無細胞液体培地における鼠らい菌の 増殖に及ぼすアミノ酸の影響

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 1982年4月17日, 特別掲載)

前報⁽¹⁾において, 各種ビタミンの無細胞液体培地における鼠らい菌の増殖に及ぼす影響を検討した。その結果, ビタミンB₆, B₁₂, H₁ (PABA) および K₃ が, 鼠らい菌の増殖を著明に促進した。これらはしかし, あくまで, 補酵素であるので, 必須栄養物質の追求が迫られた。その理由は現在まで用いて来た培地に, これらビタミンを添加しても, 成程, 増殖は促進されるが, 二, 三試みた継代培養実験では, なおも, 継代培養が続継しなかったためである。これらの結果については, 別に報告する予定であるが, ビタミンだけではまだ, 本質を衝いていない結果で, 用いている培地が, 未だ, 何らかの必須栄養素に欠けていることを示している。

従って, 当然, 考えられるものとして, アミノ酸の効果を検討した。その結果, 恐らく鼠らい菌の発育に必須であろうと思われるアミノ酸を探し出したので, ここに報告する。

材料と方法

1. 供試菌液

鼠らい菌ハワイ株 (M-70~71) の実験的に接種して生じた C₃H マウスの皮下結節を用いた。無菌的に採取し, ガラスホモジナイザーで細砕し, 0.1%牛血清加M/30 Sørensen buffer で菌液とした。

2. 供試培地

NDDL_P. DMSO-5K₃ と呼称する培地を用いた。その作製法は下記のとおりである。

Base :

Dubos 粉末 (栄研)	0.5g
Adenosine	1.0mg
Thymidine	2.0mg
Thioglycollate	1.0mg
Succinamide	42.0mg
Dextran	82.0mg

Liposome	0.6ml
DMSO (Dimethyl sulfoxide)	0.4ml
Aq	35.0ml

20% NaOH で pH 7.3に補正, オートクレーブで滅菌する。

この中で, Dextran は分子量100,000~200,000のものを使用。

Liposome は次の如くに作製した。

レシチン (和光純薬) 80mg とコレステロール (和光純薬) 10mg を 2ml の CHCl₃ に溶解, 次いで, これに N₂ ガスを吹き込んで, クロロホルムをとばす。油状の沈渣に10mlの蒸留水を加え, 5分間 Sonicator (海上電機 T-A 4280型) で homogenate する。4°C 保存。

Supplements :

ミリポアフィルター (pore size : 0.22 μ) で予め濾過された下記の supplement を加熱滅菌された base に無菌的に加える。

5 % α -Ketoglutarate	0.5ml
0.3% L-Cysteine HCl	0.5ml
0.02% Hemin (0.01M NaOH 溶解)	1.0ml
0.5% Cytochrome C	0.5ml
0.03% NADH	0.5ml
Calf serum	5.0ml

3. アミノ酸

アミノ酸の効果をみるについては, 所定量のアミノ酸を base に加え, pH 補正後, オートクレーブで滅菌した。

4. 培養法

調製された培地に, 鼠らい菌液を0.2ml 接種, よくピペットで混和したのち, 7ml 宛中型試験管 (10.5×1.3 cm) に分注, ゴム栓で密栓, 30°C で培養した。

5. 増菌判定

鼠らい菌の増菌判定は, Hanks⁽²⁾ のピンヘッド法に

Table 1 Effect of amino acids on the growth of *M. lepraemurium* in cell-free liquid medium

