STUDIDS ON MURINE LEPROSY BACILLUS
III. Effect of Treatment in the Isolation Culture on the Invasion
of Saprophyte and Growth of the Supposed Hawaiian Strain of
Mycobacterium lepraemurium

TATSUJI OGAWA and KEIKO MOTOMURA
(*The Kitasato Institute*)

We have been, for the purpose of isolation culture of murine leprosy bacilli obtained from mice infected by *Mycobacterium lepraemurium*, trying to make the isolation culture more firmer one by conductig various preliminary treatment, as stated in Report No. 1, and further after that by trying various kinds of preliminary treatments. We compared the contamination rate and positive rate of the supposed Hawaiian strain and observed the effect of preliminary treatments of only those cases on which two different kinds of preliminary treatments were conducted at the same time on the same material.

As the materials for inoculation, using organs, superficial lymph nodes and subcutaneous leprous nodules obtained aseptically from the mice in dd-N strain which were infected by the supposed Hawaiian strain we isolated, subcutaneously or intravenously and autopsied in various stages, (1) Nontreated : materials were ground in a mortar and were inoculated by smearing, (2) Treatment with 1% NaOH solution : small portion of 1% NaOH solution was added to the material prepared by (1) and was homogenized and was inoculated by smearing, (3) Treatment with 1% H₂SO₄ solution was used. Other process followed (2). (4) Treatment with 1% NaOH solution and 10 times diluted : materials were weighed beforehand and were ground and 10 times diluted 1% NaOH solution was added and homogenized and 0.1 ml each of the homogenate was inoculated. (5) Neutralizing treatment : after neutralizing the homogenate prepared in (4) by addition of 2% HCl solution, 0.1 ml each of them was inoculated.

Two kinds of methods of the preliminary treatments above mentioned and inoculation were conducted for each same material at the same time. The materials were inoculated onto 1 % egg yolk media on which the supposed Hawaiian strain grows, and onto 1% Ogawa's whole egg media and on which the bacilli does not grow, then were incubated for more than 3 months at 37 C. By this method, contamination rate of saprophyte and positive rate of the supposed Hawaiian strain was compared. The result was as follows.

1) Contamination rate : (Table 1 and Table 2).

In 1% egg yolk media, by (1), it was about a half or more than a half of the number of media used, and by (2), it decreased to about one-sixth of that of the (1) There was no big difference between (2) and (3), and in (4) and (5), invasion of no saprophyte was found. Also in 1% Ogawa's whole egg media, comparing with 1% egg yolk media,

generally the contamination was smaller.

2) Positive rate of the supposed Hawaiian strain : (Table 3 and Table 4).

Excluding the facts that it was assumed that some times, due to the invasion of small amount of saprophyte, the supposed Hawaiian strain did not grow, and that the positive rate of (3) was lower than that of (2), no big difference was found in the positive rate of those preliminary treatment. Also, when observed the process of growth of colonies, it was assumed that these solutions used for preliminary treatments had slightly disturbing effect for growth.

鼠らい菌に関する研究

(第3報) 初代培養における前処理の雑菌侵入および
ハワイ株様抗酸菌の発育に及ぼす影響

小川 辰次 本村 恵子

(北里研究所)

(受付1971年4月19日)

1. 結 言

われわれは種々の材料よりの人型結核菌や広い意味の非定型抗酸菌の分離培養の経験から、鼠らい菌感染マウスよりの鼠らい様抗酸菌の分離培養のために、第1報¹⁾で述べたような種々の前処置を行い、さらにその後も種々の前処理を試みて、分離培養を確実なものにしようと努めてきた。それで今回は、昭和43年1月より昭和45年5月までの間に実施してきた分離培養の実験の中で、同一材料について2種類の前処理を同時に行ったもののみを集めて、雑菌の侵入率、鼠らい様抗酸菌の陽性率を比し、前処理の影響を観察したので、ここに発表する次第である。

