Successive Cultivation of *M. lepraemurium* by Bacterial Mass Inoculation

TATSUO MORI

*Department of Leprology, Research Institute for Microbial Diseases,
Osaka University, Yamada Kami Suita Osaka Japan*

Since *M. lepraemurium* Hawii was isolated on 1% Ogawa yolk medium,¹⁾⁻⁹⁾ Kozeki et al¹⁰⁾¹¹⁾ and Mori¹²⁾ succeeded in the follow-up-experiments of Ogawa's method, but successive inoculation with smooth suspension was not succeeded, just as described at first by Ogawa.

It was still obscure that some growth-negative tubes were always observed in cases of successive inoculation and primary isolation, in despite of bacterial mass inoculation. The difficult problem is to solved when the single cell culture of *M. lepraemurium* would be succeeded. As it was very difficult to get 100% success of the successive inoculation even in the bacterial mass inoculation, some conditions for getting the better efficiency were carefully studied by the method of bacterial mass inoculation.

1) Successive inoculation of *M. lepraemurium* was not affected on the 1% Ogawa yolk medium without malachite green.

2) Successive inoculation of *M. lepraemurium* was independent on any modified 1% Ogawa yolk media supplemented respectively with the following substrates: cystin, cystein special agar noble, sodium citrate, sodium α -ketoglutarate, glucose, protoporphyrin and water- or butanol-extract of 1% Ogawa yolk medium on which *M. lepraemurium* had grown.

3) Successive inoculation of *M. lepraemurium* was slightly inhibited on the modified 1% Ogawa yolk medium supplemented with sodium pyruvate.

4) Addition of hemin to 1% Ogawa yolk medium gave a good result for successive inoculation of *M. lepraemurium*.

5) In successive inoculation of *M. lepraemurium*, air-loose condition through a small hole in gum stopper gave the better result than air-tight condition without a small hole in it.

6) The organism from old culture over 2 months was not good for successive inoculation, and young rough organism from 30 to 40 days culture was most suitable. More over, the organisms should not be scattered on the surface of medium. It was important to inoculate crowdly for getting good results.

菌塊接種による鼠癩菌の継代培養

森 竜 男

(大阪大学微生物病研究所癩部門)

(受付 50年1月27日)

小川ら¹¹⁻⁹⁾が鼠癩菌の分離培養に成功していらい、小関¹⁰⁾¹¹⁾、森¹²⁾らの追試の成績が報告されているが、小川らが初期に記載したように菌液にして継代を行うとうまく成功せず、また初代分離培養にて大量菌接種にもかかわらず、常に増殖陰性の試験管が見られることは依然として解決されていない。

鼠癩菌の単個菌培養ができないようでは自然界に存在する微量の鼠癩菌を発見することは不可能であるし、また薬剤の効果の判定や増殖促進因子の追跡において、種々の困難をとまなうことは明らかである。大量菌塊接種による鼠癩菌の継代培養においても100%継代に成功させることは非常にむづかしいので、単個菌培養はしばらくおき、大量菌塊接種による継代培養の条件を種々検討したので、今回はそれについて報告する。

材料および方法

継代鼠癩菌は小川らの分離した鼠癩菌様抗酸菌を森¹²⁾のところで *Mycobacterium lepraemurium* Hawaii と同定し、約3年にわたって継代された菌を用いた。培地としては1%小川卵黄培地を対照として、修飾1%小川卵黄培地は基礎培地に添加物を加えたものを用い、1%小川卵黄培地にならって作った。ヘミン、シスチン、プロトポルフィリン、クエン酸は基礎培地に加えてオートクレーブ滅菌し、システイン、 α -ケトグルタル酸、焦性ブドウ酸、ブドウ糖はオートクレーブ滅菌した基礎培地に後で加えた。ヘミンの添加は中村¹³⁾¹⁴⁾の行った方法に従った。ブタノール抽出培地画分および水抽出培地画分は85°Cの2回の間湯滅菌の後、オートクレーブ滅菌した基礎培地に加えた。基礎培地100mlにつき40本の卵黄培地からの抽出物を濃縮して加えた。水抽出の方法は増殖した鼠癩菌を除いた後の卵黄培地に蒸留水20mlを加え一夜放置し、水層に移る画分を減圧濃縮した。ブタノール抽出画分は上記の水抽出を終えた卵黄培地をビーカーに移して水飽和ブタノールを加えて抽出し、濾紙に

