**Effect of Procedures for Making Bacillary Suspensions on
Elongation of *M. lepraemurium* in vitro**

MASAHIRO NAKAMURA

(Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine, Kurume)

Factors, involved in the procedures for making bacillary suspensions, affecting the elongation of *M. lepraemurium* in vitro, were studied and the following results were obtained.

1. The most significant elongations of the bacilli were observed when the bacillary suspensions were made by a mild procedure in which a leproma was cut with scissors and suspended in 0.1% bovine albumin V (Armour)-saline by pipetting, or was gently ground and homogenized in a mortar for one or five minutes.

2. Slight elongation took place in the cases of experiment in which partially purified bacilli or bacilli obtained from the homogenate of fifteen minutes' ground in a mortar were used.

3. There was a remarkable difference between two kinds of medium used for observing elongation phenomena; in the original Kirchner medium, elongation occurred at pH 6 and in the enriched Kirchner medium pH 7.

The data mentioned above, should contribute toward the experiment for cultivation and animal experiment of *M. lepraemurium*.

鼠癩菌液作製操作の *in vitro* elongation に及ぼす影響

中 村 昌 弘

(久留米大学医学部微生物学教室細菌学講座)

(受付 1972年1月25日)

鼠癩菌の *in vitro* elongation について一連の研究^{1)~5)}を続行中であるが、時々当然 elongation が起る筈の条件でも、elongation が認められないことがある。

この原因について第一に想像されることは用いた菌液によると思われること、次には培地に用いた血清によるものではなかろうかということである。

鼠癩菌の *in vitro* elongation は微妙なる現象ではないので、一定の条件を具備すれば100%に例外なく elongation が起ることが観察されている。しかし、菌液の作製条件か、鼠癩腫を採取する場合の日時によるのか、時に elongation の程度が極めて軽度のことがある。この原因を菌液作製溶液、塗抹すべきスライド、塗抹後の

乾燥度及び菌液を乾かしてから培地へ投入するまでの時間などについて検討しているが、今回は鼠癩腫を採取して菌液にする場合の条件について検討した。

実験材料と方法

供試鼠癩腫：鼠癩菌ハワイ株 (M-53) を用いた。これは採取4カ月前、C₃H/dd マウスの皮下に接種されたもので、採取時には小指頭大の鼠癩腫であった。

菌液作製法：elongation 実験に用いるための菌液の作製法は次の5方法によった。まず鼠癩腫を無菌的にとり出し、滅菌シャーレに移し、これを5等分した。

1) 非磨砕菌液：とり出した鼠癩腫の一部を別の滅菌

Fig. 1 Elongation curves of *M. lepraemurium* in Enriched Kirchner medium pH 6.0
 ○ Bacilli obtained from non-ground leproma
 ● Ground for one minute
 △ Ground for five minutes
 ▲ Ground for fifteen minutes
 □ Purified bacilli

Fig. 2 Elongation curves of *M. lepraemurium* in Enriched Kirchner medium pH 7.0

Fig. 3 Distribution of length *M. lepraemurium*

シャーレに移し、滅菌ハサミで出来るだけ小さく細切、これに0.1%牛血清アルブミンV (Armour)-生塩水を注ぎ、更に滅菌ピペットでよく pipetting して菌液としたもので乳鉢で磨砕する操作を行なわなかったもの。実験に供する菌液は約30分静置して粗大組織片が自然に沈下するのを待って、その上清を別の滅菌試験管にとったものを用いた。

2) 1分間磨砕菌液：鼠癩腫の一部を滅菌乳鉢に移し、乳鉢で正確に1分間軽く磨砕したのち、これに0.1%牛血清アルブミンV-生塩水を注いで、あとは pipetting によって菌液としたもの。

3) 5分間磨砕菌液：鼠癩腫を滅菌乳鉢で5分間磨砕

したもので、以下の操作は1分間磨砕菌液と同じくした。

4) 15分間磨砕菌液：鼠癩腫を滅菌乳鉢で15分間磨砕したもの。

5) 精製菌液：鼠癩腫からの鼠癩菌の集菌精製は森らの方法に準じて次の方法で簡便に行なった。即ち、鼠癩腫を5分間滅菌乳鉢で磨砕し10 mlの滅菌生塩水を注ぎ、菌浮游液とした。これに2%トリプシン(1:250 Difco) 2 mlを加え、37°C 30分間消化後3,000 rpm 1時間30分遠心、沈渣を生塩水4 mlに再浮遊、これに1% NaOH 4 mlを加え2~3回 pipetting し、3,500 rpm 30分間遠心、沈渣を4 mlの0.1%牛血清アルブミンV-生塩水に再浮遊したものを精製鼠癩菌液とした。

