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

13. Growth Evaluation; Sediment Smear Method (SSM)

MASAHIRO NAKAMURA

(Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine)

To evaluate the growth rate of *M. lepraemurium* on the course of cultivation in cell-free liquid medium, a new estimation method for this purpose was established, and named the Sediment Smear Method (SSM). The procedure is as follows: centrifugalize culture tubes at 2,500 rpm for 30 min, discard carefully the culture fluid by a capillary pipet, resuspended collected sediment in 0.1 ml of a formaline-gelatin solution, smear this suspension by a loop on a slide glass, and stain, then observe the bacterial mass under the low magnification. The results obtained illustrate there is roughly a parallel relationship with the increase of the number of bacilli measured by a bacillary counting method. Therefore, the SSM could be recommended as a simple screening method for course evaluation of the growth of *M. lepraemurium*, may be as well as *M. leprae*, in the cell-free cultivation experiments.

無細胞液体培地における鼠癩菌の増菌

第13報 増菌判定法, SSM (Sediment Smear Method) の紹介

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)

癩菌および鼠癩菌の培養実験を行うに当って最初に問題になる点はその増菌の判定法である。鼠癩菌で小川¹⁾の行ったような大胆な方法で一挙に固形培地上に集落を形成させることはむしろ正統な手技ではなくて、一般には接種した菌が一定培養期間にどの位増加するかで増菌の判定を下すのが常道である。尤も小川の達成した鼠癩菌の卵黄培地での集落形成は多くの示唆をこのデータに含むところがあって癩菌培養実験にたづさわる研究者に多大の imagination と idea を提供している。

著者^{2,3)}の創案した鼠癩菌増殖用無細胞合成液体培地はこれに対して極めて細菌学のオーソドックスな方法で

考案されたもので、小川の増菌判定方法が macroscopic であるに反して著者のそれは microscopic なものである。従って、いちいち顕微鏡を用いねばならず、労力も時間も macroscopic な方法に比して数十倍の消費を要求されることになる。

そこで、実験の種類によってはそれほど正確な菌数増加率を必要としない場合もあり、おおざっぱに菌数が増えたのか増えていないのかさえ知り得れば十分のこともあり、実験の進捗上、時間と労力の節約を目的として Shepard⁴⁾の菌数カウント法に代る方法を考案したいと日頃から思索をめぐらしていた次第である。更にもう一

つの目的は *in vitro* 増殖鼠癩菌は一般抗酸菌と異なることなく、増殖形式上 microcolony を作って増えてきて、即ち、clumping の状態を呈して来る。これが菌数カウントのさい総菌数に大きい偏差を与えることになる。従ってこの誤差を除く必要がある。以上、二つの目的を満足させるため Sediment Smear Method (SSM) を考案したので、ここに報告する。

実験材料と方法

供試鼠癩菌：鼠癩菌ハワイ株 (M-61) を C₃H マウス皮下に接種して生じたレプロームを使用した。無菌的に採取されたレプロームをガラスホモジナイザーで磨砕、M/30リン酸緩衝液 (pH7.0) で菌液にした。

鼠癩菌の精製：できるだけマウス皮下組織成分の混存を避けるため鼠癩菌液をプロナーゼで処理して鼠癩菌を精製した。ミリポアフィルターで無菌化されたプロナーゼ液を0.1%になるように鼠癩菌液に加え37°C 30分処理、直ちに2,500rpm 30分遠心上清を除き、沈渣をM/30リン酸緩衝液に再浮遊し、これを粗精製鼠癩菌液とした。この処理によってほとんどマウス皮下組織の混存が認められない状態になる。

供試培地：NC-5培地およびND-5培地を用いた。それぞれ25mlのbase mediumをフラスコに作製、今回はこれに更にアデノシン(協和醗酵)を3.125mg加え溶解、滅菌、それに添加物を無菌的に加えた。

菌接種と培養：フラスコに調製されたNC-5培地およびND-5培地にそれぞれ0.2mlの菌液を接種し軽く混和、これを7ml 宛中試験管(10.5×1.5cm)に分注、ゴム栓で密栓、このようにすることにより接種菌が平等に各試験管に分布することになる。培養温度30°C。

SSM (Sediment Smear Method)：培養一定日後、試験管より培液の上部5ml 宛を静かにピペットで除去し、2,500rpm 20分遠心、次に毛細管ピペットで沈渣に注意しながら培液の全部を除去する。沈渣を0.1mlのフォルマリン・ゲラチン液(4%フォルマリンに等量の0.4%ゲラチン水を加えたもの)に再浮遊、標準白金耳で1öseスライドガラスにsmearを作り乾燥、Ziehl-Neelsen染色、低倍率で鏡検、菌塊の存在の大きさ、数を観察する。次いで強拡大(油浸)で菌の形態を観察。対照としては、4°Cに同一期間保存した同一条件の培養試験管についてsmearを作製してその所見と30°C培養試験管のそれとを比較して増菌の程度を知る。

