STUDIES ON CULTIVATION OF LEPROSY BACILLI

Tadao Toda and Shinya Otomo (Bact. Dep., Kyushu Univers.)

Yo Nakakawa and Masahiro Nakamura (Bact. Dep., Kurume. Faculty)

1) The addition of amino-delivates to the media seems to give a favorable effect for multiplication of bacilli.

2) We advocated as the judging method of successive culture, to describe the size and number of microscopic colonies at every generation, and to regard the increase of the size and number as positive.

3) By this judging, our culture of the leprosy bacilli were successful to second generation.

癩菌の培養実験に関する研究 特に累代培養実験に於ける増菌判定の一試案

九州大学医学部細菌学教室

久留米医科大学細菌学教室

戸 田 忠 雄
大 友 信 也
中 川 洋
中 村 昌 弘

序

癩菌培養に関してはわれわれの一人戸田は既に二十数年前よりその実験を志し、さきに昭和14年その一部の成績①を発表し、また近くは昭和21年その後の成績②について公にするところがあつた。その後なお不斷の努力を続行中であることは論を俟たないところであるが、今回は更にその後の成績についていささか述べてみたいと思う。

そもそも戸田が癩菌の培養実験に着手してから、実験を遂行するに当つては鋭意癩菌培養実験の多くの試みを行う一方、他面癩菌と同一のカテゴリーに属する結核菌並に自然界抗酸菌の研究を常に平行的に行つてそれらの性状を徹底的に究明して、その得られた成績から癩菌の性状を類察し、併せて癩菌培養条件の示唆を得たいと考えたことは度々述べたところである③。従つて今回も結核菌の発育促進物質を研究中、アミノ酸注射製剤のあるものが結核菌に著しい発育促進性を示すこと④を認めたため、早速癩菌の培養実験に援用して以下述べる成績を得たわけである。なお、培養の物理的条件に関しては中

村が占部教授の指導のもとに行つた実験方法⑤—⑧をそのまま用うることにしたのである。

更に増殖したと思われる癩菌の累代培養も試みたのであるが、その際の増殖判定法の一つの試案を考案したために、これも公にして諸賢の批判を得たいと考える次第である。

実験方法並に成績

I. 人 癩 菌

実 験 方 法

実験は数回にわたつて行つているのであるけれどもその一つ一つを逐次述べることは紙面の都合上許されないから、次に簡単に実験の概要を述べることにする。

供試材料：鼠癩菌株としては久留米42号（20代）接種後4カ月の膝関節部淋巴腺および時期を異にして用いた同上株の接種後6カ月の鼠癩腫並に熊本株の接種後5カ月の鼠癩腫で、凡て無菌的に採取し、滅菌生塩水で乳剤となし、その濃度は塗抹染色標本で1視野平均20～50個位

の菌数を示す程度にして、それを注射器の滅菌注射器にすい上げその1滴宛を培地に移植した。

供試培地：

I) 牛血清加 Kirchner 液に2% CaCl_2 を注射で3滴添加したもの。

II) 同上培地にポリタミン注射液〔武田〕を10%に添加したもの。

III) II) の培地にフチオコール、ビタミン B_1 , B_2 を加えたもの。

IV) 血清加 Kirchner 液からアスペラギンを排除しそれにポリタミン、フチオコール、ビタミン B_1 , B_2 を加えたもの。

V) 中村培地⑨

VI) 血清加 Kirchner 液にアミノ酸注射製剤であるマリアミン1号注射液〔安原製薬加工会社〕を10%添加したもの。

大体以上のような培地を用いたのであつてそのPHは凡て6.6として使用した。

培養条件：25°Cの孵卵器に収め、その外扉を開放し分散光線を導入しながら培養を行つた。

成績判定：一定培養日数を歴したのち先ず肉眼的に実験培地を観察し次に滅菌毛細管ピペットで無菌的にその沈渣を培液の一部と共にすい上げ、それによつて塗抹標本作製し、Ziehl-Neelsen 染色を施したのち鏡検、対照の加熱死菌移植の培養管所見並にその塗抹染色標本と対比しながら成績の判定を行つた。

