Studies on Murine Leprosy Bacillus

**V. Growth in Relation to Concentrations of Monopotassium Phosphate,
Sodium Glutamate and Glycerol in the 1% Egg Yolk Medium,
and in Relation to pH of the Medium**

TATSUJI OGAWA and MINAKO HIRAKI

(Kitajuku Municipal Hospital at Urawa and Kitasato Institute)

The 1% egg yolk medium¹⁾ is prepared as follows: The salt solution consists of KH_2PO_4 , 1.0 g; sodium glutamate, 1.0 g; distilled water, 100 ml. Added 6 ml glycerol, 6 ml of a 2 per cent malachite green solution and 200 ml egg yolk to the salt solution, mixed well, and distributed in sterile test tubes (170 mm long, 18 mm in diameter) in 5 ml amounts. The medium is then coagulated in a slanting position at 90°C for 60 minutes. Reaction of the medium is about 6.1.

Despite the fact that only the egg yolk medium supports gross visible growth of the acid-fast organisms supposedly murine leprosy bacilli, the ability of the medium proved not so satisfactory. As previously described²⁾, all of the ingredients in the medium appeared to be necessary for growth of the organism. This paper aimed for the improvement of the medium.

The following modified egg yolk media were prepared by varying the concentration of the salts and the glycerol or by varying the pH of the medium. The test media in Experiments I and II had the same composition as the original (standard) one except that the amount of monopotassium phosphate in the salt solution was varied to give concentrations ranging from 0.3 to 3 per cent. As a result, these slants possessed different pH values from that of the standard (Table 1). In Experiment III, similarly, the test media had the same formula as the standard one except the concentration of sodium glutamate in the salt solution was altered from 1 to 0.5 or 2 per cent (Table 2). The glycerol was decreased or increased to give final concentrations ranging from 0.5 to 16 per cent in the case of the test media in Experiments IV and V (Table 3).

In Experiments VI—IX, the pH of the medium was adjusted to 6.4 to 7.0 either by adding dibasic sodium phosphate to the salt solution (Table 4) or by adding an aqueous sodium hydroxide solution to the medium before inspissation (Table 5).

A total of 169 subcultures of the supposed Hawaiian strain was used for these growth experiments. Small portions of the growth were transferred by a loop lightly on the middle of the surface of media and then the tubes were incubated at 37°C for 3 months. Observations were repeated weekly or biweekly to compare the size of the gross visible growth on the standard and modified egg yolk media with that of the negative control growth on Ogawa's egg medium inoculated in parallel.

Evaluation of the modified media was made according to whether the frequency of the positive growth on them is higher or not than that of the positive growth on the standard egg yolk medium. The results showed, however, that none of the modified egg yolk media tested were superior to the original one.

鼠らい菌に関する研究

(第5報) 1%卵黄培地に混入されている KH_2PO_4 , グルタミン酸
ナトリウム, グリセリンの量および培地の pH の検討

小川 辰次 平木 美奈子

(浦和市立北宿病院, 北里研究所) (北里研究所)

(受付 1972年2月15日)

緒 言

我々の使用している1%卵黄培地¹⁾の中に混入されている種々の要素は、鼠らい菌様抗酸菌の発育に不可欠のものであることは、前に報告²⁾したとおりである。しかし、その混入の量や培地の pH が適当であるかどうかは、まだ検討していない。これらの点を検討することによって、1%卵黄培地の性能を高めることができないかどうかと思い、実験したのでここに報告する。

方 法

i 培地の作り方

イ 標準培地…… KH_2PO_4 1.0g, グルタミン酸ナトリウム1.0g, 溜水100ml の組成のものを基汁とする。基汁100ml, グリセリン6ml, 2%マラカイト緑液6ml, 卵黄200ml をよくかきまぜて、5ml 宛、中試験管に分注し、斜面として、90°C, 1時間、凝固器でかためた。pH は6.1~6.2位である。

ロ 試作培地

a. KH_2PO_4 …… KH_2PO_4 の基汁への混入量を、0.3%, 0.5%, 2%, 3%と変更しただけで、その他の組成は標準培地と全く同様である。このようにして作った試作培地を①, ②, ③, ④とした。

b. グルタミン酸ナトリウム……a に準じて、グルタミン酸ナトリウムの基汁への混入量を、0.5%, 2%として作った試作培地を、⑤, ⑥とした。

c. グリセリン……1%卵黄培地の全量に対して混入するグリセリンの量を、0.5%, 1%, 4%, 8%, 16%として作った試作培地を、⑦, ⑧, ⑨, ⑩, ⑪, とした。

d. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ の混入によって pH を修正した培地……1%卵黄培地の基汁に0.5%, 1%, 2%, 3

