

## 短 報

## マクロファージ内抗酸菌数の計測法について

佐藤 勝 昌

島根医科大学微生物・免疫

受付 平成4年5月15日

COUNTING EFFICACIES OF THE CFU-ENUMERATING METHOD AND  
MICROSCOPIC COUNTING METHOD FOR MYCOBACTERIA  
LOCATING IN CULTURED MACROPHAGES

Katsumasa SATO \*

(Received for publication May 15, 1992)

I compared counting efficacies of CFU-enumerating method for the number of mycobacteria (*Mycobacterium intracellulare* and *M. fortuitum*) locating in cultured macrophages with that of microscopic counting method. Zymosan A-induced macrophages from ddY mice were infected with either *M. intracellulare* or *M. fortuitum* by incubation in 10% FBS-RPMI 1640 medium containing the organisms for 1 hr, thereafter thoroughly washed to remove extracellular bacilli, and cultured for 3 to 5 days. At intervals, macrophages were thoroughly rinsed and subjected to either CFU-enumeration or microscopic counting, as follows. In the former method, macrophages were lysed with 0.2% Tween 80-distilled water by sonication using Handy Sonic and CFUs were counted on 7H11 agar plates. In the latter method, the number of acid-fast bacilli was counted by microscopy for macrophages after Ziehl-Toda's staining. The number of bacteria by the CFU-enumerating method was much greater than that by the microscopic counting method.

**Key words :** The number of mycobacteria,  
Macrophage

**キーワード :** 抗酸菌数, マクロファージ

抗酸菌は他の細菌と異なって、その細胞壁が脂質に富み、疎水性が強いため凝集しやすく、液体培地中での培養では菌の集塊を生じやすいことが知られている<sup>1)</sup>。このような抗酸菌の集塊形成を伴う発育はマクロファージ内でも認められ、Gangadharam および Pratt<sup>2)</sup> によれば *Mycobacterium intracellulare* を貪食した細胞を saponin で溶解させた場合の細胞内 CFU 数は Ziehl-Neelsen 染色を施したマクロファージ内の菌数を鏡検

で計測した場合に比べて少ないという。この場合、saponin 処理で得られた細胞溶解液にさらに超音波処理を施しても鏡検法によって計測した値には及ばないと報告されている。われわれは以前よりマクロファージ内菌数の測定では、マクロファージを detergent として Tween 80 加蒸留水中で超音波処理を行い細胞溶解液を得る方法を採用しているが、今回は本法により計測される細胞内 CFU 数と鏡検法により計測した菌数との比較

\* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693 Japan.

を試みたので以下報告する。

マクロファージは既報<sup>3)</sup>の方法に従って調製した。すなわち、Zyosan A (Sigma) の1mg を8週齢の ddY 系雌マウス (日本 SLC, 静岡) に腹腔内投与し、その4日後に Hanks' balanced salt solution (HBSS) で腹腔浸出細胞を採取した。得られた細胞を HBSS で洗浄後、抗菌剤非含有 10% FBS 加 RPMI 1640 培地 (FBS-RPMI) 中に  $5 \times 10^5$  cells/ml になるように浮遊させ、その 2ml を 34mm 径の組織培養用 well (Corning) に注ぎ、5% CO<sub>2</sub> 下で 37°C、2 時間培養後、well を HBSS で洗浄して非付着細胞を除去し、得られた付着細胞をマクロファージ ( $1.5 \sim 2 \times 10^5$  cells/well) として用いた。このマクロファージ単層培養上に *M. intracellulare* N-260 株あるいは *M. fortuitum* 18367 株の FBS-RPMI 中菌浮遊液の 2ml を加え、5% CO<sub>2</sub> 下で 37°C、1 時間培養後、HBSS で洗浄し、非貪食菌を除去した。その後、well に 2ml の FBS-RPMI を加え、*M. intracellulare* では 1 日 1 回の培地交換を行いながら、5 日間にわたって、また *M. fortuitum* では 1 日 3 回の培地交換を行いながら、3 日間にわたり 5% CO<sub>2</sub> 下、37°C での培養を行った。培養期間中の所定時間にマクロファージ単層培養を HBSS で 5 回洗浄後、0.2% Tween 80 加蒸留水を加え、37°C、20 分処理した後、15 秒間の超音波処理 (Handy Sonic; Tomy Seiko, 東京) を行い細胞溶解液を得た。次いでこの細胞溶解液を蒸留水で 10 倍階段希釈し、その 0.1 ml を 7H11 寒天培地にまき、37°C での培養を行い、CFU を計測した。別途、well 上のマクロファージ単層培養をメタノール固定、次いで Ziehl-戸田染色を施し、細胞内菌数を光学顕微鏡 (1,000 倍) 下で計