Amino acid	Concentration tested	Growth stimulation	Optimal concentration
Alanine	0.02, 0.1, 0.2, 0.4%	—	
Arginine	0.02, 0.1, 0.2%	—	
Aspartic acid	0.01, 0.02, 0.1, 0.2%	卅	0.02%
Glutamine	0.035, 0.07, 0.15%	—	
Glutamate	0.02, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8%	+	0.4 %
Glycine	0.01, 0.02, 0.1, 0.2%	+	0.01%
Histidine	0.02, 0.1, 0.2%	+	0.2 %
Isoleucine	0.01, 0.02, 0.1, 0.2%	+	0.02%
Leucine	0.02, 0.1, 0.2%	—	
Lysine	0.02, 0.1, 0.2%	—	
Methionine	0.02, 0.1, 0.2%	—	
Phenylalanine	0.02, 0.1, 0.2%	—	
Proline	0.01, 0.02, 0.1, 0.2%	+	0.02%
Serine	0.02, 0.1, 0.2%	+	0.02%
Threonine	0.02, 0.1, 0.2%	—	
Tryptophane	0.01, 0.02, 0.2%	—	
Tyrosine	0.02, 0.04, 0.1%	+	0.04%
Valine	0.02, 0.1, 0.2%	—	
Ornithine	0.02, 0.1, 0.2%	+	0.2 %

よった。増菌促進度はアミノ酸を添加しない同一条件で培養した control 培地内での増菌と同程度の増菌のあったものを (—), control より菌数が2倍多かったものを (+) 4倍多かったものを (++)、8倍以上多かったものを (卅), と記載した。

成 績

得られた実験成績は表1のとおりである。

鼠らい菌の増殖を著明に促進したものは、アスパラギン酸のみであった。その至適添加濃度は0.02%であった。この増殖した鼠らい菌の菌形態を観察すると、やや伸延しているが、その長さは正常形の2倍を越さず、しかも、solid の形態が比較的多く、以前に NC-5⁽⁵⁾ および ND-5⁽⁴⁾ でみた異常に elongated した菌形と全く異なる正常形に近い菌形であった。

その他、軽度に増菌を促進したものはグルタミン酸ソーダ、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、プロリン、セリン、チロシンおよびオルニチンであった。その添加至適濃度はそれぞれ0.4%, 0.01%, 0.2%, 0.02%, 0.02%, 0.02%, 0.04%および0.2%であった。このさいの菌形態はアスパラギン酸の場合より、やや non-

solid なものが多かった。

その他のアミノ酸は全く効果がなかった。

考 察

抗酸菌、ことに結核菌の増殖に及ぼすアミノ酸の効果については詳しく検討されている⁽⁵⁾その結果、グルタミン酸ソーダ或はアスパラギンが Kirchner 培地および無蛋白培地である Sauton 培地に加えられて、結核菌の発育を支持している。これらは、結核菌が菌体を合成する上に、不可欠の窒素源である。

鼠らい菌については、その in vitro の無細胞増殖系が確立されていなかったのも、アミノ酸の増殖に及ぼす影響については、未だ検討されていなかった。小川培地⁽⁶⁾は鼠らい菌培養には極めて確実な培地であるが、固型培地であり、その組成が卵黄に依存しているのも、Growth factor などの効果分析には適しない。

一方、Nakamura system⁽⁸⁾は既知の薬物で合成された無細胞合成培地であって、しかも、液体培地であるので、Growth factor などの研究には極めて好個の system である。成分のぬきとりも、添加も意のままであるからである。すでに Dhople & Hanks⁽⁷⁾によってこの sys-

tem を用いて鼠らい菌の増殖条件が検討されている。

今回は、この system を用いてアミノ酸の影響を検討した。その結果、鼠らい菌がアスパラギン酸 (DL-Aspartic acid) によって著明に増殖が促進されることが判明した。この結果は余りにも simple で、期待を裏切るものがあった。何故なら、アスパラギン酸はすでに抗酸菌の発育促進物質として、古くから知られている成分で、特殊なものではないからである。

しかし、アスパラギンは Dubos 粉末に初めから加えられているものであるが、アスパラギンには増殖促進効果がなく、アスパラギン酸のみに、増殖促進効果があることは興味深い。しかも、添加濃度が0.02%が至適で、それを越すと、全く効果がないか、やや阻止的に働く。これらのことは、アスパラギン酸の方がアスパラギンよりも、鼠らい菌の菌体膜通過が効果的であることを示している。

