

牛型菌の発育に及ぼす 2, 3 の炭素源の影響

加藤 睦子・室橋 豊穂

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 47 年 8 月 25 日

EFFECT OF A FEW CARBON SOURCES ON THE GROWTH OF
*MYCOBACTERIUM BOVIS**

Mutsuko KATO and Toyoho MUROHASHI

(Received for publication August 25, 1972)

To stimulate the growth of dysgonic bovine strains of mycobacteria, the effect of the addition of Tween 80 to M-Y RP medium was investigated, which contained glucose and Na pyruvate as main carbon sources and was regarded as the best medium among those tested in the foregoing experiments. In any of the media, which contained only one of the above mentioned three carbon sources, i.e. glucose, Na pyruvate and Tween 80, independently, no favorable growth was observed. However, in the media, which contained Na pyruvate and Tween 80, obviously better growth was obtained in most of the strains examined than in M-Y RP medium. On the other hand, the growth was stimulated obviously by the addition of Na pyruvate to the medium, which contained glucose and Tween 80 but did not enhance the growth of organisms favorably. Therefore, for the better utilization of Na pyruvate and Tween 80 as carbon sources, it seemed better to remove or reduce the amount of glucose to less than 0.5%. The semi-synthetic agar medium of the following prescription seemed to be adequate, at present, to stimulate the growth of dysgonic bovine strains of mycobacteria:

KH_2PO_4 2.0, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 1.5, Asparagine 6.0, Na. citrate 2.0, CaCl_2 0.0025, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.02, Glucose 5.0, Na. pyruvate 2.0, Tween 80 0.1 ml, BSA Fraction V 5.0, Yeast RNA 100 μg , Agar-agar 15.0, Aq. 1,000 ml.

分離当初の牛型菌は、一般に小川培地では十分な発育が得られないので、増殖を良くする条件を見出すべく、エネルギー獲得のための炭素源利用に目標を集中して培地組成に検討を加えた。前報¹⁾に述べたごとくこれら牛型菌は、多くの場合に、グリセロールを加えずにグルコースとピルビン酸 Na を含む半合成寒天培地 (M-Y RP)²⁾ で発育が著しく促進されることが示されたが、中にはその条件のみではまだ発育が十分とはいえないものもみられた。これらに対しては発育をいつそう促進する条件として脂肪酸代謝経路を検討する必要があると考えられた

ので、M-Y RP 培地を基礎としてこの点を調べることにした。

実験材料および方法

I. 実験材料

菌株：牛型菌 13 株。結核牛から分離培養後 4 年以上を経過してはいるが、卵培地での発育がまだ比較的劣性の菌株を選んだ。これらの菌株を用いて 1 年にわたって行つた実験の間に、発育速度に多少の差はあれ、全菌株とも小川培地に旺盛に発育するようになった。

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

培地：炭素源としてグルコースとピルビン酸 Na を含む既述の M-Y RP 培地と Redmond の RVA 培地[®]を対照とした。グルコースとピルビン酸 Na 以外に、新たに Tween 80 を追加し、これら 3 種の炭素源の単独あるいは 2, 3 者共存の場合の菌の発育の差異を観察した。M-Y RP 培地の処方は次の通りである。

KH₂PO₄ 2.0 g, Na₂HPO₄·12 H₂O 1.5 g, アスパラギン 6.0 g, クエン酸 Na 2.0 g, CaCl₂ 0.0025 g, MgSO₄·7 H₂O 0.02 g, ピルビン酸 Na 2.0 g, グルコース 5 g, 牛血清アルブミン(Fraction V) 5 g, 酵母 RNA 100 mcg, 粉末寒天 15 g, 精製水 1,000 ml.