%に混入したもので作った試作培地を、それぞれ⑫, ⑬, ⑭, ⑮とし、更に $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ と KH_2PO_4 をそれぞれ0.5%に混入した基汁で作った試作培地を⑯とした。

e. NaOH 液で pH を修正した培地……凝固する前の1%卵黄培地、100ml に対して1% NaOH 液、2% NaOH 液、3% NaOH 液、4% NaOH 液を、それぞれ2.0ml 宛加えてよくまぜて作った試作培地を、⑰, ⑱, ⑲, ⑳とした。

これらの培地の pH の測定には、1本の培地に約10ml の溜水を加え、箸で培地をつぶして十分にまぜ、濾紙で濾した濾液を日立の pH メーターで測定した。

ii 検討の仕方

1%卵黄培地を標準培地として、被検の種々の試作培地および1%小川培地を2本宛使用した。これらの培地に菌株より集落の1片をとって、斜面の中央におき、綿検を無孔のゴムのキャップにとりかえ、37°C に3カ月培養し、1~2週に1回宛見て、集落の大きくなならない1%小川培地に比して、集落の大きくなった時に陽性とした。なお2本使用の培地中の1本にだけ発育した時も陽性とし、雑菌の侵入したものは成績より除外した。そして最後の判定の時に、集落の縦と横の長さを、試験管の外よりはかり、大きさを比較した。使用した菌株は、初代および種々の継代のハワイ株様抗酸菌、37°C, 約2~3カ月培養のもとであって、継代にあたっては、なるべく同じ菌量になるよう心がけた。

成 績

a. KH_2PO_4 の混入量を種々にした試作培地

試作培地の pH は Table 1 に示したように、標準培地に比して、混入量の少い時は、高い pH を示し、混入量の多くなるにしたがって低い pH を示している。

Table 1 Growth of the Acid-Fast Organisms, Supposedly *M. lepraemurium*, on the Egg Yolk Media Modified by Varying the Concentration of Monopotassium Phosphate

Experiment	No. of cultures inoculated	No. of cultures giving positive growth ^a on					
		1% egg yolk medium (standard)	Modified egg yolk medium				
			(1)	(2)	(3)	(4)	
I	23 (100%)	16 (70%)	9 (39%)	10 (44%)	..	..	
II	22 (100%)	21 (95%)	..	..	20 (91%)	19 (86%)	
i)	Conc. of KH ₂ PO ₄ in the salt solution of the medium indicated above.....		1%	0.3%	0.5%	2%	3%
ii)	Medium pH (initial)		6.0	6.4	6.3	5.6	5.7

The sign (..) indicates no experiment.

Table 2 Growth of the Acid-Fast Organisms, Supposedly *M. lepraemurium*, on the Egg Yolk Media Modified by Varying the Concentration of Sodium Glutamate

Experiment	No. of cultures inoculated	No. of cultures giving positive growth on		
		1% egg yolk meedium (standard)	Medified egg yolk medium	
			(5)	(6)
III	17 (100%)	8 (47%)	8 (47%)	8 (47%)
i) Conc. of sodium glutamate in the salt solution of the medium indicated above		1%	0.5%	2%
ii) Medium pH (initial).....		6.2	6.1	6.1

①, ②の試作培地の実験および③, ④の試作培地の実験は、ともに3回宛行われたが、前者を実験Ⅰ、後者を実験Ⅱとして綜括した。使用した菌株は、2代が5株、3代が16株、4代が18株、5代が9株、合計51株であったが、雑菌の侵入したものが6株あった。それで判定の対象となったものは45株となる。

陽性率は Table 1 に示したようで、試作培地の陽性率は何れも低い。殊に KH_2PO_4 の少量混入の①, ②の試作培地が、多量混入の③, ④の試作培地に比して、ずっと低い。なお試作培地においては、標準培地に比して、集落の小さいものが多い。

b. グルタミン酸ナトリウムの混入量を種々にした試作培地

試作培地の pH は標準培地と大差ない。使用した菌株は、初代が7株、2代が8株、4代が1株、10代が2株、合計18株で、2回に亘って実験した。これを綜括して実験Ⅲとした。1株に雑菌の侵入があったので、判定の対象となったのは17株である。陽性率は Table 2 に示したとおりで、試作培地の⑤, ⑥、と標準培地の間に