2. 方 法

i 接種材料：ハワイ株接種マウスの皮下らい結節、あるいは分離した初代培養、種々の継代のハワイ株様抗酸菌を皮下あるいは静脈に接種した種々の経過の ddN 系マウスと屠殺剖検し、無菌的に採取した脾、肝、肺、腎、リンパ節および皮下らい結節である。

ii 前処理の方法：つぎの5種類の前処理を行った。

①無処理……採取した材料の一部あるいは全部(約0.5g~1.0g)を滅菌した乳鉢で約1分間ずつつぶし、均等な濃い粥状にする。

②1% NaOH 液処理……①の方法で処理した材料に、1% NaOH 液を0.5ml~1.0ml 程度いれて、さらに1分間すりつぶし、均等な濃い粥状にする。

③1% H₂SO₄ 液処理……1% H₂SO₄ 液で②と同様に処理する。

④1% NaOH 液10倍稀釈処理……予め材料の量をはかって(約0.5g)①のように乳鉢ですりつぶし、それに材料の10倍量の1% NaOH 液を加えて、さらにすり、うすい均等液とする。

⑤中和処理……④で処理して得た均等液を0.5ml、滅菌中試験管にとり、これに2% HCl 液を0.5ml 加えて、中和する。

iii 接種の方法：材料はいずれの方法においても処理直後に接種した。①、②、③では直径5mmの渦巻白金耳で、培地斜面に1白金耳宛塗抹接種し、直ちに綿糸を、滅菌した無孔のゴムキャップにかえた。④、⑤ではメスピペットで0.1ml 宛を培地斜面に流しこみ、培地を手でゆり動かして、接種材料を斜面に広げ、斜面を上

にして斜面台に水平にねかし、37°C に24時間保存し、液のほぼ乾いた時に綿栓を無孔のゴムキャップにかえた。培地は、同一方法について1%卵黄培地と、対照として1%小川培地を平行して2～4本宛使用したが、その時々により同一培地の使用培地数は異なり、また両培地の使用本数も必ずしも同数ではなく、概して1%卵黄培地が多かった。

iv 培養の方法と判定：37°C に3カ月以上培養し、週1回宛観察した。そして1%小川培地に発育せず、1%卵黄培地のみに、肉眼的に、淡黄色の多少湿潤性の集落を認め、それを Ziehl-Neelsen 法で染色して顕微鏡で見て、抗酸菌が網の目のようにならんでいる時に、ハワイ株様抗酸菌陽性とした。つぎに雑菌は1本の培地に少しでも侵入したものは全部雑菌として記載した。広い意味の非定型抗酸菌や *Nocardia* の混入したものは雑菌から除外した。

3. 成績

i 雑菌の侵入率

イ. 無処理塗抹接種と1% NaOH 液塗抹接種における培地別、接種材料別にみた雑菌侵入率。

表1に示すように、実験材料数は141コであって、無処理における雑菌侵入率は、1%卵黄培地では57.5%、1%小川培地では43.2%であったが、1% NaOH 液処理では、1%卵黄培地で9.1%、1%小川培地で6.7%とそれぞれ約1/6、約1/7に減少している。なお1%卵黄培地においては、無処理でも、1% NaOH 液処理でも、1%小川培地に比して雑菌侵入率が多い。また材料別に見ると、1%卵黄培地では、無処理では肺が最も多く、腎が最も少い。1% NaOH 液処理においては、接種局所の皮下らい結節が最も多く、腎が最も少い。なお培地斜面の全部が雑菌に汚染されて、判定のできなかったものは、無処理では、1%卵黄培地で約15%、1%小川培地で約10%であり、1% NaOH 液処理では、それぞれ約5%であった。

ロ. 種々の前処理における1%卵黄培地の雑菌侵入率。

イ. と同様にして各種の前処理における1%卵黄培地のみの雑菌侵入率を比較した。

表2でみるように、実験(2)では無処理、塗抹接種と1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種、実験(3)では1% NaOH 液処理、塗抹接種と1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種、実験(4)では、1% Na