て濾過したブタノール画分を蒸留水を少量加えながら減圧濃縮してブタノールを十分に除いた。

マラカイトグリーン(一)というのはマラカイトグリーンを加えずに卵黄培地を作ったものをいう。

ゴム栓: air tight のゴム栓としてはダブルキャップゴム栓を用い、air loose のゴム栓としてはダブルキャップゴム栓に手術用絹糸5号を4重にして通して通気穴を作ったもの、および栄研のゴムキャップ(内側に側溝あり)を用いた。

結 果

中村の NC 5 培地¹⁵⁾にシステインを用いているので、システイン67 μ g/ml になるように加えた修飾1%小川卵黄培地を作ってみたが、Table 1 にみられるように対照の1%小川卵黄培地と、鼠癩菌継代の陽性率において差はなかった。

小関¹⁰⁾は1%小川卵黄培地のゴム栓に手術用の糸を通して通気性としたものを用うると鼠癩菌の発育のいいことを報告しているので、air tight と air loose の条件で1%小川卵黄培地に鼠癩菌継代陽性率を比較してみたが、Table 1 にみられるように第1回目の成績では大差なかったが、第2回目の成績では air loose の条件が菌塊の増量の点で air tight の条件よりはるかにまきっていた。

Table 1 および Table 2 にみられるように、マラカイトグリーンは加えても加えなくても鼠癩菌の増殖に影響がなかった。1%小川卵黄培地にシステインを加えた実験を Table 1 に示したので、シスチンを加えた例を、また寒天にて固めた固型培地を鼠癩菌の増殖促進因子検索のために用うる関係上、special agar noble を加えた例を、Table 2 に示したがともに添加物の影響はなく鼠癩菌はよく増殖した。

中村¹⁵⁾の No. 5 培地にクエン酸、 α -ケトグルタル酸、焦性ブドウ酸、ブドウ糖を用いているので、これ

Table 1 Passage Cultivation of *M. lepraemurium* on Modified 1 % Ogawa Yolk Media

Date of Inoculation	Days of Cultivation	Stopper	Modification	Results of Tube Numbers
15, 3, 1973	42	Air Tight	—	+++28 +16 -59
	73	"	—	+ 48 -55
	42	Air Tight	Cystein 67 μ g/ml	+++27 +16 -61
	73	"	"	+ 51 -53
30, 4, 1973	61	Air Tight	—	+++17 +13 -69
	61	Air Loose	—	+++17 +15 -68
18, 6, 1973	71	Air Tight	Malachite Green(-)	+++17 +35 -33
5, 7, 1973	68	Air Tight	Malachite Green(-) Hemin 5 μ g/ml	+++41 -5
18, 7, 1973	55	Air Tight	Hemin 5 μ g/ml	+++35 +17
23, 7, 1973	50	Air Loose	Hemin 5 μ g/ml	+++45
	50	"	Malachite Green(-) Hemin 5 μ g/ml	+++24
27, 10, 1973	72	Air Loose	Malachite Green(-)	+++88 +10 -5
15, 12, 1973	110	Air Loose	Malachite Green(-) Hemin 5 μ g/ml	+++21 -9

Table 2 Passage Cultivation of *M. lepraemurium* on Modified 1 % Ogawa Yolk Media

