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

**9. Effect of Transfer of the Smeared Slide
on the Growth of *M. lepraemurium***

MASAHIRO NAKAMURA

(Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine)

The experiments of the factors influencing the growth of *M. lepraemurium* smeared on slides and cultivated in NC-5 medium were carried out as following ways:

1. Slide-transfer group: the group which a smeared slide was transferred to a freshly prepared medium at a definite interval.
2. Air-exposure group: the group which a slide was just taken out and put again in the same medium at a definite interval.
3. Stopper-opening group: the group which a rubber stopper was just taken out and sealed again at a definite interval.
4. Control: no treated group.

The growths of bacilli treated with the four procedures were compared. The most remarkable growth was observed in the case of the air-exposure group, and the inferior growth was obtained in control group. From the results, it could be presumed that periodical exchange of air in sealed culture medium might be necessary for the growth of bacilli.

In the experiments of bacillary cultivation, the suspensions of bacilli were inoculated and cultivated in 50 ml of NC-5 medium, which were distributed to a 50 ml-flask, 100 ml-flask, and 200 ml-flask, respectively. After two months' cultivation at 30°C, bacterial cells were collected by centrifugation and the wet weights of sediments were measured. The best yield of bacterial cells was obtained when the bacilli were cultivated in a 50 ml-flask, and the poor yield was observed in the case of a 200 ml-flask. Therefore, it would be presumed that *M. lepraemurium* might multiply under a slightly anaerobic condition, rather than aerobic one.

From the results of two experiments mentioned above, it could be emphasized that the growth of *M. lepraemurium* would unexpectedly depend upon the influence of air.

無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌

第9報 菌塗抹スライド transfer の鼠癩菌増菌に及ぼす効果の検討

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)

既報¹⁾において鼠癩菌をスライド培養法で NC-5 培地に培養するさい、スライドを新しい培地へ約1カ月の間隔で transfer すると増菌が促進されることを述べた。また前報²⁾においてその増菌現象は使用培地が培養の間に老廃化して使用に耐えなくなるのを更新するのではないことも証明した。なぜなら NC-5 培地は想像以上に安定な培地で菌接種前に2カ月間 37°C に保存していても使用に耐え鼠癩菌をよく増殖させたからである。

それならば、菌塗抹スライドを transfer することによって増菌が促進される現象のメカニズムは果して何であろうかということについて多少の検討を試みたので、その概略を述べることにする。

材料と培地

供試菌：鼠癩菌ハワイ株を用いた。教室において C₃H マウスに継代されている (M-57) 小指頭大の皮下レプロームを無菌的に採取、ハサミで細切、滅菌蒸留水 (Aq) 20 ml に浮游静置、上清をとり、これに1%プロナーゼ (科研) 液を0.1%になるように加え、37°C、30分処理、2,500 rpm 30分遠心、沈渣を Aq 5 ml に再浮游、冷蔵庫に1晩静置、翌日一旦 pipetting 更に暫時静置、上清をとり、これに0.1%の割に牛血清 アルブミン V (Armour) を加えたものを原液とした。実験にさいしてはこれを10倍及び100倍希釈して用いた。それぞれ部分精製鼠癩菌原液、10倍希釈菌液、および100倍希釈菌液と称する。

使用培地：NC-5 培地³⁾⁴⁾を供試した。

方法と成績

1. スライド培養法

既報³⁾記述のシリコン・スライドを用い、これに別個に部分精製鼠癩菌原液、10倍希釈菌液および100倍希釈菌液を1滴塗抹、NC-5 培地に投入して 30°C で培養する。

増菌の判定は肉眼的観察によるスライドの菌塗抹部位の白濁形成度と12週間培養後スライドをとり出し Ziehl-Neelsen 染色を施して顕微鏡観察による菌塊形成度、菌数増加度の総合的判断によった。

実験群として下記の4群をセットした。更に NC-5 培地量を中型試験管 (10.5 cm×1.3 cm) 当り 8 ml 分注したものと 4 ml 分注したものの2群を設け下記の4実験を試みた。

