

原 著

## 種々の抗酸菌に対する Tween 80 の殺菌作用

束 村 道 雄

国立療養所中部病院内科

受付 昭和63年4月27日

## BACTERICIDAL EFFECT OF TWEEN 80 ON MYCOBACTERIA

Michio TSUKAMURA \*

(Received for publication April 27, 1988)

Various mycobacteria were suspended in a 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 5% Tween 80 to a concentration of 10 mg wet weight per ml and incubated at 37°C. At various intervals, a 2 ml-sample of the suspension was taken for determining the number of colony-forming units (CFU) per 0.2 mg wet weight. The results are shown in figures 1 to 4. *Mycobacterium avium* complex, *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum* and *M. fortuitum* were relatively resistant to Tween 80 and the number of CFU remained at  $10^{-1}$  after incubation for 7 days. In contrast, *M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. smegmatis*, *M. chelonae* subsp. *Chelonae*, *M. aurum* and *M. parafortuitum* were relatively susceptible and the number of CFU decreased to  $10^{-3}$  or less. The response of *M. avium* complex strains to Tween 80 varied depending on the strain, and no difference between naturally rifampicin-resistant and rifampicin-susceptible strains was observed. *M. fortuitum* and *M. chelonae* were similarly resistant to more than 200 µg/ml rifampicin, but the response to Tween 80 was greatly different. Previously, it was supposed that, based on observation of increased susceptibility to rifampicin after exposure to Tween 80, a permeability barrier exists in naturally rifampicin-resistant strains of *M. smegmatis* and *M. avium* complex. However, such hypothesis was not supported by the results of this study, because the increased susceptibility to rifampicin that occurred after exposure to Tween 80 was considered to be due to the reduction of the number of CFU by exposure to Tween 80.

**Key words :** *Mycobacterium*, Tween 80, bactericidal activity

**キーワード :** 抗酸菌, Tween 80, 殺菌作用

## 緒 言

Hui et al.<sup>1)</sup> は, *Mycobacterium smegmatis* の 1 株の Rifampicin (RFP) 感受性が, Tween 80 の存在

で強められることを観察し, RFP に自然抵抗力のある抗酸菌には一種の permeability barrier があり, この barrier は Tween 80 によって弱められるのであろうと述べた。この仮説は, RFP に自然耐性のある抗酸菌の

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

耐性機作としては、極めて興味ある考えであるので、この仮説が真実かどうか検討してみることにした。

われわれが、実際の臨床で最も興味を懐くのは、*Mycobacterium avium* complex の自然耐性であり、これと並んで *Mycobacterium fortuitum* および *Mycobacterium chelonae* の自然耐性も高度であることが知られる<sup>2)</sup>。

また、最近、われわれは、*M. avium* complex 株は、RFP 感受性によって 2 群に分けられることを報告した<sup>3)</sup>。一般に、*M. avium* complex は、RFP に耐性と思われているが、事実はそうではなく、比較的高耐性の群と比較的感受性の群に分けられるのである。

もし、Hui et al.<sup>1)</sup> が述べるごとく、抗酸菌の RFP 自然耐性が、Tween 80 によって影響される permeability barrier によるものであれば、*M. avium* complex の RFP 自然耐性の菌は、Tween 80 の作用に比較的抵抗が強いであろうし、barrier が無い感受性の菌は、容易に Tween 80 の作用を受けるであろうと思われる。

そこで、われわれは、*M. avium* complex の感性群と耐性群に対する Tween 80 の作用を比較してみた。そして、併せて、他の抗酸菌の感受性も比較してみた。Tween 80 が、抗酸菌に殺菌作用を示すことは、*M. smegmatis* を用いたわれわれの実験で報告されている<sup>4)</sup>。

## 研究方法

### 菌 株

使用した菌株は、図の説明に示した。

### Tween 80 の殺菌作用

被検株を「1%小川培地」に培養し、集落をとって「ガラス」玉コルベンで振盪して均一化し、Tween 80 を 5% の割合に含有する 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1) 100 ml に浮遊させて 10 mg (湿菌量)/ml の菌液を作った。この菌液を、300 ml 容量の Erlenmeyer flask に入れて、37°C (*M. marinum* 28°C) に保った。

