

형광분광측정법에 의한 항산균의 생명력 평가

이 영 남

영국국립의학연구소 나병 및 항산균실험실

Assessment of Mycobacterial Viability by Fluorospectrophotometry

Young Nam Lee

Laboratory for Leprosy and Mycobacterial Research, National Institute for Medical Research,
The Ridgeway, Mill Hill, London, United Kingdom, NW7 1AA

Abstract: Viable potential of *Mycobacterium smegmatis*, a slow grower *in vitro* cultivation and of *M. leprae*, an obligate intracellular parasitic bacterium, which can not be cultured yet *in vitro* was assessed by fluorospectrophotometry. Bacterial cells in different numbers and under various physiological status were incubated with fluorescein diacetate (FDA). After an incubation of the bacterial preparations with FDA at specified conditions, amount of fluorescein inside bacteria was measured by a fluorospectrophotometer at 470 nm and 510 nm of excitation and emission wavelengths, respectively. Fluorounit given by such bacteria showed a correlation with assessment of viability of the same preparations made by other methods, such as optical density and colony forming units of *M. smegmatis* and intracellular ATP content of *M. leprae*. The possible use of fluorospectrophotometry in assessing viability or physiological potential of bacteria, particularly intracellular parasites and fastidious organisms to culture *in vitro* is discussed in relation to other methods.

Key Words: *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium leprae*, fluorospectrophotometry, viability

세균의 생명력(viability) 또는 생리능(physiological potential)의 측정평가(assessment)는 세균생리학에 기초적 비중을 차지한다. 세균 생명력은 여러 방법으로 측정평가될 수 있는데, 세균생명력을 평가하고자 할때는 균의 배양조건, 성장속도, 균의 성질, 성장, 평가목적 등 여러면을 고려한뒤 가장 적절한 방법으로 이루어져야 한다. 균의 생명력 측정평가법은 배양균액의 광학밀도(optical density) 측정, 균집락형성수(colony forming unit) 측정, 생체질량(biomass) 측정, 호흡속도(respiration rate)나 대사속도(metabolic rate)의 측정, 특정효소의 역가(enzymatic activity)의 측정등 여러가지가 있다. 한편 세균의 에너지 대사에 근거

를 둔 세포내 ATP량(intracellular ATP content)의 측정(Calderwood *et al.*, 1985, Prioli *et al.*, 1985), adenylate energy charge(AEC)의 측정(Chapman *et al.*, 1971, Lee and Colston, 1986), 인산화반응추진력(phosphorylation potential) 측정(Slater, 1979)도 보편화되어 가며, 세균의 특수염료에 대한 친화성을 이용한 특수염색법(special staining)도 사용되고 있다(Jarnagin and Luchsinger, 1980, Kvach and Veras, 1982). 동물실험에 근거를 둔 세균의 생명력 평가법도 있으나 이는 생명력의 평가라기 보다는 병원성 세균의 감염능 측정으로 보는 것이 타당하겠다.

항산균(mycobacterial spp.), 특히 병원성

항산균의 생명력 측정평가는 다른 미생물에 비해 극히 어려울 뿐만 아니라 측정평가 값의 해석에도 문제가 있다. 시험관 배양이 가능한 항산균(cultivable mycobacteria)의 경우, 항산균의 성장속도 및 대사능이 다른 일반 세균에 비해 너무 완만하고 세포벽을 둘러 싸고 있는 다량의 지질성분에 의한 세균의 군집성(clumpiness) 및 지질성분에 의한 생화학반응의 민감도의 저하 등 문제점이 제기되고 있다. 아직도 시험관에서 배양이 안되는 나균, *Mycobacterium leprae* (intracellular parasitic bacterium)의 경우 "mouse foot-pad technique"이 현재 유일하게 공인된 나균 생명력 측정법인데 (Shepard, 1960), 균의 접종후 결과를 얻기까지 1-2년을 기다려야 하는 점, 동물실험에 따른 제약 및 난점, 결과의 해석의 애매성 등이 방법의 한계성은 주지된 바이다(Lee and Colston, 1986). 따라서 간단, 신속하고 신뢰할 수 있는 "시험관내의 나균의 생명력 평가법"의 고안이 오래 전부터 요구되어 왔다. 이러한 방법이 고안된다면, 이는 나균의 대사연구 및 배양법의 개발, 항나제 개발 등에 큰 기여를 하리라 사료된다. 최근 항산균의 생명력 평가는 fluorescein diacetate(FDA), hydroethidine, 등의 비형광성 형광전구물질로 균을 처리한 뒤, 균의 생대사 반응에 의해 야기된 형광성 물질에 의한 균의 염색 여부를 자외선현미경 (ultra violet microscope)으로 검사함으로써 이루어지기도 한다.(Kvach and Veras, 1982, Kvach *et al.*, 1984). 그러나 현미경 검사에 의한 생균 집계의 지루함, 집계의 객관성의 결여, 생명력 측정치의 정량성 결여, 집계 중 자외선에 의한 균의 형광성의 소멸에 따른 생명력 존재 여부의 판단의 혼돈 등이 문제점으로 지적되어 왔다.