II. 実験方法

小川培地上に塗抹接種、培養して得た菌苔を用いて前法¹⁾通りに菌液を作り、希釈して、10⁻⁵ または 10⁻⁶ mg ずつ培地 2 本または 3 本に接種し 37°C で培養した。1 週間後綿栓をゴムキャップに替え、3 および 4 週後に集落を数え発育状態を観察した。

Tween 80 は精製水で 10 倍に希釈してから 120°C で 15 分間滅菌し、アルブミンやグルコースなどとともに、あらかじめ滅菌しておいた培地に加えた。Tween 80 濃度は滅菌前の培地量 100 ml に対し、10 倍希釈の Tween 80 を 1.5 ml あるいは 0.1 ml 加えた場合をそれぞれ 0.15% および 0.01% として表現した。

実験成績

1. 0.15% Tween 80 含有培地における発育

牛型菌株 6 株を用いた。グルコースとピルビン酸 Na を含む M-Y RP 培地と RVA 培地を対照とし、M-Y RP 培地からピルビン酸 Na を除き代りに Tween 80 を 0.15% に加えた培地における集落の発育を調べた。表 1 に示すように、0.15% Tween 80 含有培地では 3 および 4 週ともに集落数が少なく、その大きさも対照両培地に劣り、発育が思わしくなかつた。一方、対照両培地をみると、集落数では M-Y RP 培地のほうが RVA 培地を凌いで多数の集落を生じ、発育菌量でも 3 株が M-Y RP 培地でまさつたが、残りの 3 株では RVA 培地のほうが多く、したがって M-Y RP 培地でも RVA 培地に劣るとは思われなかつた。

2. 0.03% および 0.01% Tween 80 含有培地における発育

実験 1 と同様に対照 M-Y RP 培地からピルビン酸 Na を除いて、代りに Tween 80 を 0.01% に減量して加えた場合と、ピルビン酸 Na を 0.2% に加え、これに Tween 80 を 0.01 あるいは 0.03% に共存させた場合につき、5 菌株を用いて調べた。この場合、培地 pH は 6.4 とした。表 2 に示すように、ピルビン酸 Na を除い

Table 1. Effect of Pyruvate and Tween 80 on the Growth of *M. bovis* in the Glucose Containing Agar Media

Strain No.	Incubation period (Week)	Medium		
		M-Y RP (Control)	M-Y RP -P*, +T*	RVA** (Control)
2	3	107	21	46
	4	107	37	46
5	3	130	14	55
	4	144	28	57
7	3	9	0	1
	4	9	1	2
11	3	20	0	28
	4	48	1	32
13	3	62	17	37
	4	62	34	45
18	3	27	19	5
	4	27	19	8

Note. Inoculum size: 10⁻⁶ mg.

* -P: Removal of Na. pyruvate.

+T: Addition of Tween 80.

** RVA: Redmon's medium.

Table 2. Effect of Tween 80 Concentrations on the Colonial Growth of *M. bovis* in the Glucose Containing Agar Medium

Strain No.	Incubation period (Week)	Carbon sources of media			
		GP (M-Y RP)	GT*	GPT*	GPT**
2	2	0	0	18	0.5
	3	18	11	29	19
5	2	13	0.3	24	14
	3	24	26	34	26
11	2	43	0	123	12
	3	127	0.3	179	52
24	2	0	0	43	22
	3	51	10	66	59
35	2	23	9	57	41
	3	148	84	128	121

Note. Inoculum size: 10⁻⁶ mg.

G: Glucose, P: Na. pyruvate, T: Tween 80.

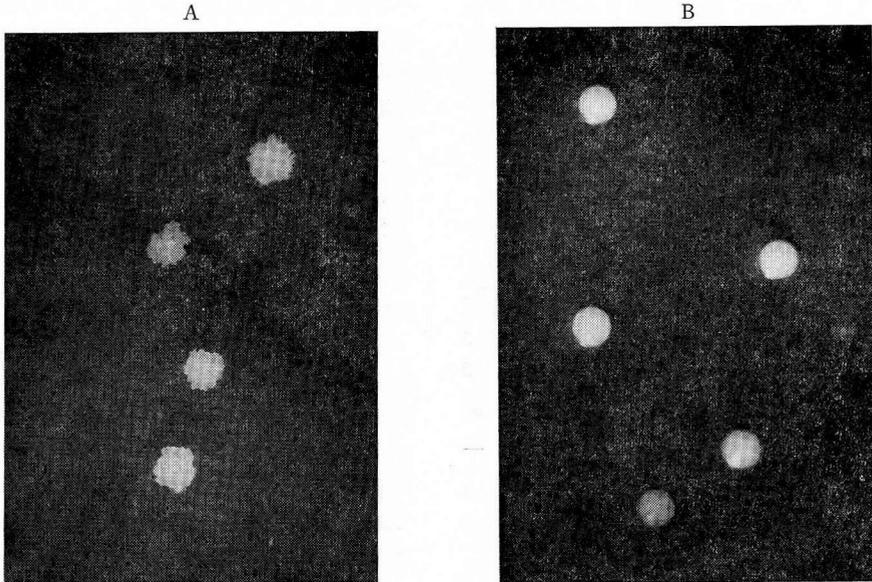
* Tween 80 0.01%, ** Tween 80 0.03%.