は差が無かった。また集落は、⑤では標準培地と大差がなかったが、⑥の試作培地では、小さいものが多かった。

c. グリセリンの混入量を種々にした試作培地

試作培地の pH は、何れもほぼ同じで、標準培地と大差ない。用いた菌株は、初代が5株、2代が5株、3代が1株、4代が6株、5代が3株、6代が11株、7代が7株、合計38株である。この中1株が雑菌の侵入を認めたので、判定の対象となったものは37株である。⑦, ⑧の試作培地の実験は2回、⑨, ⑩, ⑪の試作培地の実験は3回行った。これらを実験Ⅳ、実験Ⅴとして綜括し、Table 3 に陽性率を示した。陽性率は、いずれの試作培地においても、標準培地に比して低い。

殊に多量に混入した⑩, ⑪の試作培地では1株も発育していない。集落の大きさは、⑦, ⑧の試作培地ではいずれも小さく、⑨の試作培地では、一部小さなものもあったが、大部分は標準培地と大差がなかった。

d. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ の混入により、培地の pH を種々に修正した試作培地。

Table 3 Growth of the Acid-Fast Organisms, Supposedly *M. lepraemurium*, on the Egg Yolk Media Modified by Varying the Concentration of Glycerol

Experiment	No. of cultures inoculated	No. of cultures giving positive growth on						
		1% egg yolk medium (standard)	Modified egg yolk medium					
			(7)	(8)	(9)	(10)	(11)	
IV	17 (100%)	10 (59%)	3 (18%)	6 (35%)	..	..	..	
V	20 (100%)	12 (60%)	..	..	8 (50%)	0 (—)	0 (—)	
i)	Final conc. of glycerol in the medium indicated above.....		2%	0.5%	1%	4%	8%	16%
ii)	Medium pH (initial).....		6.1	6.1	6.1	6.0	6.1	6.1

The sign (..) indicates no experiment.

Table 4 Growth of the Acid-Fast Organisms, Supposedly *M. lepraemurium*, on the Egg Yolk Media Modified in pH by Adding Dibasic Sodium Phosphate

Experiment	No. of cultures inoculated	No. of cultures giving positive growth on					
		1% egg yolk medium (standard)	Modified egg yolk medium				
			(12)	(13)	(14)	(15)	(16)
VI	14 (100%)	13 (93%)	..	6 (43%)	4 (29%)	0 (—)	..
VII	15 (100%)	10 (67%)	9 (60%)	9 (60%)	..	..	..
VIII	25 (100%)	15 (60%)	..	..	..	..	13 (52%)
i) Conc. in salt sol. of the medium indicated above (%) :							
{a. KH_2PO_4		1	1	1	1	1	0.5
{b. $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$		0	0.5	1	2	3	0.5
ii) Medium pH (initial)		6.2	6.4	6.6	6.8	6.9	6.4

The sign (..) indicated no experiment.

Table 5 Growth of the Acid-Fast Organisms, Supposedly *M. lepraemurium*, on the Egg Yolk Media Modified in pH by Adding Sodium Hydroxide

Experiment	No. of cultures inoculated	No. of cultures giving positive growth on				
		1% egg yolk medium (standard)	Modified egg yolk medium			
			(17)	(18)	(19)	(20)
IX	16 (100%)	12 (75%)	12 (75%)	9 (56%)	4 (25%)	1 (6%)
i) A NaOH solution *used for pH adjustment.....		None	1% sol.	2% sol.	3% sol.	4% sol.
ii) Medium pH (initial).....		6.1	6.4	6.6	6.8	7.0

*) Two ml. was added to each 100 ml. of the 1% egg yolk medium before inspissation.

