Studies on Murine Leprosy Bacillus¹

II. Further Characteristics of Slow Growing Acid-Fast Organisms Isolated from Experimental Mice with the Hawaiian Strain and an Investigation of the 1% Egg Yolk Medium

TATSUJI OGAWA and KEIKO MOTOMURA

(Kitasato Institute)

In a previous communication¹⁾ some characteristics of the acid-fast organisms which had been isolated from mice infected intravenously and subcutaneously with the Hawaiian strain of *M. lepraemurium* were reported. The present paper describes some further differential characteristics of the organisms and an experimental study of the role of ingredients of the egg yolk medium.

Characteristics of the acid-fast organisms grown in vitro: a) Growth response to the media for cultivation of mycobacteria.¹⁾—Various media such as nutrient agar, glycerol agar, Kirchner's serum agar,²⁾ modified Kirchner's No. 3 agar,³⁾ blood No. 1 and No. 2 agars,⁴⁾ Dubos Tween-albumin liquid medium, and 1% Ogawa egg medium were tested for their abilities to support the macroscopic growth of the organisms which had been subcultured on the egg yolk medium. All of them but the standard medium proved incompetent for supporting the growth of 39 cultures employed (Table 1). b) The length of the bacilli. The bacillary smears prepared from the growth of cultures and stained by Ziehl-Neelsen method were subjected to a measurement of length by light microscopy (450×mag.) with a scale in the ocular. The average for the maximum and the minimum length of the bacilli in 21 cultures examined were to be 10.9 μ and 2.4 μ , respectively. Thus, the bacilli grown in vitro were found to be about twice as long as the bacilli in the tissues of mice infected intravenously with a primary culture of the organisms 6 months before (Fig. 1 and Table 2).

c) Catalase.—The test on 5 cultures revealed that the organisms were weakly positive for catalase to the same extent as *M. tuberculosis* (Table 3). And, so-called atypical mycobacteria showed higher activities than those organisms above.

The 1% egg yolk medium: This medium was used as the standard to examine the effect of removal of its ingredient(s) on in vitro growth of the organisms. Several modified egg yolk slants (Table 4) were tested for such purpose using 80 cultures of the organisms. Results in Table 5 showed that out of 13 cultures inoculated 10 cultures or 77 percent were positive by the use of the standard medium whereas only 3, i.e., 23 percent were positive by the one deprived of phosphate, 7 cultures or 54 percent positive without glutamate, but none without glycerol. An egg yolk saline medium (2:1) containing no glycerol was also found to be useless. It was concluded that the only medium superior to the 1% egg yolk medium was the one deprived of malachite-green and all

the other modified media gave results either negative or inferior to those of the standard one.

The results obtained above also suggest that the acid-fast organisms which have been isolated from infected mice with the Hawaiian strain and subcultures continuously on the 1% egg yolk medium do not belong to *M. tuberculosis*, atypical mycobacteria, *M. paratuberculosis*, nor to *M. microti*. It may be suggestive of murine leprosy bacillus.

1. Presented partly at the 43rd annual meeting of the Japan Leprosy Society, April 1970-

鼠らい菌に関する研究

(第2報) 我々の分離した菌の性状に関するその後の
成績と、1%卵黄培地の吟味

小川辰次 本村恵子
(北里研究所)

(受付 昭和45年9月30日)

1. 緒言

我々の分離した菌の性状に関しては、既に前報¹⁾においてその一部を報告したが、今回はその後得た成績、即ち抗酸菌用培地における発育、菌の長さ、カタラーゼ反応の諸性状および、我々の使用している1%卵黄培地の改良の手はじめとして、組成の吟味を行なったので、その成績を合せて報告する。

2. 方法と成績

A. 菌の性状

a. 抗酸菌用培地における発育

i. 使用した培地と、その作り方の概略。

i. 普通寒天培地、Dubos 液体培地は型の如く作り、グリセリン寒天培地は普通寒天培地にグリセリンを2%に混入した。

ii. 血清寒天培地

① Kirchner 寒天培地²⁾;

