Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in Cell-free Liquid Medium

8. Growth of *M. lepraemurium* in Culture Media which were Preserved before Inoculation

MASAHIRO NAKAMURA

(Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine)

Stabilities of the NC-5 and NC-7 medium for the growth of *M. lepraemurium* were studied. For this purpose, these media were kept at 37°C and 4°C for one and two months. Using slide culture method, *M. lepraemurium* were cultivated in a freshly prepared medium and the preserved media. In order to see the stabilities of the preserved media, the multiplication of *M. lepraemurium* in the preserved medium was compared to that in a freshly prepared one. The results obtained show that the bacilli multiplied equally in both freshly prepared and preserved media in the case of NC-5 medium, and that, in the NC-7 medium, the dominant growth was observed in the medium which was kept for one month at 37°C, and the inferior growth was seen in the medium preserved for two months at 37°C. Therefore, it could be concluded that the NC-5 medium would be very stable for use.

無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌

第8報 陳旧培地における鼠癩菌の増菌

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 1975年1月8日)

鼠癩菌をスライド培養法で無細胞液体培地 NC-5 培地¹⁾に培養すると、培養日数が経過するにつれてスライドの菌液塗抹部位に白濁が生じ、肉眼的に増菌が観察される²⁾。一定時期にスライドをとり出し、Ziehl-Neelsen 染色を施して光顕で観察すると疑いもない増菌像¹⁾²⁾³⁾が認められ、染色を施さずに走査電顕で観察すると、立体的にその増菌の状況を詳細に知ることが出来る⁴⁾⁵⁾。この増菌によって生ずる白濁は増菌が培養後4週ないし6週の時点で急速に進むためである。他方、菌液培養法で菌数をカウントすると、4ないし6週が log phase の後半部に相当し、培養8週で peak に達するので、増菌

の jump と称する菌体合成の最盛期は培養4週の時点であろうと思われる。若し培養4ないし6週で白濁の生じ方が顕著でない場合はその増菌は培養を継続しても進展の見込みは少ない。このような所見は塗抹菌量が僅少な時に経験される。このような場合、そのスライドを約1カ月の間隔で新しい NC-5 培地へ transfer すると、増菌は促進され、transfer しないスライドとの差は顕著である⁶⁾。

このスライド transfer の増菌促進効果が何に由来するものかを考察すると、最初に想像されるものは培養中の諸条件に影響される培地そのものの老廃にもとづく増

菌阻止現象であろう。その他、菌の代謝産物より生ずる inhibitor も考えられる。

そこで本報では NC-5 培地が incubate の条件でどの程度安定であるかを一定条件で保存された培地中での鼠癩菌の増殖度より検討したので報告する。

材料と方法

供試菌：教室において C_3H マウス皮下接種により継代されている鼠癩菌ハワイ株 (M-57) を用いた。レプロームを無菌的に採取し、ハサミで細切、滅菌蒸留水 (Aq) を注ぎ、pipetting により菌浮游液を作製、これに 0.1% の割になるようにプロナーゼ (科研化学) を加え、 37°C で 30 分間消化、2,500 rpm 30 分遠心、上清をすてて沈渣を Aq で再浮游。使用にさいしてはこれに 0.1% の割に牛血清アルブミン V (Armour) を加えた。

供試培地：既報¹⁾の NC-5 培地と NC-5 培地の作製するさいに加える添加物 (Additives) のうちチトクローム C を控除した NC-7 培地²⁾と呼称する 2 種類の培地を用いた。

鼠癩菌培養法ならびに増菌判定法：既報¹⁾のスライド培養法によった。シリコン・スライドに上記菌液を 1 滴塗抹し、肉眼観察による白濁形成の程度および一定日後にとり出して Ziehl-Neelsen 染色を施された光顕的観察によって増菌の有無ならびに程度を判定した。