測した。

Table 1 に *M. intracellulare* 貪食マクロファージの培養中の細胞内菌数の推移を示した。マクロファージへの供試菌の感染を低濃度の菌液 ( $1 \times 10^5$  CFU/ml) 中で行った場合 (実験 1) では鏡検法の方が CFU 法よりも細胞内菌数がやや多く計測される傾向がみられるものの、両者に有意差は認められなかった。他方、マクロファージへの供試菌の感染を高濃度の菌液 ( $2 \times 10^7$  CFU/ml) 中で行った場合 (実験 2) では、0 time では CFU 法と鏡検法両法により求められた細胞内菌数は互いに大きく変わるところはなかったが、培養 3 並びに 5 日後では CFU 法での計測菌数の方が鏡検法でのそれよりも有意に多くなることが分かった。

Table 2 には *M. fortuitum* 貪食 ( $5 \times 10^6$  CFU/ml) マクロファージの培養中の細胞内菌数の推移を示したが、CFU 法、鏡検法いずれの方法により計測された細胞内菌数の間には有意差はみられず、両法での計測菌数は互いによく一致していることが分かった。

今回のわれわれの実験成績では、先に Gangadharam および Pratt<sup>2)</sup> が *M. intracellulare* について指摘しているように、CFU 法で計測したマクロファージ内菌数は鏡検法でのそれに比べて著しく少ないといったような傾向はみられず、むしろこれとは逆の傾向すら認められた。これは、(1) 細胞内の菌数を鏡検法で計測する場合、20 個以上の菌の集塊が存在する場合にはその菌数を正確に数えることは不可能であること、(2) われわれの方法では Tween 80 加蒸留水中での超音波処理法によって細胞溶解液を調製しているため細胞内で菌の集塊を形成していた抗酸菌が detergent の作用でその多くのものが遊離し、結果として孤菌状態になったことによ

**Table 1** Counting Efficacies of CFU-enumerating Method and Microscopic Counting Method for Intracellularly Locating *M. intracellulare*

Expt.	Incubation time (days)	CFU counting	Microscopic counting
		CFU/macrophage ( $\times 10^{-2}$ )	AFB*/macrophage ( $\times 10^{-2}$ )
1	0	0.99 ± 0.04	1.05 ± 0.06
	1	1.12 ± 0.05	1.64 ± 0.19
	3	1.29 ± 0.13	1.50 ± 0.50
2	0	79 ± 2	91 ± 5
	3	186 ± 19	98 ± 27
	5	124 ± 3	88 ± 3

\* : Acid-fast bacilli

**Table 2** Counting Efficacies of CFU-enumerating Method and Microscopic Counting Method for Intracellularly Locating *M. fortuitum*

Incubation time (days)	CFU counting	Microscopic counting
	CFU/macrophage	AFB *macrophage
0	0.73±0.04	0.60±0.05
1	0.85±0.01	0.78±0.03
2	0.76±0.11	0.65±0.12
3	0.41±0.01	0.59±0.05

\* : Acid-fast bacilli

るものかと思われる。したがって、CFU法での細胞内菌数計測を行う際には Tween 80 加蒸留水中での超音波処理が極めて有効な方法であるものと思われる。

#### 文 献

- 1) 斎藤 肇：抗酸菌，「戸田新細菌学」，第29版，森良一，天兒和暢編，南山堂，東京，1988，453-477.
- 2) Gangadharam PRJ and Pratt PF. *In vitro* response of murine alveolar and peritoneal

macrophages to *Mycobacterium intracellulare*. *Am Rev Respir Dis.* 1983 ; 128 : 1044-1047.

- 3) Saito H, Sato K and Tomioka H. Comparative *in vitro* and *in vivo* activity of rifabutin and rifampicin against *Mycobacterium avium* complex. *Tubercle.* 1988 ; 69 : 187-192.