Kirchner 液体培地の基礎培地に0.1%マラカイト緑液を0.2%に、Difco の Bacto-Agar を2%に混入して滅菌し、60°C 前後に冷却して馬血清を10%に加えて、5ml 宛、中試験管に分注して斜面とした。抗酸菌の培

養においては、無処理、中和処理、1% NaOH 液処理の材料等を0.1ml 接種に用いている。

② Kirchner 変法Ⅲ培地³⁾;

Kirchner 寒天培地中の KH_2PO_4 を100ml について1.0g に増量混入したものである。抗酸菌の培養においては、4% NaOH 液処理の材料を、0.1ml 接種するのに用いている。

iii. 血液寒天培地⁴⁾

① I 培地; KH_2PO_4 ……0.1g, Na_2HPO_4 12 H_2O ……0.3g, グルタミン酸ナトリウム……0.3g, グリセリン……1.5ml, 0.1%マラカイト緑液……3.0ml, Difco の Bacto-Agar……2.0g, 可溶性澱粉……2.0g, 蒸溜水……100ml を加えて滅菌、60°C 前後に冷却して保存全血液を10%に加えて5ml 宛中試験管に分注して斜面としたもの。抗酸菌の培養では、無処理、中和処理、1% NaOH 液、処理の材料を0.1ml 接種するのに用いている。

② II 培地; I 培地の KH_2PO_4 の量を0.5g に増量して作った培地。抗酸菌の培養では、4% NaOH 液処理の材料を0.1ml 接種するのに用いている。

これらの培地の PH は表1に記した。

ロ. 接種と判定の方法

種々の継代の菌株より、白金耳で集落の小片をとっ

Table 1. Growth of Acid-Fast Organisms, Supposedly *M. lepraemurium*, in Various Media for the Cultivation of Mycobacteria

Experiment	No. of cultures inoculated	Number of cultures giving positive growth									
		1 % egg yolk med. (standard)	Nutrient agar		Serum agar		Blood agar		Liquid medium		1 % Ogawa egg med. (control)
			Plain	Glycerol 2 %	Kirchner's	Modified Kirchner No. 3	No. 1	No. 2	Dubos' Tween-albumin	Distilled water (control)	
I	10	7 (70%)	0	0	*	*	*	*	*	*	0
II	10	8 (80%)	*	*	0	0	*	*	*	*	0
III	5	7 (78%)	*	*	*	*	0	0	*	*	0
IV	10	7 (70%)	*	*	*	*	*	*	0	0	0
The pH of medium (initial)		6.0—6.2	6.9	6.9	6.5	6.2	6.4	6.0	6.0	(6.2)	6.8

Note: *) Not examined.

て、固形培地では斜面の上に、液体培地では管底に入れて接種し、ともに綿栓を無孔のゴムのキャップにかえて、37°C に3カ月以上培養した。なお、発育する標準培地として1%卵黄培地を、発育しない対照の培地として固形培地の1%小川培地と、液体培地は滅菌蒸溜水を5ml 宛分注したものを使用した。そして発育しない対照培地の集落片に比して、実験した培地の集落が大きくなった場合は陽性とし、1%卵黄培地における陽性率と比較した。培地は2本宛使用したが、1本でも発育したものは陽性とした。

ハ. 成績

表1に示した様に、実験は4回行なっている。1%卵黄培地には70%—80%の陽性率を示しているのにかかわらず、何れの回の実験においても抗酸菌用培地に発育したものは1株も見られなかった。特に1%卵黄培地のPHに近い変法Ⅲ Kirchner 寒天培地、血液寒天のⅡ培地でも集落の発見は見なかった。

b. 得られた集落中の菌の長さ

イ. 方法

1%卵黄培地に接種して37°C に約3カ月間培養した種々の継代の菌株21株を用いた。対照として、ハワイ株を皮下および静脈に接種感染し、4～9カ月経過したddN系のマウスの臓器14および1%小川培地に約1カ月培養の4株の人型結核菌を用いた。

まず集落の小片を白金耳で採り、滅菌蒸溜水を1滴ずつ滴下してあるスライドの上におき、白金耳でまぜて約10mm 前後に丸く広げ、乾燥、固定の上、型の如くZiehl-Neelsen法で染色し、5×90の拡大の顕微鏡下で、マイクロメーターにより、1枚のスライドについて200前後の菌体を測定し、その最長と最短の長さを記した。菌