実験成績

成績を一括すると第1表の如くである。

即ち第169より第178実験まですべて陰性であるが、第179, 183 および 184実験において増菌の徴候があつた。とくに第184実験においては後述するような所見がえられた。

累代培養実験

第184実験においては7本の試験管中2本において増菌の徴が現われ、とくにその1本においては別頁写真のように培養44日後に $56 \times 21 \mu$ の小集落をえたので、これを第2代へ累代した。

第2代培地としては第1代と同じく牛血清加塩化カルシウム加マリアミン加 Kirchner 液を用いた。この第2代は培養67日後にこれも写真の如く2本中1本において $154 \times 77 \mu$ の小集落をえた。これは明かに初代菌よりも増大していることが判つた。次に更にこの2代小集落を第3代へ累代した。この場合は培地として第2代培地と同様の培地の外に、第2代培地より塩化カルシウムを排除した培地を用いた。培養41日後観察するに前者培地の1本に $22 \times 15 \mu$ の小集落をうることが出来た。しかしこの第3代集落ははるかに第2代集落より小さいものであつた。

以上の所見を一括すると第2表の如くである。

第2表 (鼠 癩 菌 累 代 培 養 実 験)

世 代	培養条件		培養 日数	第 1 8 4 実 験			
	温 度	明 暗					
I	25°C	明	44	培地：Kirchner+ CaCl_2 +牛血清+マリアミン1号10%			
				1 ++	2 +	-	-
II	25°C	明	67	培地：Kirchner+ CaCl_2 +牛血清+マリアミン1号10%			
				1 +++			-
III	25°C	明	41	培地：Kirchner+ CaCl_2 +牛血清+マリアミン1号		Kirchner+牛血清+マリアミン1号	
				-	2 +	-	-
IV	25°C	明	30	培地：Kirchner+ CaCl_2 +牛血清+マリアミン1号		Kirchner+ CaCl_2	
				-	-	-	-

II. 人 癩 菌

実験方法

供試材料：菊池恵楓園より分与をうけた第14号、第15号人癩結節および久留米医科大学皮膚科教室より分与をうけたS号人癩結節である。結節はなるべく無菌的に採

第 1 表

(鼠 癩 菌 培 養 実 験)

実験 番号	培 液				培養 日数	条件 世代 所見	25° C 明		
	基 液	添 加 物					I 陽性 管数	I 供試 管数	I
		血清	CaCl ₂	そ の 他					
169	Kirchner	牛	3 滴	—	47	0/9			
170	ク	ク	—	ポリタミン	50%	ク	0/3		
					20	ク	0/3		
					10	ク	0/3		
					5	ク	0/3		
171	ク	ク	3 滴	ポリタミン	50	ク	0/3		
					20	ク	0/3		
					10	ク	0/3		
					5	ク	0/2		
172	ク	ク	ポリタミン + フチオコール V-B ₁ ・B ₂	20	ク	0/3			
				10	ク	0/7			
				5	ク	0/3			
173	ク (-アスペラギン)	ク	同 上	50	ク	0/3			
				20	ク	0/3			
				10	ク	0/3			
174	中 村 培 地	ク	—	ポリタミン	20	ク	0/3		
					10	ク	0/3		
					5	ク	0/3		
175	中 村 基 礎 培 地	ク	—	ク	20	ク	0/3		
					10	ク	0/3		
					5	ク	0/3		
176	ク	ク	—	ム チ ン	No.25	45	0/[4]		
					29	ク	0/[4]		
					30	ク	0/4		
					31	ク	0/4		
					35	ク	0/4		
					38	ク	0/[2]		
177	Kirchner	ク	3 滴	ム チ ン	ク	0/[4]×6			
178	ク	ク	ク	—	ク	0/10			
179	ク	ク	ク	V-B ₆	ク	1/12			
183	ク	ク	ク	—	30	1/4			
184	ク	ク	ク	マリアミンI号 10%	ク	2/7 → ½ →			

註 : 1) 供試菌株 : 169→175 久留米42号, 176→179 久留米42号

183→184 熊本株

2) []=雑菌

第3表 (人癩菌培養実験)