따라서 본고에서는 현미경 검사의 문제점을 보완하기 위해, 균체내의 형광량을 형광분광측정법(fluorospectrometry)으로 측정함으로써 특수 염색에 의한 항산균의 생명력 평가를 보다 신속, 객관적으로 할 수 있음과, 형광분광법에 의한 세균의 생명력 평가와 다른 방법에 의한 평가와의 상관성을 살펴보고자 한다.

재료 및 방법

Mycobacterium leprae

나균에 감염된 armadillo의 간이나 비장으로 부터 세계보건기구가 제시한 WHO-IMMLEP 법에 의해 균을 순수 분리하였다(WHO, 1980, Lee and Colston, 1985). 순수분리한 나균은 buffered-Tween(0.1% Tween-80 in 1mM 2 [N-morpholino] ethane sulfonic acid(MES), pH 6.8)에 현탁했다. 0.1% bovine serum albumin이 함유된 생리식염수로 적절히 희석된 나균현탁액의 일정량을 슬라이드에 도말, 고정한 후 Ziehl-Neelsen 색 법으로 염색, 현미경검사에 의한 균의 집계로 원래의 현탁액의 나균 밀도를 계산했다(Rees, 1964).

나균의 체내 ATP의 추출 및 정량

나균 현탁액과 100mM Tris- 2mM EDTA buffer, pH 7.75를 1:2로 혼합한 후 끓는 물에 5분간 넣음으로 균체내의 ATP를 추출했다(Prioli *et al.*, 1985, Lee and Colston, 1985). 혼합물을 얼음속에서 충분히 냉각시킨 후 반딧불벌레의 luciferin-luciferase을 이용하여 시료의 ATP양을 정량했다(firefly luciferin-luciferase coupled ATP assay, Lee and Colston, 1985).

M. smegmatis(NTCC 10265)

Lowenstein-Jensen(L-J) 사면배지에 보관된 균주를 glucose-glutamate-low phosphate-Tween80배지에 접종한 후 37°C 진탕배양기에서 배양하였다(Lee and Colston, 1985). 배양기간 중에 배양액의 균광학밀도(optical density)는 600 nm의 파장에서 측정했다. 배양액의 집락형성능은 적절히 희석된 배양액이 0.8% nutrient broth-0.06% Tween 80-1.5% agar의 고체배지 상에 형성하는 집락수(colony forming units)를 셈으로써 평가했다. 사멸시킨 균액은 끓는 물에서 균액을 20분간 처리하여 마련하였다.

FDA 용액

백색 분말의 fluorescein diacetate (Sigma Chemical Co.)를 acetone에 5 mg/ml의 농도

로 녹인 뒤 0.22 μ 의 여과지로 여과, -20°C의 암소에서 사용시까지 보관하였다. 신선한 FDA 용액은 무형광이나, 가수분해에 의해 fluorescein 부분이 diacetate로 부터 유리되면 황록의 형광을 띤다.

