レプトスピラの培養に関する研究

(I) 組織液を基礎とする新培地について

真 子 憲 治 大 塚 悟

福岡県衛生研究所 (所長：真子憲治)

[受付：7月26日1957年]

は し が き

レプトスピラ(レと略)の培養には、現在 Korthof 培地が主として用いられているが、その他に Schuffner⁷⁾ Stuart¹⁾ 等の培地も用いられている。しかしいずれの培地でもレ線の濃厚な発育は認められないため、色々の添加物を加えて発育促進をはかろうとする実験が多くの研究者によつて追求されてきた。すなわちニコチン酸、ビタミン類^{3,4,6,9,13,14)}、乾燥肝粉末¹⁾、魚類肝より作った市販製剤 アドベリン¹⁰⁾、ジャガイモのグリセリン浸出液^{9,11)}、動物の臓器浸出液¹²⁾、家兎血清、卵黄、牛心のアルコールエキス¹⁴⁾等の添加はレ線の発育を著しく促進すると報告されている。しかしこれら実験の大部分は Korthof 培地を基礎培地とするものであった。

私共は新たな見地からレ用好適培地を作製するため実験を試みているが、今回は馬の肝臓及び腎臓浸出液を基礎とした培地を作り、主として *L. canicola* の培養を行い培養用、継代用並びに分離用培地として、Korthof 培地に劣らないばかりか優れた成績を得たので、ここに報告する。

実験方法および材料

組織浸出液にペプトン、イースト、塩化ナトリウム、ガラチンブイオンを色々組合せて試験培地とした。この場合ペプトンは5%、イースト、塩化ナトリウムはそれぞれ10%、ガラチンブイオンは30%と濃厚原液を作り、その都度必要量を加えた。試験培地、対照培地はいずれも pH 7.2~7.4 に補正し、5 cc 宛中試験管に分注して 100°C30分3日間間歇滅菌する。使用時には新鮮家兎血清を約10%の割合に無菌的に加え、56°C 1時間加温したもの2本宛を用いた。移植用レ株は Korthof 培地に27°C12~14日間培養したもの0.1cc宛を各管に移植して27°Cに所要期間培養した。

またすべての実験の対照には Korthof 培地(原法通り)を用い発育状況を比較した。尚レの発育程度判定に

は標本5枚を暗視野鏡検して、1枚につき50視野宛数えその平均値をとった。使用レ株は *L. canicola* (Utrecht IV), *L. icterohaemorrhagiae* (ワイル), *L. autumnalis* (秋疫A), *L. hebdomadis* (秋疫B), *L. australis* A (秋疫C), *L. pyrogenes* (沖縄), *L. bataviae* (Swart), *L. grippotyphosa* (Moscow V), *L. pomona* (Suis S. R.), *L. poi* (Poi), *L. bovis* (Bovis), *L. andaman* A (Andaman CH11), *L. mochtarii* (R. Semarang) の13株で10%家兎血清加 Korthof 培地に継代されたものである。

新培地の成分的検討

1. 組織浸出液について：組織浸出液はフィラートの原法に従った。即ち屠殺直後の新鮮な馬の肝臓及び腎臓を密閉容器に入れ、2~4°Cの冷蔵庫に7日間置く。脂肪及び筋膜を除きミキサーで細碎して、その100gに蒸留水1,000 ccを加え、1時間室温放置後温槽で80°C30分加温する。綿布濾過後更に100°C15分間温槽で加温、濾紙濾過、120°C30分滅菌、冷却後冷暗所に保存する。この浸出液はそのまま補正して *L. canicola* を培養しても発育は認められないが、之に家兎血清を10%の割合に加えると両浸出液とも発育してくる。然し対照の Korthof 培地には及ばなかつた。又2倍濃厚浸出液を作り比較したが、発育は極めて悪かつた。

2. 組織浸出液に加える諸成分について：

(a) ペプトン：Witte, Poly 及び Proteose ペプトンの3種類を用い、それぞれ0.3, 0.1, 0.06, 0.03, 0.01%及び加えない場合についてしらべた結果、0.03%で発育

MANAKO Kenji & OTSUKA Satoru: Studies on the Cultivation of Leptospira. (I) New Medium using Organs Infusion. Fukuoka Prefectural Laboratory of Public Health.—Jap. J. of Bact., 763-767, 1957.