Fig. 4 Distribution of length of *M. lepraemurium*

菌塗抹スライド：以上のように作製した菌液をそれぞれ滅菌した Bioden meshcement タンザクスライド (BM スライド)⁵⁾の一端にマントー針をつけた注射器で一滴宛滴下，菌塗抹スライドとした。菌液を BM スライドに滴下して約30分放置，乾かない菌液を注射器で吸い取って，菌液が乾いたところで次の培地に塗抹端を下して投入，37°C で培養，10日および20日にスライドを取り出し，10%ホルマリン水で固定後，水洗，Ziehl-戸田染色を施してこれを白黒の写真にとり，更に1 μm が1 mm になるように引伸しておのおの菌長を実測した。対照としては出発材料の菌液塗抹 BM スライドを乾燥後直ちにホルマリン水に固定したものの平均菌長をそれに当

てた。

培地：Kirchner 原法処方に0.25%ブドウ糖，0.25% 焦性ブドウ酸ソーダ，7.5%蔗糖を加えて pH 6 及び pH 7 に補正し滅菌したものに無菌的に10%になるように牛血清を加えた。Enriched Kirchner (EK) 培地を用い，試験管当りの培養量は8.8 ml とした。用いた試験管は長さ10.5 cm，径1.3 cm で培養液8.8 ml を入れると液層の高さは7.0 cm になる。菌塗抹 BM スライド投入後はゴム栓で密栓した。

実験成績

1. 出発材料の菌長

菌液作製法の異なるによって出発材料の平均菌長が異なった。最も短かったのは非磨砕菌液のそれで $2.0\ \mu\text{m}$ であり、最も長かったのは部分精製された菌液の菌長で $2.7\ \mu\text{m}$ であった。その他、1分間磨砕菌液は $2.4\ \mu\text{m}$ 、5分間磨砕の分は $2.1\ \mu\text{m}$ 、15分間磨砕菌液は $2.3\ \mu\text{m}$ であった。

2. 培養後の菌長の変化

1) pH 6 EK 培地における菌長の変化

前記5種類の菌液の pH 6 EK 培地における菌長の変化は図1のとおりである。非磨砕菌と精製菌の elongation が最も顕著であり、15分間磨砕菌がこれに次ぎ、1分間磨砕と5分間磨砕の菌体の elongation は不良であった。

2) pH 7 EK 培地における菌長の変化

pH 7 EK 培地における菌長は変化は図2に示すとおりで、pH 6 EK 培地のそれと非常に異った成績を示した。即ち、elongation の最も速かったのは非磨砕菌であったが、20日間培養ではその伸びがよくなかった。1分間及び5分間磨砕菌は10日および20日間培養につれてスムーズに線状に elongate した。これに対して15分間磨砕菌および精製菌の elongation は不良であった。

これらの成績をさらに出発材料、10日間培養および20日間培養中の菌長とその菌数の分布をヒストグラムで示すと図3、4および5の通りである。非磨砕菌および特に1分間磨砕菌では $2.1\ \mu\text{m}$ 以下の菌数が培養につれて減少しているのが分り、このことは塗抹された菌の大部分が一斉に elongate したことを示している。5分間磨砕菌では $2.1\ \mu\text{m}$ 菌の数の減少が前2者に比して少ない。しかし、elongate した菌も多い。15分間磨砕菌および精製菌では $2.1\ \mu\text{m}$ 以下の減少が極めて少ないので elongate しえない菌がはじめから多く含まれていたことを示している。

考 察

この研究によって鼠癩菌の *in vitro* elongation の実験を行なうさい用いられる菌液はどのように作製するべきかということが明瞭になった。即ち、なるべく温和な方法でレプロームをこわして菌液を作るべきで、乳鉢を全く用いないでハサミで細切するか、乳鉢で磨砕するならば1分間、長くても5分間以内の磨砕に止むべきである。このような mild な方法で作製した菌液を用いると確実に再現性のある elongation を観察することが出来る。