OH 液処理、塗抹接種と、1% H_2SO_4 液処理、塗抹接種、実験(5)では、1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種と中和処理、0.1ml 接種を同一材料について同時に行った。なお、実験(1)は前述のイの成績の中の1%卵黄培地の成績のみを綜括したもので、種々の前処理における雑菌侵入率の比較のために、再び挿入した。

成績は表2に示すように、実験例数は延243例である。実験(1)では、前述のように、1% NaOH 液、塗抹接種が、無処理、塗抹接種に比して約1/6に減少している。実験(2)では無処理、塗抹接種の46.1%に比して、1% NaOH 液10倍希釈処理0.1ml 接種では0%であった。また実験(3)では、1% NaOH 液処理、塗抹接種の13.3%に比して、1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種では0%を示した。即ち実験(2)(3)では両処理の間に大差が見られた。実験(4)では1% NaOH 液処理、塗抹接種の14.3%に比して、1% H_2SO_4 液処理、塗抹接種は15.7%であった大差はない。実験(5)の1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種と、中和処理、0.1ml 接種では、ともに0%であって差がない。

なお、これらの雑菌侵入培地の中で、培地斜面の全体が汚染されてしまったものは、無処理で約15%、16%であり、1% NaOH 液処理、塗抹接種で約4%、5%および4%であり、1% H_2SO_4 液処理、塗抹接種では約4.5%であった。

ii 種々の前処理におけるハワイ株様抗酸菌の陽性率

前述のような方法で、同一材料について、2つの前処理を同時に行って培養した時に、ハワイ株様抗酸菌の陽性であった株数を全部集めて、これを100%とし、この場合の個々の前処理によって陽性となった株数の%を計算して、両者の前処理における陽性率を比較したのが表3である。

表3に示すように、実験(1)では、無処理、塗抹接種における陽性率は1% NaOH 液処理、塗抹接種に比して約1/3である。実験(2)の無処理、塗抹接種と、1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種では殆んど差がなく、実験(3)の1% NaOH 液処理、塗抹接種と1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種でも全く差が無い。また実験(4)では、1% H_2SO_4 液処理、塗抹接種が、1% NaOH 液処理、塗抹接種に比して約1/3の陽性率であった。実験(5)の1% NaOH 液10倍希釈処理、0.1ml 接種と、中和処理、0.1ml 接種では、合計の例数が少ないが、殆んど差が無いものと推定される。

Table 1 Contamination rate in the specimens of the non-treated and the treated with 1% NaOH solution

	Number of specimens experimented	Non-treated (by smearing inoculated)				Treated with 1% NaOH solution (by smearing inoculated)			
		1% Egg yolk medium		1% Ogawa's whole egg medium		1% Egg yolk medium		1% Ogawa's whole egg medium	
		Number of media used	Number of media contaminated ((Contamination rate))	Number of media used	Number of media contaminated ((Contamination rate))	Number of media used	Number of media contaminated ((Contamination rate))	Number of media used	Number of media contaminated ((Contamination rate))
Spleen	36	79	49 (62.0)	76	38 (50.0)	89	15 (16.7)	77	5 (6.5)
Liver	37	75	48 (64.0)	75	24 (32.0)	85	3 (8.5)	74	4 (5.5)
Lung	8	23	23(100.0)	23	23(100.0)	23	3 (13.0)	23	3 (13.0)
Kidney	35	73	27 (37.0)	72	18 (25.0)	81	1 (1.2)	73	2 (2.7)
Superficial lymph nodes	17	34	16 (47.1)	34	16 (47.1)	41	4 (9.8)	35	5 (14.3)
Subcutaneous leprous nodule	8	17	10 (58.8)	16	9 (56.3)	20	5 (25.0)	16	1 (6.3)
Total	141	301	173 (67.7)	296	128 (43.2)	339	31 (9.1)	298	20 (6.7)