本論文の要旨は第31回日本伝染病学会総会において報告した。

が最も良く、0.1%以上或は0.01%以下では悪かった。ペプトンは Witte と Poly が良く、Difco の Proteose ペプトン (No. 3) はこれらに劣っていた。従つて実験には入手し易い Poly ペプトンを用い、約0.03%の割合に加える事とした。

(b) イースト：粉末酵母エキス（大五栄養）を 5.0, 2.0, 1.0, 0.5及び 0.2%の割合に加えたが、いずれの濃度でも発育はよくなかった。又乾燥酵母エキス（オリエンタルドライイースト）を 0.6, 0.5, 0.4, 0.3, 0.2, 0.1, 0.04, 0.02, 0.01%及び加えない場合について、しらべた結果 0.1~0.02%で良く発育し、0.5%以上及び0.01%以下では悪かった。実験には乾燥酵母エキスを0.04%程度に加える事とした。

(c) 塩化ナトリウム：0.45, 0.4, 0.3, 0.25, 0.2, 0.15, 0.08及び0.01%に加えた場合及び全然加えない場合についてしらべた結果、0.25~0.3 %が最も良く、0.08%以下及び 0.4%以上では劣っていた。0.25~0.3 %が至適濃度と思われる。

(d) グラチンブイヨン：30%グラチンブイヨンを 1.3, 1.1, 0.9, 0.7, 0.5及び 0.3%の割合に加えた場合 0.9%が最も発育が良く、1.1%, 0.7%が之に次ぎ 0.5 %以下 1.3%以上では極めて発育が悪かった。又グラチンとブイヨンをそれぞれ単独に加える場合よりもグラチンブイヨンとして加えた方が発育が良かった。0.9%前後が適当と思われる。

尚上記各成分の中から一つ宛を除いて、どの成分がレの発育に大きな影響を与えるかをしらべた結果（表1）

第1表 培地成分と *L. canicola* の発育との関係

成分	培養日数	10日	17日	30日	50日
成分全部を加えた場合		3+	2+	2+	1+
ペプトンを除いた場合		1+	1+	1+	0+
イーストを除いた場合		1+	2+	1+	1+
塩化ナトリウムを除いた場合		1+	1+	1+	0+
グラチンブイヨンを除いた場合		1+	1+	1+	1+
酵母エキスを除いた場合		2+	4+	5+	4+
対照コルトフ培地		3+	4+	3+	2+

記号：0+……数視野に1~2匹

1+……1視野に1~10匹

2+……" 11~20匹

3+……" 21~30匹

4+……" 31~40匹

5+……" 41~50匹

6+……" 51~60匹

7+……" 61匹以上

塩化ナトリウムを除く場合が最も発育が悪く、次いでペプトン、グラチンブイヨン及びイーストの順であつた。従つて本培地では塩化ナトリウムとペプトンが不可欠の成分と思われる。

3. 新培地の組成

(1)(2)における各成分の検討から次の組成の培地を作製した。即ち組織浸出液 500ccに対して予め作つておいた5%ペプトン溶液3cc(約0.03%)、10%イースト溶液2cc(約0.04%)、10%塩化ナトリウム溶液15cc(約0.3%)、30%グラチンブイヨン溶液16cc(約0.9%)を順次加えよく攪拌後10%炭酸ソーダ溶液でpH 7.2~7.4に補正、中試験管に5cc宛分注後100°C30分3日間間歇滅菌する。使用時には新鮮な家兎血清を10%の割合に加え56°C1時間加温する。