형광량과 형광단위의 표준곡선 작성

10⁻⁴M FDA 용액 (4.146 mg/ml acetone) 10 μ l와 2 units의 wheat germ lipase (Sigma Chemical Co.)를 100 mM Tris-10 mM EDTA buffer, pH 7.75에 녹이고 총 반응용량을 2ml로 조정했다. 혼합 반응용액의 FDA의 농도는 50 μ M이며 lipase는 1 unit/ml 이 된다. 이 혼합물을 37°C의 암소에 20분간 방치 후, 얼음 속에서 급냉시킴으로 FDA로 부터 fluorescein의 유리방출반응을 종식시켰다. 혼합 반응물을 100 mM Tris-buffer, pH 7.75로 연속적으로 희석, 희석액의 형광량을 Aminco-Bowman 형광분광기로 측정 (excitation 파장 : 470 nm, emission 파장 : 510 nm), 형광량과 형광단위의 상관성을 살폈다 (Aminco-Bowman Spectrophotometer, American Instruments Co., Silver Springs, Maryland, USA, Guilbault and Kramer, 1964). 희석수로 사용한 Tris-buffer로 기기를 보정하였다.

항산균의 FDA 염색

FDA 용액, 항산균액, Hank's balanced salt solution (HBSS)-0.05 % Tween-80 용액을 1 : 1 : 2의 비율로 섞은 뒤 1ml의 혼합액을 37°C의 암소에 20분간 보관하였다. 균을 원심분리로 수집 (Maxifuge로 30초, 6000 \times g)한 뒤 수집균을 buffered-Tween으로 세번 세척하였다. 형광분광 측정을 위해 균을 1ml의 100 mM Tris-buffer, pH 7.75에 현탁하고 균체내의 형광량을 상기의 방법으로 측정했다. 실험 때마다 Tris-buffer, pH 7.75와 염색처리가 안된 동량의 균액을 실험 대조군으로 택하여 형광분광기를 보정하였다.

결과 및 고찰

비형광 물질인 FDA는 fluorescein과 diacetate의 ester 화합물로, steapsin, wheat germ

lipase 등에 의해 가수분해되면 형광성의 fluorescein을 유리한다 (Guilbault and Kramer, 1964). 따라서 유리된 fluorescein을 형광분광기 (fluorospectrophotometer)로 정량함으로써 esterase 및 lipase의 활성도를 용이하게 측정하고 있다.

세포벽 및 막의 손상을 입지 않은 온전한 세균은 FDA를 선택적으로 통과시키며, 통과된 FDA는 세포질 안에서 균체가 갖고 있는 여러종의 lipases와 esterases 효소 작용에 의해 형광성 fluorescein을 유리, 균체로 하여금 황록의 형광을 띄게 한다. 이러한 원리에 근거를 두고 생균과 사균을 감별하는 특수 염색법이 개발되었는데 이러한 FDA 특수 염색법은 나균 등 항산균의 생명력의 유무를 감별하는데 널리 쓰이고 있다 (Jarnagin and Luchsinger, 1980, Kvach and Veras, 1982, Kvach, et al, 1984).

FDA로 염색 처리된 항산균의 생균성 감별은 자외선현미경 (U. V. microscope)의 검경으로 가능한데 현미경검사로 는 개개 균의 생균여부의 정성적 감별은 되나, 균이 지닌 생명도를 정량적으로 표기할 수 없음과 현미경 검사에 따르는 조작의 지루함과 완만성, 일정 농도 이

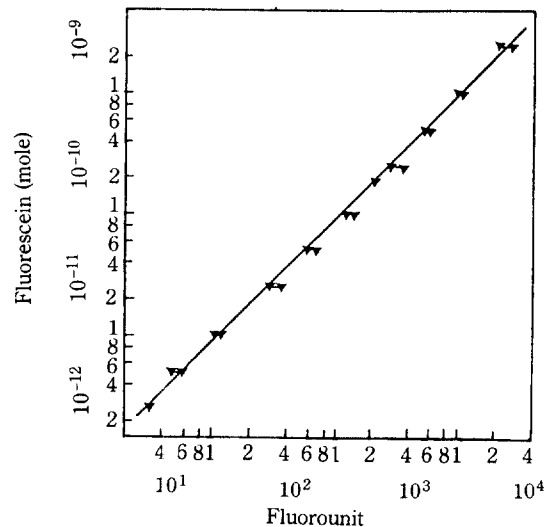


Fig. 1. A standard curve calibrating concentration of fluorescein (mole) yielded from fluorescein diacetate (FDA) by wheat germ lipase and fluorounit of Aminco-Bowman spectrophotometer. Excitation and emission wavelengths were 470 nm and 510 nm, respectively. See details in text.