た培地では、Tween 80 を 0.01% に減らして加えても集落数は少なく、その大きさも対照培地に劣り、発育は思わしくなかつた。4 週に至つてこの両培地での集落数の差は小さくなつたが、集落の大きさ、したがって発育菌量はやはりピルビン酸 Na を含む培地には及ばなかつた。これに対してピルビン酸 Na を追加した場合には、集落発育が非常に促進され、すでに 2 週培養で集落の大

きさは Tween 80 無添加培地に比べて最大径で 2~5 倍以上の差を示した。また培養 2 ないし 3 週の早期においては, Tween 80 濃度の 0.01% よりも 0.03% において集落発育の遅れが大きく表われたが, 4 週では 0.03% 濃度の培地で急速に集落が大きくなるものがみられ, 中には 0.01% 濃度の培地を凌ぐ菌株もあつた。本実験とは別の時期に対照として RVA 培地を追加し, 4 菌株を

用いて同様の実験を行つたが, ビルビン酸 Na·Tween 80 共存培地上の集落が S 型できわめて湿潤, ドーム状のもり上りを示したのに対して, RVA 培地上の集落が SR 型で扁平に培地面を這うような様相を呈したのはきわめて対照的であつた。M-Y RP 培地 (GP) およびそれに Tween 80 を追加したビルビン酸 Na·Tween 80 共存培地 (GPT) 上の集落の性状を菌株 No.11 および No.15

Photo 1. *Myc. bovis* No.11 (4 week-old-culture)

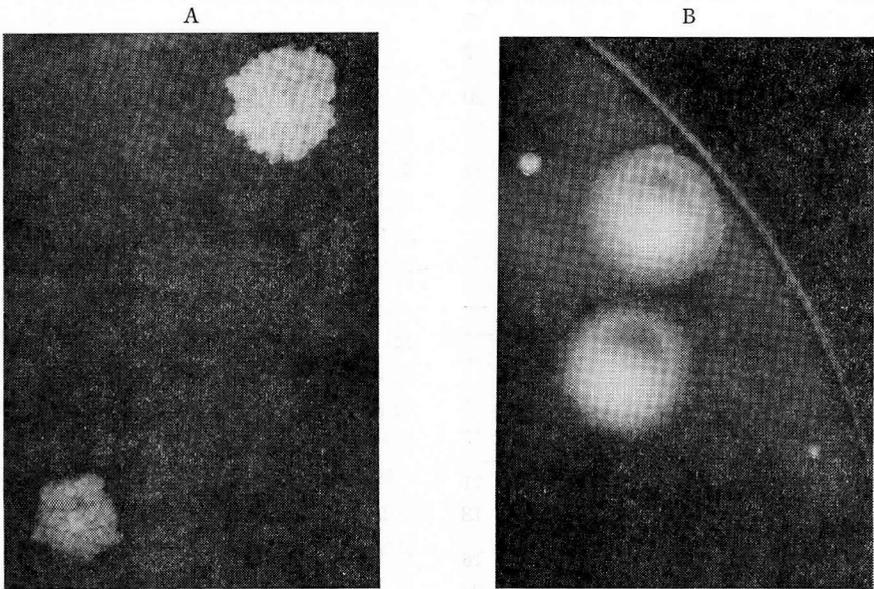


Medium

A : Contains glucose and Na. pyruvate (GP)

