**Elongation of *Mycobacterium lepraemurium* in vitro
by α -ketoglutaric Acid**

**II. Factors Affecting Elongation of *M. lepraemurium*
in the NK Medium**

MASAHIRO NAKAMURA

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

In the previous paper, it was demonstrated that *M. lepraemurium* extraordinarily elongated in the NK medium which was composed of the Kirchner medium containing bovine serum and α -ketoglutaric acid. This paper is to report the factors affecting this elongation phenomenon of *M. lepraemurium* in the NK medium under several considerable conditions.

The results obtained are as follows:

(1) Optimal temperature of cultivation for extraordinary elongation was somewhat lower temperature, 30°C, rather than 37°C.

(2) Significant elongation could be observed when the bacilli were cultivated in the medium in which 8 ml of the NK medium was contained in a test tube, 10.5 cm length and 1.3 cm diameter.

(3) No elongation did take place under an obligate anaerobic condition.

(4) The same phenomenon was also observed when partially purified *M. lepraemurium* was used.

(5) Such a characteristic elongation phenomenon as seen in the NK medium was also demonstrated when oxaloacetate was used instead of α -ketoglutaric acid.

(6) It was presumed that isoniazide and malonate had destructive effect on the bacilli after elongation in the NK medium, while penicillin and streptomycin had no such effect.

(7) No morphological change in the bacterial cells was illustrated in the case of *M. leprae* even the bacilli were cultivated under the same condition as used for *M. lepraemurium*.

α -ケトグルタル酸による鼠癩菌の *in vitro* Elongation

第2報 NK 培地における鼠癩菌の Elongation に影響する因子

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 9月20日)

前報¹⁾²⁾において α -ケトグルタル酸を含む enriched Kirchner (EK) 培地での鼠癩菌の異常なる Elongation 現象を記載した。

本報ではこの α -ケトグルタル酸含有 EK 培地すなわち NK 培地での鼠癩菌の Elongation 惹起諸条件および人癩菌を同一条件で培養した場合の結果について述べる。

実験材料と方法

供試鼠癩菌液：前報²⁾と同様の鼠癩菌ハワイ株を使用した。菌液の作製法など一切前報と同じである。

供試人癩菌液：国立療養所菊池恵楓園より分与を受けた結節T株をそのまま2% NaOH で15分処理し、あとシャーレ中で蒸留水で洗い、とり出し、別の滅菌シャーレ中でハサミで細切し、鼠癩菌液作製法と全く同一の方法で蒸留水で菌液とした。

部分精製鼠癩菌の作製法：供試鼠癩菌液を出発材料として森ら³⁾の方法を更に簡便にして部分精製鼠癩菌を作製した。その精製法を簡単に記載すると次の通りである。

トリプシン Difco (1:250) を最終濃度0.2%に加え37°C 30分消化、低速心、上清を3,500rpm 30分遠心、沈渣を5ml の蒸留水に再浮游、これに等量の1% NaOH を加え、3,500rpm 30分遠心、沈渣を蒸留水10ml に再浮游したもの。この活性を CaH マウスの皮下接種により検したところ、6カ月後典型的なレプロームの形成が見られた。

供試一般抗酸菌：小川培地に継代されている教室保存の人型結核菌 H37Ra 株、BCG、A3717株およびスメグマ菌を蒸留水で適当濃度の菌液にして使用した。

Elongation 観察法：前報と同様で、タンザクスメイドを Borden meshcement で coated したもの (BM スライド) を使用した。本報では Elongation 率は測定し

なかった。出発材料の塗抹標本と比較して、菌体の Elongation がどの程度起ったかを単に光顕で観察した。

実験成績

1. Elongation に及ぼす培養温度の影響

鼠癩菌液と部分精製鼠癩菌液との smear について30°C と37°C で培養した場合の EK 培地および NK 培地における Elongation を比較した。成績は表1のよう

Table 1 Elongation of crude and partially purified *M. lepraemurium* cultivated at 30°C and 37°C

Material	Culture temp.	Medium	Incubation period (Days)	
			30	60
Crude	30°C	EK	+	+
		NK	+++	+++
	30°C	EK	+	+
		NK	+	—
Purified	37°C	EK	+	+
		NK	++	++
	37°C	EK	+	±
		NK	++	—

