

原 著

M. intracellulare 感染症の実験的研究 (1)Tween 添加培地による発育促進と CF₁ マウスに対する病原性について

後藤 義孝・高橋 宏

松矢 徳太郎・徳永 徹

国立予防衛生研究所結核部

受付 昭和 57 年 4 月 30 日

GROWTH OF *M. INTRACELLULARE* ON OGAWA'S EGG MEDIUM
SUPPLEMENTED WITH TWEEN 80 AND PATHOGENICITY AGAINST
MICE OF THE BACTERIA GROWN ON THE MEDIUM

Yoshitaka GOTO*, Hiroshi TAKAHASHI, Tokutaro MATSUYA and Tohru TOKUNAGA

(Received for publication April 30, 1982)

Comparative studies on the growth of 16 strains of *Mycobacterium (M.) intracellulare* on Ogawa's egg medium (Ogawa's medium) supplemented with or without 1% Tween 80 were carried out. Eleven strains of *M. intracellulare*, mostly isolated freshly from patients of atypical mycobacteriosis (AM), showed excellent growth on the medium supplemented with Tween but not on Ogawa's medium without Tween. Three strains of *M. intracellulare* showed almost the equal growth on the both media and 2 strains showed less growth on the medium containing Tween 80 rather than Ogawa's medium. These 5 strains had been maintained by passing Ogawa's media without Tween more than at least 4 generations.

Freshly isolated *M. intracellulare* showed higher virulence to CF₁ mice in comparison with those maintained on Ogawa's medium for long time periods. Several passages on Ogawa's media without Tween reduced the virulence of the bacteria. However, passages on media with Tween did not reduce virulence. These findings suggest that Ogawa's medium with Tween is useful for isolation of *M. intracellulare* from AM patients and from experimentally infected animals for the sake of getting better growth and of maintaining bacterial virulence. Based on these observations, it becomes possible to make the mouse model of *M. intracellulare* infection, which will be described in a subsequent paper, and virulent strains of *M. intracellulare* may be practicable for establishment of experimental AM model.

序 論

我が国の非定型抗酸菌症 (AM 症) のなかで最も症例が多いのは *Mycobacterium intracellulare (M. intracellulare)* による肺疾患である¹⁾²⁾。しかし AM 症、とりわけ *M.*

intracellulare に対する治療法は、現在のところ確立されていない。この理由のひとつは、これまで *M. intracellulare* に対する感染モデルの作成が必ずしも成功しなかつたためと考えられ³⁾、*in vivo*, *in vitro* ともによりよい実験系の確立が望まれている。

* From the Department of Tuberculosis, National Institute of Health, 2-10-35, Kamiyasaki, Shinagawa-ku, Tokyo 141 Japan.

現在、我が国では結核菌の分離培養、薬剤感受性テストなどに小川培地が多用されているが、AM症患者から菌を分離する場合にも小川培地が用いられる。しかし分離当初の *M. intracellulare* は小川培地での発育が一般的に悪い。一方、1976年に平峰が結核菌の分離培養に Tween 80 添加卵培地 (Tween 培地) がすぐれていることを報告した⁴⁾。我々もその後結核菌、とくに患者から分離した新鮮菌が、小川培地よりも Tween 培地ですぐれた発育を示すことを認めたが⁵⁾、今回我々はこの Tween 培地を用いることによつて、小川培地では発育の悪い *M. intracellulare* が短期間に分離培養されることを確認した。

そこで Tween 培地を用いて CF₁ マウス内の *M. intracellulare* 増減を調べた結果、菌力の比較的高い株を見つけることができた。さらに培地継代により起こる *M. intracellulare* の菌力低下は Tween 培地より小川培地のほうが著明であることを見出したのでそれらについて報告する。

I. 材料と方法

培地: 1% 小川培地 (小川培地) ならびに Tween 80 添加凝固卵培地 (Tween 培地) を用いた。Tween 培地は平峰の処方⁴⁾に従った。すなわち KH₂PO₄ 1g, グルタミン酸 Na 2g, Tween 80 3g, グリセリン 2ml を 100ml の蒸留水に溶解し、200ml の全卵と 6ml の 2% マラカイトグリーンを加えた。両培地はいずれも 6ml ずつ中試に分注し、90°C 60分加温凝固、斜面培地

