Elongation of *Mycobacterium lepraemurium* in vitro
by α -ketoglutaric Acid
III. Relationship between Elongation Phenomenon and the
Increase of the Bacilli, and Morphological
Findings of Elongated Bacilli

MASAHIRO NAKAMURA

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

In this paper, it was noted that the number of bacilli of *M. lepraemurium* increased approximately four times compared with that of the initial inoculum when the bacilli were cultivated in the NK medium at 30°C for one month. There was no increase of the bacilli when the bacilli were cultivated in the EK medium which was used as a control. However, no significant relationship between the increase of the bacilli and that of protein contents of bacterial cells was recognized. It was illustrated by electron micrographs that the elongated *M. lepraemurium* in the NK medium had band structures which were found to be observed in acid-fast bacilli and in addition no destructive findings of the cells should be noticed. However, it was observed that there was a slight decrease in the number of phosphate granules in the cell of elongated bacilli in comparison with that cultivated in the EK medium.

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

第3報 伸延現象と菌数計算との関係ならびに伸延菌の形態学的観察

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)

細菌細胞の Elongation は退行性変化としても惹起される現象であることは周知のとおりである。特に本来の細菌菌長の2倍以上の elongation は分裂の前段階としては不必要な伸延であるので、当然病的変化として理解すべきであろう。従って既報¹⁾²⁾の α -ケトグルタル酸による鼠癩菌の elongation が病的な、ことに退行性変性であるか否かは菌数の増加がこれに伴うか否かによって一応決定される問題である。しかし、鼠癩菌という現在までの *in vivo* 生体寄生性細菌が *in vitro* でどのような発育形式をとるものか全く知られざることであるので、たとえ異常に *in vitro* で elongate してもこれを直ちに一般培養容易な細菌のそれと同一に退行性変性であると決めることは当を得ていないだろうと思う。

本報ではそれ故に elongation と菌数増加の関係および電顕による形態的観察を行った。

実験材料と方法

供試鼠癩菌：既報¹⁾²⁾で使用してきた鼠癩菌ハワイ株(M-53, 54)を用いた。菌液の作製法など前述のとおりである。

供試培地と培養法：作製鼠癩菌菌液を一晩冷室に静置し、その上清をとり菌集団のない単個菌の状態の菌液であることを確かめてその0.2ml 宛を NK 培地および対照として EK 培地に接種し30°C で培養した。培地の処方、作製法など既報¹⁾²⁾のとおりである。

菌数計算法：培養一定日後、培養試験管を electric vibro shaker でよく攪拌し、その培地の1白金耳(阪大微研作製)を阪大微研法によって菌数計算した。すなわち、1白金耳をスライド上に静かに置き、動かさずにそのまま静かに離し乾燥する。乾燥後スライドを10%ホルマリン・アルコール(ホルマリン原液10, エタノール90)を少量入れた密封ガラスビン中に1~2分間入れ固定、約50~60°C の water bath 上でホルマリンをとば

す。冷却してから0.5%ゼラチン、0.5%フェノール混合液を smear 上に一滴注ぎ、直ちにすて、再び water bath 上で乾燥し、Ziehl-戸田染色を施す。菌数カウントは円形 smear の赤道部を油浸レンズで1視野ずつその中の菌数を数え、次の式によって菌数を算出する。

$$a \times \frac{D}{1.27} = A/0.002\text{ml}$$

a=総菌数

D=数えた視野数

A=0.002ml 当りの総菌数

蛋白量測定法：培養試験管を3,500rpm. 30分遠心し、上清をすて、滅菌生塩水を注ぎ、再び遠心し、上清をすてた沈渣を蒸留水1ml に再浮游、その0.5ml について Lowry 法³⁾で蛋白量を測定した。

電顕的観察：日本電子製 JEM 7型を用い、加速電圧 80K volt、菌体はそのままクロームによる shadowing により直接倍率9,000倍で観察した。

実験成績

1. NK 培地に培養された鼠癩菌の菌数の推移

鼠癩菌を EK 培地と NK 培地に培養した場合の培養1カ月および2カ月の菌数の推移は表1のとおりである。すなわち、鼠癩菌は NK 培地で培養1カ月にして

Table 1. Bacillary count of *M. lepraemurium* cultivated in EK and NK medium

Medium	Cultivation period (Days) at 30°C		
	0	30	60
EK	3.7×10^6 *	3.1×10^6	6.2×10^6
NK	3.5×10^6	15.5×10^6	13.2×10^6

* Number of bacilli per milliliter

Fig. 1 Starting material, Upper : No shadowing
Lower : Shadowing with chrome
(21,000 $\times$ Magnification)

Fig. 2 *M. lepraemurium* cultivated in EK medium for 30 days at 30°C.