試作培地の pH は、Table 4 に見るように 6.4~6.9 を示している。用いた菌株は、初代が11株、2代が5株、3代が10株、4代が10株、5代が11株、6代が1株、7代が2株、9代が5株、10代が3株、合計58株である。4株に雑菌の侵入があったので54株が判定の対象となった。⑫、⑬の試作培地の実験が2回、⑭、⑮の試作培地の実験が2回、⑯の試作培地の実験を3回行った。これをVI, VII, VIIIの実験としてまとめた。陽性率は Table 4 で見えるように、いずれの試作培地においても、標準培地にくらべると低い。そして⑯の試作培地では、1株も発育していない。試作培地⑯の陽性率が、実験VIと実験VIIとで著明の差があることに眼がつく。次に集落の大きさは、試作培地においては概して小さいものが多かった。

e. NaOH 液の混入により、培地の pH を種々に修正した試作培地、

試作培地の pH は Table 5 でみるように、6.4~7.0 であった。使用した菌株は、初代が2株、3代が4株、5代が2株、6代が3株、8代が4株、9代が3株、合計18株であるが、2株に雑菌の侵入を見たので、判定の対象となったものは16株である。陽性率は Table 5 で見るように、⑯の試作培地のみが標準培地と同率を示したが、その他の試作培地では、いずれも低く、pH 7.0 に近づくに従って、陽性率は次第に低下した。集落の大きさは、標準培地に比して小さいものが多かった。

考 察

我々の使用している1%卵黄培地は、ハワイ株様抗酸菌の集落の発育を示すとは云え、満足すべき性能のものではない。それで今回は、 KH_2PO_4 、グルタミン酸ナトリウム、グリセリンの混入量が果して適当であるかどうか、培地の pH の 6.1~6.2 が、はたして適当であるかどうかを検討するために、種々の量に混入した試作培地、および種々の pH の試作培地を作って実験した。その結果は前述のように、予期に反して、1%卵黄培地よりもすぐれたものはなかった。即ち1%卵黄培地の種々の要素の混入量は、現在までのところ、本来のままの量が最もよいし、pH も本来の 6.1~6.2 程度が最もよいことがわかった。しかしこの事実は、1%卵黄培地の性能を高める方法を、まだつかんでないと云うことであって、さらにこの培地の改良の余地を多分に残しているものと思われる。なお $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ の混入の⑯の試作培地が、第VI実験と第VII実験で陽性率に差を示したのは、集落の1片を培地斜面にそっとのせるといった様な培養

の手技のための誤差によるのではなかろうかと推定している。今回の実験によって、1%卵黄培地の KH_2PO_4 、グルタミン酸ナトリウム、グリセリンの最も適当の量が、1%小川培地に混入されている量と全く同じであることがわかった。また $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ を培地に加えることによって、発育が悪くなることも1%小川培地と全く同様であった。これらのことは、我々の分離した鼠らい菌様抗酸菌と人型結核菌とが、似ている性状の一面を示しているものと思われるが、しかし我々の分離した鼠らい菌様抗酸菌は pH 6.1前後の1%卵黄培地にのみ発育し、人型結核菌の最も良く発育を示す pH 6.6前後の全卵の1%小川培地に発育しないことは、鼠らい菌様抗酸菌と人型結核菌とは、全く異なった性状の一面を示しているものと思われる。

綜 括

1%卵黄培地を標準培地とし、培地中に混入されている KH_2PO_4 、グルタミン酸ナトリウム、グリセリンを種々の量に混入した種々の試作培地および $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 、NaOH 液を加えて作った種々の pH の試作培地に、初代あるいは種々の継代のハワイ株様抗酸菌の集落の一片を、培地斜面に静かに置き、37°C 3カ月間培養し、陽性率、発育した集落の大きさを判定の基準として比較した結果、標準培地よりすぐれた性能の培地は見られなかった。

(本論文の要旨は昭和46年10月の第20回日本癩学会東部地方会において発表した。本研究に終始御指導と御鞭撻を頂いた故内田三千太郎博士に感謝する。)

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.
Tatsuji Ogawa and Keiko Motomura: Studies on Murine Leprosy Bacillus., Attempt to cultivate in vitro the Hawaiian strain of mycobacterium lapraemurium. Kitasato Arch. of Exp. Med., 43: 21, 1970.
- 2) 小川辰次, 本村恵子: 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, レブラ, 40: 9, 1971.
Tatsuji Ogawa and Keiko Motomura: Studies on Murine Leprosy Bacillus. 2. Further characteristics of slow growing acid-fast organismus isolated from experimental mice with Hawaiian strain and investigation of the 1% egg yolk medium. Kitasato Arch. of Exp. Med. 44: 37, 1971.