とした。

菌株: 実験に用いた *M. intracellulare* 各株の名称および実験に使用以前の小川培地での継代数を表1に記す。小川培地で長期継代された ATCC 15984 (NIHJ-1618) の保存株 (No. 1), AM 症患者から分離された13株 (No. 2~No. 14), およびブタ由来の2株 (No. 15, No. 16) の合計16株を用いた。患者分離株は小川培地で数回継代されたものから分離後間もないものまでが含まれ、ブタ由来の2株は新鮮分離のものである。

培地上での発育: 16株の *M. intracellulare* を新たに小川培地に接種し、37°C 14日間培養したものを滅菌蒸留水で菌浮遊液とした。1,000回転3分間遠心して凝集塊を除き比濁計で O. D. 0.08~0.1 に調整した。調整後菌液を滅菌蒸留水で10倍段階希釈して、適当希釈を1希釈濃度につき小川培地ならび Tween 培地各3本ずつにそれぞれ 0.1ml 接種した。接種後 37°C で2週間および4週間培養して両培地の発育の程度を比較した。高濃度菌液を接種したところでは菌の肉眼的な発育量で判定し、- (発育なし), + (軽度発育), ++ (中等度発育), +++ (高度発育) の4段階で表示した。一方、希釈した菌液を接種したところでは形成された集落数をカウントし、その表示は小川培地上の集落平均を100とした場合の Tween 培地上の集落平均を指数で示した。

感染方法と菌の定量培養: 前述した方法で作成した菌液を4週齢の雄の CF₁ マウスの尾静脈に接種した。接種後1日目と21日目にマウスを殺処分して、脾 (一部は肝) を重量測定後、一部をガラスホモジナイザーで磨砕し、

表1 *M. intracellulare* 16株の小川・Tween 両培地での発育差

番号	菌株	小川での 継代数	2 週		4 週		Tween/小川 集落%
			小川	Tween	小川	Tween	
1.	ATCC 15984	20	++	+	+++	++	9.3
2.	K 2	4-10(詳細不明)	++	+	+++	++	60.8
3.	K 3	"	++	++	+++	+++	94.4
4.	K 4	"	++	++	+++	+++	110.2
5.	K 6	"	++	++	+++	+++	91.7
6.	K 8	"	+	++	++	+++	86.0
7.	K 9	"	+	++	++	+++	101.5
8.	K 10	"	+	++	++	+++	98.4
9.	K 14	"	+	++	++	+++	101.7
10.	K 16	"	+	++	++	+++	115.3
11.	Ninomiya	"	+	++	++	+++	102.0
12.	Tanabe	"	+	++	++	+++	102.1
13.	Mino	3	-	+	+	++	98.9
14.	Teshiogi	1	-	+	+	++	106.2
15.	YP-7	1	-	+	+	++	102.5
16.	YP-10	1	-	+	+	++	96.9

-: 発育せず +: 軽度発育 ++: 中等度発育 +++: 高度発育

滅菌蒸留水で1:10希釈の乳剤とした。さらに滅菌蒸留水で10倍段階希釈して、適当希釈を0.1 ml ずつ小川または Tween 培地に接種し、37°C 4週間以上培養ののち形成された集落数より臓器あたりの生菌数を算定した。

臓器内菌増殖率: *M. intracellulare* 各株のマウスに対する病原性の強弱を脾内生菌数の増減により判定することとし、感染21日目の生菌数を感染1日目の生菌数で除した値を菌増殖としてあらわした。