菌数カウント：既報にのべた方法で菌数をカウントした。

実験成績

1. SSM 所見

ND-5培地に鼠癩菌を培養して一定培養期間毎に検したSSMの所見は図1のとおりである。一見して分るように培養日数が増す毎に菌塊の増加がみられて、SSMの有用性を示している。

2. 増殖曲線とSSMとの関係

NC-5培地とND-5培地について鼠癩菌の増殖を一方では菌数カウントにより、他方ではSSMにより検討した。その成績は図2および図3のとおりで、それをまとめたものが表1のとおりである。

これによると菌数カウントとSSMとの成績が必ずしも正確には一致してはいないが、それでもSSMによって大略の傾向を知ることが出来る。

考察

癩菌培養実験のさい常に問題になるのは増菌判定の規準である。固形培地の場合には集落が形成されれば疑いもない増菌であるが、鼠癩菌の場合は他の一般抗酸菌とは全く異って菌液の状態で固形培地に接種したのでは集落は形成されず、必ずレプローム小片か、集落のままのtransferでないと集落が作られない。従って極めて定量性に欠く方法でのみ実験を行うしかないとするれば、液体培地によるほかはない。幸い鼠癩菌の場合は比較的均等な菌液を作ることのでき、接種菌量がNC-5およびND-5培地中で培養日数と共に増加するので明かに増殖状況を知ることが出来るが、人癩菌を材料として液体培地で培養を試みるとその増殖の判定に苦慮することが多い。なぜならば人癩菌の場合は材料中に含まれるglobiを均等な個々の菌体にほぐすことは困難で、しかも結節の中にはたまたま巨大なglobiがあり、その形態があたかも*in vitro*で増菌したような格好のものさえある。また菌数カウントで菌数を計算してみてもGlobiを何個の菌数として数えるかまた長期間の培養中にGlobiがほぐれた結果として菌数の増加を招来することがあつて同一条件で数本の試験管を同時に調べても菌数が極めてまちまちである。そのために長時間かけて菌数計算を行うことが実験の種類では余り意味のないこともあり、何とか大略の増菌判定を行う方法をあみ出す必要性に迫られていた。そこでここに報告したSSMを試作した次第である。

実験成績の示すようにこの方法は一応増菌をおおまかに知るためには有用な方法である。増菌を来す条件を

Fig. 1 Growth features of *M. lepraemurium* observed by the Sediment Smear Method (SSM) : From the top of left ; “0” time, 4, 6, 8, 10 and 12 weeks’ cultivation.

SSM で screening してえりわけ、必要があれば更に詳細に菌数カウントを行って再現性をみればいいわけである。

しかし、この方法で問題があるのは ND-5 などの

Tween を含む培地での抗酸菌の増殖は homogeneous な発育を来し、一定の重さになって初めて管底に落下するので 2,500rpm 程度の遠心では沈下しない菌体が培地の上部に残存して菌数の loss を来すことがある。この

Fig. 2a. Growth features of *M. lepraemurium* in NC-5 observed by SSM (From the top of left; "0" time, 1, 2, 4 and 12 weeks' cultivation).

現象は鼠癩菌でしばしば経験するところで SSM の場合でも培液の粘稠度などの条件を考慮して成績判定を行う必要がある。

結 論

鼠癩菌培養における増殖の判定のために培養試験管を

Fig. 2b. Growth features of *M. lepraemurium* in ND-5 observed by SSM (From the top of left; "0" time, 1, 2, 4 and 12 weeks' cultivation).

遠心して集菌し、これを一定量の溶液に再浮遊して、その1白金耳を塗抹染色し、それを弱拡大の光学顕微鏡で観察、その中に見られる菌塊、菌量より増菌の程度をうかがう方法を考案し、SSM (Sediment Smear Method)

と命名した。培養日数が増すにつれて菌塊も増加し、これが菌数カウントによる菌数増加とほぼ平行した。従って、このSSMは培養実験における増菌判定の簡単なスクリーニング法として有用である。

Table 1 Relationship of growth evaluation between bacillary counting method and SSM in the course of cultivation of *M. lepraemurium*

Culture medium	Evaluation	“0”	1	2	4	12 (weeks)
NC-5	Bacillary count	1.2×10^5	7.9×10^5	1.7×10^6	9.9×10^5	7.6×10^6
	SSM	⊥	+	⦶	+	⦶
ND-5	Bacillary count	5.9×10^4	3.7×10^6	9.6×10^6	5.7×10^6	1.2×10^7
	SSM	—	⊥	⦶	⦶	⦶

Fig. 3 Growth curves of *M. lepraemurium* in NC-5 adenosine and ND-5 adenosine medium.

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) 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.
2) Nakamura, M.: Multiplication of *Mycobacterium lepraemurium* in cell-free medium containing α -ketoglutaric acid and cytochrome c. J. Gen. Microbiol., 73, 193-195, 1972.
3) Nakamura, M.: A new cell-free liquid medium for rapidly culturing *Mycobacterium lepraemurium* (ND-5 medium). Proc. Jap. Acad., 51, 707-711, 1975.
4) Shepard, C. C. and McRae, D. H.: A method for counting acid-fast bacteria. Intern. J. Leprosy, 36, 78-82, 1968.