実験番号	培 液				培養 日数	条件 管	25° C 明					37° C 暗		
	基 液	添 加 物					1	2	3	4	5	6	7	
		血清	CaCl ₂	そ の 他										
74	Kirchner	牛	3 滴	ポリリタミン	20% 10% 5% 1% 0.5%	33		-	-	-			-	-
								-	-	-			[-]	-
								-	-	-			-	-
								-	-	-			-	-
								-	-	-			-	[-]
75	ク	ク	ク	フチオコール VB ₁ + アラビ VB ₂ + ヤゴム	2.5% 1% 0.1%	ク		-	-	-				
								-	-	-				
								-	-	-				
76	ク	ク	ク	-		ク		+	+	+	+	+		
77	ムチン No. 9	ク	-	フチオコール V-B ₁ , B ₂	25° C ↑ ↓ 37° C	ク		-	-	-				
	10							-	+	[-]				
	11							-	-	-				
	12							-	-	[-]				
	13							-	-	+				
	15							-	-	-				
	17							-	-	[-]				
78	中村培地	ク	-	活 性 炭		ク		-	-	-	-	-		
	Kirchner	ク	3 滴	ム チ ン		ク		+	[-]	[-]	[-]	[-]		
79	ク	ク	ク	ロデアリン	5% 1 0.5 0.1 0.05 0.01 0.005 0.001	33								
80	ク	ク	ク	サポニン	1% 0.5 0.1 0.05 0.01 0.005 0.001 0.0005	ク								
81	ク	ク	ク	-		47		-	+	-	-	-		
82	中村培地 (No.31)	ク	-	フチオコール V-B ₁ , B ₂		ク		+	-	+	+	-	+	
83	Kirchner	ク	3 滴	ポリタミン 10%		ク		-	-	-	-	[-]		
84	ク	ク	ク	ポリタミン10%+ムチン		ク		-	-	-	-	-		
85	中村培地	ク	-	フチオコール V-B ₁ , B ₂		ク		-	-	-	-	-		
86	ク	ク	-	ポリタミン 10%		ク		[-]	-	-	-	-		
90	Kirchner	ク	3 滴	ポリタミン 10%		30		-	-	-	[-]			
97	ク	ク	ク	ポリタミン 10%		ク		-	-	-	-	-		

註：供試材料，74→80 惠楓園結節第14号，81←86 皮膚科S号，90→97 惠楓園結節第15号

取されたが念のため5% H_2SO_4 で40分間処置後、生塩水で数回表面の H_2SO_4 を洗をい去った後ハサミで細碎、乳鉢で十分磨碎して生塩水で乳剤とした。濃度は鼠類菌の場合と同様、1視野20~50個位の菌数とした。移植の方法等すべて鼠類菌の場合に準じた。

供試培地：大部分鼠類菌の場合用いたものと同様であるが、第3表に一括しておく。この場合もPHは6.6とした。

実験成績

第3表の如くである。

即ち大部分陰性成績であるが、第76, 77, 78, 81, および82実験において見るべきものがあつた。

累代培養実験

1) 第77, 81, 82実験

この3実験においては初代培地と同一培地を用いて累代培養実験を行つたが、培養48日後の所見ではすべて全く菌影をみとめず成績は陰性とした。

2) 第76実験

この実験では初代菌において供試管5本中5本に多少の小集落が散見されとくにその第1号では $21 \times 14 \mu$ 大の小集落をえたので、それを、初代供試培地と同一培地3本並にそれに10%の割合にポリタミンを添加した培地3本へ累代培養した。培養45日の所見では後者の培地中1本に $77 \times 35 \mu$ の小集落が標本の方々に観察された。従つて第3代に累代した。こ

の場合も第2代と同様に2種の培地を用いた。

培養79日後の所見ではその後者の培地に $98 \times 28 \mu$ の小集落をえ、前者培地でも $42 \times 22 \mu$ の小集落をえた。更に第4代にこれらの累代培養を試みたが培養137日後に $21 \times 12 \mu$ の小集落をえた。一方 $98 \times 28 \mu$ の集落は消失した。