の長さの単位は μ とし、小数点以下の2桁目は4捨5入して1桁とした。なお測定する菌体は、個々に分離しているものを選び、分枝しているもの、菌体の太くなっているものは避け、一定の太さで、なるべく真直のものを選んだ。

ロ. 成績

図1は菌の長さを0.6 μ 以下、0.6 μ ～19.4 μ と区別して、1枚のスライドの中の最長のものと、最短のものを図示したものである。最長の所を見ると、最も長いものは19.4 μ で最も短いものでも7.7 μ であった。最長の所は、臓器の中の菌にくらべると可なり長いし、人型結核菌の集落中の菌に比しても長い。1枚のスライドの中の最も短い所も、我々の分離した集落中の菌は、臓器の中の菌や、人型結核菌の集落中の菌に比しても多少長い。これらを平均してみると表2の様で、最長の所は、我々の分離した集落中の菌は、臓器中の菌の約2倍以上、人型結核菌の集落中の菌の約3倍以上である。最短の所も、我々の分離した集落中の菌は、臓器の中の菌や、人型結核菌に比して長い。

c. カタラーゼ反応

イ. 方法

1%卵黄培地に約3カ月間培養した種々の継代の5株の菌株を用いた。対照には1%小川培地に約1カ月培養した4株の人型結核菌と1%小川培地に約3週間培養した3株の非定型抗酸菌を用いた。方法は3.3%のH₂O₂水をスライドに1滴たらし、それに発育した集落を1白金耳とり、白金耳でまぜ合せ、発泡の有無、および発泡の程度を1分間かんさつして+……僅な発泡、++……著明な発泡に分け、更に発泡までの時間を記した。

ロ. 成績

Fig. 1 Measurement of the Length of Acid-Fast Bacilli *In Vitro* and *In Vivo*

Table 2. Lengths of the Acid-Fast Organisms *In Vitro* and *In Vivo*

Organisms	No. of cultures or tissues examined	Average length (μ)§	
		Maximum	Minimum
Acid-fast bacilli grown in vitro, supposedly <i>M. lepraemurium</i>	21	10.9	2.4
Acid-fast bacilli in the tissues of mice infected intravenously with a primary isolate of the organisms 6 months before.....	10	5.3	0.7
Clinical isolates of <i>M. tuberculosis</i>	4	3.3	<1.0

Note : §) The values were calculated from the same data as in Fig. 1.

Table 3. Catalase Test on the Acid-Fast Organisms Grown *In Vitro*

Organisms	Culture or strain used	Time taken for the start of bubbling(second)	Amount of bubbling*
Acid-fast bacilli, supposedly murine leprosy bacilli, isolated from the experimental animals	1 st subculture.....	35	+
	1 st subculture.....	50	+
	2 nd subculture.....	40	+
	4 th subculture.....	45	+
	4 th subculture.....	30	+
<i>M. tuberculosis</i>	Laboratory strain { Kurono	40	+
	H37Rv	35	+
	Clinical isolates { Nakada	30	+
	Yokoyama	30	+
So-called atypical mycobacteria	Clinical isolates { Takahashi (Scotochromogen)	3	++
	Katagiri (Nonphotochromogen) ...	5	++
	Hayakawa (<i>M. kansasii</i>)	3	++

Note: *) Expressed according to an arbitrary scale; +, small amount, and ++, large amount.

Table 4. List of Formulas for the Modified Egg Yolk Media and Ogawa Egg Medium

Ingredients	1% egg, yolk medium	Modified egg yolk medium								1% Ogawa egg medium
		(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	
KH ₂ PO ₄ 1.0g	+	—	+	+	+	—	—	—	—	+
Sodium glutamate... 1.0g	+	+	—	+	+	—	—	—	—	+
Glycerol 6 ml	+	+	+	—	+	+	—	—	—	+
Malachite-green..... 6 ml, 2%	+	+	+	+	—	+	+	—	—	+
Distilled water100 ml	+	+	+	+	+	+	+	+	Normal saline, 100ml*	+
Egg yolk.....200 ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Whole egg, 200ml**
pH	6.0-6.2	5.6	5.9	5.9	6.1	5.9	6.0	6.2	6.2	6.8

Note: *) instead of 100ml of distilled water; **) instead of 200ml of egg yolk.