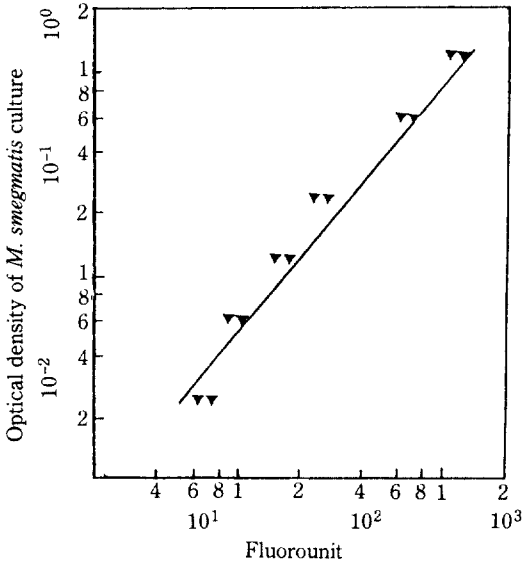


Fig. 2. A curve between optical density (at 600nm) and fluorounit of *M. smegmatis* culture. See details in text.

상의 균액이라야만 현미경 검사의 결과를 통계학적 의미가 있는 결과로 받아들일 수 있다는 균액농도에 따른 제한, 특히 검경 중 자외선에 의해 균체 내의 형광이 급격히 소멸되기에, 생명력 유무 판별에 혼돈이 있을 수 있어, 실험자의 주관이 작용할 수 있다는 점 등이 특수염색-자외선현미경 검사에 의한 항산균생명력 판별의 한계점으로 지적되고 있다.

따라서 이 부문에서는 FDA 특수염색 후 균체 내의 형광을 형광분광기로 측정, 균체의 생명력을 객관적인 공인력을 지닌 단위로 표현하려는 시도를 하였다. 즉 특수염색-자외선현미경 검사에 의한 세균의 생명도 평가법을 기기정량적으로 보완함으로써 상기의 자외선현미경 검사가 앓고 있는 한계성을 탈피코져 하였다.

우선 Aminco-Bowman 형광분광기의 민감도를 알기 위해 기능도의 FDA를 충분한량의 wheat germ lipase로 처리, 유리된 fluorescein 액으로 표준곡선을 작성하였다. Fig. 1은 Aminco-Bowman 형광분광기의 fluorescence와 fluorounit 사이의 상관성을 보여주는 표준곡선으로 Aminco-Bowman 형광분광기로 picomole-nanomole의 fluorescein량을 정량할 수 있었다(상관계수 1.02).

FDA로 염색된 항산균의 생명력 평가가 형광분광기법으로 가능한지 알아보기 위해 glucose-glutamate-low phosphate-Tween80 액체배지에 배양 중인 *M. smegmatis*의 광학밀도(optical density)와 염색된 균체 속의 fluorescence의 fluorounit과의 관계를 살핀바 (Fig. 2) 배양균액의 광학밀도와 fluorounits 사이에 상관성이 있음을 관찰하였다(상관계수 1.18). 상기 액체배지에서 계대배양된 가속기에 있는 *M. smegmatis*는 균생력이 적어 비교적 균일한 양상의 혼탁도를 보였다.