新培地に対する培養試験

1. *L. canicola* の培養試験

前述の方法に従つてまず *L. canicola* を移植後10日、17日、30日、及び50日の4回に亘つて発育状況を観察した。表2に示すように各回いずれの場合にも Korthof

第2表 新培地における *L. canicola* の発育状況

培地	培養日数	10日	17日	30日	50日
新培地		6+	7+	6+	5+
コルトフ培地		4+	6+	4+	3+

記号：表1と同じ

培地に優り50日後までの観察でも、レの変動、死滅など認められなかった。又新培地で1カ月毎に現在迄7代に亘つて *L. canicola* の継代培養を行っているが、何等の変化も認められず、継代も可能であつた。尚組織浸出液は2回製造し、上記組成の培地を作り、培養試験を行つたが成績は2回共殆んど同様であつた。

2. 各種レ株の培養試験

新培地に各種レ株を移植後7日、14日、21日及び30日の4回に亘つて発育状況を観察した。表3に示すように1. *canicola* 3. *autumnalis* 5. *australis* A 6. *pyrogenes* 等は Korthof 培地より発育が良く、8. *pomona* だけは少し劣っていたが、その他のレ株は殆んど Korthof 培地と発育上優劣は認められなかった。

私共はたまたまレの発育を阻止する家兎血清を新培地に添加して各種レ株を移植後7日、14日、21日及び30日の4回に亘つて発育状況を観察した。その成績は表4に示す通りで、新培地には各種レ株共よく発育して、かゝる家兎血清による影響は認められなかった。

第3表 新培地における各種レ株の發育状況(a)

レ株	培地	培養 日数	7 日	14 日	21 日	30 日
			新 培 地	新 培 地	新 培 地	新 培 地
1	canicola	新 培 地	5 +	7 +	7 +	6 +
		コルトフ	4 +	5 +	6 +	4 +
2	icterohaemorrhagiae	新 培 地	5 +	6 +	6 +	5 +
		コルトフ	3 +	5 +	5 +	3 +
3	autumnalis	新 培 地	5 +	7 +	4 +	4 +
		コルトフ	3 +	5 +	2 +	2 +
4	hebdomadis	新 培 地	4 +	7 +	6 +	5 +
		コルトフ	3 +	5 +	4 +	4 +
5	australis A	新 培 地	5 +	7 +	7 +	6 +
		コルトフ	4 +	5 +	5 +	4 +
6	pyrogenes	新 培 地	5 +	7 +	7 +	6 +
		コルトフ	4 +	5 +	5 +	4 +
7	bataviae	新 培 地	2 +	4 +	4 +	3 +
		コルトフ	3 +	4 +	5 +	3 +
8	pomona	新 培 地	5 +	6 +	5 +	4 +
		コルトフ	4 +	6 +	6 +	5 +
9	andaman A	新 培 地	7 +	6 +	6 +	4 +
		コルトフ	5 +	6 +	6 +	5 +
10	grippotyphosa	新 培 地	4 +	6 +	6 +	5 +
		コルトフ	4 +	5 +	6 +	5 +
11	bovis	新 培 地	4 +	5 +	5 +	5 +
		コルトフ	3 +	4 +	5 +	5 +
12	poi	新 培 地	2 +	4 +	4 +	3 +
		コルトフ	2 +	3 +	4 +	4 +
13	mochtarii	新 培 地	6 +	6 +	5 +	3 +
		コルトフ	5 +	6 +	6 +	5 +

記号：表1と同じ

新培地の分離培地としての検討

1. モルモット接種の場合

当所において分離後比較的新しい犬系 *L. canicola* 5 株 (D274, D277, D279, D428, D479) 及び予研より分譲うけた *L. icterohaemorrhagiae* (三河島株) をモルモットの腹腔内に接種して、心血より2回、死亡或は屠殺(8~20日)後肝及び腎を培養し、初代鏡検でレを認めない場合は更に2代まで継代培養を行って対照と比較した。新培地と Korthof 培地との間には發育上殆んど差異は認められなかった。尚心血培養の際は両者