表3に示した様で、我々の分離した菌のカタラーゼ反応は何れも陽性であって、その程度は概して弱く、人型結核菌とはほぼ同等であり、非定型抗酸菌に比しては弱かった。

B. 培地の吟味

イ. 方法

我々の用いている1%卵黄培地は、KH₂PO₄……1.0g, グルタミン酸ナトリウム……1.0g, 蒸溜水……100mlの基汁 100ml に対して卵黄……200ml, グリセリン……

6.0ml, 2%マラカイト緑液……6.0ml を加えてよくまぜ、中試験管に5ml 宛分注して、凝固器でかためたものである。そこで、1%卵黄培地を標準培地として、まず表4に示した様に、個々の組成の1つずつを除去した(1)―(4)までの4種類の試作培地を作った。更にKH₂PO₄とグルタミン酸ナトリウムの2つを同時に除去した(5), KH₂PO₄, グルタミン酸ナトリウム, グリセリンの3つを同時に除去した(6), KH₂PO₄ グルタミン酸ナトリウム, グリセリン, マラカイト緑の4つを同

Table 5. Trials of Various Egg Yolk Media for the Cultivation of the Acid-Fast Organisms, Supposedly *M. lepraemurium*

Experiment	No. of cultures inoculated	No. of cultures giving positive growth on									
		1 % egg yolk medium (standard)	Modified egg yolk medium								1 % Ogawa egg med. (control)
			(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)	
I	13	10 77%	3 23%	7 54%	0	..	..	..	..	..	0
II	13	11 85%	..	..	..	13 100%	..	..	..	..	0
III	12	10 83%	..	..	..	..	0	0	..	..	0
IV	10	8 80%	..	..	..	..	0	0	..	..	0
V	19	15 79%	..	..	..	..	..	..	0	..	0
VI	13	11 85%	..	..	..	..	..	..	..	0	0

Note: The sign (..) indicates no experiment.

時に除去した(7) および卵黄3容量に対して、生食水1容量を加えて作った(8)の試作培地を作った。

これらの培地の PH は表4に示した様であって、標準培地の 6.0~6.2に比して、試作培地は 5.6~6.2であって、著明の差は無い。吟味の方法は、前述の“a 抗酸菌用培地における発育”の実験の場合とはほぼ同様で、標準培地、試作培地および1%小川培地を2本宛使用して、集落の薄片を培地斜面に接種し、1%小川培地に接種した集落に比して大きくなった場合は陽性とし、標準培地および試作培地における陽性率を比較し、培地性能の判定を行なった。

ロ. 成績

成績は表5に示した様で、合計6回の実験を行なっている。第1回目の実験では、(1)、(2)、(3)の試作培地を比較しているが、1%卵黄培地では76.9%、(1)培地では23%、(2)培地では53.5%の陽性率で、(3)培地には1株も発育しなかった。試作培地に発育した集落を1%卵黄培地に継代してみると、(1)培地では3株中の1株が、(2)培地では7株中の2株だけが継代できたに過ぎない。第2回目には、(4)培地を実験したが、この培地では、1%卵黄培地の84.6%に比して発育した株数が多く、100%であった。発育した菌株13株中の7株を継代してみると、内6株が陽性を示した。第3回目と第4回目は(5)、(6)の試作培地を、第5回目は(7)培地を、第6回目は(8)培地を実験したが、1%卵黄培地では79%~84.6%の陽性率を示したのにかかわらず、これ