한편 *M. smegmatis* 배양액 속의 생균수를, 고체배지에 형성된 집락수로 측정후 (colony forming units), colony forming unit와 염색된 균액의 fluorounit와의 상관성을 살핀바(Fig. 3) 균액에 존재하는 colony forming unit, 소위 생균수와 fluorounit 사이에 밀접한 상관관계가 있음을 알 수 있었다(상관계수 1.08). 배양액의 광학밀도와 균의 fluorounit, colony forming unit와 fluorounit간의 상관계수의 차이는, 광학밀도가 배양균액의 총탁도의 표현치인 것에 기인된다고 사료된다.

생균과 사균이 섞여 있는 경우, 혼합균액의 생균 분포를 특수염색-형광분광법에 의해 파악할 수 있는지의 여부를 알기 위해 성장가속기

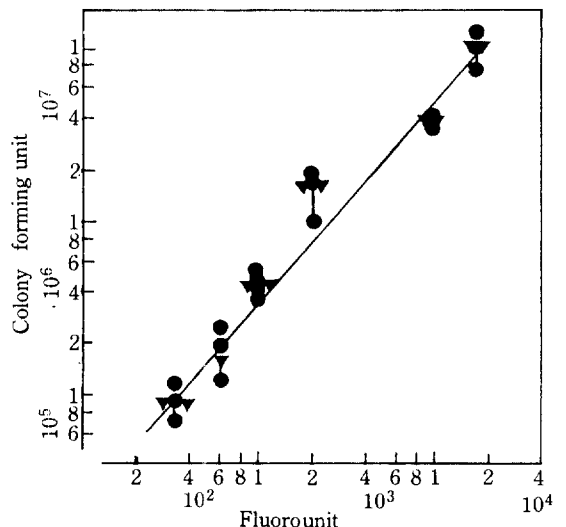


Fig. 3. Colony forming unit(●-●)and fluorounit(▼-▼) of *M. smegmatis* culture. Colony forming unit per ml of culture was measured in triplicate.

의 *M. smegmatis* 배양액의 일부를 열처리, 균을 사멸시킨 뒤, 생배양액과 사멸균액을 각기 다른 비율로 혼합하고, 그 혼합액을 FDA 염색한 후, 균액의 fluorounit를 측정, 혼합액 중의 생균비율과 fluorounit와의 관계를 살핀 바 (Table 1), 혼합균액 속의 생균이 차지하는 비율과 균액이 지닌 상대적 생명도(relative viability of culture)가 서로 부합함을 볼 수 있었다(상관계수 1.04). 한편 이 실험으로 사멸된 균은 FDA에 의해 염색되지 않음도 다시 확인되었다.

이와 같은 실험결과로, 시험관 배양이 되는 항산균, *M. smegmatis*의 경우, 균액의 생명력은 이미 널리 알려진 optical density, colony forming unit 측정으로 평가될 수도 있지만 FDA 등 특수염료로 균액을 처리, 형광분광측정에 의한 방법으로 평가할 수 있음을 보고한다. 형광분광법에 의한 균의 생명도 측정은 고체배지를 사용하여 생균집락수를 셈하는 것보다 간편하고 단시간에 생명도 측정이 가능하여 균의 생명도 정도에 따라 다음 과정의 실험을 계획할 때, 효율적으로 실험을 할 수 있다. 물론 집락형성능 측정(colony forming unit)으로는 절대생균수를 알 수 있는데 비해, 형광분광법으로는 균액 중의 절대수보다는 균이 지닌 생대사반응력에 근거를 둔 균액의 생명도가 평가된다는 차이점을 기억하여야 할 것이다. 항산균액의 광학밀도를 측정함으로써 배양균액의 성장 및 생명도를 가름하고자 할 때 광학밀도가 균액의 총

다도의 표현치라는 점과 항산균의 군집성에 기인한 광학밀도의 부항성이 문제시 되는데, 형광분광법으로 항산균의 생명도를 평가할 때, 이런 점들은 문제가 안된다.

형광분광법에 의한 세균의 생명력 평가도 시험관내 배양이 되는 균보다 배양이 안되는 세균이나, *Listeria* 등의 세포내 기생세균들의 생명력 평가에 보다 적절히 쓰일 수 있다.

