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

**15. Growth Stimulating Effects of Adenosine and Thymidine
on *M. lepraemurium* in vitro**

MASAHIRO NAKAMURA

(Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine)

Evidence is presented that the multiplication of *M. lepraemurium* is remarkably stimulated by addition of adenosine at final concentration of 0.005 % to NC-5 and ND-5 medium. The effect resulted in maintenance of plateau of stationary phase of *M. lepraemurium*. On the other hand, there is no effect of addition of thymidine on the growth of *M. lepraemurium* in NC-5 as well as ND-5 medium.

無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌

第15報 アデノシンおよびチミジンの鼠癩菌増菌促進効果

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 1977年3月31日)

NC-5¹⁾およびND-5培地²⁾では可成り少数の鼠癩菌液の接種によって定量的増菌がみられるが、結核菌の場合のような顕微鏡下で全く菌体が認められないものから培地の中で自己増殖して定量できるような菌数に達したり管底に肉眼で認められるような沈渣を生じるようなことはない。換言すれば培地 1 ml 当り 10⁴以上の菌数が当初にないと、その後の増菌は起らない。このことは鼠癩菌の増菌には一定量以上の菌数が必要であることを示し、一個の菌体から集落まで発展する活性に欠けていることを示唆している。この現象が多数の菌体の中に活性をもっている菌体の population が極めて少ないことを意味しているのか又は、一定量以上の菌体のエネルギーの蓄積が増菌をスタートさせるのに必要なかは不明である。

いずれにしても菌体の活性を高めることの必要性は否定できないので、本報においては ATP の素材であるア

デノシンおよび核酸の素材であるチミジンの鼠癩菌増菌に及ぼす影響を検討したので報告する。

材料と方法

供試鼠癩菌：C3H マウス 皮下に接種して生じた鼠癩菌ハワイ株 (M-58) のレプロームを M/30 リン酸緩衝液で乳剤としたものを無菌試験し、1晩 4 °C に保存した菌液の上清を適当に希釈して用いた。

培地作成法および培養法：NC-5 培地を供試する場合はその基礎培地である Kirchner 培地をフラスコに作成し、これにアデノシンおよび、またはチミジンを加えて pH 7.3に補正し、オートクレーヴで滅菌した。ND-5 培地の場合はその基礎培地である Dubos 培地にアデノシンおよび、またはチミジンを加えて同様に滅菌した。そのあと添加物を無菌的に加えて培地を作成し、一定量の菌液 0.2 ml を接種、よく混ぜて中試験管 (10.5×1.5

cm) に 7 ml 宛分注し, ゴム栓で密栓し 30°C で培養した。

増菌判定法: 菌数カウント法³⁾ によった。培養試験管を vibro shaker でよく振盪し, その 0.4 ml を 1.6 ml の Formol milk に加え, 即ち, 5 倍に稀釈し, その 1 白金耳を塗抹し, その中の菌数をカウントした。

実験成績

1. アデノシン添加濃度の検討

NC-5 培地についてアデノシン添加濃度の検討を行った。アデノシンの最終濃度が 0.001, 0.005, 0.01 および 0.05% になるように加えたそれぞれの培地を作成し, この中での鼠癩菌の増菌を検討した。対照として NC-5 培地そのものを準備し, この中での増菌度と比較した。

えられた成績は図 1 のとおりである。これによれば 0.01% および 0.05% の濃度のアデノシン添加はかえって抑制的に働き, 0.001% および 0.005% 添加で鼠癩菌の増菌が促進された。ことに 0.001% 添加では培養 8 週後においても増殖曲線の上昇の継続がみられた。

Fig. 1 Effect of adenosine on the growth of *M. lepraemurium* in NC-5 medium.

ND-5 培地についてアデノシンの効果をみた成績は図 2 のとおりである。検討した添加濃度は NC-5 培地のデータをもとにした。えられた成績は培養初期の 1 週間では 0.001% の添加が最良であるが最終的には ND-5 培地そのものよりやや劣った。0.005% 添加では培養初期に ND-5 培地よりやや促進的であるが, その後 ND-5

Fig. 2 Effect of adenosine on the growth of *M. lepraemurium* in ND-5 medium.

培地とほとんど同等で最終的にはやや促進的であるという結果を示した。

2. チミジン添加の効果

チミジンの添加は最終濃度が 0.005% と 0.01% のみについて検討した。えられた結果は図 3 のとおりで 0.01% は全般的にみて最初やや促進的, のち抑制的になり最終的には ND-5 培地よりやや優れた成績であり, 0.005% は ND-5 培地とほぼ同等の増殖曲線をとった。ただいずれも対照の ND-5 培地が培養 6 週をピークとしてその後次第に増菌が下降するに対して, 増菌が 8 週まで上昇を続けたことが異った。

3. アデノシンとチミジンの添加効果

次に ND-5 培地についてアデノシンの 0.001% とチミジンの 0.005% を同時に加えて増菌促進効果を検討した。えられた成績は図 4 のとおりで両者の添加は明かに増菌促進効果を示した。そしてその増殖曲線は単独添加に比して安定なものであった。

考 察

Dhople & Hanks⁴⁾ は ATP の微量測定法を鼠癩菌の生物活性測定に応用し, *M. phlei* の ATP は *E. coli* の 1/3 量であり, 鼠癩菌ハワイ株の ATP 量は *M. phlei* の 1/3 量であると述べている。即ち鼠癩菌の生物活性が

Fig. 3 Effect of thymidine on the growth of *M. lepraemurium* in ND-5 medium.

