

Tween 80 による遅発育性 *Mycobacterium intracellulare* の発育促進

東 村 道 雄・水 野 松 司・外 山 春 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 45 年 4 月 8 日

ENHANCEMENT OF GROWTH OF SLOWLY GROWING STRAINS OF *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE* BY TWEEN 80*

Michio TSUKAMURA, Shoji MIZUNO and Haruo TOYAMA

(Received for publication April 8, 1970)

In the course of the co-operative study with thirteen National Sanatoria on the infection of atypical mycobacteria, 277 strains of mycobacteria received from various hospitals were identified as *Mycobacterium intracellulare*.

Among these strains of *M. intracellulare*, 15 strains (5.4%) showed very dysgonic growth on the Ogawa egg medium as well as on the Sauton agar. In contrast to the other strains of *M. intracellulare* that showed good growth on a modified Sauton agar, in which sodium glutamate was substituted for asparagine, these 15 strains showed no growth or, if any, very scant growth on the Sauton agar.

Unlike the other strains of *M. intracellulare*, these slowly growing strains were unable to grow on synthetic media containing various nitrogen compounds as the sole source of nitrogen. The growth of these slowly growing strains of *M. intracellulare* was enhanced greatly by addition of Tween 80** (final concentration of 1%) to the Sauton agar.

肺結核患者の喀痰から分離される抗酸菌は、もちろん通常人型結核菌であるが、比較的まれにきわめて発育の悪い (dysgonic) S 型集落を示す抗酸菌が発見される。このような発育の悪い菌の正体ははつきりとは分かっていないが、一部分は人型結核菌の変異株と想像され、また少なくとも一部分は、次に述べる「遅発育性」の *Mycobacterium intracellulare*¹⁾ であると思われる。

われわれは前に肺結核と同じ病像を示す患者の肺切除標本から純培養のかたちで、発育の遅い *M. intracellulare* を分離した²⁾。この菌の発育は、人型結核菌よりも遅く、S 型の dysgonic な発育を示したが、その性状は *M. intracellulare* に一致した。ただ通常の *M. intracellulare* と異なる点は、発育が遅いことと N 源として種々の N 化合物を利用できないことであつた²⁾。

その後、われわれは国立療養所非定型抗酸菌研究班の一員として、screening で集められた非定型抗酸菌の同定にたずさわることとなつた。この共同研究で国立療養所中部病院に送付され同定された *M. intracellulare* の菌株数は現在までに 277 株に達したが、このうち 15 株 (5.4%) は比較的発育が悪く、とくに台成培地の Sauton 寒天には全く発育しないか、してもせいぜい極少量の発育を示すにすぎなかつた。これらの菌株の性状を調べた結果、われわれが前に報告した吉田株²⁾と同じく、N 源要求が厳重で、glutamate 以外の N 源を単一 N 源として利用しないことが分かつた。しかも 15 株中 10 株は glutamate を N 源としても発育しなかつたが、これに Tween 80 を添加するときわめてよく発育することが分かつたので報告する。

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Chita-gun, Aichi-ken 474 Japan.

** Polyoxyethylene sorbitan monooleate produced by Katayama Chemical, Co., Osaka.

実験材料および方法

国立療養所非定型抗酸菌研究班は、昭和43年4月から発足し、同年6月から、参加施設で「salicylate 培地」の screening でひつかかった非定型抗酸菌を国立療養所中部病院に集めて同定した。43年6月から44年6月までに集められた菌株の中で、*M. intracellulare* と同定された菌株は277株で、現在なお同定作業は進行中である。同定には既報の97性状³⁾のほか、ethambutol 耐性、nitrite 耐性⁴⁾を加え、さらに最近 Tween 80 耐性（未発表）を加え、合計100性状を検討した。

Tween 80 耐性は、asparagine を sodium glutamate で代えた変法 Sauton 培地に1%の割合に Tween 80 (polyoxyethylene sorbitan monooleate; 片山化学製)を加え、115°C 30分滅菌して斜面とした培地で調べた。この培地と対照の Sauton 寒天培地に被検菌を一白金耳塗抹して、37°C に2週培養して発育の有無を観察した。通常、非定型抗酸菌は、1% Tween 80 含有 Sauton 寒天培地 (Tween 寒天培地) によく発育するが、*M. gastri* と Tap water scotochromogens は発育しないので、菌種鑑別に有用であつた。

