**Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium*
in cell-free liquid medium**

5. Establishment of NC-5 medium

MASAHIRO NAKAMURA

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

In the present paper, it was described that newly improved cell-free culture medium, referred to as NC-5, permitted more abundant multiplication of *M. lepraemurium* than that of NC-3 medium which was previously reported. The NC-5 medium was established by the method in which L-cysteine HCl was added to NC-3 medium. Optimal concentration of L-cysteine HCl to be added was 0.03%. When three strains of *M. lepraemurium*, Hawaii, Kurume No. 42, and Kumamoto, were inoculated to and cultivated in NC-5 medium at 30°C, these strains easily multiplied, whereas there were some differences of growth abilities among the three strains in the case of NC medium.

無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌

第5報 NC-5 培地の開発

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 1973年7月20日)

前報¹⁾において NC 培地²⁾³⁾と呼称する無細胞培地を改良した NC-3培地を記載したが、本報では NC-3培地に更に改良を加えた NC-5培地を創案したのでここに報告する。NC-5培地の培地組成などについては短報⁴⁾⁵⁾としてすでに報告したが、ここではその調整法の詳細を報告する予定である。

このNC-5培地では NC-3培地より更に再現性ある鼠癩菌の増菌像がえられ、菌数増加も著明である。

材料と方法

供試鼠癩菌：C₃H マウス皮下に継代されたハワイ株・久留米42号株および熊本株の3株を用いた。鼠癩腫を無菌的にとり出し、シャーレ中でハサミで細切、滅菌蒸溜水約10mlを注ぎ、試験管に移し、ピペットで pipetting して菌浮遊液を作製。一晚、氷室に静置、上清を実験材料として使用した。普通はこの上清を更に20倍から50倍に蒸溜水で希釈して用いた。

増菌観察法：たて切りスライドをシリコンでカバーしたいわゆるシリコン・スライドに菌液を注射器で一滴々下。約30分放置、菌液を注射器で軽く吸い取った。この際、菌液が滴下面全般に円形にわずかに残る程度に吸い取る方があとの増菌度観察に便である。余り完全に菌液を吸い取ると、菌数が少ないせいか、microcolony は形成しても肉眼で増菌度を観察するには適しない。菌液が乾いて白い円形斑が認められたら菌塗抹端を下部にして直ちに培地に投入し、ゴム栓で密栓し、30°C で培養する。普通は1カ月毎にスライドを取り出し、10%ホルマリン水中に投入して2～3分固定した後、水洗、Ziehl-Neelsen 染色を施して菌形・菌増加度を観察し、増菌率を決定した。場合によっては1週間毎、あるいは2週間毎にスライドを取り出し、経時的菌形変化の観察も行った。一枚は培地へ投入しないで、10%ホルマリン水へ投入、固定、“O” time の菌形、菌数の観察に供し

た。

NC-5 培地の調整法：基礎培地 (EKP) と添加物より成る。

1) 基礎培地 (EKP) :

第1 燐酸カリ (KH₂PO₄) (和光特級) 6.0g

第2 燐酸ソーダ (Na₂HPO₄·12H₂O)

(和光、特級) 6.0g

クエン酸ソーダ (C₆H₅O₇Na₃·2H₂O)

(和光、特級) 3.7g

グルタミン酸ソーダ (和光・特級) 15.0g

硫酸マグネシウム (MgSO₄·7H₂O)

(和光・特級) 0.9g

グリセリン (和光・特級) 30ml

グルコース (和光・特級) 4.0g

焦性ブドウ酸ソーダ (片山化学) 5.0g

Aq を加えて1,000ml として加温溶解、20% NaOH でpH 7.3に補正 (この状態でフリーザ保存可)

以上の培地 5 Vol. に0.5% (w/v) パントテン酸カルシウム水溶液 (和光・純薬) を0.1 Vol. 加え、下記の添加物の量を考慮してコルベンに作製し、115°C、10分間オートクレーブで滅菌する。

2) 添加物:

1) 山羊血清……1 Vol.

2) 2% (w/v) α-ケトグルタル酸 (和光純薬) 水溶液……0.5 Vol.

3) 0.1% (w/v) チトクローム C (和光純薬) 水溶液……1 Vol.

4) ヘミン液……0.5 Vol.

5) 0.3% (w/v) L-シスチン塩酸塩 (和光純薬)……0.2 Vol.

以上を上記滅菌 EKP 培地に無菌的に加え、よく混和、8 ml 宛を中型試験管 (10.5×1.3cm) に分注し、

ゴム栓で密栓。

山羊血清は全採血により非無菌的に大コルベンに採血、一晚4°C に保ち、遠心により血清を分離、ポアサイズ8 μm のミリポア・フィルターで濾過、そのあと0.2 μm のミリポア・フィルター濾過で無菌にし、更に56°C 30分3回の非働化を行なったものを使用した。4°C 保存

α -ケトグルタル酸、チトクロームCおよびL-システイン塩酸塩は再蒸留水に溶解、0.2 μm のミリポア・フィルターによって濾過滅菌、4°C に保存。L-システイン塩酸塩は永く保存すると沈澱を生じるので沈澱が認められたら使用しない。

ヘミン液はヘミン (Re-crystallized [NBC]) の80mgを2 ml の triethanolamine (和光一級) に溶解し、Aq 8 ml を加う。これを stock solution として4°C 保存。これを Aq で100倍に希釈し、ミリポア・フィルターで濾過滅菌して4°C 保存。この希釈ヘミンを培地作製に用いる。