II. 成 績

M. intracellulare の小川培地ならびに Tween 培地での発育

16株の *M. intracellulare* の小川および Tween 培地における発育は表1に示すとおりである。すなわち $10^5 \sim 10^6$ の生菌数を接種した場合、培養2週後の菌発育は、保存株を含む5株 (No. 1~No. 5) が小川培地で \pm とかなりの発育を示した。残る11株 (No. 6~No. 16) はいずれも小川培地に比べ Tween 培地での発育がはやかった。特に小川培地で3代および初代培養の Mino, Teshiogi, YP-7, YP-10 (No. 13~No. 16) の4株は小川培地上には菌発育が認められないのに対して、Tween 培地では $+$ の発育が認められた。16株のうち保存株 (No. 1) と K2 (No. 2) の2株は Tween 培地より小川培地での発育が優っていた。16株の両培地上での発育差は、培養4週後においても2週目とほぼ同様の傾向を示した。さらに

希釈した菌液を接種した場合の両培地における発育集落数を比較すると、Tween 培地での発育がよくなかつた保存株 (No. 1) と K2 株 (No. 2) の2株は小川培地に比べて集落数が少なくなかつたが、他の K3 株 (No. 3) ~ YP-10 株 (No. 16) の14株では両培地に殆んど差がなかつた。集落の大きさは保存株 (No. 1) ~ K6 株 (No. 5) の5株は培養4週で径 3~5 mm で両培地に殆んど差がなかつたが、残る11株はすべて Tween 培地の集落のほうが大きく、Tween 培地で 3~4 mm であるのに対して小川培地で 1~2 mm であり、とくに Mino (No. 13), Teshiogi (No. 14), YP-7 (No. 15), YP-10 (No. 16) の4株は 1 mm 以下であつた。

CF₁ マウスに対する病原性

つぎに *M. intracellulare* 16株を各群6匹の CF₁ マウスの尾静脈に接種し、1日目および21日目に脾内生菌数を測定することにより菌増殖率を調べた。脾からの還元培養には保存株 (No. 1) と K2 株 (No. 2) については小川培地が菌分離にすぐれていることからこれを用い、他はすべて Tween 培地を用いた。結果を表2に示す。株により脾内菌増殖率には著しい差が認められた。16株中10株が脾内で増殖したがその程度は 2.18~48.0 とさまざまであつた。そのなかで K4 株 (No. 4), Mino (No. 13), Teshiogi (No. 14), YP-7 (No. 15), YP-10 (No. 16) の5株が比較的高い増殖率を示した。一方、保存株 (No. 1), K6 (No. 5), K10 (No. 8), K14 (No. 9), K16

表2 *M. intracellulare* 16株の CF₁ マウスに対する病原性

番号	菌株	脾 内 生 菌 数		菌 増 殖 率 ^c
		1 日	21 日	
1.	ATCC 15984	5.78 ^a	3.35±0.30 ^b	0.004
2.	K 2	6.10	6.44±0.08	2.18
3.	K 3	6.06	6.86±0.19	6.30
4.	K 4	6.07	7.75±0.14	48.0
5.	K 6	5.33	5.16±0.17	0.68
6.	K 8	4.49	5.74±0.26	17.80
7.	K 9	5.70	6.86±0.26	14.45
8.	K 10	5.70	4.90±0.30	0.16
9.	K 14	6.03	5.05±0.09	0.10
10.	K 16	6.21	6.11±0.10	0.80
11.	Ninomiya	4.53	5.66±0.37	13.48
12.	Tanabe	5.27	4.65±0.12	0.24
13.	Mino	5.25	6.77±0.36	33.09
14.	Teshiogi	5.97	7.37±0.09	25.08
15.	YP-7	6.17	7.58±0.18	25.68
16.	YP-10	6.69	8.09±0.30	25.10

a: 2匹の平均 (log 10)

b: 4匹の平均 (log 10) ± S. D.

c: 菌増殖率 = $\frac{21日目の生菌数(平均)}{1日目の生菌数(平均)}$

(No. 10), Tanabe(No. 12) の 6 株は菌増殖率が 1.0 以下で、その値は株間で大きな差がみられ、とくに保存株 (No. 1) の菌増殖率は 0.004 と極めて低かった。