1) transfer 群：菌塗抹スライドを2週間毎に新しい NC-5 培地に transfer するもの。

2) air-exposure 群：2週間毎に菌塗抹スライドをピンセットでとり上げ、一旦空気にさらしたあと、すぐそのままの培液におさめ、同じゴム栓で密栓するもの。

3) ゴム栓開放群：2週間毎にゴム栓を無菌的にあげ、直ちにまた密栓するもの。

4) 無処置群：何らの処置も施さぬ対照になるもの。

以上の処置を行って培養12週後の鼠癩菌の増殖の状況を肉眼的に観察すると図1のようである。

NC-5 培地 8 ml で培養したものでは増菌の最も顕著であったものは air-exposure 群であった。次に transfer 群とゴム栓開放群が同程度の増菌を示してこれに次ぎ、無処置群の増菌がこれらに比すると最も不良であった。

NC-5 培地 4 ml で培養したものは図1の下の方の如く実験4群共に著しい差はなかった。

なお顕微鏡観察と総合して判定した増菌の成績をまとめると表1のようであった。一般的にみて 4 ml 培液での増菌は 8 ml 培液のそれに劣った。

2. フラスコ培養法

NC-5 培地 50 ml を 50 ml 用、100 ml 用および 200 ml 用のフラスコに分注した。このさいの空気層の体積はそれぞれ 12 cm³、81 cm³ および 194 cm³ となった。これ

Fig. 1 Macroscopic findings of the growth of *M. lepraemurium* cultivated in NC-5 medium.

Upper: culture medium, 8 ml/tube.

Lower: culture medium, 4 ml/tube.

From left to right: Every two weeks, transfer a slide to freshly prepared medium, just take out a slide and put in again, just open a rubber stopper, and no treatment.

Table 1 Effect of air on the growth of *M. lepraemurium* in NC-5 medium

Treatment	Volume of medium/tube	
	8 ml	4 ml
Transfer a slide to fresh medium	++	++
Take out a slide and put in	++	++
Open a rubber stopper	++	++
Control: No treatment	++	++

Fig. 2 Macroscopic findings of *M. lepraemurium* cultivated in NC-5 medium, which were collected by centrifugation.

Upper: cultivated at 30°C.

Lower: incubated at 4°C.

From left to right: 50 ml of NC-5 medium in a 50 ml, 100 ml, and 200 ml flask.

Table 2. The growth of *M. lepraemurium* in flask culture of NC-5 medium

Volume of flask used	Volume of NC-5	Volume of air part	Culture temperature	
			30°C	4°C
50 ml	50 ml	12 cm ³	22.5 mg*	4.2 mg
100 ml	50 ml	81 cm ³	29.7 mg	5.6 mg
200 ml	50 ml	194 cm ³	25.3 mg	6.4 mg

*: Wet weight of bacilli harvested after 62 days' incubation

に部分精製鼠癩菌原液の0.2 ml を接種，ゴム栓で密栓，30°C で培養する。対照としては4°C に保存したものを準備した。

2 カ月後，上清を静かに除き，沈澱部を遠心管にとり2,500 rpm 20分遠心，沈澱を集め湿菌量を秤量した。その結果は図2，表2のとおりである。図2は遠心によって集められた沈澱（菌体）である。表2では秤量された湿菌量を示した。勿論，遠心によって集められたものが鼠癩菌であることは光顕的観察で確かめられた。

これによると30°C で培養することにより鼠癩菌は約4～5倍の重量の増加を来した。増加率のもっとも高かったのは50 ml 用フラスコで培養された場合で，100 ml 用フラスコでこれと大差ないが，200 ml 用フラスコではこれより劣った。