Table 2 Contamination rate into 1% egg yolk medium in various treatment methods

Experiment number	Number of specimens experimented	Non-treated (by smearing inoculated)		Treated with 1% NaOH solution		Treated with 1% H ₂ SO ₄ solution		Treated with 1% NaOH solution and 10 times diluted		Treated with neutralization	
		Number of media used	Number of contaminated media ((Contamination rate))	Number of media used	Number of contaminated media ((Contamination rate))	Number of media used	Number of contaminated media ((Contamination rate))	Number of media used	Number of contaminated media ((Contamination rate))	Number of media used	Number of contaminated media ((Contamination rate))
(1)	141	301	173 (57.5)	339	31 (9.1)						
(2)	52	154	71 (46.1)					154	0 (0)		
(3)	15			30	4 (13.1)			30	0 (0)		
(4)	24			70	10 (14.3)	70	11 (15.7)				
(5)	11							22	0 (0)	22	0 (0)

Table 3 Positive rate of the supposed Hawaiian strain in various treatment

Experiment number	Total number of positive case in any of the treatment method	Number of positive case in each method(Positive rate)				
		Non-treated (by smearing inoculated)	Treated with 1% NaOH solution (by smearing inoculated)	Treated with 1% H ₂ SO ₄ solution (by smearing inoculated)	Treated with 1% NaOH solution (by smearing inoculated)	Treated with neutralization
(1)	21	7 (33.3)	21 (100.0)			
(2)	10	7 (70.0)			8 (80.0)	
(3)	9		9 (100.0)		9 (100.0)	
(4)	8		8 (100.0)	3 (37.5)		
(5)	4				4 (100.0)	3 (75.0)

Table 4 Three cases of growing process of the supposed Hawaiian strain in various treatment methods

	Inoculated specimens		Growing process of colony of the supposed Hawaiian strain					
			2 weeks	4 weeks	6 weeks	8 weeks	10 weeks	12 weeks
The 1st case	Spleen of mice which passed 8 months after intravenous infection	Non-treated (by smearing inoculated)	-(×)	-(×)	-(×)	-(×)	-(×)	-(×)
			-	-	±	+	++	+++
		Treated with 1% NaOH solution (by smearing inoculated)	-	-	-	±	+	++
			-	-	-	±	+	+
The 2nd case	Liver of mice which passed 5.5 months after intravenous infection	Non-treated (by smearing Inoculated)	-	±	+	++	++	+++
			-	±	+	++	++	+++
		Treated with 1% NaOH solution and 10 times diluted (0.1 ml inoculated)	-	±	±	±	+	++
			-	±	±	±	+	++
The 3rd case	Spleen of mice which passed 9 months after intravenous infection	Treated with 1% NaOH solution (by smearing inoculated)	-	-	±	±	+	++
			-	-	±	±	+	++
		Treated with 1% H ₂ SO ₄ solution (by smearing inoculated)	-	-	-	±	±	+
			-	-	-	±	±	+

Remark: - negative, ± suspected positive, + positive,

++ } As the number of + increases, it indicates many rising of colonies

+++ }
(×) indicates the contamination

つぎに種々の前処理におけるハワイ株様抗酸菌の3例の発育過程を表4に示した。

第1例は無処理、塗抹接種と1% NaOH 液処理、塗抹接種を同時に行ったものであるが、この例では、無処理においても、多少の雑菌の侵入は、ハワイ株様抗酸菌

の発育に影響することがあることを推定させる。第2例は無処理、塗抹接種と、1% NaOH 液10倍稀釈処理、0.1ml 接種を同時に行ったものであるが、この例では、1% NaOH 液10倍稀釈処理は、発育に影響のあることを推定させる。

第3例は、1% NaOH 液処理、塗抹接種と、1% H₂SO₄ 液処理、塗抹接種を同時に行ったものであるが、この例は、1% NaOH 液処理に比して1% H₂SO₄ 液処理が発育に強い影響のあることを推定させる。