マウス通過後の *M. intracellulare* の小川培地ならび Tween 培地での発育

さきの実験で感染 21 日目のマウスの脾より分離した 16 株の *M. intracellulare* のうち保存株 (ATCC 15984), K 2, Tanabe, Toshiogi の 4 株を再度 CF₁ マウスに感染させ 3 週後に小川培地と Tween 培地を用いて脾より菌を分離し、両培地上での分離菌の発育を調べた。対照として小川培地継代株を用いた。いずれも生菌数が 10⁴~10⁵/0.1 ml になるように調整して接種した。結果を表 3 に示す。マウスを通過後分離した K 2 と Tanabe は小川培地を継代した同株に比べて小川, Tween 両培地での発育が悪かった。とくにマウス通過後の Tanabe 株の小川培地での発育は極めて悪く集落は微小であつた。しかし、保存株および Teshiogi のマウス通過株と小川培地継代株とを比べると、保存株は小川培地で優性、Teshiogi は劣性発育を示す株であるが、継代方法の違いによる発育速度、集落の大きさに関する変化はみられなかつた。

マウス通過後、小川培地継代株と発育速度ならび集落

性状の異なつた Tanabe 株について、原株の小川培地継代株と CF₁ マウスに対する病原性を比較した。その結果は表 4 に示すとおりで脾内菌増殖率は小川培地継代株の 0.06 に対してマウス通過株は 7.59 と高く、著明な差がみられた。

Tween, 小川各培地継代菌の CF₁ マウスに対する病原性の比較

マウスを通過することにより菌増殖率が高くなつた Tanabe 株を用いて Tween, 小川各培地継代による菌増殖率に与える影響を調べた。マウスを通過した Tanabe 株を、1 継代期間 3 週間の割合で Tween 培地と小川培地にそれぞれ 5 代ずつ継代し、5 代目の両培地の菌をそれぞれ CF₁ マウスに感染させた。感染 1 日と 21 日目に脾内生菌数を測定し菌増殖率を調べた。その結果は表 5 に示すとおりで、Tween 培地継代では菌増殖率が 8.9 であつたのに対して小川培地継代では 1.21 で、Tween 培地継代菌に比べて菌増殖率が低かつた。

III. 考 察

小川培地は結核菌の分離・培養に優れた培地としてひろく用いられている。さきに平峰, 東村らは結核菌の分離・培養の向上を目的として卵培地に Tween 80 を添

表 3 小川培地継代株とマウス通過株の小川培地と Tween 培地での発育差

	菌 株	2 週		4 週		Tween/小川 集落%
		小 川	Tween	小 川	Tween	
小川培地継代株	ATCC 15984	++	+	+++	++	9.2
	K 2	++	+	+++	++	69.5
	Tanabe	+	++	++	+++	102.1
	Teshiogi	-	+	+	++	測定不能
マウス通過株	ATCC 15984	++	+	+++	++	13.2
	K 2	+	+	++	++	89.2
	Tanabe	-	+	+	++	測定不能
	Teshiogi	-	+	+	++	測定不能

-: 発育せず +: 軽度発育 ++: 中等度発育 +++: 高度発育
測定不能: 微細集落のため計測できなかつた。

表 4 培地継代とマウス通過後の Tanabe 株の CF₁ マウスに対する病原性の比較

Tanabe 株	脾内生菌数 (log 10)		菌増殖率 ^c
	1 日	21 日	
小川培地継代	6.20 ^a	5.01 ± 0.24 ^b	0.06
マウス通過	5.66	6.54 ± 0.86	7.59

a: 2 匹の平均

b: 4 匹の平均 ± S. D.

c: 菌増殖率 = $\frac{21日目の生菌数(平均)}{1日目の生菌数(平均)}$

表5 マウスを通過させた Tanabe 株の Tween, 小川各培地継代後のマウスに対する病原性

培地	継代数	脾内生菌数 (log 10)		菌増殖率 ^c
		1 日	21 日	
Tween	5	6.26±0.15 ^a	7.21±0.13 ^b	8.90
小川	5	6.03±0.12	6.11±0.10	1.21

a: 3匹の平均 ± S. D.

b: 4匹の平均 ± S. D.

