

原 著

遅発育性抗酸菌における C 源としての Tween 80 利用

水野松司・東村道雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 53 年 1 月 13 日

UTILIZATION OF TWEEN 80 AS CARBON SOURCE FOR
GROWTH OF SLOWLY GROWING MYCOBACTERIA

Shoji MIZUNO* and Michio TSUKAMURA

(Received for publication January 13, 1978)

The present study shows that Tween 80 serves as a good carbon source of slowly growing mycobacteria.

The basic media used were sterilized by autoclaving at 120°C for 20 minutes. They were dissolved before its use by heating in a water bath, and added with additional carbon or nitrogen sources, which were sterilized separately by heating at 100°C for 10 minutes. The medium was poured at 8 ml quantities into tubes (17 by 170 mm), and re-sterilized at 100°C for 10 minutes. The pH was adjusted to 7.0 by adding 10% KOH (and if necessary 10% HCl). The medium was inoculated with one loopful of the test organism, and the growth in it was observed after incubation at 37°C for 4 weeks.

1. When Tween 80 was used as carbon source, use of glutamate as nitrogen source supported the growth of almost all mycobacteria, except for fresh isolates of *M. tuberculosis*. Use of ammonium sulfate supported the growth of mycobacteria except for *M. tuberculosis*, *M. bovis* and *M. kansasii*. Nitrite supported growth of many slowly growing mycobacteria, although it was reported that in the presence of glycerol, it did not support the growth of slowly growing mycobacteria. The use of nitrate supported the growth of all mycobacteria except for *M. tuberculosis* (and *M. bovis*) (Table 1). It was remarkable that *M. xenopi* showed good growth in the presence of Tween 80 as carbon source, in spite of poor growth of this organism on Ogawa egg medium and Löwenstein-Jensen medium.

2. The use of glucose as carbon source did not support the growth of *M. nonchromogenicum* complex, whereas the use of Tween 80 supported their growth in the majority of cases (Table 2).

3. The use of glycerol or glucose did not support so much the growth of slowly growing mycobacteria in the presence of urea or nicotinamide as nitrogen source, whereas the use of Tween 80 supported their good growth (Table 3).

In view of the above results, Tween 80 is considered to be a good carbon source for slowly growing mycobacteria. It supports also good growth of *M. xenopi*, which shows dysgonic growth when glycerol or glucose is used as carbon source.

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Tween 80 が結核菌のC源および energy 源として利用されることは、Dubos¹²⁾, Youmans ら³⁴⁾, 南ら⁵⁾, 山根ら⁶⁾, Stinson & Solotorovsky⁷⁾ (*Mycobacterium avium* 使用) などによつて報告されている。すなわち Tween 80 は Dubos 培地⁸⁾ で結核菌を均一化するだけでなく、C源としても利用されていると考えられる。われわれは発育の遅い抗酸菌で、C源としての Tween 80, glycerol および glucose を種々のN源との組み合わせで比較し、Tween 80 が、これら抗酸菌の発育を促進することを認めた。

実験材料および方法

使用菌株は国立療養所中部病院研究部に保存されているものを用いた。菌株は1%小川培地に37°C 2週間(*M. tuberculosis* および *M. bovis* は3週)培養したものを接種源として用い、1白金耳ずつ(約0.1mg 湿菌量)接種した。

使用した基礎培地は次の組成をもつ。KH₂PO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, 精製寒天 20.0g, 蒸留水 1,000ml, いずれも10% KOH で pH 7.0 に修正し(行きすぎた場合は10% HCl で元に戻す), 120°C 20分滅菌して保存した。この基礎培地に Tween 80, glycerol, glucose のいずれかをC源として、また種々のN源のうちの一つを

組み合わせて加えたが、これらC源およびN源は別個に100°C 10分滅菌して冷蔵庫(5°C)に保存し、7日以内に使用した。Tween 80 は片山化学(大阪)製、精製寒天は栄研(東京)製である。

C源およびN源は、融解した基礎培地に所用量(表に記載)を得るように添加し、滅菌した中試験管(17×170 mm)に8ml ずつ無菌的に分注し、100°C 10分間水浴中で再滅菌し、冷却して斜面培地とした。菌を接種した後は、穴あきゴム栓をつけて、37°C 4週培養して、発育の有無を判定した。各実験とも、C源およびN源のいずれか、または両方を含まない対照をおき、これと比較して発育の有無を判定した。対照培地に residual growth がある場合は、これより明らかに多い発育を示す場合を、発育(+)とした。

添加量は終末濃度(仕上がった培地中の濃度)で、Tween 80 0.5%, glycerol 3%, glucose 1%, N源は0.02M である。

実験成績および考察

1. Tween 80 をC源とした場合のN源の比較成績を表1に示す。

Tween 80 をC源とし、(NH₄)₂SO₄ をN源とした場合は、*M. tuberculosis* および *M. bovis* はほとんど発育

Table 1. Growth of Slowly Growing Mycobacteria Using Tween 80 as Sole Carbon Source Together with Various Nitrogen Compounds