Fig. 3 *M. lepraemurium* cultivated in NK medium
for 30 days at 30°C. No shadowing.
(21,000 $\times$ Magnification)

Fig. 4 *M. lepraemurium* cultivated in NK medium
for 30 days at 30°C. Shadowing with chrome.
(21,000× Magnification)

約4倍に増加するが、培養2カ月ではかえって菌数はやや減少し、NK 培地での菌数増加は1カ月が最高と思われる。対照として用いた EK 培地ではこれに対して菌数増加は殆んどない。

2. NK 培地に培養された鼠癩菌の蛋白量

EK 培地に培養された鼠癩菌の蛋白量は培養1カ月が282 μ g/ml, 2カ月培養が220 μ g/ml であって、NK 培地のそれがそれぞれ328 μ g/ml および234 μ g/ml であり、菌数の増加に比例する蛋白量の増加は認められなかった。別に鼠癩菌を2倍段階希釈して蛋白量を測定した値は菌数と蛋白量との間に平行関係があったので、EK 培地の鼠癩菌の蛋白量と NK 培地のそれとの間に殆んど差がなかったことは、NK 培地の鼠癩菌の蛋白量は殆んど増加していないことになる。

3. 電顕的観察成績

図1~4にその所見を示す。EK 培地と NK 培地に30°C で1カ月培養された菌形で特記すべき差はEK 培地のものはNishiura et al.⁴⁾の示す Band structure が明瞭で、その幅が広いのに対してNK 培地のものは Band は明瞭であるが幅が極めて細くなっていることである。更に菌体内の磷酸顆粒⁹⁾らしいものがEK 培地のものでは明瞭で菌体の両端と中央にもあり数も多いのに対して、NK 培地のものは明瞭さにやや欠け且つ主として両端にのみ局在し、その数も少く、構造が不明瞭である。また菌体の表面構造がNK 培地のものはEK 培地に比べるとやや不整である。

考 察

死滅へ向わない非退行性変性の細菌の elongation というのは cell wall の合成は進むが隔壁の形成が行われない状態である。一般にはこのような伸延した状態の菌を最適培養環境に移すと隔壁形成が一斉に行われて伸延した菌体が正常菌長で除した数の菌体に分離、合成される。鼠癩菌のNK 培地での elongation も恐らくこれと類似の状態のものであろう。しかしこの場合培養後の菌数計算を行うと菌数の約4倍の増加があるので elongation の過程に菌の分裂が起っている可能性がある。この約4倍の菌数の増加は第1報に記載した菌体が約4倍 elongate したのと全く一致した数なので elongation と共に分裂が起ったことを意味すると言える。しかし菌数カウントのさい Vibro shaker で強く攪拌することによって分裂のすぐ前まで来ている菌体を機械的に断裂した可能性も考えられるので、elongation を直ちに分裂と考えることには現段階ではなお断定できなく研究デ

ータ不足が感じられる。しかし、ともかくこの elongation を退行性変性の現象と断定するのは当を得ていないと思われ、むしろ分裂の前段階と理解すべきであろう。既報²⁾の如き抗生物質に対する態度もこれを支持するであろう。但し、菌数計算に平行して菌体蛋白の増加がないことは菌体構成成分の合成が正常でないことを示している。電顕観察による形態変化はEK 培地培養の形態とも多少異なるが、EK 培地では菌数増加が起らぬのでEK 培地が鼠癩菌にとって培養基としての作用を有しているとは考えられぬため、このNK 培地での菌体所見の変化の解釈は今後の実験結果を待たねばならない。とくに超薄切片法による観察所見があれば、これらの解釈に可成りの助けになるものと思われる。

結 論

NK 培地に鼠癩菌を接種して30°C で培養すると1カ月後に菌数が約4倍に増加した。対照たる EK 培地では菌数の増加はなかった。しかし菌体蛋白量は両者の間に菌数増加に平行した増加は認められなかった。

NK 培地で elongate した鼠癩菌を電顕で観察すると抗酸菌に特有な Band structure が認められ菌体の破壊所見もなかったが、菌体内の磷酸顆粒の減少が多少認められた。

本研究の一部は日米医学協力計画ライ専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鼠癩菌の *in vitro* elongation 第1報 特徴的伸延現象とその伸延率。レプラ, 41: (1972)。
- 2) 中村昌弘： 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。レプラ 42: (1973)。
- 3) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem., **193**: 265(1951)。
- 4) Nishiura, M., Okada, S., Izumi, S. and Takizawa, H.: An electron microscope study of the band structure of the leprosy bacillus and other mycobacteria. Intern. J. Leprosy, **37**: 225-238(1969)。
- 5) Mudd, S., Takeya, K. and Henderson, H. J.: Electron-scattering granules and reducing sites in mycobacteria. J. Bacteriol., **72**: 767-783(1956)。