らの試作培地では発育を示したものは1株も見られなかった。

3. 考 察

我々の分離した菌は前報で述べた様に、抗酸菌用の1%小川培地には発育しなかったが、今回の実験では、更に抗酸菌用の寒天培地、血清寒天培地、血液寒天培地、Dubosの液体培地等にも発育を認めなかった。これらの成績は、我々の分離した菌株は前回述べた様に人型結核菌でも、非定型抗酸菌でも無いであろうとする根拠を更に裏づけたものと思われるし、また Vole 菌や Johne 菌にもあてはまらない。カタラーゼ反応が人型結核菌同様に弱かった事は、非定型抗酸菌ではなさそうに思われることを更に示唆するものと思われる。次に鼠らい菌の長さは、Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity⁵⁾では3—5μ小沢⁶⁾らは、最頻菌長は1.3μと記している。これらの成績は組織の中のものであろうと推定されるので、我々の組織中の菌の長さと比較すると、Topley and Wilsonの本の成績と似ているが、小沢らの成績とは比較しにくい。我々の分離した集落中の菌は、組織の中の鼠らい菌にくらべると、平均2倍以上も長いし、人型結核菌に比しても3倍以上長い。幅は測っていないが、人型結核菌とはほぼ同様に繊細である。このような培地中の菌の伸長は、植田⁷⁾の成績に似ている様にも思われる。また中村⁸⁾の述べている、培地の PH が 6.0で、低酸素状態であるとする条件を、我々の培地

および培養の条件がほぼみたしている様にも思われる。しかし PH が 1% 卵黄培地にはほぼ近い培地即ち、1% 卵黄培地よりグリセリンを除去した培地や Kirchner 変法 III 培地、血液寒天 II 培地に集落の形成を認めなかったことは、菌伸長と集落形成とは必ずしも一致しないこと、集落形成には、更に細い配慮が必要であることを示しているものの様に思われる。次に Wallace S. Brooke⁹⁾は Vole 菌においては培養した菌よりは組織の菌が長いと述べているが、我々の分離した菌は Vole 菌とは反対に培養した菌の方が長い。この点も Vole 菌にあてはまらない。また Johne 菌の長さは Bergey's¹⁰⁾ Manual of Determinative Bacteriology および Topley and Wilson の本では $1 \sim 2 \mu$ と記しているが、我々の分離した菌は、Johne 菌に比して長い。この点も Johne 菌にはあてはまらない。さて 1% 卵黄培地は、前報で述べた様に、人型結核菌用の種々の固形培地を単らい菌の培養実験に用いている中に、この培地がたまたま適当していることを認めただけであって、その組成の内容の全部が果して必要かどうかはわかっていない。それで 1% 卵黄培地を標準として、組成の内容を除去した種々の培地や、Wallace S. Brooke が Vole 菌の実験に用いていた卵黄生食水培地を作って実験した。しかし我々の分離した菌株は前報で述べた様に人型結核菌や非定型抗酸菌でやっている様な、菌浮游液を用いての定量培養的な方法では発育しないので、菌浮游液にくらべれば比較的大量の集落の小片を培養し、集落の発育の有無によって判定した。これは前に述べた抗酸菌用培地における発育実験においても同様である。このような方法では、陰性の判定は、大量の菌を接種しても陰性ということであるから、従来の考え方からすると厳格であるといえるし、陽性の判定は、大量の菌を接種して初めて陽性ということであるから、従来の考え方からすると甘いといえる。

我々の培養実験は、常にこの様な事を念頭において判定する必要がある。そこで我々の成績から判定すると、 KH_2PO_4 、グルタミン酸ナトリウム、グリセリン等は、我々の培地には何れも必要であり、陽性率の点から重要な度は、第 1 がグリセリン、第 2 が KH_2PO_4 、第 3 がグルタミン酸ナトリウムの順であることが推定される。なおマラカイト緑は、菌の発育を多少抑える様であるが、雑菌を抑えることと、集落の発育を見易くする為に必要である。我々の成績は、人癩菌によって実験した志賀ら¹¹⁾、人型結核菌によって実験した小川¹²⁾の成績とほぼ一致する。このことは、我々の分離した菌株は、人

らい菌や、人型結核菌と性状の一部が似ていることを示している。なお以上の成績の中、グリセリン除去の 1% 卵黄培地には発育しなかったこと、また初めからグリセリンの混入されていない生食水卵黄培地では菌が発育しなかったことは、Vole 菌に関する A. Q. Wells¹³⁾の成績、Bergy や Topley and Wilson の本の記載と全く反するし、Wallace S. Brooke の成績とも全く反する。したがって我々の分離し得た菌株は、この点からも Vole 菌にはあてはまらない。