c: 菌増殖率 = $\frac{21日目の生菌数(平均)}{1日目の生菌数(平均)}$

加した培地を考案した⁴⁾⁶⁾。この培地は小川培地に比べ発育支持力が優れており、かつ長期間培養しても菌の死滅が少ないことが認められている。また Tween 80 を添加した寒天培地でも、結核菌および抗酸菌の分離・培養にすぐれた結果が得られたことを水野ら⁷⁾、Youmans ら⁸⁾ が報告している。Tween 80 は菌の体積を増加させ⁹⁾、グリセリンよりも炭素源としてより優れているという。

今回我々は、*M. intracellulare* の分離培養に小川培地を用いると長期間を要するところから、Tween 培地との比較を行なった。その結果、多くの菌株について、集落数のうえでは両培地の間に有意差が認められないが、集落の出現日数がはやく、かつ集落が一様に大型化する点で Tween 培地のほうが優れていることを認めた。実験に用いた16株を、培地継代数から長期間継代した保存株(表1, No. 1) (A), 4~10代継代した K 2 (No. 2)~Tanabe (No. 12) の11株 (B), 1~3代継代の Mino (No. 13)~YP-10 (No. 16) 4株 (C) の3群に分けてみると、継代数のさほど多くないB群で11株中7株、分離後間もないC群では全株が小川培地よりも Tween 培地で良好な発育を示した。逆に Tween 培地より小川培地で優れた発育を示したのは、継代数の多い A (保存株) と B 群の K 2 株の2株だけであつた。これは繰り返して小川培地に継代されたために小川培地へ適応したためと考える。我々は、分離当初には小川培地上で微細集落しか形成しなかつた *M. intracellulare* を小川培地で長期間継代・培養すると、微細集落に混じて大型集落が出現するのをしばしば認めている。これらのことから分離当初の *M. intracellulare* は栄養条件のよい Tween 培地では接種したすべての菌が一様に発育するのに対して、小川培地では多くの菌は充分に発育できず、長期間継代・培養された場合のみ培地に適応した一部の菌が選択的に優位に発育するのではないかと考える。

このような Tween 培地を用いることにより、我々は感染マウスの臓器中の生菌数を的確に把握することができた。そして16株の *M. intracellulare* のうち10株までが CF₁ マウスの脾内で増殖することを認めた(表2)。各

菌株の脾内菌増殖率と培地継代との関係を前に述べた A, B, C の分類を用いてみると、長期継代菌である A が最も菌増殖率が低く、B 群の11株中5株が増殖率1.0以下であつた。B 群の残り6株と C 群の全株が2.18~48.0の増殖率を示しているが、新鮮分離の C 群のほうが培地継代の B 群に比べて菌増殖率の高い傾向がみられる。また最初増殖率が0.24を示した Tanabe 株が小川培地継代後には0.06と低下したのに対し、マウスを通過した場合は7.59と高くなつた(表2, 4)。さらにマウスを通過した Tanabe 株を小川, Tween 両培地を5代継代したのち、脾内菌増殖率を比較した実験において、小川培地継代株は1.21と低下したのに対し、Tween 培地継代株は8.90と菌増殖率の低下が抑制された。これらのことから、小川培地で継代することにより菌力が低下する可能性が示唆された。*M. intracellulare* を含むある種の抗酸菌は人工培地でしばしば集落変更を生じ¹⁰⁾、しかもこの変異によつて動物に対する病原性が低下する^{11), 12)} という報告があるが、小川培地では発育の良い菌が選択された結果、菌力の弱い集落が優位に増殖したのではないかと考える。

長期間小川培地で継代された保存株の菌力がマウスを通過することにより回復するかどうかは明らかでないが、マウスを通過した Tanabe 株の菌増殖率が高くなつたことから、継代数の少ない菌はマウスを通過することによつて菌力を回復できるものとする。したがつて、菌力の維持にはマウスでの継代を基本として、人工培地は小川培地や寒天培地に代わつて Tween 培地を用い、さらに継代は最小限にとどめるのが良い方法であろう。