R : Contains glucose, Na. pyruvate and Tween 80 (GPT)

Photo 2. *Myc. bovis* No.15 (4 week-old-culture)



Medium

A : Contains glucose and Na. pyruvate (GP)

B : Contains glucose, Na. pyruvate and Tween 80 (GPT)

を例として写真 1 および 2 に示した。

3. グルコースあるいはピルビン酸 Na の各単独または 2 者共存培地に 0.01% に Tween 80 を追加した培地における発育

実験 2 における 5 菌株において、グルコースとピルビン酸 Na の共存する培地に Tween 80 を 0.01% になるように追加した場合には、菌発育が著しく増強されることが示された。この効果の一般性を確かめると同時に、炭素源として、Tween 80 が単独に含まれる場合と、他の炭素源と共存する場合とで発育にどのような相

Table 3. Effect of the Addition of Glucose, Pyruvate and Tween 80 Either Independently or in Combination on the Growth of *M. bovis* in Agar Medium

Strain No.	Incubation period (Week)	Carbon sources of media**						
		GP	GPT	G	GT	P	PT	T
2	3	11	12	1	2	8	4	5
	4	11	12	2	6	9	4	9
4	3	82	65	85	102	75	83	86
	4	—	—	—	—	—	—	—
5	3	4	5	2	2	3	5	4
	4	5	5	2	4	4	6	4
7*	3	79	69	1	90	67	46	101
	4	87	70	17	107	67	48	115
9*	3	94	64	56	56	67	50	66
	4	96	64	76	54	81	56	71
11	3	14	22	6	7	14	19	18
	4	24	23	5	19	18	20	32
13	3	26	29	8	11	13	31	20
	4	32	33	18	18	15	33	20
15	3	33	34	18	23	14	40	14
	4	39	35	28	29	21	40	28
16*	3	162	176	0	0	117	194	120
	4	219	233	64	82	152	231	254
17*	3	135	173	91	84	146	131	139
	4	143	150***	130	126	157	132	180
24	3	19	17	1	0	23	17	5
	4	23	19	7	9	26	19	17
35	3	11	21	2	1	14	29	11
	4	17	29	8	8	17	31	13
43	3	36	31	0	2	31	26	16
	4	40	33	18	23	34	29	28

Note. Inoculum size: 10^{-6} mg. * 10^{-5} mg.

** Refer to Table 1 & 2. *** Confluent growth.

違が表われるかをこの実験で観察した。

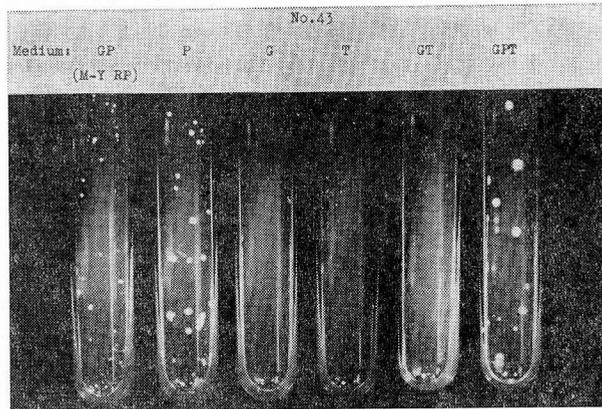
被検 13 株はほぼ 3 カ月の間隔で 3 回に分けて実験に供された。成績は表 3 に示した。全菌株ともグルコースを単独に含む培地 (G) で発育が最も悪く、これに Tween 80 を加えても (GT)、集落数の著しい増加は 2 株 (No. 7, No. 11) に示されただけで、ともに 3 週培養は 4 週に比べて集落数に関しはなはだしく劣つた。しかし集落の大きさは Tween 80 添加培地 (GT) でまさり、その差は 4 週で明らかであつた。ピルビン酸 Na 単独含有培地に Tween 80 を添加した場合 (PT) も同様で、集落数の増加を示さない菌株でも、集落の大きさが顕著に増加し、この効果は使用全菌株に認められた。Tween 80 添加による発育促進効果はグルコース含有培地に加えた場合と異なり、2~3 週の培養の早い時期ほど差が明らかに示された。対照としたグルコース・ピルビン酸共存培地 (M-Y RP: GP) に Tween 80 を追加した場合 (GPT) にも、集落の増大がみられ、その大きさの差は培養早期に大きいことが示された。