Fig. 5 Distribution of length of *M. lepraemurium*

換言すれば、鼠癩菌は磨砕などの物理的処理に対して極めて sensitive な脆弱な菌といえよう。このことは鼠癩菌の培養実験のさい特に念頭においておかなければならぬ特性である。現にこの後は非磨砕菌液を用いて研究を続行中であるが、実に再現性ある鼠癩菌の elongation を認め得、実験データの処理と解決に進展と理論性を与えることが出来ている。また、鼠癩腫の採取時期などを考慮に入れば、elongation の synchronize も可能だという印象を得ている。

これらの成績は動物接種の場合も当然考慮すべきことで、感受性動物系統や接種部位の選択と共に発症のよ

りよい画一性もこの方法によって得られるであろう。

以前まで elongation の研究に Kirchner 培地をもとにしたものを使用してきた。Hart & Valentine⁷⁾ も大略類似の培地を使用している。しかし、最近⁵⁾、培養実験を考えて Kirchner 培地にブドウ糖、焦性ブドウ酸ソーダおよび蔗糖を加えて enrich したものを使用しているが、このように enrich することにより elongation のパターンが全く変貌したことを感ずる。それは pH 6.0 では elongation が不良で pH 7.0 での elongation が極めて著明になったことである。

今回の実験でも同一の所見を得たが、pH 6 と pH 7 培地での elongation は或は全く異質のものではないかと思う。なぜならば今回の実験成績の示すように pH 6 での elongation は 15 分間磨砕菌と精製菌に認められて、1 分間磨砕菌と 5 分間磨砕菌では極めて軽度であったのに反して、pH 7 培地ではこれと全く逆に 1 分間磨砕菌と 5 分間磨砕菌に著明な elongation が認められたからである。

ただ、非磨砕菌の elongation は pH 6 でも pH 7 でも 10 日培養では良好であったことに対しては未だ明確な説明はできかねる。

結 論

鼠癩菌の *in vitro* elongation 実験に用いる菌液の作り方で、菌の elongation がどう影響されるかを検討したところ、次の結論を得た。

1. 鼠癩菌を乳鉢で磨砕せずに、なるべく菌に障害を与えない操作で作製した菌液と 1 分間乳鉢で磨砕して作製した菌液中の菌体が最もよい elongation を示し、次

には 5 分間磨砕して作製した菌液中の菌体がスムーズな elongation を示した。しかし、15 分間磨砕菌液と部分精製菌液の菌体の elongation は良好でなかった。

2. Enriched Kirchner 培地での elongation は前報までに述べた Kirchner 培地での elongation と異ったパターンを示した。即ち、前者では pH 7 で、後者では pH 6 で elongation が起った。

これらの結果は鼠癩菌の培養実験に多大の重要な資料と示唆を与えたものと思われる。

本研究は日米医学協力計画ライ専門部会の研究費によった。

文 献

- 1) Nakamura, M.: Improved method for observing elongation of *Myc. lepraemurium in vitro*, Intern. J. Leprosy, **35**: 505-509 (1967).
- 2) Nakamura, M.: 鼠癩菌の *in vitro* elongation に関する研究. レブラ, **38**: 11-14 (1968).
- 3) 中村昌弘: 鼠癩菌の *in vitro* elongation に影響を及ぼす因子. レブラ, **37**: 162-169 (1969).
- 4) Nakamura, M.: Effects of the depth of culture medium on elongation of *Mycobacterium lepraemurium in vitro*. Intern. J. Leprosy, **38**: 162-169.
- 5) 中村昌弘: 鼠癩菌の *in vitro* elongation: Bi-oden meshcement slide を用いての実験. レブラ **41**: 7-10 (1972).
- 6) 森 竜男, 高坂健二, 伊藤利根太郎, 西村真二: 鼠癩菌の集菌法, 日本細菌学雑誌, **16**: 808-813 (1961).
- 7) Hart, P. D'Arcy and Valentine, R. C.: Growth of *Myc. lepraemurium* in cell-free medium. J. gen. Microbiol., **32**: 43-54 (1963).