* Elongation degree

gation が起るのに対して37°C では Elongation は EK 培地のそれと大差ない。部分精製菌では37°C 培養でも Elongation が起ったが、培養期間を長くすると菌体の破壊と思われる所見に遭遇する。すなわち、菌体の染色性が低下し、且つ顆粒状になる。従って37°C では不可で30°C 培養が至適である。

2. 培地の液量と培養環境の影響

培地を中型試験管に3ml および8ml 分注したものでの鼠癩菌の Elongation を検討した。3ml および

8 ml 分注した場合、液量はそれぞれ 2 cm および 7 cm になり、上部の空気層は 7 cm および 2 cm になる。このようにして作製した培地にスライドを投入したのち、ゴム栓で密栓したものを好氣的条件とし、アルミキャップで覆って、これを BBL 社のカタリストとガスパックを用いた嫌気培養 jar にて培養するものを嫌氣的条件とした。30°C で 30 日培養後の菌の Elongation を観察すると表 2 の通りで、好氣的条件でも液層が厚いものだけに Elongation が認められ、嫌氣的条件下の培養では NK 培地でも Elongation は全く認められず菌の破壊が観察された。

Table 2. Effects of culture conditions on elongation of *M. lepraemurium*

Culture medium	EK		NK	
Volume of medium (ml)	3	8	3	8
Aerobic condition	—*	+	—	卅
Anaerobic condition	—	—	—	—

* Elongation degree, 30 days' incubation at 30°C

3. TCA サイクル基質の影響

EK 培地に最終濃度がいずれも 0.1 % になるように表 3 に示したミリポアフィルターによる濾過滅菌基質を加えて鼠癩菌の Elongation の有無を検討した。なお、これら基質の外にアミノ酸も 2, 3 検討したので附記する。30°C で 2 カ月培養後のスライドによってその結果を見ると表 3 の通りであった。すなわち、 α -ケトグルタル酸よりはやや劣るが、Elongation を起しえたものはオキザロ酢酸のみであった。

Table 3. Effects of substrates related with TCA cycle and amino acids on elongation of *M. lepraemurium*

Medium	Elongation
EK	—
EK + Oxaloacetate	卅
EK + Malic	—
EK + Succinate	—
EK + Nicotinic acid	—
EK + Nicotinamide	—
EK + Isoni-cotinate	—
EK + Glutamine	—
NK (EK + α -ketoglutaric acid)	卅

4. 抗生物質および代謝阻害剤の影響

NK 培地に最終濃度としてペニシリン 1,000 U/ml, INH 10 μ g および 100 μ g/ml, ストレプトマイシン 1,000 μ g/ml. マロン酸 2×10^{-2} M および 10×10^{-2} M を加えてそれら培地での Elongation の有無を検した。30°C 2 カ月培養後の成績は表 4 の通りで、INH とマロン酸 10×10^{-2} M で菌体は一旦 elongate したあと顆粒化、繊細化した所見が得られ、染色性は不良であったので恐らく破壊されたものと思われる。

Table 4. Effects of antibiotics and malonate on elongation of *M. lepraemurium*

NK medium contained	Elongation
Non	卅
Penicillin 1,000 U/ml	卅
Streptomycin 1,000 μ g/ml	卅
INH 10 μ g/ml	卅→degeneration
INH 100 μ g/ml	卅→degeneration
Malonate 2×10^{-2} M	卅
Malonate 10×10^{-2} M	卅→degeneration

5. 人癩菌の NK 培地での態度

人癩菌 T 株を鼠癩菌と同様にして EK 培地と NK 培地での Elongation の有無を検討した。このさいは特に 30°C と 37°C で培養し、培養期間も 4 カ月に延長した。結果は EK 培地でも NK 培地でも菌体に何らの変化も起らず出発材料のそれと同一であった。

6. 一般抗酸菌の NK 培地での態度

人型結核菌 H37Ra, BCG, A3717 およびスメグマ菌を鼠癩菌と同様の方法に NK 培地で培養して日を追ってスライド上の菌形を観察した。結果は著明な Elongation を来すことなくマイクロコロニーの形成が開始された。