これらの 3 種の炭素源をおのおの単独に含む場合には、Tween 80 はおおむねピルビン酸 Na に匹敵する程度に集落を発生せしめることがわかつた。両者の違いは、Tween 80 を炭素源とする培地のほうで集落発生が遅れが示され、培養 3 週以降に多くの集落が数えられることである。集落はピルビン酸 Na 含有培地では白く乾固し、厚みがある R 型であるのに対し、Tween 80 含有培地では半透明で薄く S 型を呈した。試験管 1 本当りの菌量が Tween 80 含有培地で多いようにみえたのは 3 株で、残り 10 株では、ピルビン酸 Na 含有培地のほうがまさる菌株と両培地ともほぼ同等の菌株とが相半ばした。

全被検菌株を通じ集落の大きさでは、常にグルコース・ピルビン酸 Na 共存培地 (GP)、あるいはピルビン酸 Na 単独含有培地 (P) にそれぞれ Tween 80 を加えた培地 (GPT) あるいは (PT) が格段にまさり、菌量でもこの両培地がまさつていた。菌株別に各培地での発育状態をみると、最も良い発育は、培養 3 週では 8 株までが上記前者の培地で、7 株が後者で、1 株がグルコース・ピルビン酸 Na 共存培地 (GP) でそれぞれ得られ、培養 4 週でも培地の発育支持力のこの順位は変わらなかつた。グルコース単独含有培地 (G) では全株とも菌量が最も劣り、次いで、菌株により変動があり必ずしも一律ではないが、グルコース・Tween 80 共存培地 (GT) で劣つた。

固型培地での発育状態を客観的に表現するための一法として、任意に 8 菌株を選び、発生した集落を、肉眼的に辛うじてみえるものから直径 0.4 mm まで、0.9 mm まで、1.9 mm まで、2.9 mm まで、および 3 mm 以上の 5 段階に群別し、1 菌株ごとに大きい集落を多く含む培地を上位にして培地に序列をつけてみた。最も大きい

Photo 3. Colonial Growth on Agar Slants (4 week-old-culture)
Myc. bovis No. 43



集落はどの菌株でもピルビン酸 Na・Tween 80 共存培地 (PT), あるいはそれにグルコースを加えた培地 (GPT) に集中し, 逆に小さい集落はグルコース (G), あるいはそれに Tween 80 を加えた培地 (GT) に多く集まった。

上記7種類の培地すべてについての集落数の推計処理は4菌株にしか行われなかつたが, 4週培養ではいずれもグルコース単独含有培地 (G) において対照培地よりも集落数が有意に少なく, 1株はピルビン酸 Na・Tween 80 共存培地 (PT) で, 他の1株はピルビン酸 Na 単独 (P) およびグルコース・Tween 80 共存培地 (GT) でも少なかつた。

結局, 培地の発育支持力はグルコース・ピルビン酸 Na・Tween 80 の3者共存培地 (GPT) で最もまさり, ピルビン酸 Na・Tween 80 共存培地 (PT) がこれとほとんど並んで続き, 次いでグルコース・ピルビン酸 Na 共存培地 (GP), ピルビン酸 Na (P), Tween 80 (T) の各単独, グルコース・Tween 80 共存 (GT) の各培地の順となり, グルコース単独含有培地 (G) での発育が最下位となつた。検討した各培地上の集落発生状況を菌株 No. 43 を例として写真3に示した。

考 察

牛型結核菌の脂肪酸利用に関しては, すでに Schaefer ら⁹⁾ (1952年) によつて Tween 80-albumin 液体培地を用いた実験成績が報告されている。本実験は, 新鮮分離牛型菌の発育を炭素源利用の面から検討した前報告を補うもので, 培地の発育支持力を高めるために, Schaefer らの脂肪酸利用に関する研究を参考とし, 他の炭素源と組み合わせた場合の Tween 80 の効果を寒天斜面培地を用いて調べた。