나병의 원인체인 나균의 시험관내 배양은 아직 성공하지 못했다. 이러한 나균의 생명력은 “마우스 죽저부 접종”에 의한 동물실험으로 추정되고 있는데, 이 방법이 개발된 이래, 방법이 안고 있는 한계성 내지 문제점은 널리 인식되어 왔다. 그러나 현재 이방법 이외는 다른 평가법이 없는 실정이다. “마우스 죽저부 접종”에 의한 나균의 생명도는 최확수(most probable number, MPN)로 표시되는데(Colston *et al*, 1978, Sharp *et al*, 1985), MPN의 통계학적 의미를 고찰해 볼 때, “마우스 죽저부 접종”에 의한 나균의 생명도 평가의 미흡점을 쉽게 간파할 수 있다. 따라서 동물실험의 난점을 보완한, 보다 직접적인 나균 생명력의 시험관내 평가방법이 절실히 요구되고 있으며, 이런 방법의 고안이 나균연구에 활기를 주리라 본다. 그리하여 FDA 특수염색 및 형광분광법을 적용하여 나균의 생명도를 시험관내에서 평가하려는 시도를 하였다. 형광분광법으로 나균의 생명력을 측정할 수 있는지 알기 위해 다음의 실험을 했다. 우선 동물에서 순수분리한 신선한 나균액

Table 1. Relationship between live population of *M. smegmatis* and fluorounit

Bacterial suspension	Fluorounit	Relative Viability
1.0 ml live cell*	6300***	1.0
0.7 ml live cell+0.3 ml dead cell**	4480	0.71
0.5 ml live cell+0.5 ml dead cell	3350	0.53
0.3 ml live cell+0.7 ml dead cell	1950	0.31
1.0 ml dead cell	65	0.01

*:culture of *M. smegmatis* in exponential growth phase, OD₆₀₀=0.92

** :dead cell suspension was prepared by treating live cells in boiling water for 20 minutes.

***:mean of duplicate values.

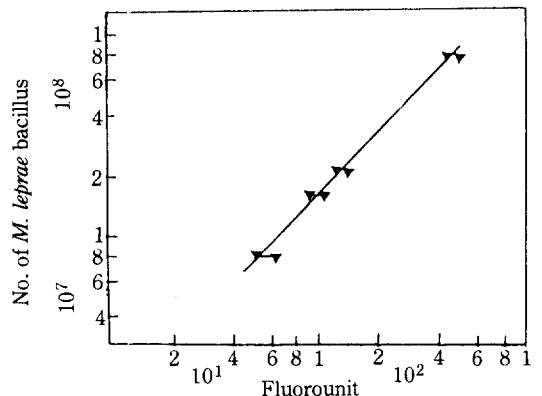


Fig. 4. A curve between numbers of *M. leprae* and their fluorounit. See details in text.

을 FDA로 처리, 균체내의 fluorescence와 나균수와와의 관계를 본 바 (Fig. 4) 나균수와 균체내의 fluorescence 사이에 높은 상관성이 있음을 알 수 있었다(상관계수 1.06).

근래의 보고에 의하면 순수분리한 나균을 시험관에서 보관할 때, 나균의 체내 ATP 양이 경시적으로 줄어들며, 보관온도 및 기타 조건에 따라 감량속도에 현저한 차이가 있음이 밝혀졌다(Lee & Colston, 1985). 또한 나균의 체내 ATP 양이 줄어들며 따라, “마우스 죽저부 접종”에 의해 추정된 생명력도 상관성 있게 저하됨이 시사되었다(Lee & Colston, 1986). 이러한 근래의 연구결과를 토대로 하여, 나균을 buffered-Tween에 현탁하여 4°C에 보관하면서 나균의 체내 ATP 양(intracellular ATP content)의 변화와 FDA로 처리한 나균의 fluorescence의 변화를 관찰하였다. 그 결과로 (Fig. 5), 보관 2일까지 체내 ATP량과 fluorescein 량, 둘다 급격한 감소를 보임과, 그 후에는 ATP 감량속도에 비해 fluorescein의 감량속도가 다소 완만하기는 하나 전반적으로 비슷한 양상의 감량곡선을 얻었다. 나균을 buffered-Tween에 현탁하여 4°C에 보관할 때, 2일까지 보관된 나균액은 “마우스 죽저부 접종” 실험에 양성을 보인다는 연구결과와 보관 2일까지 체내 ATP와 fluorescein의 급격한 감량현상에 상통함이 있는지는 좀더 검토되어야 할 것이다.