3. 考 察

わが国の諸先進は、鼠らい菌を培養する目的で、前処理液を使用しないで、そのまま²⁾³⁾⁴⁾あるいは1% HCl 液⁵⁾、1% H₂SO₄液⁶⁾、5% H₂SO₄ 液⁷⁾⁸⁾⁹⁾¹⁰⁾、10%アンチフォルミン液¹¹⁾¹²⁾等で前処理してそのまま、あるいは洗って接種していた。

しかし分離培養の不可能であった当時においては、前処理の方法論的な記載がなく、実際には暗中模索的に実施されていたのが本当であろう。外国の諸先進においても、ほぼ同様であったことと推定される。

われわれも、これら諸先進にならって、最初のころは、鼠らい菌の発育をなるべく障害しないために、専ら、無処理で塗抹接種した。その結果は、鼠らい様抗酸菌の発育は見たが、培地の汚染が多かった。まとめて見ると前述のように、その半分以上に雑菌の侵入を見たし、ことに肺では、その全部に雑菌の侵入が見られた。

そして、少量の雑菌の侵入した培地でも、鼠らい様抗酸菌の発育の見られなかったことが度々であった。それで鼠らい菌の発育をなるべく障害しないで、しかも雑菌の侵入をなるべくおさえようと種々の前処理を行ってきた。われわれのすべての分離培養の実験において、前処理の直後に接種しているのは、鼠らい様抗酸菌の発育を、なるべく障害しないため、これは結核菌や非定抗酸菌の分離培養¹³⁾になったものである。また1% NaOH液¹³⁾を前処理に用いたのも、マウス、モルモットの感染動物の臓器よりの結核菌、非定型抗酸菌の分離培養に好成績を得たからであり、渦巻白全耳で塗抹接種したのは、1本の培地に沢山の材料を接種して、成績を確実にしようと思ったからである。1% NaOH 液処理、塗抹接種の方法では、雑菌の発菌がかなりおさえられ、陽性率が、一見、無処理に比してすぐれている成績のみられたこともあったが、再度の実験では、無処理と大差ないことが推定されたし、このような前処理によっても、鼠らい様抗酸菌の発育は、ある程度おさえられることがわかった。1% H₂SO₄ 液を前処理に用いたのは、着色性の広い意味の非定型¹⁴⁾抗酸菌においては、1% NaOH 液よりは、1% H₂SO₄ 液の前処理による障害の程度が少いことを見ているため、もしや鼠らい菌

に、このような性状がありはしないだろうかと考えたからである。

その結果は、雑菌をおさえることは1% NaOH 液と大差なかったが、鼠らい菌の発育をおさえる程度は、われわれの期待とは反対に、1% NaOH 液に比して強いことがわかった。

しかしこの実験では、用いた1%卵黄培地のpHが6.0の様に酸性であるので、pHを考慮すべきであったかもしれない。今後さらに検討してみたい。つぎに接種材料の10倍量の1% NaOH液¹³⁾で前処理して0.1ml宛接種したのは、動物臓器よりの結核菌、非定型抗酸菌の定量培養法をそのまま踏襲したものであり、また中和処理は¹⁵⁾、結核菌の実験では、1% NaOH 液処理と、発育の上では大差のないことを見ているのであるが、鼠らい菌では、もしや中和した方がよいのではないかと考えたからである。しかしこれらの前処理は、雑菌の侵入は殆んどおさえたとはいえ、鼠らい様抗酸菌の発育には、特にすぐれた成績は示されなかった。

以上の成績を総括してみると、今回の実験においては、細い優劣の差を引き出すことができなかったし、また特にすぐれた前処理の方法も見出せなかった。このことは、沢山の菌を1度に接種しなければ発育しない現状においては、やむを得ないことであったかもしれない。しかしいずれの前処理においても、鼠らい様抗酸菌の発育に対しては、ある程度の障害のあること、またその障害の程度は軽度であることが推定された。われわれは是等の実験を踏台として、さらに種々の方法を試み、分離培養を、より確実なものにしたいと思っている。