なお、本研究では宿主として CF₁ マウスを用いたが、これは CF₁ マウスが結核菌¹³⁾、および BCG のような弱毒菌に対しても高い感受性を示すためである。今回の成績には示さなかつたが、*M. intracellulare* を感受性の高いマウスの静脈内に接種すると、接種菌の95%以上が肝・脾に定着し、肺には数%以下が定着するにすぎないが、6カ月以上観察すると肺に粟粒結核と同様の病変を作ることを認めており¹⁴⁾、今まで AM 症のモデル動物とはなりにくいと考えられてきたマウスが、系統を

選択しさえすれば AM 症の有用なモデル動物になりうると考える。現在数種類の近交系マウスを用いて、*M. intracellulare* に対する感受性を検討中であるが¹⁴⁾、今回は CF₁ マウスに増殖率の高い菌株を用い、脾内生菌数を追求することで一応モデル系を確立できたと考える。

IV. 結 論

長期間小川培地で継代培養された株および新鮮分離株を含む16株の *M. intracellulare* について、小川培地と Tween 培地上での培養性状の比較と、CF₁ マウスの脾内の菌増殖率を調べ、以下の結果を得た。

- (1) 新鮮分離株は小川培地での発育が極めて悪いが、Tween 培地ではよく発育する。
- (2) 16株の *M. intracellulare* 中10株はマウスの脾内で増殖し、増殖率は新鮮分離株が小川培地継代株に比べて高い傾向を示した。
- (3) マウスを通過させることにより、培地継代株の脾内菌増殖率を高めることができた。
- (4) Tween 培地上での継代は小川培地に比べて菌増殖率の低下を来しにくかった。
- (5) *M. intracellulare* のマウス感染モデル系を確立できた。

稿を終わるにあたり、菌株を提供いただいた三重県桑名市民病院の吉本鎌一博士に感謝いたします。

本研究の一部は文部省科学研究費の援助を受けた。

文 献

- 1) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班：日本における肺非定型抗酸菌症の疫学的・細菌学的研究，結核，55：273，1980。
- 2) 東村道雄：肺非定型抗酸菌症の発症要因，結核，52：367，1977。
- 3) 久世文幸他：実験的非定型抗酸菌症に関する研究。1. 非定型抗酸菌症のマウスに対する病原性について，結核，53：39，1978。
- 4) 平峰 繁：Tween 80 加凝固卵培地，衛生検査，25：1257，1976。
- 5) 後藤義孝：Tween 80 添加卵培地における抗酸菌の発育，第4回臨床抗酸菌談話会，1981。
- 6) 東村道雄：喀痰から抗酸菌を分離するための新しい卵培地，医学と生物学，97：129，1978。
- 7) 水野松司他：遅発抗酸菌における C 源としての Tween 利用，結核，53：537，1978。
- 8) Youmans, A.D. et al.: Studies on the metabolism of *Mycobacterium tuberculosis*: The effects of fatty acids on the growth of *M. tuberculosis var. hominis*, J Bacteriol, 67: 731, 1954.
- 9) Stinton, M.W. et al.: Interaction of Tween 80 detergent with mycobacteria in synthetic medium. 1. Effect of Tween 80 on the growth and turbidimetric response of *Mycobacterium avium* cultures, Am Rev Respir Dis, 104: 717, 1971.
- 10) Moehling, J.M. et al.: Relationship of colonial morphology to virulence for chickens of *Mycobacterium avium* and the nonphotochromogens, Am Rev Respir Dis, 92: 704, 1965.
- 11) Olitzki, A.L. et al.: Colony variants of avian Batty group mycobacteria intracerebrally injected into mice, Path Microbiol, 34: 316, 1969.
- 12) Dunbar, E.P. et al.: *Mycobacterium intracellulare*. Maintenance of pathogenicity in relationship to lyophilization and colony form, Scand J Resp Dis, 49: 153, 1968.
- 13) Cohn, M.L. et al.: Chronic aerogenic tuberculosis in mice, Proc Soc Exp Biol Med, 131: 805, 1969.
- 14) 後藤義孝他：M. intracellulare 感染症の実験的研究。(2). マウス系統間にみられる感受性差. 投稿中。