接着して作った。試料はリングの側孔より注射器により注入し、その後 MF-cement で封じた。

菌浮遊液：鼠癩菌(ハワイ株)をマウスの皮下に接種して生じた鼠癩腫を無菌的に切除し、出来るだけ単個菌の浮遊液となるように調整した。

宿主細胞：マウス腹腔大食細胞は4週令のddO系雌マウスから採取した。LBU細胞は組織培養びん内で単層を形成させたあと、細胞浮遊液を調整した。

動物と手術操作：chamberの埋没に使用した動物は4週令ddO系雌マウスおよび市販の体重400～500gの雌モルモットを用いた。動物はエーテル麻酔下で開腹し、chamberを腹腔内に挿入し、二層縫合で腹壁を閉じた。

In vitro の実験：小型および中型chamberは試験管内に、大型chamberはすり合わせシャーレ内に

入れ、これにChangの培地5:4:1 (NTCT Medium109:50%、馬血清:40%、5倍稀釈牛胎児抽出液:10%)を加え、密封して、37°Cふ卵器内に静置し、週2回の培地交換を行なった。

観察方法:培養開始後経時的にchamberを取り出し、菌数計算はShepardの変法により行ない、chamberの内側の観察は10%ホルマリンで固定後 millipor filter をチール、ヘマトキシリン、ネールセン法で染色し鏡検した。

(I) in vivo の実験結果

1) 5.5×10^4 の鼠癩菌をchamberに封入してマウス腹腔に埋没し、1カ月から6カ月まで毎月観察したが、4カ月目が最高で約5倍の増菌をみた。しかし5カ月目、6カ月目には培養開始時菌数を下まわるchamberも現われた。

2) chamberに鼠癩菌とマウス腹腔大食細胞をともに封入し、これをマウス腹腔内に埋没した。chamber当りの細胞数は 9.0×10^2 、 9.0×10^3 、 9.0×10^4 とし、封入した鼠癩菌の数は 2.4×10^5 としたが、いずれも6カ月間の観察で対数的な菌の増殖が見られた。そのdoubling timeはそれぞれ7.5日、7.9日、9.1日であった。しかし、chamber当りの細胞数が14個のものは細胞を封入しない対照と4カ月間の観察で菌数に差がみられず、増菌はみられなかった。

増殖した菌は鼠癩菌であることが同定された。

つぎにchamberに封入する細胞数は 1.1×10^5 とし、鼠癩菌の数を 10^5 、 6.5×10^3 、 6.5×10^2 、 6.5×10^4 とかえて培養したところ、いずれも顕著な増菌をみる事ができた。

3) chamber内に 2.3×10^5 の鼠癩菌と 1.2×10^5 のマウス腹腔大食細胞を封入し、これをモルモットの腹腔に埋没したときには、鼠癩菌の顕著な増殖はみとめられなかった。

4) chamberに 5.5×10^4 の鼠癩菌と 2.2×10^4 のLBU細胞を封入し、マウスの腹腔に埋没した場合4カ月の観察で、chamber内のLBU細胞はよく維持されていたが、鼠癩菌の顕著な増殖はみられなかった。

(II) in vitro の実験結果

1) chamberに鼠癩菌とマウス腹腔大食細胞を封入して、in vitroで培養した場合(鼠癩菌: 3.3×10^5 、細胞: 1.5×10^5)3カ月後まで対数的な増菌を示し、約3000倍に達した。そのdoubling timeは7.8日であった。また、この増殖菌を同様の方法で次代培養を行なったが、これも対数的増菌を示した。マウスへの還元接種でも病原性を保持していることを証しえた。つぎにchamber当りの菌数を 3.3×10^5 とし、封入する細胞数を 6.0×10^2 と 6.0×10^4 の二種類で培養を行なったところ、2カ月目までは両者間に増菌の程度はほとんど差がないが、3カ月目、4カ月目となると、 6.0×10^2 の方は増菌がみとめられないのに対して 6.0×10^4 のものは対数的増菌を示した。

2) chamberに鼠癩菌に対して感受性のない動物であるモルモットの腹腔大食細胞を 2.4×10^4 、鼠癩菌を 6.0×10^5 封入して培養したところ、4カ月の観察で、まったく増菌はみられなかった。

3) chamberに 2.2×10^4 のLBU細胞と 5.5×10^4 の鼠癩菌を封入して培養したが、4カ月目までの観察では増菌の所見はみとめられなかった。

4) 中型および大型chamberに鼠癩菌とマウス腹腔大食細胞を封入して培養したところ、中型ch-

amberでは11週で約100倍、大型chamberは4カ月で約30000倍の増菌をみた。

〔総括〕

- 1) 鼠癩菌の生体内細胞外増殖はありうるが、きわめて限られた程度のものであった。
- 2) 鼠癩菌をin vivo、in vitroで培養する方法としてdiffusion chamberの利用を工夫し、本法を利用すれば、マウス腹腔大食細胞での鼠癩菌の増殖をin vivoでも in vitroでも、定量的に観察しうることを確認した。
- 3) diffusion chamber法を用いることによって鼠癩菌の細胞培養をin vitroで大量化する可能性を認めた。

論文の審査結果の要旨

本研究は従来不明であった鼠癩菌の生体内細胞外増殖について、diffusion chamber法を用いることにより、その増殖は認められるが、非常に限られた程度であることを明らかにした。

また diffusion chamber法の応用により鼠癩菌の細胞培養がin vivo及びin vitroで長期間定量的に観察できることを確認し、更にin vitroで鼠癩菌の細胞培養が大量に行なえることを明らかにした。

以上の成績は鼠癩の免疫学的研究、鼠癩菌の生化学的研究に寄与することが大きいものと認める。