Date of Inoculation	Days of Cultivation	Stopper	Modification	Results of Tube Numbers
29, 9, 1973	110	Air Loose	Hemin 5 μ g/ml Cystin 800 μ g/ml	+++14
30, 9, 1973	109	Air Loose	Hemin 5 μ g/ml Special Agar Noble 0.7%	+++20
	109	Air Loose	—	+++113
24, 10, 1973	62	Air Loose	Citrate 3.7mg/ml	+++10
	62	"	α -KGA 1.25mg/ml	+++10
	62	"	Pyruvate 3 mg/ml	+ 10
	62	"	Glucose 3.7mg/ml	+++10
26, 12, 1973	71	Air Loose	Pyruvate 4.1mg/ml	+++8 +7 -6
28, 12, 1973	53	Air Loose	Hemin 12.5 μ g/ml Butanol Extract of Growth Medium	+++32 -9
	67	Air Loose	Hemin 12.5 μ g/ml Butanol Extract of Growth Medium added Protoporphyrin	+++32 +3 -9

Table 3 Passage Cultivation of *M. lepraemurium* on Modified 1 % Ogawa Yolk Media

Date of Inoculation	Days of Cultivation	Stopper	Modification	Results of Tube Numbers	
6, 11, 1973	118	Air Loose	Malachite Green(-)	+++94(53%)	± 82(47%)
15, 11, 1973	62	"	"	+++14(8%)	++21(12%)
				+ 24(14%)	- 100(58%)
				- 14(8%)	
9, 2, 1974	132	Air Loose	Hemin 5 µg/ml Malachite Green(-)	+ 125(70%)	- 55(30%)
20, 2, 1974	122	Air Loose	Malachite Green(-)	+ 36	- 3
			"		
			Water Extract of Growth Medium	+ 68	- 11
9, 3, 1974	82	Air Loose	Hemin 5 µg/ml Malachite Green(-)	+ 5	- 44
29, 4, 1974	52	Air Loose	Hemin 5 µg/ml	+++172(85%)	-30(15%)
12, 6, 1974	62	Air Loose	Malachite Green(-)	+++231(97%)	- 6(3%)
31, 7, 1974	86	Air Loose	"	+++268(95%)	-14(5%)
31, 8, 1974	61	Eiken Cap	"	+++251(94%)	±15(6%)

Table 4 Effect of Hemin and Protoporphyrin on the Growth of *M. lepraemurium*

	after 45 days	85 days		45 days	85 days
Control	+++ 9 ++ 13 ± 17	+++ 24 + 4 - 11			
Hemin 5 µg	+++ 10 ++ 20 + 7	+++ 33 + 1 - 3	Protoporphyrin 5 µg	+++ 7 + 8 + 18 - 4	+++ 26 + 3 - 8
10µg	+++ 2 ++ 16 + 18 - 1	+++ 24 + 4 - 3 × 7	10µg	+++ 8 ++ 13 + 13 - 5	+++ 21 + 7 - 8 × 3
20µg	+++ 3 ++ 27 + 7 - 1	+++ 31 + 4 - 3	20µg	+++ 9 ++ 11 + 14 - 3	+++ 23 + 5 - 9
50µg	+++ 0 ++ 0 + 6 - 29		50µg	+++ 10 + 9 + 14 - 6	+++ 22 + 5 - 12

× contamination

ら炭素源の添加効果を検討したが、Table 2 に示すように鼠癩菌の増殖は添加物を加えない対照の培地に劣るとも優るものではなかった。中でも焦性ブドウ酸の添加において増殖が悪かったので2回実験を行つたが、やはり焦性ブドウ酸を添加すると鼠癩菌の増殖はよくなかった。

鼠癩菌の継代において大量接種すれば、接種菌が培地にして増殖に好都合な条件を作るのではないかと考えて、鼠癩菌のよく増殖した1%小川卵黄培地（マラカイトグリーン無添加）から水抽出物（Table 3）およびブタノール抽出物（Table 2）を作り、夫々1%小川卵黄培地に添加してみたが、これによって著明に鼠癩菌の増殖がよくなることはなかった。