培地調整に当っては、2 ml および5 ml の滅菌メスピペットを使用する。

成 績

1. L-システイン塩酸塩の効果

NC-3培地に、はじめはL-システインを加えてその効果を検討した。なお、その場合、NC-3より基礎培地に含まれている7.5%の蔗糖を除いた NC-3 (-sucrose) も同時に検討し、蔗糖が必要かどうかの検討も加えた。

その結果は表1のとおりであって、L-システインの添加は明らかに NC-3培地よりもすぐれていた。ただし、その添加量に至適があり最終濃度が0.01%から0.001%の間が発育を促進し、0.1%では阻止的に作用した。

また、蔗糖は必要でなく、むしろ蔗糖を加えない方が発育は良好であった。

ただ、L-システインは不安定であり、約2週間4°C の保存の間に白色の沈澱を生じるので、より安定なL-システイン塩酸塩を用いることにした。従ってその添加量はL-システインの添加量より換算して、すでに述べた如く、0.3% (w/v) L-システイン塩酸塩を0.2Vol. 加えることにし、0.1% L-システイン 0.5Vol. とほぼ同量の添加量にした。

このようにして創案された培地を NC-5培地と呼称し実験方法の項で記載したものである。

2. 鼠癩菌3株の NC-5培地での増殖

NC 培地に鼠癩菌ハワイ株、久留米株および熊本株を培養すると、それらは増殖度の間に著しい差があり、ハワイ株は極めて良好な発育像を示すのに、他の2株の増殖は著明でなかった。NC-3培地ではその検討は行っていない。

従ってここではこれら3株の NC-5培地での増殖の比較を行なった。その結果は図1に示すとおりで、3株とも良好な増殖像を示したが、中でもハワイ株および久留米株の増殖は著明であつた。熊本株がやや増殖度が劣った。

考 察

NC-3培地の改良を試みる手段として電子伝達系の中でL-システインの添加を行なったところ、NC-3培地に優る再現性のよい鼠癩菌増殖用培地の開発に到達した。これを NC-5培地と呼称した。

本報では、しかし、スライドの塗抹上の増菌像の形態的観察のみでその判定を行なったので、今後菌数カウントを行なって菌数増加率も当然 NC-3培地のそれと比較

Table 1 Effect of L-cysteine on the growth of *M. lepraemurium* in NC-3 medium

Culture medium	Growth of <i>M. lepraemurium</i> for 2 months cultivation
NC-3	+
NC-3+1% L-cysteine	—
NC-3+0.1% L-cysteine	++
NC-3+0.001% L-cysteine	+++
NC-3 (—sucrose)	+
NC-3 (—sucrose)+1% L-cysteine	—
NC-3 (—sucrose)+0.1% L-cysteine	++
NC-3 (—sucrose)+0.01% L-cyssteine	+++

Fig. 1 Growth status of *M. lepraemurium* in NC-5 medium: upper ; Hawaii, middle ; Kurume No. 42, lower ; Kumamoto strain.

すべきである。

ただ NC 培地よりも NC-5培地 がはるかに 優ると思われる点は鼠癩菌 3 株の増菌が NC 培地では著しい優劣があるのに NC-5培地では 3 株とも比較的均一に増殖することであった。

菌株によって増殖に差があるのは菌株そのものの特性であるのは勿論であって in vivo の増殖曲線の差もこれによって生じるものである。C₃H マウスの足趾での増殖曲線より算出された generation time⁶⁾は、ハワイ株は 3.8日、久留米42号株は 4.4日、熊本株は10.1日であった。この data とこの NC-5培地での増殖度の差が一致したことは興味深い。すなわち NC-5培地で観察された増殖度はハワイ株と久留米42号株は殆んど同一で熊本株はやや劣ったのである。しかし、一方 in vitro での菌の増殖はその接種量にも非常に影響されるので本報ではスライドへの塗抹量が一定化されていないため、一概に菌株の特性とは規定しがたく、感染組織の含有量も考慮されねばならない。ただ、菌株間の増殖率に著しい差がないことが増菌用培地としては当然すぐれている訳でこの点からして NC-5培地が NC 培地よりかなり所期の目的に近づいたものということが出来よう。

結 論

NC-3 培地の基礎培地より 蔗糖を除き、1-シスチン塩酸塩を加えて NC-3培地を改良しこれを NC-5培地と呼称した。

この培地に鼠癩菌、ハワイ株、久留米42号株および熊本株を培養すると著明な増菌像がほぼ均一に観察された。

謝 辞

本研究の一部は日米医学協会議ライ専門部会研究費によった。技術的援助をいただいた境美鶴・岡田敏子技手補に謝意を表す。

文 献

- 1) 中村昌弘：無細胞培地における鼠癩菌の増菌，第4報，NC-3培地の開発，レブラ，**42**，161-164 (1973)。
- 2) 中村昌弘：無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌，第1報，NC 培地の開発，レブラ，**42**，47-51 (1973)。
- 3) Nakamura, M.: Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in cell-free medium containing α -ketoglutaric acid and cytochrome C. J. gen. Microbiology, **73**, 193-195 (1972)。
- 4) 中村昌弘：ネズミライ菌増菌用 NC 培地の改良 (NC-5 培地)，医学のあゆみ，**83**，201-202 (1972)。
- 5) Nakamura, M.: Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in cell-free liquid medium. Proc. Japan Academy, **49**, 42-46 (1973)。
- 6) 中村昌弘・金川貞子：ネズミライ菌 4 株の dd 系及び C₃H 系マウスにおける増菌曲線と世代時間，レブラ，**40**，179-183 (1971)。