Species	No. of strains tested	No. of strains showing growth				
		Nitrogen source				Sodium glutamate
		(NH ₄) ₂ SO ₄	NaNO ₂	NaNO ₃	Nicotinamide	
<i>M. tuberculosis</i> (a)	10	0	0	0	0	8
<i>M. tuberculosis</i> (b)	30	3	3	3	0	6
<i>M. bovis</i>	20	1	0	11	4	18
<i>M. kansasii</i>	33	7	29	32	28	28
<i>M. marinum</i>	18	13	3	12	9	18
<i>M. scrofulaceum</i>	25	25	3	21	20	25
<i>M. gordonae</i>	25	18	10	18	15	25
<i>M. xenopi</i>	4	4	4	4	4	4
<i>M. avium</i>	30	25	2	25	24	30
<i>M. intracellulare</i>	70	43	23	64	64	70
<i>M. nonchromogenicum</i>	30	30	30	30	30	30
<i>M. terrae</i>	15	15	15	15	15	15
<i>M. novum</i>	26	26	26	26	15	26
<i>M. triviale</i>	22	22	22	22	22	22
<i>M. gastri</i>	8	8	8	8	8	8

(a) Strains maintained for a long time in our laboratory (more than 15 years).

(b) Strains freshly isolated from sputa of patients.

Basic medium used was composed of 0.5g of KH₂PO₄, 0.5g of MgSO₄·7H₂O, 5ml of Tween 80, 20.0g of purified agar, and 1,000ml of distilled water. Nitrogen compounds were added to 1,000ml of the basic medium at the following concentrations: ammonium sulfate 2.64g, sodium nitrite 1.3g, sodium nitrate 1.6g, nicotinamide 2.5g, sodium glutamate 4.0g (0.02M at final concentrations).

せず, *M. kansasii* も大部分が発育しないが, 他の抗酸菌はよく発育した。

Tween 80 をC源とし, NaNO_2 をN源とした場合は, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. avium*, *M. intracellulare* は発育しないものが多いが, *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. novum* (以下 *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. novum* を *M. nonchromogenicum* complex と称す), *M. gastri* はよく発育した。前に Tsukamura & Tsukamura⁹⁾ は, NaNO_2 をN源, glycerol をC源とした場合, 遅発育性抗酸菌は発育しないことを報告したが, Tween 80 をC源とすると約半数が発育可能となることが分かった。

NaNO_3 をN源とし, Tween 80 をC源とした場合は, *M. tuberculosis* および *M. bovis* 以外の遅発育性抗酸菌が発育可能である。Nicotinamide もN源としては利用されにくい物質であるが¹⁰⁾, Tween 80 をC源とすると *M. tuberculosis* および *M. bovis* 以外は発育可能である。ただし *M. marinum* と *M. gordonae* の中には発育しないものもあつた。

Sodium glutamate をN源とすると, *M. tuberculosis* の fresh isolates 以外は発育した。根本ら¹¹⁾は, Tween 80 が *M. bovis* の発育を促進することを認め, これを卵培地に添加して実用しているが, この所見は, 今回の基礎実験でも裏書きされた。また常用される培地では発育の悪い *M. xenopi* が Tween 80 をC源とするとよく発育した(表1)。

2. 種々のN源を用いての Tween 80 と glucose の比較

M. nonchromogenicum complex の菌は, glucose をC源とした場合は, 種々のN源のいずれをも利用できないが, Tween 80 をC源とすれば, これらを利用して発育できることが多かつた(表2)。

3. Urea および nicotinamide をN源とした場合の glycerol, glucose, Tween 80 の比較

Urea および nicotinamide をN源として, C源としての glycerol, glucose および Tween 80 を比較すると, 一般に glucose が最も成績が悪く, glycerol が中間で, Tween 80 が最も優れていた(表3)。ただし若干の例外もあり, nicotinamide と glycerol の方が優れていた場合もあつた(例えば *M. avium*, *M. nonchromogenicum*)。

以上の結果は, Tween 80 が抗酸菌の培養にしばしば用いられる glycerol よりも, C源として一般的に優れていることを示している。

なお表2および表3に示されているように, Tween 80 をC源とした場合に, N源を添加しない対照培地にも 'residual growth' すなわち, 薄膜状の微量発育がみられることがあつた。この理由は, 菌体内に貯蔵されているN源によつて発育が起こつたものと解される。本実験で Tween 80 をC源とした場合にのみ起こつたのは, おそらく Tween 80 が発育を支持するのに最も適していたからであろうと思われる(注. 合成培地を用いて, C源およびN源の研究を行なう際に, 'residual growth' はN源を欠く場合にのみみられる。C源を欠く場合は, 'residual growth' は全く起こらない。このような 'residual growth' の存在は前に記載したが¹²⁾, 菌体外に付着した前培養培地成分の混入は考えられない。接種菌を3回生食水で洗浄しても 'residual growth' は同じに起