共家兎血清を添加しなかったが發育にかわりなかった。

2. 子犬接種実験の場合

前同様分離後比較の間もない犬系 *L. canicola* 2 株 (D279, D479) を生後3カ月前後の同腹子犬4頭に2頭宛接種した。心血より2回培養し、30~45日後と殺して、肝、腎、脾、淋巴節、副腎、肺、骨髓の各臓器から分離培養を行つた。心血、腎からは両培地共全例陽性であつたが、副腎からは新培地のみ陽性であり、他の臓器からは両培地共全例陰性の結果を示したので、対照と略々同様の分離成績であつた。

第4表 新培地における各種レ株の發育状況(b)
レの發育を阻止する家兎血清添加の際の發育状況

レ	株	培地	培養 日数			
			7日	14日	21日	30日
1	canicola	新培地 コルトフ	4+ 2+	5+ 2+	4+ 1+	4+ 0+
2	icterohaemorrhagiae	新培地 コルトフ	4+ 2+	4+ 2+	2+ 1+	1+ 0+
3	autumnalis	新培地 コルトフ	5+ 2+	5+ 2+	3+ 1+	2+ 0+
4	hebdomadis	新培地 コルトフ	5+ 2+	7+ 2+	5+ 1+	4+ 1+
5	australis	新培地 コルトフ	5+ 2+	7+ 2+	7+ 2+	6+ 1+
6	pyrogenes	新培地 コルトフ	5+ 2+	7+ 2+	7+ 1+	4+ 1+
7	bataviae	新培地 コルトフ	2+ 3+	4+ 2+	4+ 2+	3+ 1+
8	pomona	新培地 コルトフ	5+ 4+	6+ 4+	5+ 3+	3+ 3+
9	andaman A	新培地 コルトフ	6+ 2+	5+ 2+	3+ 1+	2+ 1+
10	grippotyphosa	新培地 コルトフ	2+ 1+	4+ 1+	3+ 1+	1+ 1+
11	bovis	新培地 コルトフ	3+ 1+	4+ 0+	4+ 0+	3+ 0+
12	poi	新培地 コルトフ	2+ 1+	4+ 0+	2+ 0+	1+ 0+
13	mochtarii	新培地 コルトフ	6+ 4+	6+ 3+	3+ 3+	2+ 2+

記号：表1と同じ

3. 自然材料（野犬及び単族腎）の場合

野犬及び単族の腎片を無菌的に新培地に培養したが、分離例数（単系1，犬系3株）が少く，両者を正確に比較する事は出来なかつたが略々同様の成績であつた。又腎乳剤の暗視野鏡検でレを認めたものについてモルモットの腹腔内に接種して心血，肝，腎から分離培養を行つた。両培地共略々同様の成績をえたが，之も例数が少いため更に実験を重ねたいと考えている。

考 按

基礎液として今回は馬の肝臓及び腎臓の組織浸出液を用いたが，両者には殆んど差はなく又馬の個体による差異も認められなかつた。然しモルモットの如きレに感受性の強い動物の臓器浸出液はレの發育を促進する作用が強いとも¹¹⁾言われているので，組織の種類，濃度，製法等については更に検討を加へたい。