次にこの第4代菌を第5代に累代培養したのに再三観察したが、ついに菌影をみとめず消失したのと思われた。これらの所見は第4表に示した。(なお別写真参照)

以上、鼠類菌、人類菌を用いての実験成績の概要をのべたが、いずれの場合にも類菌の増殖判定に際しては、これら集落を一般抗酸菌用培地例えば岡・片倉培地にうつし、これら培地上に集落の発生をみないことを確認し、類菌以外の培養可能な抗酸菌を除外したことは勿論である。

第4表

(人類菌累代培養実験)

世 代	培養条件		培養 日数	第 7 6 実 験													
	温 度	明 暗															
I	25°C	明	33	培地 : Kirchner+CaCl ₂ +Bovine Serum													
				2 +				2 +		3 +		5 +					
II	25°C	明	45	培地: I				I		II		I.I		I.I			
				---		- 2 +		-		3 +		-		-		-	
III	25°C	明	79	I		II				I.I							
				3 +		4 + - - 7 +				-							
VI	25°C	明	137	I		II		I		II		I.I					
				---		---		6 +		---		---					
V				実験中													

註： 培地 I, Kirchner + 2% $CaCl_2$ 3 滴

培地 II, Kirchner + 2% $CaCl_2$ 3 滴 + ポリタミン 10%

肩数字, 試験管番号

考察並に總括

以上の実験を総括するに先人が行つた成績に幾らかの知見を加うことが出来たものと信ずるのであるが、その知見を生むに到つた動機は結核菌の発育促進物質が黴菌においても一部において何らの影響を与えずにはおかないことを裏書きするものようである。また 25°C という培養条件はたしかに黴菌の増殖には好影響をあたえたものと考えられる。とくに今回においては以上2つの理由のためか、鼠黴菌では3代、人黴菌では4代の累代培養実験成績をえている。しかしながらわれわれはこの場合無論非難なしとは考えてはいない。何となればこのような増菌所見並に累代培養所見が毎常えられないこと、および黴菌の自然凝集と増菌とを確然と区別しえないこと、また累代培養実験においては初代の菌が新しい2代培養基において確かに増殖したものであるか、或は単に初代の菌を2代に運んだにすぎないものであるものかが不明であるからである。ことに代をふるにつれて小さくなる場合はとくにその点の区別が困難である。

われわれはこのようなことからして特に累代培養における黴菌の増殖判定に次の議案は極めて参考的根據とな

ることと信じたのでここに提唱したいと考える。

実験方法：培養の沈澱を一定量の培養と共に吸い上げ、これを載物ガラス上に直径約1 cm 大に拡げて塗抹標本を作製し染色する。(出来ればこのような標本を3～5枚作製したら更に良成績をうと思う。)次にこの標本について全視野を綿密に観察し、そこに観察される癩菌の小集落の短径×長径並にその数を測定する。

2代、3代培養についても同様のことを行う。

実験成績：われわれは前述の鼠癩菌第184実験および人癩菌第76実験の累代培養についてこの実験を行つたのであるが成績は先ず鼠癩菌では第5表の如くである。

即ち初代管においては31~50 μ の小集落1個, 71~90 μ の集落1個であるが, 第2代管では151~170 μ の集落1個, 第3代管では10~30 μ のもの1個で第4代管では消失している。

人糞菌における成績は第6表の如くである。

即ち初代管では10~20 μ の集落3個, 21~30 μ 1個で第2代管では10~20 μ のもの4個, 21~30 μ 6個, 31~40 μ 5個, 71~80 μ 1個である。ところが第3代管になると21~30 μ 2個, 41~50 μ 1個, 91~100 μ のもの1個

て集落の大きさは1個大なるものを得ているが、その数は減少している。第4代管になると10~20 μ 1個、21~30 μ のもの1個で第3代管に比し量、質共に著しい減少であつた。

以上2つの実験より判断するところによれば初代に増殖したものは2代に及んで明かに増殖するが、第3代以降はこれを運搬しているに過ぎないものの如く、更に進んで増殖しているとは考えられなかつたのである。故にここに人類菌で4代まで培養出来たというには未だ確信がない。