Tween 80 がピルビン酸 Na と同じ程度に菌の発育を促進するか否かをグルコースの存在下で比較した実験1および2では, 0.15 および 0.01% のいずれの添加濃度でもピルビン酸 Na に比べてその効果は明らかに劣り,

発育はきわめて悪かつた。一方, ピルビン酸 Na および Tween 80 の各単独含有培地においては, 4週で Tween 80 はピルビン酸 Na に全く遜色ない数の集落を発生させることができ, 両培地間の総体的な発育程度の差は, グルコースと共存する場合に示された差ほどには顕著ではなかつた。すなわちグルコース・ピルビン酸 Na 共存培地における発育は, ピルビン酸 Na 単独含有培地における発育よりもまさるのに対し, グルコース・Tween 80 共存培地においては Tween 80 単独含有培地における発育よりも劣る傾向を示す菌株があつた。

これらのことから, ピルビン酸 Na および Tween 80 おのおのとグルコースとの共存培地において, グルコースは, 相対的に, ピルビン酸 Na を主要炭素源とする菌発育に対しては発育増強的に, また, Tween 80 を主要炭素源とする発育に対しては抑制的に, それぞれ影響を与える傾向があるようにみえる。しかし菌株によつては, ピルビン酸 Na 含有培地の場合でも, グルコースとの共存では初発日数の遅れなど初期の発育が抑制される場合があることは, 否定できない。グルコースによるこの発育抑制影響の有無を菌株本来の性質とみるか, あるいは発育抑制を受ける菌株については, Ramakrishnan ら⁴⁾や金井⁵⁾の報告にも示唆されているように, 培地への継代が重ねられる経過の中で, 比較的酸化経路の比率の多い菌が選択されたために生じた現象とみるかについては, 比較の対照となる分離当初の菌に関する成績がないので明らかではない。しかし, この抑制が示されるのも培養2週間後までで, その後はむしろグルコースとの共存下で発育が増強される場合のほうが多かつた。

これに対し, Tween 80 の場合を脂肪酸の利用として考えると, いつたん分解が始まれば莫大なエネルギーが獲得されることはその長鎖構造から予想されるが, 実際には Tween 80 単独培地では十分な発育量を得ることができなかつた。またグルコースが共存する培地条件では, Tween 80 単独の場合よりも発育が抑制される場合

があつたのに対して、ピルビン酸 Na 共存培地では顕著な発育促進を示した。これらのことからすると、ピルビン酸 Na がきわめて有効な物質として即効的に利用され、これによつて脂肪酸の好氣的酸化経路への道が開かれて十分に酸化が行われ、その結果として生合成が効率よく進んだのではあるまいかと推察される。この場合に、添加したピルビン酸 Na によつて CO₂ の蓄積が促進され、Tween 80 構成成分であるオレイン酸の利用効率が高まつたと推察することも Tsujimoto ら⁹⁾の成績と関連してできそうに思われる。しかし反面、Tween 80 による発育促進をオレイン酸の利用のみに帰することには疑問もあり、むしろ Tween 80 の細胞壁透過性亢進効果に基づく問題として、菌体表面の変化に期待するほうにあるいは意味があるのかもしれない。この点に関し南ら⁷⁾は人型 H₃₇Rv 休止菌の酸素吸収の測定によつて、Tween 80 自体、しかもそれが一つの完全な分子の形において代謝利用されるのであろうと推定している。続いて山根ら⁸⁾は培養実験により、Tween 80 が炭素源として利用されることを報告した。南ら⁷⁾の報告中の、グルコースに Tween 80 を加えた場合よりも、グルコースを除いて Tween 80 のみとした場合にいつそう酸素吸収が増加し、メチレンブルーの脱色時間も短縮されるという成績は、本実験のグルコース・Tween 80 共存培地における菌発育の良否に示唆するところがあるように思われる。