基礎液に加える成分としては塩化ナトリウムがレの發育に最も大きな影響を持つており，ペプトン，ガラチン

ブイオンが之に次いでいた。ゲラチンブイオンはゲラチン或はブイオンをそれぞれ単独に加える場合よりもゲラチンブイオンとして加える方がよかつた。坂、宮永⁹⁾はアラビアゴム或は布海苔を加えた場合、その培地のコロイド状態の如何がレの発育に影響するのだろうと述べているが、ゲラチンブイオンの場合も培地が単にコロイド状態となるために発育に好都合であるのか或は之がレの発育促進に作用するためであるのか更に実験を続けたいと思つている。酵母エキスがレの発育に良い¹²⁾ 或は悪い⁹⁾ といわれているが、粉末酵母エキス(大五栄養)を使用した分ではよくなかつた。然し製パン用乾燥酵母エキス(オリエンタルドライイースト)を用いた場合にはよい発育という程でもないが、長くレの発育を保持した。ところが全然加えない場合でも発育はするが1カ月以上も経過すれば発育保持が困難のようである。かかる点から矢張り発育に何等かの関係があるように思われる。勿論これは上述の如く酵母の種類にも関係するので更に検討の必要があろう。

レの培養実験の際に誰もが経験することはレの発育を阻止する家兎血清に遭遇して、しばしば実験の支障を来す場合のあることであろう。山地¹¹⁾はジャガイモのグリセリン浸出液を Korthof 培地に添加すると発育を阻止する家兎血清の場合にもよく発育したと述べているが、私共はたまたまレの発育を阻止するような家兎血清を加えたところ、対照の Korthof 培地では極めて発育が悪かつたにもかかわらず新培地では各種レ株共よく発育して、かゝる血清による影響は認められなかつた。このことは新培地が Korthof 培地にまさる大きな優点の一つと云えるであろう。然し培地中のどの成分がかゝる作用を示すのか現在までのところ不明である。

次に既知レ株のモルモット、子犬接種後の分離成績では対照と殆んど同様の成績を示した。又野犬、単族等の自然材料からのレ株分離はまだ例数も少いが、Korthof 培地と略々同様の成績であつたことなどから分離用培地としても使用しうるものと思われる。

むすび

私共は組織浸出液を基礎液とした次の組成即ち浸出液 500cc, 5%ペプトン液 3 cc (約0.03%), 10%イースト液 2 cc (約0.04%), 10%塩化ナトリウム液15cc (約0.8%), 30%ゲラチンブイオン液16cc (約0.9%) からなる新培地を作り、レの培養試験を行つて、次のような成績をえた。

1. 新培地は *L. canicola* の好適培地であるのみならず各種レ株の培地としても好適であり、継代培養も可能である。
2. 新培地は接種動物或は自然材料からの分離用培地としても使用しうる。
3. 新培地はレの発育を阻止するような家兎血清を加えた場合にもよく発育する。

供試菌株の御分譲にあづかつた予研北岡博士並びに農林省家畜衛生試験場中国支場岩田技官に深謝する。

主要文献

- 1) Chang, S. L.: J. Infect. Dis., 81: 28-34, 1947.
- 2) Greene, M. R.: J. Bact., 50: 39-45, 1945.
- 3) 前田: 医学研究, 26: 115-129, 1956.
- 4) Rosenfeld, W.D. & Greene, M.R.: J. Bact., 42: 165-172, 1941.
- 5) 坂・宮永: 愛知医誌, 29: 101-114, 1923.
- 6) Schneid erman, A., Green, M. R., Schieler, L., Mc Clue, L. E. & Dunn, M. S.: Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 82: 53-56, 1953.
- 7) Schuffner, W. & Mochtar, A.: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 101: 405-413, 1927.
- 8) Stuart, R. D.: J. Path. & Bact., 58: 343-349, 1946.
- 9) 高須: 関西医学, 5: 593-604, 1956.
- 10) 土屋: 慶応医学, 27: 209-218, 1950.
- 11) 山地: 日本医大誌, 19: 1278-1289, 1952.
- 12) 山地: 日本医大誌, 19: 1530-1534, 1952.
- 13) 吉田: 福岡医誌, 32: 1539-1548, 1939.
- 14) Woratz, H.: Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 162: 106-111, 1955.