中村¹⁴⁾は NC 培地にヘミンを添加した NC 3 培地では鼠癩菌の増殖がよくなると報告しているので、1%小川卵黄培地にヘミンの添加効果を検討した。Table 1 にはヘミンを添加した方が鼠癩菌継代陽性率がよかったが、Table 3 の1974年3月9日に継代した実験にてはヘミンの添加効果は全然なかった。ここで気づいたことは継代に用うる菌が2ヶ月を過ぎた古い培養の菌では死菌が多く継代の陽性率が悪くなるということであった。そこで継代の鼠癩菌を30日から40日間培養し、よく増殖した Rough の菌を用いて、ヘミン添加の影響をみた。Table 3 の最後の欄にみられるように、ヘミンの添加、無添加によって鼠癩菌の継代にさしたる影響はないという結果がえられた。ヘミン無添加の培地で最も継代率のよかったときは、237 本中 6 本が陰性で、陰性率は僅か 3% という成績であった。ヘミンと同時にプロトポルフィリンの添加効果も検討したが、Table 4 に示したようにプロトポルフィリン添加は対照の 1%小川卵黄培地の成績と大差なく、ヘミン添加では多少ながら対照培地よりまさるようであった。しかしながらヘミンはトリメチルアミンにとかしているの、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の量を添加するとトリメチルアミンの影響が出るためかすべて陰性の結果となっている。

Table 3 の1973年11月15日継代の欄にて-14 (8%) と-100 (58%) と陰性の成績が二つに分けて記載しているが、-14 (8%) というのは大量接種して1ヶ月後菌塊の増殖がみられなかったもの、-100 (58%) というのは1ヶ月目では増殖と判定したもの内、凝水とともに培地全面に塗抹して拭いた結果2ヶ月後には増殖しなかったということである。これは大量菌接種にて1ヶ月後に増殖と判定した群の中に増殖のたしかでなかったものが含まれていることを示し、大量菌接種における増

殖の判定は慎重にすべきであると思う。

Table 2 において添加物の影響をみた実験においては100%増殖をみたことが多いが、これは鼠癩菌を多量に収獲する目的ではなかったため、継代に用うる鼠癩菌を培地の中央に集簇して継代したためである。1%小川卵黄培地にて鼠癩菌を増菌させて多量に集める目的のために培地一面に点々と菌塊を移植する場合は、全部の菌が枯死することがあるので、継代にはなるべく密に移植することが必要である。

考 察

鼠癩菌の継代において斜面培地の中央に菌塊を少量移植するのでは air tight と air loose の条件の差は著明に現われない。試験管内に初めに含まれていた酸素の量が鼠癩菌の増殖を支持する程に存在しているからで、移植菌量が多くなり、また増菌が進み試験管内の酸素の消費量が多くなるに従って air tight のゴム栓では酸素不足の現象が起るために、移植された鼠癩菌の増殖が阻害されて、自己融解を起すのであろう。このように一見 smooth 型に変わったように思われるコロニーから菌塊を移植すると継代率が悪くなる。既ち自己融解のために死菌が多くなっているのであろう。

ダブルゴム栓に手術用の絹糸を通して通気させる方法も、その通気穴がふさがることがあり、継代移植した鼠癩菌の増殖率に影響を興えることを考えて、栄研のゴム栓を用いた。このゴム栓は内側に側溝があり、それを通じて確実に通気状態が保たれるものである。

1%小川卵黄培地に添加物を加えて鼠癩菌の継代率をよくせしめようと考えた初期の目的に多少とも貢献した物質としてヘミンをとりあげることができたが、ヘミンを添加せずとも、air loose の条件で30日ないし40日培養のよく増殖した鼠癩菌の菌塊を斜面培地の中央に集簇すれば、概ね100%に継代を成功させることができる。なおヘミンを5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の割に添加すればこれを一層確実にすることができる。

総 括

1. 1%小川卵黄培地からマラカイトグリーンを除いても鼠癩菌の継代培養に影響を与えなかった。
2. 1%小川卵黄培地に次のような物質を添加しても鼠癩菌の継代培養に影響を与えなかった。シスチン、システイン、special agarnoble、クエン酸ソーダ、 α -ケトグルタル酸ソーダ、ブドウ糖、プロトポルフィリン、鼠癩菌の増殖した培地の水抽出画分およびブタノール抽