実験の最初、グルコース添加には栄養源としての他に培地の酸化還元電位を下げて、解糖経路の比重が大きいと考えられる分離直後の牛型菌発育に有利な条件を与えるという意図が加えられていた。しかし、すでに小川培地で旺盛な発育を示すまでに至つた菌株が、代謝経路の違い⁴⁾による発育量の差で選択された、酸化経路の比重の高いもので占められている可能性を考えると、上記のような意図におけるグルコース添加の意義はもうなくなつてしまうことにならう。ピルビン酸 Na・Tween 80 共存培地に加えられたグルコースは、したがつてむしろ、酸化的経路の比重の大きい菌の選択的発育を抑制するのにかえつて力を貸す結果になるとも考えられるのであつて、一般的に牛型菌の場合にはグルコースを 0.5% を限度として、それを越えない濃度に留めたほうがよいように思われる。

以上の考察から、発育劣性と称される牛型菌の培養条件の問題点は、エネルギー源となる炭素源の種類がこれまで必ずしも適切ではなかつたことにあるといえよう。グルコースを基調として、ピルビン酸 Na および Tween 80 で炭素源を補強すれば、RVA 培地のようなきわめて複雑な組成の培地を用いなくても、たとえば M-Y 培地のような比較的簡単な組成の寒天培地でも牛型菌の発育

を相当良く支持するのである。

本実験でみる限り、グルコースはピルビン酸 Na および Tween 80 よりも利用能率が劣るので、それを培地に加えないほうが早く増殖する菌株もあるが、これを加える場合には 0.5% を限度とするほうがよいであろう。

以上の実験成績からみて、発育劣性牛型菌の増殖をある程度計りうる半合成寒天培地としては、次の処方が今のところ適切のように思われる。

KH₂PO₄ 2.0 g, Na₂HPO₄·12 H₂O 1.5 g, アスパラギン 6.0 g, クエン酸 Na 2.0 g, CaCl₂ 0.0025 g, MgSO₄·7 H₂O 0.02 g, ピルビン酸 Na 2.0 g, グルコース 5 g, Tween 80 0.1 ml, 牛血清アルブミン (Fraction V) 5 g, 酵母 RNA 100 mcg, 粉末寒天 15 g, 精製水 1,000 ml, pH 6.6~6.7。

総 括

牛型菌の増殖を促進せしめるために、グルコース・ピルビン酸 Na を主要炭素源とした前報¹⁾の M-Y RP 培地にさらに Tween 80 をつけ加え、これら 3 種類の炭素源の単独および 2, 3 者共存の菌の発育に及ぼす影響を検討した。その結果、各炭素源の単独含有培地ではいずれも満足すべき発育が得られず、0.2% ピルビン酸 Na と 0.01% Tween 80 共存培地で迅速な増殖が得られることが示された。その程度は一般に、グルコース・ピルビン酸 Na 共存の場合よりも強力であることが示された。

0.5% グルコースと 0.01% Tween 80 との共存培地では発育が思わしくないが、これにピルビン酸 Na を追加すると増殖が促進されるので、結局はピルビン酸 Na と Tween 80 が非常に早く利用されるために、菌株によつて、グルコースを除くかあるいは減量するほうが発育を早くするにはよいと思われる。したがつてグルコースを 0.5% を越えない濃度に留め、ピルビン酸 Na を 0.2% に、Tween 80 を 0.01% に含む 3 者共存培地が適切であると考えられる。

文 献

- 1) 加藤睦子：衛生検査, 20: 650, 1971.
- 2) Redmond, W. B. and Ward, D. M.: Bull. Wld Hlth Org., 35: 563, 1966.
- 3) Schaefer, W. B.: J. Exp. Med., 96: 207, 1952.
- 4) Ramakrishnan, T. Indira, M. and Maller, R. K.: Biochim. Biophys. Acta, 59: 529, 1962.
- 5) 金井興美：結核, 38: 224, 1963.
- 6) Tsujimoto, T. and Misutani, H.: 奈良医学雑誌, 16: 13, 1965.
- 7) 南一守・山根績・安居千賀子：福島医学雑誌, 3: 77, 1953.
- 8) 山根績・南一守・安井千賀子：福島医学雑誌, 3: 87, 1953.