菌液を作るための菌の培養日数は、*M. tuberculosis* 10日、*M. avium* complex、*M. kansasii*、*M. marinum*、*M. scrofulaceum*、*M. gordonae*、*M. nonchromogenicum* 7日、*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. smegmatis*、*M. aurum*、*M. parafortuitum* 3日であった。

菌液を 37°C に、0, 1, (2), 3, 5, 7, 10, 14 日間保った後に、次の測定を行った。まず、5 ml の駒込ビペットで菌液を 10 分間パンピングして均一化した後、メスピペットでサンプル 2.0 ml を採取し、これを 0.9% NaCl 溶液で 10 倍希釈してゆき、 $10^{-6}$  に至った。

この  $10^{-2}$ 、 $10^{-3}$ 、 $10^{-4}$ 、 $10^{-5}$  および  $10^{-6}$  希釈液から渦巻白金耳 (1 白金耳接種で 0.02 ml 接種できる) で 1 白金耳ずつ、小川培地斜面 2 本ずつに塗抹接種した。接種した試験管に底に 3 mm の切れ目のあるダブルゴム栓を覆せ、37°C (*M. marinum* のみ 28°C) に培養した。

集落数は、迅速発育菌では 5~7 日培養後、*M. marinum*、*M. kansasii* および *M. nonchromogenicum* では 21 日後、他の菌では 28 日後に数えた。集落数と希釈度から、サンプル 0.02 ml に含有される生菌単位を計算した。この値は、湿菌量 0.2 mg あたりの生菌単位である。

### 抗結核剤感受性

前報<sup>2)</sup> に記した方法により最小発育阻止濃度 (MIC) を、小川培地で測定した。

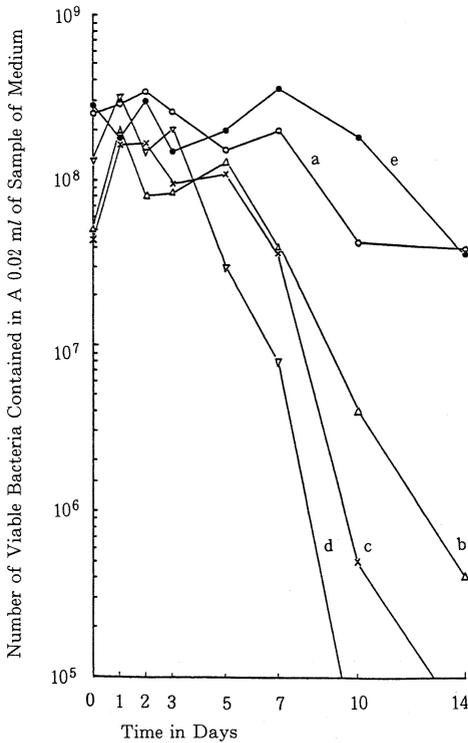
## 研究成績

研究結果を Fig. 1~4 に示す。

*M. avium* complex で、Rifampicin (RFP) の最小発育阻止濃度 (MIC) が 100 µg/ml 以上の自然耐性株の、5% Tween 80 中での生菌単位の変化を Fig. 1 に示す。また、*M. avium* complex で RFP の MIC が 25 µg/ml 以下の感性株の生菌数の変化を Fig. 2 に示す。両者を比較して、Tween 80 の殺菌作用に対する抵抗性は、菌株差がはなはだしいが、RFP の感受性——耐性には関係がないと考えられる。しかし、以下に示す他の抗酸菌と比較すると、*M. avium* complex は、Tween 80 抵抗性がかなり強い。*M. avium* complex では、生菌単位の  $10^{-3}$  の低下を起こすのに 7 日以上かかっている。7 日後でみると、生菌単位の減少は、おおよそ  $10^{-1}$  の範囲にとどまる (Fig. 1, 2)。