E. coli の $1/15$ であることは鼠癩菌を *in vitro* で増やすことの困難を如実に物語っているといえよう。このことは直ちに世代時間にも言及できることで、推測すれば *E. coli* の最適培養条件下での世代時間が20分であるから、*M. phlei* のそれは60分即ち1時間、そして鼠癩菌のそれは5時間ということになる。この値はさきに ND-5 培地での鼠癩菌の最適条件下での増殖のさいに計算された世代時間⁹⁾ 1.4日~2.6日に比すれば約 $1/6$ であるが極めて興味あるデータである。

鼠癩菌の生物活性の弱さはさきに述べたように NC-5 培地でも ND-5 培地でも 10^4 以上の接種菌量を用いないと増菌がみられない事実でも裏付けされる。小川⁶⁾ によれば卵黄培地に鼠癩菌の集落を形成させるためにはレプローム小片をそのままそっと培地上に置く必要があり、更に出来上った集落の継代培養には集落のままの transfer を必須要件とし、もしレプロームを菌液化したり、集落を菌液化して卵黄培地に接種したのでは初代集落も継代培養の集落もえられないという。そして、この事実は他の研究者によっても追試確認されている。

そこでさきに述べたようにこの事実が鼠癩菌液又はレプローム中の鼠癩菌の中で自己増殖する活性をもっている菌体の population に起因するものか、一定量以上の菌

Fig. 4 Effects of adenosine and thymidine on the growth of *M. lepraemurium* in ND-5 medium.

体が集合してはじめて自己増殖に必要なエネルギーに達するののかの2つの問題がここに提起されることになる。

NC-5 培地を用いてのスライド培養法の結果⁷⁾ は前者の予想を支持するような所見を示している。即ち、スライド培養の所見は単独菌の中で或る菌はそのまま最後まで静止の状態にあり、或る菌は elongate して直ちに増菌を開始するものであるような所見を示しているようにみえる。しかし、それとても一つの標本を生のまま経時的に観察したわけではなく、経時的にとられた染色標本をならべて思考の中で連続的に類推したものであるもので、増菌を示した部分の菌体が果して完全に単独菌であったかどうか不明である。数個の菌体の集合がはじめてからあって、それから増菌が開始されたものをたまたまみているのかもしれない。

後者の予想、即ち増菌には一定量以上の菌数が必要であろうとする予想はその機作が非常に多岐にわたる。例えば、細胞融合が起るのか自己発育促進物質が集合した菌体と菌体の間に蓄積してそれが吸収されるのかなどの想定があって、実験手技上の慎重な考慮がなされた上で

結論が導かれそうである。

しかし、ともかく鼠癩菌の生物活性は極めて弱いことは事実なので今回アデノシンおよびチミジンを添加して鼠癩菌の増菌が促進されるか否かを検討した。その結果、菌数カウントにおいてはアデノシンで0.001%および0.005%の添加量で鼠癩菌の増菌が促進された。チミジンは左程、明確な増菌促進効果はみられなかった。

これらの所見は著者が Johns Hopkins 大学で Dhople & Hanks⁸⁾ と行った ATP 量の測定と一致した (表1)。これによればアデノシンの添加は明かに鼠癩菌の活性を促進し、チミジン添加の促進効果は軽度であり、アデノシンとチミジンの両者の添加はアデノシンのみの添加に劣った。

Table 1 Effects of adenosine and thymidine on the growth of *Mlm*

NC-5	Percent of original ATP/culture			
	0	2	4	6 wks
+ 0	100	415	2010	2504
+ Adenosine*	100	476	2457	2918
+ Thymidine*	100	404	1969	2624
± Adenosine Thymidine	100	443	2285	2729

* Adenosine: 0.00006M (final conc.)
Thymidine: 0.0003M (final conc.)

Fig. 5 Effect of renewal of culture medium containing adenosine on ATP potentiality of *M. lepraemurium* during cultivation in NC-5 medium.

また、培液を培養経過中に更新して鼠癩菌の活性を高めようとする実験においても、アデノシンを含む NC-5 培地で更新する場合が最も効果的であることも ATP の量から判明し、アデノシンの増菌効果は否定しがたいものである。

結 論

NC-5 および ND-5 培地に アデノシンを 最終濃度が 0.005 % になるように加えると 鼠癩菌の増殖が明かに促進され、且つ増殖曲線の プラトーの維持にも効果がある。チミジン添加はアデノシンの添加ほどの効果は認められなかった。

謝 辞

本研究の一部は日米医学らい専門部会研究費および笹川記念保健協力財団研究費によった。茲に謝意を表す。

文 献

- 1) Nakamura, M.: Quantitative multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in a cell-free liquid medium. J. Gen. Microbiol., 82, 385-391, 1974.
- 2) Nakamura, M.: A new cell-free liquid medium for rapidly culturing *Mycobacterium lepraemurium* (ND-5 medium). Proc. Jap. Acad., 51, 707-711, 1975.
- 3) 森 竜男, 高坂健二, 岸 良治, 亀井征子, 西村真二: 実験動物の皮膚と四肢および内臓における抗酸菌の分布. レブラ, 35, 28-32, 1966.
- 4) Dhople, A. M. and Hanks, J. H.: Personal communication.
- 5) Nakamura, M.: Improvement to the NC-5 medium for culturing *Mycobacterium lepraemurium* (ND-5 medium). Kurume Med. J., 22, 67-70, 1975.
- 6) 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. レブラ, 38, 246-256, 1969.
- 7) Yoshii, Z. and Nakamura, M.: Growth features of *Mycobacterium lepraemurium* cultivated in NC-5 medium. Kurume Med. J., 22, 35-56, 1975.
- 8) Nakamura, M., Dhople, A. M. and Hanks, J. H.: Effects of adenosine and thymidine and of renewals of the NC-5 medium on the stationary phase in the growth of *M. lepraemurium*. US-Japan Cooperative Meeting p. 32-36, 1976.