일반적으로 생명체가 생리력 혹은 생명력을 소실하면 체내 ATP량도 점점 줄어든다고 알려졌는데, 나균을 시험관에 보관할 때 나균의 체내 ATP와 fluorescein의 감량이 상응하는 것으로 미루어 보아 형광분광측정법으로 시험관내에서 나균의 생명력을 상대적으로 평가할 수 있다고 사료된다.

형광분광측정법에 의한 나균의 생명력 평가는 “마우스 죽저부 접종”에 의한 것보다 객관

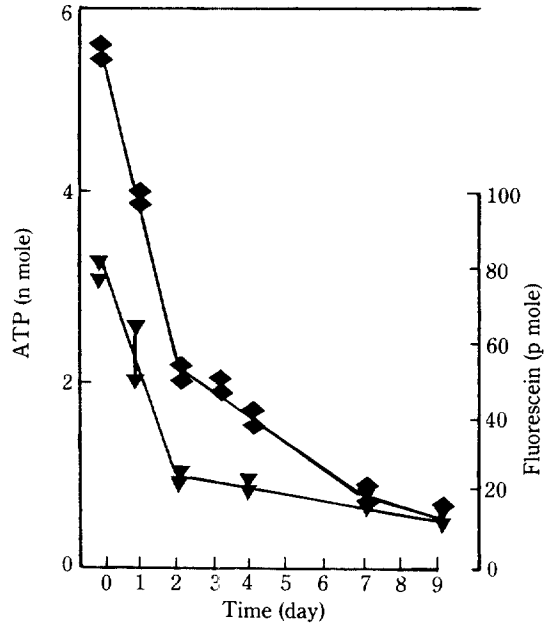


Fig. 5. Decay of *M. leprae* intracellular ATP (◆◆) and reduction of fluorescein (▼▼) of *M. leprae* during storage in buffered-Tween at 4°C. Numbers of *M. leprae* bacilli were 1.6×10^8 .

성을 지닌 정량평가법으로 동물의 희생이 없이, 간단한 조작으로 신속한 평가치를 얻을 수 있다. 이밖에 시험관내에서 할 수 있는 나균생명력 평가로 체내 ATP측정과 adenylate energy charge (AEC) 측정법이 제시되었는데(Lee and Colston, 1985, 1986), ATP-AEC 측정과 특수염색-형광분광법을 병행하면 비교적 용이하게 시험관내에서 나균의 생명력을 평가할 수 있으리라 사료된다. 따라서 이러한 시험관내 나균생명력 평가법을 이용하면, 나균의 배양배지의 개발도 가능해지고, 나균의 생리대사의 연구도 보다 활발해지리라 본다. 무엇보다도 ATP 및 AEC, 형광분광법에 의한 세균의 시험관내 생명력 평가는 항나제를 비롯한 항균제의 대규모의 선별에 유용하리라 사료된다.

적 요

나균(*M. leprae*)을 비롯한 항산균(mycobacterium)의 시험관내 생리력 또는 생명력평가법(in vitro assessment of physiological potential or viability)으로 형광분광측정법(fluorospectrophotometry)를 고안하였다. 균액을 비형광성의 fluorescein diacetate (FDA)로 처리, 균체의 생대사능에 의해 FDA로부터 유리된 체내 fluorescein량을 Aminco-Bowman 형광분광기로 측정함으로써 균체의 생리능을 fluorounit로 표기해 보았다. Fluorounit로 표기된

균체의 생명력을 균배양의 광학밀도 (optical density), colony forming unit, 체내 ATP량 (intracellular ATP content) 등으로 표기되는 항산균의 생명력과 비교 검토함으로써 형광분광법에 의한 시험관내 항산균의 생명력 평가법의 적합성을 살펴 보았다.