ただわれわれはここに
このような1つの試みを
提唱することにより、そ
の累代培養実験が成功し

第5表 (鼠癩菌累代所見)

[illegible]

第6表 (人癩菌累代所見)

[illegible]

第7表

(鼠癩菌累代培養実験)

世 代	培 養 条 件			培 養 日 数	
	培 地	温 度	明・ 暗		
I	キ ル ヒ ナ ー + CaCl ₂ + マ ロ ア ミ ン	25° C	明	54	<p>56 × 21 μ</p>
II	キ ル ヒ ナ ー + CaCl ₂ + マ リ ア ミ ン	25° C	明	67	<p>154 × 77 μ</p>
III	キ ル ヒ ナ ー + CaCl ₂ + マ リ ア ミ ン	25° C	明	41	<p>22 × 15 μ</p>
IV					(-)

第8表

(人癩菌累代培養実験)

世代	培養条件			培養日数	
	培地	温度	明暗		
I	キルヒナー + CaCl ₂	25°C	明	33	21 × 14 μ
II	キルヒナー + CaCl ₂ + ポリタミン	25°C	明	45	77 × 35 μ
III	キルヒナー + CaCl ₂ + ポリタミン	25°C	明	79	42 × 22 μ 98 × 28 μ
IV	キルヒナー + CaCl ₂	25°C	明	137	21 × 12 μ (-)
V					(-)

つつあるものであるか否かを判定する重要な根拠をあたえるものであらうと考ふるものである。黴菌の培養実験の場合屢々はじめの供試菌量が問題になる。理想からいえば甚だ僅少な菌量乃至単孤菌を移植してそれが著しく増加すれば増殖したとするのが最も確実にして賢明な訳であるが、結核菌の場合においてすら、余りの少量の菌数では発育増殖に困難を来す場合があり、これらの関係は黴菌においても容易に想像される。従つて一定量の菌量を移植した方が生活力を旺盛にするとと思われる、けれども前述のように増殖判定に苦しむことが再三に止らない。しかしながらこの場合の判定にわれわれが前述した方法を用いたならば、はじめの移植菌量は余り問題にならないのではないだろうか。万一眞に良好な培地であつたならば菌量の如何にかかわらず常にはじめに移植された菌より増加せねばならないからである。

結 論

われわれは今回、鼠黴菌・人類菌についてその培養実験の一部を発表した。

1) われわれの得た成績ではアミノ酸注射製剤の添加は黴菌の増殖に好影響をあたえるもののようであつたが、毎常同一の成績は得られなかつた。

2) 累代培養実験の成績判定に当つては各代毎に塗抹標本中に観察される黴菌の集落の長径×短径並びにその数を記載することにより、その大きさおよびその数が増加

することを以て陽性とみなす方法を提唱した。このようにすれば当初の移植菌量は余り問題にならないのではないかと思う。

3) 累代培養実験において、鼠黴菌では3代、人類菌では4代にわたつて、それらの集落が観察された。しかしながら如上の判定法を用うれば兩菌とも2代まではたしかに発育増殖していると考えられるが、第3代以降はそれらの集落を機械的に運搬しているにすぎない感が深い。

(貴重な結節の提供をこころよく受諾下さつた菊池恵楓園長宮崎博士、大塚・井手兩技官並に久留米医科大学重松教授に深謝する。)

(本研究の一部は文部省科学研究費によつた)

文 献

- 1) 戸田・占部・山田：レブラ，10巻，283頁，昭14年。
- 2) 戸田・中川・山田：臨床と研究，28巻，272頁，昭21年。
- 3) 戸田：レブラ，12巻，1頁，昭16年。
- 4) 戸田・中川・三淵・大友・吉村：結核，25巻，440頁，昭25年。
- 5) 占部・中村：医学と生物学，11巻，207頁，昭22年。
- 6) 占部・中村：医学と生物学，11巻，345頁，昭22年。
- 7) 占部・中村：久留米医学会雑誌，11巻，16頁，昭23年。
- 8) 中村：久留米医学会雑誌，12巻，44頁，昭24年。
- 9) 中村(敬)：レブラ，18巻，10頁，昭24年。