実験手技：詳細は成績の項において一括して述べる。

成 績

1. 培地の保存

NC-5 と NC-7 培地を作製し、これらを 4°C と 37°C に保存、1 カ月後、別に NC-5 と NC-7 培地を作製して同一条件で保存、更に 1 カ月後、両培地を作製して前に保存した 2 カ月及び 1 カ月保存の培地とを合せて培養実験を同時に開始した。従って培地の作製は時期を異にして 3 回別個に行ったわけである。添加物として用いるヤギ血清は冷蔵庫保存の同一ロットのものをを用いたが、 α -ケトグルタル酸外の添加物はその都度作製したので、同一条件で培地を作製した筈であるが、多少の差異は否定できない。これらを 2 カ月保存培地、1 カ月保存培地および新鮮培地と呼称することにする。

培地保存の条件は培液を 8 ml 宛中型試験管に分注して直ちにゴム栓で密栓して保存した。

菌塗抹スライドを投入する前に保存培地の色調を新鮮培地と比較したがその間に差はなかった。また 2 カ月および 1 カ月保存培地共沈澱などの変化は認められなかつ

た。

2. 鼠癩菌増殖の判定

新鮮培地、1 カ月保存培地および 2 カ月保存培地にスライド法で鼠癩菌を 30°C で 2 カ月間培養した光顕所見を図 1 および図 2 に示す。

NC-5 培地、NC-7 培地共保存期間の長短にかかわらず鼠癩菌は増殖した。しかしその程度には多少差があり、表 1 に示すとおりである。NC-5 培地では新鮮培地、保存培地ともによく増菌した。ことに 37°C 2 カ月保存の培地でも新鮮培地に劣らずよく増菌がみられたことは興味があった。また NC-7 培地では、1 カ月保存培地が新鮮培地より増菌度が良好であったことも意外であった。2 カ月保存培地では、しかし、新鮮培地より劣った増菌像を示した。

2 カ月保存培地と 1 カ月保存培地では菌塗抹スライドを投入して増殖判定まで 2 カ月の培養期間があるので総保存期間はそれぞれ 4 カ月および 3 カ月になる。従ってとくに NC-5 培地は極めて安定な培地といえる。

Table 1. Growth of *M. lepraemurium* in NC-5 and NC-7 media which were preserved

Medium	NC-5	NC-7
Freshly prepared	+++	+++
Preserved :		
One month : 4°C	+++	+++
One month : 37°C	+++	+++
Preserved :		
Two months : 4°C	+++	++
Two months : 37°C	+++	+

考 察

スライド培養法によって鼠癩菌を NC-5 培地で培養すると明かな増菌が認められる。このさい、一定培養期間毎にそのスライドを新しい NC-5 培地に transfer すると、その増菌は促進され、その病原性は非 transfer 群に比すると明かに強力であることを先に報告した³⁾。このことはスライドを transfer することによって、活性をもった菌数が増加していることを疑いもなく示している。非 transfer、即ち 1 代では増菌がある時点で停止するのに transfer することによって 2 次の増菌が開始するのでこれは継代培養とも言うべき現象であろう。

しかし、一般細菌では初代で増菌が停止するのは代謝

Fig. 1 Microscopic features of the growth of *M. lepraemurium* in NC-5 medium. 1) "0" time, 2) freshly prepared medium, 3) preserved one month at 4°C, 4) at 37°C, 5) preserved two months at 4°C, and 6) at 37°C. (1,000×magnification)

Fig. 2 Microscopic features of the growth of *M. lepraemurium* in NC-7 medium. 1) freshly prepared medium, 2) preserved one month at 4°C, 3) at 37°C, 4) preserved two months at 4°C, and 5) at 37°C. (1,000×magnification)

産物の蓄積が培地内に inhibitor を産生する現象として表現されるものと考えられるが、他の考え方では一種のフィードバック現象とも思われる。

鼠癩菌の培養については液体培地での増菌現象はこの NC-5 培地が最初のものであるのでまだ一般細菌における増殖現象でえられたような種々なるデータは揃っていない。従ってスライドの transfer によって増菌が促進されるこの現象を一般細菌のそれに相当するものか、或は NC-5 培地そのものが長い培養の間に培養に不適当なものに変化するものか未だ不明である。もし前者であるならばスライドの transfer は継代培養の 1 代に相当するものと考えていいわけである。何故ならば、小川⁹⁾の固形培地における継代でもコロニーの大部分をそっと次の新しい培地に植えつぐことを以て 1 代と表現しているからである。それほど鼠癩菌は発育増殖の弱い菌とも言えるし、考案された培地がまだ不完全とも言えるのである。