M. intracellulare は通常、37°C 2週培養で、対照 Sauton 寒天培地によく発育するが、277株のうち15株は、Sauton 寒天培地に発育しないか、発育してもきわめて僅少の発育を示すにとどまつた。これらの菌株は、1% 小川培地でも発育が多少とも dysgonic であつた。そこで、これらの菌株の性状を通常の菌株と比較することとした。

実験成績

1. N源要求

通常株と dysgonic 株とを比較すると、N源要求で著しい差が認められた。通常株は大部分の amino acids や amides を単一N源として発育したのに対して、dysgonic 株はこれらを単一N源として利用しなかつた。とくに15株中5株は glutamate のみを利用し、glutamate をN源としても僅少の発育を示すにとどまつた。(表1)

2. Tween 80 による発育促進

通常株は Sauton 寒天培地にも Tween 80 寒天培地にもよく発育した。一方、dysgonic 株は Sauton 寒天培地には発育しないか、しても僅少であつたのに対して、Tween 80 寒天培地にはよく発育した。(表2)

考 察

M. intracellulare の通常株と dysgonic 株の著しい差は、N源要求にみられる。dysgonic 株は単一N源として合成培地に加えた amino acids や amides を利用

Table 1. Comparison between Two Subtypes of *M. intracellulare*

Nitrogen compound as sole nitrogen source	Number of strains showing positive growth	
	Subtype I*	Subtype II**
Glutamate	262	5
Serine	134	0
Methionine	26	0
Acetamide	237	0
Benzamide	0	0
Urea	176	0
Pyrazinamide	126	0
Nicotinamide	193	0
Isonicotinamide	131	0
Succinamide	229	0
Nitrate	239	0
Nitrite	0	0
Number of strains tested	262	15

* Subtype in which several amino acids and amides are utilized as the sole source of nitrogen in a synthetic agar medium.

** Subtype in which amino acids and amides are not utilized as the sole source of nitrogen in a synthetic agar medium. Utilization of nitrogen compounds as the sole source of nitrogen was tested on the following medium: glycerol 30 ml; KH_2PO_4 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; sodium citrate 1.0 g; purified agar 20.0 g; distilled water 970 ml (the medium was adjusted to pH 7.0 by addition of KOH solution). Nitrogen compound was added to the above medium at a final concentration of 0.02M.

Table 2. Enhancement of Growth of Slowly Growing Strains of *M. intracellulare* by Tween 80

Number of strains tested	Growth on:	
	Sauton agar (control)	Sauton agar + Tween 80 (1%)
5	+	+++
10	—	+++

Growth was read after incubation at 37°C for two weeks.

して発育できない。その他の性状については、両者はほぼ同じである。dysgonic 株でも glutamate のみは利用できるものがある。N源とC源との組合せは単純ではない。今回は通常株に入れたが、glutamate と succinamide, glutamate と succinamid と nitrate のみを利用する株もときに見出される。この株でも Tween 80 寒天培地の発育が、対照の Sauton 寒天培地の発育よりも明らかに優れている。

dysgonic 株は glycerol をC源としては amino acids や amides をN源として発育できなくとも、硫酸アンモンや塩化アンモンをN源とすれば、acetate や pyruvate, ときに propanol をC源として発育できる。また glutamate と glycerol の組合せでは発育できなくとも、

glutamate と acetate または pyruvate の組合せでは発育できる。

これらのC源とN源との組合せの問題は、現在、適当な説明はできない。しかしN源要求の厳格な株が、Tween 80 によつて発育を促進されることは明らかである。

dysgonic 株の起源は明らかではないが、種々のN源利用能が一度に脱落したとか、または次々と脱落したとは考えがたい。このような突然変異が同一菌で反復する可能性は考えがたいからである。むしろN源利用に関係するある因子の脱落と考えたほうがよさそうに思われる。もし、そうであればN源の代謝に Tween 80 に類似したある物質が関与している可能性が考えられる。

結 論

Mycobacterium intracellulare は通常 Sauton 寒天培地によく発育するが、ときに Sauton 寒天培地に発育しないか、またはほんの少し発育するだけの株が見出される。この菌株は卵培地でも発育が遅い。この菌株の発育は、Sauton 培地に Tween 80 を 1% の割合に添加することにより促進され、通常の株とほぼ同様の発育を示すようになる。

文 献

- 1) Runyon, E. H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 95 : 861, 1967.
- 2) 東村道雄・水野松司・外山春雄・板坂安修・稲垣博一：結核, 43 : 147, 昭 43.
- 3) Tsukamura, M.: Tubercle, 48 : 311, 1967.
- 4) Tsukamura, M.: Tubercle, 50 : 51, 1969.