4. 総 括

1) 我々の分離した菌の性状については、次の様な成績を得た。

①抗酸菌用培地の発育試験：普通寒天培地、グリセリン寒天培地、Kirchner 寒天培地、変法 III Kirchner 寒天培地、血液寒天 I 培地、血液寒天 II 培地、および Dubos 培地を用い、のべ 39 株の菌株により実験した結果、何れの培地にも発育しなかった。

②菌の長さ：継代培養菌 21 株について測定した。最長の平均は 10.9μ 、最短の平均は 2.4μ であった。この長さは、ハワイ株を感染したマウスの臓器中の菌に比して 2 倍以上である。

③カタラーゼ反応：5 株について実験した。何れも陽性であったが、その強さは人型結核菌とはほぼ同等で、非定型抗酸菌に比して弱かった。

2) 1% 卵黄培地の吟味：

1% 卵黄培地より、種々の組成を除去した培地を作った、のべ 80 の継代培養菌株を用いて実験した結果、1% 卵黄培地よりも陽性率の良かったのはマラカイト緑除去の培地だけであって、その他の培地においては 1% 卵黄培地に比して悪く、1% 卵黄培地の陽性率が 76.9% に比して、 KH_2PO_4 除去の培地は 23%、グルタミン酸ナトリウム除去の培地は 53.8%、グリセリン除去の培地は 0% であった。また 2 つあるいは 3 つの組成を除去した培地においてもグリセリンの除去された培地は 0% であった。なお生食水卵黄培地も 0% であった。

(本論文の一部は、昭和 45 年 4 月の第 43 回日本癩学会総会で発表した。)

終始、御指導と御鞭撻を頂きました内田三千太郎博士、研究に種々御援助頂いた付属病院研究検査室の諸氏に感謝する。

文 献

1) 小川辰次、本村恵子：鼠らい菌に関する研究、

- 第1報, 鼠らい菌培養の試み, レブラ, 38, 247, (1969).
- 2) 小川辰次, 島田英彦他: 結核菌用寒天培地に関する研究, 第1報 Kirchner 寒天培地について, 細菌学雑誌, 14, 94, (1959).
- 3) 小川辰次, 島田英彦他: 結核菌用寒天培地に関する研究, 第2報 4%水酸化ナトリウムで処理した材料を培養する変法 Kirchner 寒天培地について, 細菌学雑誌, 14, 171, (1959).
- 4) 小川辰次, 大谷典子: 結核菌用寒天培地の研究, 第6報保存全血液を用いた寒天培地の改良—その2, 結核, 37, 611, (1962).
- 5) Wilson, G. S. and Miles, A. A.: Topley and Wilson's Principles of Bacteriology and Immunity vol. II, fourth Edition, London Edward Arnold L. T. D. (1955).
- 6) 小沢利治, 中村一成他: 癩菌の検査に関する研究, 第1報癩菌の長さについて: 第16回日本細菌学会関東支部例会演説抄録, 1, (1964).
- 7) 植田三郎: 癩菌, 鼠癩菌に関する研究, (4) 斜面培養基に培養された鼠癩菌の特異な顕微鏡的な発育: レブラ, 33, 273, (1964).
- 8) 中村昌弘: 鼠癩菌の Elongation に関する研究 (続報): レブラ, 38, 108, (1969).
- 9) Brooke, W. S.: The Vole Acid-fast Bacillus, Experimental Studies on the New Type of Myco tbc., Am. Rev. Tbc., 43, 806, (1941).
- 10) Breed, R. S., Murray, E. G. D. and Smith, N. R.: Seventh Edition The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1957).
- 11) 志賀潔, 松岡憲国他: 癩菌培養の研究, 第2報, 朝鮮医学会雑誌, 20, 1033, (1930).
- 12) 小川辰次: 結核菌分離培養基としての2, 3の鶏卵培養基の検討, 東京医事新誌, 2933, 1915, (1935).
- 13) Wells, A. Q.: Tuberculosis in Wild Voles, Lancet, 1221, (1937).