형광분광측정에 의한 생명도의 평가는 객관성을 띤 기기정량법으로 조각이 간단하고 신속하게 결과를 얻을 수 있어 시험관내 배양의 속도가 완만한 균이나 (slow growing mycobacteria, i.e. *M. tuberculosis*, *M. microti*, etc), 세포내기생세균 (intracellular parasitic bacteria, i.e. *M. leprae*, *Listeriae* sp) 등의 생명력의 상대적 평가에 활용될 수 있다고 사료된다.

REFERENCES

1. Calderwood, S.K., E.A. Bump, M.A. Stevenson, I. van Kersen, G.M. Hahn, 1985. Investigation of adenylate energy charge, phosphorylation potential and ATP concentration in cells stressed with starvation and heat. *J. Cellular Physiol.* **124**: 261-268
2. Chapman, A.G., L. Fall and D.E. Atkinson, 1971. Adenylate energy charge in *Escherichia coli* during growth and starvation. *J. Bacteriol.* **108**: 1072-1086
3. Colston, M.J., G.R.F. Hilson, D.K. Banerjee, 1978. The proportional bactericidal test: a method for assessing bactericidal test of drugs against *Mycobacterium leprae* in mice. *Lepr. Rev.* **49**: 7-15
4. Guilbault, G.G. and D.N. Kramer, 1964. Fluorometric determination of lipase, acylase, alpha- and beta-chymotrypsin and inhibitors of these enzymes. *Anal. Chem.* **36**: 409-412
5. Jarnagin, J.L. and D.W. Luchsinger, 1980. The use of fluorescein diacetate and ethidium bromide as a stain for evaluating viability of mycobacteria. *Stain Technology* **55**: 253-258
6. Kvach, J.T. and J.R. Veras, 1982. A fluorescent staining procedure for determining the viability of mycobacterial cells. *Int. J. Lepr.* **50**: 183-192
7. Kvach, J.T., G. Munguia and S.H. Strand, 1984. Staining tissue-derived *Mycobacterium leprae* with fluorescein diacetate and ethidium bromide. *Int. J. Lepr.* **52**: 176-182.
8. Lee, Y.N. and M.J. Colston, 1985. Measurement of ATP generation and decay in *Mycobacterium leprae* in vitro, *J. Gen. Microbiol.* **131**: 3331-3337
9. Lee, Y.N. and M.J. Colston, 1986. The measurement of adenylate energy charge in mycobacteria including *M. leprae* (submitted in *J. of Bacteriology*)
10. Lee, Y.N. and M.J. Colston, 1986. Comparison for methods for assessing the viability of *M. leprae* (submitted in *Int. J. Leprosy*)
11. Prioli, R.P., A. Tanna and I.N. Brown, 1985. Rapid methods for counting mycobacteria-comparison of methods for extraction of mycobacterial adenosine triphosphate (ATP) determined by firefly luciferase assay. *Tubercle* **66**: 99-108
12. Rees, R.J. W., 1964. Limited multiplication of acid fast bacilli in the footpads of mice inoculated with *M. leprae*. *Br. J. Exp. Pathol.* **145**: 297-318
13. Sharp, A.K., Colston, M.J. and D.K. Banerjee, 1985. Susceptibility of *M. leprae* to the bactericidal action of mouse peritoneal macrophage and to hydrogen peroxide. *J. Med. Microbiol.* **19**: 77-84
14. Shepard, C.C., 1960. The experimental disease that follows the injection of human leprosy bacilli into foot-pads of mice. *J. Exp. Medicine* **112**: 445-454
15. Slater, E.C., 1979. Measurement and importance of phosphorylation potential: calculation of free energy of hydrolysis in cells. p. 245-245, in S. Fleischer and L. Packer (eds), *Methods in Enzymology*, vol. 55, Academic Press, New York.
16. World Health Organisation, 1980. UNDP/World Bank/WHO social program for research and training in tropical diseases. Report of the fifth meeting of the scientific working group on the immunology of leprosy (IMMLEP). TDR/IMMLEP SWG Annex 4, 123(5)/80.3. Geneva

(Received Mar. 26, 1986)