4. 綜 括

ハワイ株感染マウスの皮下結節、あるいはわれわれの分離したハワイ株様抗酸菌より菌浮遊液を作り、静脈、皮下に感染したマウスを種々の時期に屠殺剖検し、無菌的に採取した臓器、リンパ節、皮下らい結節を接種材料として、①無処理、②1% NaOH 液処理、③1% H₂SO₄ 液処理、④1% NaOH 液10倍稀釈処理、⑤中和処理を行い、①、②、③は塗抹接種、④、⑤は0.1ml宛の接種を1%卵黄培地と1%小川培地に行ない、37°C 3カ月以上培養した。そして之等の前処理を同一材料について2種類宛実施したものについて、雑菌の侵入率およびハワイ株様抗酸菌の陽性率を比較し、次のような成績を得た。

1) 雑菌侵入率：1%卵黄培地においては、①では約

半数,あるいは半数以上であったが,②では約1/6に減少した。②と③とでは大差がなかった。そして,④と⑤とでは,雑菌の侵入を認めなかった。なお1%小川培地においては,1%卵黄培地に比して概して少なかった。

2) ハワイ株様抗酸菌の陽性率:①においては雑菌の少量の混入のために,発育しないことのある事実が推定されたこと,②は③に比して陽性率が低いことなどを除けば,これらの前処理の間には,陽性率において大差を認めなかった。なお,集落の発育の経過をみると,これらの前処理は,集落の発育に軽度の障害のあることが推定された。

(この論文は,昭和45年9月の第19回日本癩学会東部地方会において発表したものである。終始御指導と御鞭撻を頂いた故内田三千太郎博士,研究の上に種々御援助を頂いた平木みな子氏,付属病院検査室の諸氏に感謝する)。

参考文献

- 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,レプラ, **38**: 246-254 (1999).
- 2) 和田智来,安藤武夫:鼠癩培養の小実験,レプラ, **13**: 285-288 (1942).
- 3) 樋口謙太郎,和田智来:椰子油の鼠癩に対する効果並に鼠癩菌培養に関する実験追補,レプラ, **14**: 361-367 (1943).
- 4) 占部 薫:鼠癩ことにその細菌学的方面,レプラ, **18**: 39-54 (1949).
- 5) 浅海修蔵:東北地方における鼠癩,その病原菌の培養及び動物試験の成績について,レプラ, **3**: 243-265 (1932).
- 6) 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,レプラ, **33**: 273-274 (1964).
- 7) 戸田忠雄,占部薫・他:癩菌培養に関する研究,レプラ, **10**: 283-313 (1939).
- 8) 植田三郎:鼠癩に関する研究,㊦家鼠における結核の自然感染,東京医事新誌,昭和14年上: 1621-1628 (1939).
- 9) 中村敬三,遠藤正義:癩菌の人工培養に関する研究,日新医学, **36**: 194-207 (1949).
- 10) 戸田忠雄,三洲一二:癩菌の培養に関する研究,第1報,レシチン加培地における鼠癩菌の発育について,レプラ, **23**: 52-56 (1954).
- 11) 内田三千太郎:癩鼠より分離せる抗酸性菌について,細菌学誌, **328**: 1-20 (1923).
- 12) 西村真二:所謂癩鼠より分離せし一種の抗酸性菌について,レプラ, **8**: 201 (1937).
- 13) 小川辰次:結核菌の定量培養法について,その2,動物臓器よりの培養法,結核, **24**: 19-23 (1949).
- 14) 小川辰次:未発表.
- 15) Tatsuji Ogawa, Naozō Saitō et al.: The Comparative Studies between NaOH Method and Neutralization Method for Isolation of Tubercle Bacilli, Kitasato Arch. of Exp. Med., **38**: 9-24 (1960).