また、抗酸菌ではアスパラギンはグルタミンと置き換えられ得るが、鼠らい菌ではグルタミンまたはグルタミン酸ソーダが軽度の効果しか示さず、アスパラギン酸でしか効果がないことは、鼠らい菌のタンパク合成が他の抗酸菌のそれと、異っていることを示唆している。

下図に示したアラニン、グルタミン、アスパラギン酸の代謝の中で、鼠らい菌はオキサロ酢酸より、アスパラギン酸を合成する系をとっているものと思われる。

NC-5⁽³⁾ および ND-5⁽⁴⁾ 培地では α-ケトグルタル酸を用いたが、このさいは菌体の異常な elongation が起り、増殖が培養 6 週をピークとして、以降、菌数の減少が起きる。アミノ酸の効果の検討の中でも、グルタミン酸ソーダは軽度の増殖促進効果はあるが、増殖した鼠らい菌の形態は elongate して beaded で、正常な鼠らい菌体とはやや異なる。即ち、α-ケトグルタル酸→グルタミンの経路は鼠らい菌の場合、正常な代謝ではないよう

に想像される。

今後、この予想の確認を実験する予定である。

結 論

無細胞液体培地における鼠らい菌の増殖に及ぼすアミノ酸の影響を検討して、次の結果をえた。

1. 著明な鼠らい菌増殖促進効果を示したものはアスパラギン酸であった。その添加至適濃度は0.02% である。
2. 軽度に増殖を促進したアミノ酸はグルタミン酸ソーダ、グリシン、ヒスチジン、イソロイシン、プロリン、セリン、チロシンおよびオルニチンであった。
3. 全く効果がなかったものはアラニン、アルギニン、グルタミン、ロイシン、リジン、メチオニン、フェニールアラニン、スレオニン、トリプトファン、およびバリンであった。

謝 辞

この研究の一部は日米医学らい専門部会および笹川記念保健協力財団の研究費によった。謝意を表す。また武田朋子技手の技術的援助に感謝する。

文 献

- 1) 中村昌弘：無細胞液体培地における鼠らい菌の増殖に及ぼすビタミンの影響，日本らい学会雑誌 投稿中
- 2) Hanks, J. H.: Microscopic counts of Mycobacteria, conversion factors for pinhead method, Int. J. Leprosy, **36**, 76-77, 1980.
- 3) Nakamura, M.: Quantitative multiplication of *M. lepraemurium* in a cell-free liquid medium (NC-5), J. Gen. Microbiol., **82**, 385-391, 1974.
- 4) Nakamura, M.: A new cell-free liquid medium for rapidly culturing *M. lepraemurium* (ND-5 medium). Proc. Jap. Acad., **51**, 707-711, 1975.
- 5) 戸田忠雄：結核菌と BCG, 南山堂 昭19.
- 6) 小川辰次, 木村恵子：鼠らいに関する研究, 第1報, 鼠らい菌培養の試み, レプラ **38**, 246-254, 1969.
- 7) Dhople, A. M., and Hanks, J. H.: Factors that influence the growth of *M. lepraemurium* in the Nakamura's system. Intern. J. Leprosy, **44**, 18-26, 1976.

Effect of Amino Acids on the Growth of *Mycobacterium lepraemurium* in Cell-free Liquid Medium

MASAHIRO NAKAMURA

(*Department of Microbiology, Kurume University School of Medicine*)

Effect of amino acids on the growth of *M. lepraemurium* was investigated and the results obtained were as follows :

1. The growth of *M. lepraemurium* in cell-free liquid medium was markedly stimulated by DL-aspartic acid at the final concentration of 0.02 %.
2. A slight growth stimulating effect was found in each case added with glutamate, glycine, histidine, isoleucin, proline, serine, tyrosine, and ornithine, respectively.
3. No any effect was recognized in the cases of alanine, arginine, glutamine, leucine lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophane and valine.