出画分。

3. 1%小川卵黄培地に焦性ブドウ酸を添加すると鼠癩菌の継代培養に悪影響を与えた。

4. 1%小川卵黄培地にヘミンを添加すると鼠癩菌の継代培養によりよい結果がられた。

5. ゴム栓に細穴をあけた air loose の条件が air tight の条件よりも鼠癩菌の継代培養により結果を与えた。

6. 鼠癩菌の継代に用うる菌は2ヶ月以上経たものはさけるべきで、30日ないし40日間培養の増殖のよい Rough の菌を用うるのがよい。さらに継代の陽性率をあげるためには培地一面に分散して播種するのではなく、培地の中央に集簇して播種するのがよい。

謝 辞

本研究にあたり培地作成の労の一部を担当していただいた斉藤和子さんに深謝するとともに、研究費の一部は日米医学協力計画らい専門部会および World Health Organisation の援助によった。ここに謝意を表す。

文 献

- 1) 小川辰次, 本村恵子: 鼠らい菌に関する研究, 第1報, 鼠らい菌培養の試み, レプラ, 38: 246-254 (1969).
- 2) 小川辰次, 本村恵子: 鼠らい菌に関する研究, 第2報, 我々の分離した菌の性状に関するその後の成績と1%卵黄培地の吟味, レプラ, 40: 8-15 (1971).
- 3) 内田三千太郎, 小川辰次: 鼠らい菌培養の小実験, レプラ, 40: 57-61 (1971).
- 4) 小川辰次, 本村恵子: 鼠らい菌に関する研究, 第3報, 初代培養における前処理の雑菌侵入およびハワイ株様抗酸菌の発育に及ぼす影響, レプラ, 40: 149-155 (1971).
- 5) 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)株培養の試み一分離

- 培養, 継代培養, 復元試験の続報, レプラ, 40: 199-207 (1971).
- 6) 小川辰次, 平木美奈子: 鼠らい菌に関する研究, 第5報, 1%卵黄培地に混入されている KH_2PO_4 , グルタミン酸ナトリウム, グリセリンの量および培地 pH の検討, レプラ, 41: 113-117 (1972).
  - 7) 小川辰次, 平木美奈子: 鼠らい菌に関する研究, 第6報, 鼠らい菌の分離培養の試み—けいしちよう株接種マウスよりの分離培養, レプラ, 41: 118-123 (1972).
  - 8) 小川辰次, 平木美奈子: 鼠らい菌に関する研究, 第7報, 鼠らい菌様抗酸菌の発育温度域と発育至適温度, レプラ, 41: 176-181 (1972).
  - 9) 小川辰次, 平木美奈子: 鼠らい菌に関する研究, 第8報, 6代継代のハワイ株様抗酸菌の種々の菌量の感染によるマウスへの復元試験, レプラ, 42: 218-227 (1973).
  - 10) 小関勇一, 安地節, 岡本茂広: 鼠癩菌感染マウスより分離された小川氏抗酸菌について, 第1報, 試験管内培養と動物接種, レプラ, 41: 127-136 (1972).
  - 11) 小関勇一, 岡本茂広, 安地節: 鼠癩菌感染マウスより分離された小川氏抗酸菌について, 第2報, 薬剤感受性と2, 3の鑑別試験, レプラ, 41: 137-148 (1972).
  - 12) 森 竜男: 小川卵黄培地による鼠癩菌培養と増殖菌の動物接種, レプラ, 43: 226-233 (1974).
  - 13) Nakamura, M.: Multiplication of Mycobacterium lepraemurium in cell-free liquid medium Proc. Japan. Acad., 49: 42-46 (1973).
  - 14) 中村昌弘: 無細胞液体培地における鼠癩菌の増殖, 第4報, NC-3培地の開発, レプラ, 42: 161-164 (1973).
  - 15) 中村昌弘: 無細胞液体培地における鼠癩菌の増殖, 第5報, NC-5培地の開発, レプラ, 42: 205-209 (1973).
  - 16) 小関勇一, 安地節: 小川菌の発育と小川培地のpH, 小川菌の発育と通気, レプラ, 42: 89 (1973).