もし後者であるならば NC-5 培地が一体どの位の安定であるか、即ち 30°C 又は 37°C に維持して何カ月間もとの鼠癩菌の増殖を起させる能力を保持できるかを知るべきである。

今回の実験はこの後者のことを明らかにすべく実験が行われた。NC-5 培地¹⁾というのは α -ケトグルタル酸、チトクローム c、ヘミンおよび L-シスチンを EKP 培地に加えて合成したものである。この添加物のうちヘミンを除けば α -ケトグルタル酸、チトクローム c および L-シスチン共余り安定な物質ではない。従って長期培養の間に酸化や分解の可能性が強い。即ち自然に老廃の傾向が強い。

しかし、得られた結果は予想に反して、37°C 2 カ月保存の NC-5 培地を用いて更に 2 カ月の培養を行っても鼠癩菌の増殖は新鮮な NC-5 培地と劣らぬ成績を示した。チトクロームを除いた NC-7 培地では、しかし、予め 37°C 2 カ月保存したものは新鮮培地に比すると増殖能力は劣った。しかし増殖が起らなかったというのではなかった。興味あったことは 37°C 1 カ月保存した NC-7 培地は新鮮培地よりも増殖が明かに良好であった。この原因は不明である。

以上の得られた結果から考察されることはスライドを transfer せずにおくと増菌が一定の程度で停止することは NC-5 または NC-7 培地そのものが培養期間に変化して使用に堪えられなくなるのではなくて、鼠癩菌が増殖の間に何らかの発育阻止物質を産生して培液中に放

出するのか、ゴム栓で密栓された限られた空気層にその原因があるのか、或はスライドを transfer する操作の中に菌体が空気にふれるなどの刺激が 2 次増殖を促すのか今後の検討にまたねばならない。

結 論

鼠癩菌増殖用液体培地 NC-5 および NC-7 培地の安定性を検討するため予めそれらを 37°C 2 カ月 および 1 カ月又は 4°C 2 カ月 および 1 カ月保存した培地を用いてスライド培養法により鼠癩菌を培養し新鮮培地での増殖と比較した。その結果 NC-5 培地では予め保存した培地でも新鮮培地と同程度鼠癩菌の増殖を惹起した。NC-7 培地では鼠癩菌の増殖は 1 カ月保存培地は新鮮培地のそれより優れたが 2 カ月保存培地は使用には耐えるがその程度は劣った。従って、NC-5 培地は極めて安定な培地といえる。

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岡田敏子・村岡資子技手補に謝意を表す。

文 献

- 1) 中村昌弘：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、レブラ、42, 205-209, 1973.
- 2) Nakamura, M.: Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in cell-free liquid medium. Pro. Jap. Acad., 49, 42-46, 1973.
- 3) Nakamura, M.: Quantitative Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in a Cell-free Liquid Medium (NC-5). J. Gen. Microbiol. 82, 385-391, 1974.
- 4) Yoshii, Z. and Nakamura, M.: Scanning electron microscopy of *Mycobacterium lepraemurium* cultivated on the slide glass. Proc. Jap. Acad., 49, 47-50, 1973.
- 5) Yoshii, Z. and Nakamura, M.: Scanning Electron Microscopic Studies on the Growth Features of *Mycobacterium lepraemurium* in Cell-free Medium. J. Gen. Microbiol., 83, 145-152, 1974.
- 6) 中村昌弘：鼠癩菌の無細胞液体培地での培養、日細菌誌、29, 517-525, 1974.
- 7) 中村昌弘：無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌。第 6 報 NC-5 培地の組成の検討。レブラ、43, 250-253, 1974.
- 8) 中村昌弘：無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌。第 7 報 NC-5 培地培養鼠癩菌。レブラ、

- 44, 7-12, 1975.
- 9) 小川辰次, 本村恵子: 鼠らい菌に関する研究(第4報) 鼠らい菌(ハワイ)株培養の試み—分離培養, 継代培養, 復元試験の続報, レブラ, 40, 199-207, 1971.