Table 2. Comparison of Glucose and Tween 80 in Combination with Various Nitrogen Compounds for Growth of *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. novum* and *M. triviale*

Species	No. of strains tested	Carbon source	No. of strains showing growth												
			S	M	A	B	U	P	N	I	Su	NO ₃	NO ₂	None	
<i>M. nonchromogenicum</i>	10	Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		Tween 80	10	9	9	8	8	3	0	1	5	6	9	(4)	
<i>M. terrae</i>	15	Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Tween 80	15	10	0	0	15	5	1	3	14	14	15	0	
<i>M. novum</i>	30	Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Tween 80	22	15	4	3	19	3	3	3	16	15	26	(1)	
<i>M. triviale</i>	10	Glucose	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
		Tween 80	10	5	2	1	7	0	0	0	2	4	0	0	

Abbreviations and the amount of nitrogen compounds added to the basic medium are as follows: S, L-serine 2.1g; M, L-methionine 3.0g; A, acetamide 1.5g; B, benzamide 2.5g; U, urea 1.5g; P, pyrazinamide 2.5g; N, nicotinamide 2.5g; I, isonicotinamide 2.5g; Su, succinamide 2.3g; NO₃, sodium nitrate 1.6g; NO₂, sodium nitrite 1.3g (0.02M). Glucose and Tween 80 were added to the medium at a final concentration of 1% and 0.5%, respectively.

The composition of the basic medium used was the same as shown in Table 1. The numbers in brackets show the number of strains which showed residual growth.

Table 3. Growth of Slowly Growing Mycobacteria under Various Combinations of Carbon and Nitrogen Sources

Species	No. of strains tested	No. of strains showing growth								
		Glycerol(3%)			Carbon source Glucose(1%)			Tween 80(0.5%)		
		Nitrogen source (0.02M)								
		O	U	N	O	U	N	O	U	N
<i>M. kansasii</i>	33	0	2	0	0	31	0	(23)	33	23
<i>M. marinum</i>	18	0	13	10	0	9	2	0	16	8
<i>M. avium</i>	20	0	4	13	0	0	0	0	14	2
<i>M. intracellulare</i>	50	0	27	24	0	22	15	0	43	37
<i>M. gastri</i>	8	0	1	0	0	6	0	(8)	8	8
<i>M. nonchromogenicum</i>	25	0	21	19	0	0	0	(13)	22	8
<i>M. novum</i>	26	0	3	0	0	0	0	0	26	0
<i>M. terrae</i>	15	0	6	4	0	0	0	0	13	0
<i>M. triviale</i>	22	0	2	1	0	0	0	0	15	0

Abbreviations: O, control (nitrogen compound was not added); U, urea; N, nicotinamide. The basic medium was the same as used in Table 2. The number of strains in brackets show the number of strains which have shown residual growth.

こる)。

結 論

Tween 80 は遅発育性抗酸菌のC源として, glycerol および glucose よりも優れていると考えられる。特に *M. xenopi* は glycerol をC源とした卵培地でも発育が悪いが, Tween 80 をC源として用いると, よく発育することが分かった。NaNO₂ は glycerol をC源とすると遅発育性抗酸菌のN源としては利用されないが, Tween 80 をC源とすることにより, 多くの遅発育性抗酸菌によつて利用されるようになった。以上の結果は, Tween 80 がC源として glycerol または glucose よりも優れていることを示すといえよう。

文 献

- 1) Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 85: 9, 1947.
- 2) Dubos, R. J.: J. Exp. Med., 92: 319, 1950.
- 3) Sattler, T. H. and Youmans, G. P.: J. Bacteriol., 56: 235, 1948.
- 4) Youmans, A. D. and Youmans, G. P.: J. Bacteriol., 67: 731, 1954.
- 5) Minami, K., Yamane, I. and Yasui, T.: Fukushima J. Med. Sci., 1: 95, 1954.
- 6) Yamane, I., Minami, K. and Yasui, T.: Fukushima J. Med. Sci., 1: 105, 1954.
- 7) Stinson, M. W. and Solotorovsky, M.: Am. Rev. Resp. Dis., 104: 717, 1971.
- 8) Dubos, R. J. and Middlebrook, C.: Am. Rev. Tuberc., 56: 335, 1947.
- 9) Tsukamura, M. and Tsukamura, J.: J. Bacteriol., 89: 1442, 1965.
- 10) Tsukamura, M. and Tsukamura, J.: Am. Rev. Resp. Dis., 94: 104, 1966.
- 11) 根本久・岡基・横堀英夫: 農林省家畜衛生試験場研究報告, 33: 19, 1957.
- 12) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 13: 27, 1966.