考 察

スライド培養法において菌塗抹スライドを一定間隔で新しい培地へ transfer すると鼠癩菌の増菌が促進される事実を示し，これが培養条件下で自然に老廃するかもしれない NC-5 培地の更新によるものではないことは前報の NC-5 培地の安定性の実験結果から示唆された。本報においては増菌促進に及ぼすスライド transfer 効果の解析の一部として，培養基内に閉された空気に着目して実験を計画した。小関，安地⁹⁾，森⁹⁾らの固形培地での鼠癩菌の増殖が用いるゴム栓によって著しい影響をうけるという実験成績に示唆をえたものである。即ち，彼らは密なゴム栓よりもゴム栓に糸を通した通気培養法が著明な増菌効果を示すという事実を確認している。このことは鼠癩菌の増菌には絶えざる少量の空気の補給が必要であることを示している。

NC-5 培地が予想以上に安定なものであることが判ると，スライド transfer の効果のメカニズムを培地以外のものに求めざるをえない。そこで培液を交換することなく，スライドを空气にさらす操作のみの効果を検討したところ，この air-exposure で鼠癩菌の増菌が促進された。更に単にゴム栓を一定期間毎に一時開放する操作のみでもスライド transfer と同程度の増菌がえられた。このことは鼠癩菌の増殖が好気的条件下でえられることを示している。著者はさきに NC 培地⁷⁾を用いてこの空气の影響を検討し嫌気的条件下では全く増菌が認められないことを示したが，今回の成績はこの再確認にもなる訳である。またこのさい，余り空气量の多い条件下での培養は増菌現象に好影響を与えないことも示したが今回フ

ラスコ培養での成績でも，空气量の多い条件下より少い条件の方が増菌量の多いことも示された。

従って鼠癩菌の増殖には少量の適度の空气の導入が必要であることを明かに示したものであるといえる。

本実験ではスライドを空气にさらしたあともとの培地に投入して培養を行うのであるがこれでも新しい培地へスライドを transfer する操作より増菌度が良好であったことは培地内に鼠癩菌増菌に伴って生ずる代謝産物とくに毒性物質の蓄積は考えられないことになるがこの点については更に将来詳細検討する予定である。

結 論

鼠癩菌をスライド培養法で NC-5 培地に培養するさいスライドを2週間毎に新しい培地へ transfer する群 (transfer 群) とスライドを2週間毎にとり出して暫時空气にさらし，またもとの培地で培養する群 (air-exposure 群) とゴム栓を2週間毎に瞬間開放する群と無処置群との4群での増菌度を比較検討した結果最も増菌の良好であったものは air-exposure 群であり，transfer 群とゴム栓開放群とが同程度でこれに次ぎ無処置群が最も顕著でなかった。これらの結果から，鼠癩菌の増菌には培地上層部の空气の適時の交換が必要であると推測される。

菌液培養法のさい，NC-5 培地 50 ml を 50, 100 および 200 ml 用フラスコに分注して，これらの中で鼠癩菌を培養すると，増菌率は 50 ml および 100 ml 用フラスコで培養した場合最良で，200 ml 用フラスコ培養が最も劣った。このことから好気的条件下より，やや嫌気的条件下の方が鼠癩菌の増菌に適しているものと推論される。

以上の2実験から結論しうるのは鼠癩菌の増菌は予想以上に空气に影響されるということが出来る。

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：鼠癩菌の無細胞液体培地での培養，日細菌誌，29，517-525，1974.
- 2) 中村昌弘：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，レブラ，44，13-18，1975，
- 3) 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.
- 4) Nakamura, M.: Quantitative multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in a cell-free liquid medium (NC-5), J. Gen. Microbiol. 82, 385-391, 1974.
 - 5) 小関勇一, 安地 節: 小川菌の発育と小川培地の pH, レブラ, 42, 89-90, 1973.
 - 6) 森 竜男: 鼠癩菌の増殖因子の探究 (大量菌接種の場合) 第23回日本癩学会東部地方会, 1974年11月.
 - 7) 中村昌弘: 無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌. 第3報 鼠癩菌増菌のための NC 培地の培養条件, レブラ, 42, 155-160, 1973.