考 察

著者⁴⁾はさきに鼠癩菌の *in vitro* elongation に影響する因子について実験した中で α -ケトグルタル酸を含む種々の代謝基質についても既に検討済みであったがそのさい、 α -ケトグルタル酸による著明なる Elongation を発見することは出来なかった。基質の添加濃度も本報と同様の 0.1 % であるのに著明なる Elongation を発見できなかった理由はいつに既報⁹⁾の実験は 37°C でのみ培養したからであった。今回、培養温度の検討を行ってみると 30°C で著明な Elongation が起り、37°C ではそ

れが極めて軽度で、EK 培地での Elongation⁵⁾と大差ないものであった。

培地液層については EK 培地における Elongation⁶⁾と同一でこれは特記すべき事実はなかった。

部分精製された鼠癩菌も粗鼠癩菌と同様、その程度はやや不良であったが Elongation が起ったことは NK 培地での Elongation が鼠癩菌感染組織に起因するものではなく菌体そのものの特性であることが肯定される。

オキザロ酢酸で可成りの Elongation が認められたのはこの鼠癩菌の Elongation が脂肪酸代謝に関係あるものではないかと思われるが、今後の検討を待たねばならない。

代謝阻害剤および抗生物質の影響がすでに *in vivo* で報告されている効果と類似であることはますますこの Elongation 現象が鼠癩菌そのものの特性を表現しているものと思われる。

人癩菌が NK 培地で全く何の変化も示さなかったことは鼠癩菌と人癩菌の治癩剤および抗生物質に対する態度が異なることなどから考えて、両菌の代謝が全く異質のものであるらしいと想像され、鼠癩菌を人癩菌のモデルとして取扱うことに検討を要する問題であろうと思われるが今後更に多量の実験を重ねるべきであろう。Hart & Rees⁷⁾がさきに人癩菌が *in vitro* で伸延しない事実を用いて人癩菌と鼠癩菌とを区別しうることを述べているが、ここでも同様の所見が得られたことは示唆多きことである。

結 論

NK 培地で起る鼠癩菌の Elongation に影響する因子について検討したところ次の結果を得た。

1. 培養温度は 30°C が至適である。37°C は不適である。
2. 培地の液量は中型試験管 (10.5×1.3cm) を用い

て、それに 8 ml 分注した状態が Elongation に適している。

3. 嫌気的条件下では Elongation は全く起らない。
4. 部分精製鼠癩菌でも Elongation は起る。
5. オキザロ酢酸でも Elongation を起しうる。しかし、その程度は α -ケトグルタル酸にやや劣る。
6. INH およびマロン酸は一旦 Elongation が起った菌をのちに破壊するものらしい。ペニシリンおよびストレプトマイシンにはこの作用はなかった。
7. 人癩菌は NK 培地で何らの菌体の形態変化も起きなかった

本研究の一部は日米医学協力計画ライ博門部会研究費によった。

文 献

- 1) 中村昌弘： α -ケトグルタル酸によるネズミライ菌の伸延現象医学のあゆめ，**81**：559-560 (1972)。
- 2) 中村昌弘： α -ケトグルタル酸による鼠癩菌の elongation 第 1 報，特徴的伸延現象とその伸延率，*レブラ* **41**：182-187 (1972)。
- 3) 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)。
- 4) 中村昌弘：鼠癩菌の *in vitro* elongation に影響を及ぼす因子．*レブラ*，**38**：162-166 (1969)。
- 5) Nakamura, M.: Effects of the depth of culture medium on elongation of *Mycobacterium lepraemurium in vitro*. *Intern. J. Leprosy*, **38**：49-53 (1970)。
- 6) 中村昌弘：鼠癩菌の *in vitro* elongation に及ぼす培地の液層と炭酸ガスの影響．*レブラ*，**41**：39-41 (1972)。
- 7) D'Arcy Hart, P. and Rees, R. J. W.: Elongation *in vitro* of *Mycobacterium lepraemurium* as a distinction from *Mycobacterium leprae*. *Intern. J. Leprosy*, **36**：83-86 (1968)。