Fig. 3 には、5 種の遅発育性抗酸菌の生菌単位の変化を示す。最も抵抗性があるのは、*M. scrofulaceum* T 12359 株で、*M. avium* complex に似た反応を示した。次いで、*M. marinum* 08010 株と *M. tuberculosis* 05001 株の抵抗性が強く、7 日間でほぼ  $10^{-1}$  の生菌単位低下を示した。他の 3 株、*M. kansasii* 07002 株、*M. nonchromogenicum* 09003 株、*M. gordonae* T 12109 株は、5 日以内に  $10^{-3}$  ~  $10^{-4}$  以下に生菌数が減少した。

Fig. 4 には、迅速発育性抗酸菌 5 株の Tween 80 に対する反応を示す。5 株の中で、*M. fortuitum* 18112 株だけが抵抗が強く、7 日間で  $10^{-1}$  程度の減少にとどまった。他の 4 株、*M. chelonae* subsp. *chelonae* 19009 株、*M. smegmatis* 17023 株、*M. aurum* 15006 株、*M. parafortuitum* 16002 株は、いずれも Tween 80 抵抗性が弱く、7 日以内に  $10^{-3}$  程度の生菌単位減少が起こった。



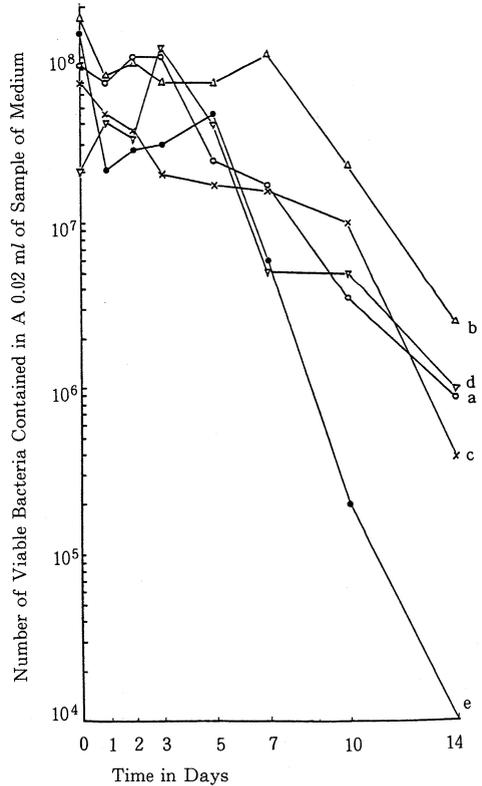
**Fig. 1.** Change of number of viable bacterial units contained in 0.2 mg wet weight of bacteria which were suspended in a 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 5% Tween 80.

- a *M. avium* complex strain 11004 (serotype 1 ; rifampicin >200  $\mu\text{g/ml}$ );
- b *M. avium* complex strain 13022 (serotype 20 ; rifampicin >200  $\mu\text{g/ml}$ );
- c *M. avium* complex strain 13032 (serotype 12 ; rifampicin >200  $\mu\text{g/ml}$ );
- d *M. avium* complex strain 13033 (serotype 15 ; rifampicin >200  $\mu\text{g/ml}$ );
- e *M. avium* complex strain 13034 (serotype 18 ; rifampicin 100  $\mu\text{g/ml}$ ).

The concentration of rifampicin shows the minimal inhibitory concentration of rifampicin in Ogawa egg medium.

考 察

われわれが、この研究を行った発端は、Hui et al.<sup>1)</sup> の *M. smegmatis* の RFP 感受性に対する Tween 80 の効果の報告に基づく。彼らは、Tween 80 の存在で RFP の発育阻止作用が増加する現象を、Tween 80



**Fig. 2.** Change of number of viable bacterial units contained in 0.2 mg wet weight of bacteria which were suspended in a 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 5% Tween 80.

- a *M. avium* complex strain 13008 (serotype 20 ; rifampicin 0.8  $\mu\text{g/ml}$ );
- b *M. avium* complex strain 13016 (serotype 4 ; rifampicin 0.8  $\mu\text{g/ml}$ );
- c *M. avium* complex strain 13021 (serotype 4 ; rifampicin 3.13  $\mu\text{g/ml}$ );
- d *M. avium* complex strain 13038 (serotype 18 ; rifampicin 25  $\mu\text{g/ml}$ );
- e *M. avium* complex strain 13887 (serotype 14 ; rifampicin 3.13  $\mu\text{g/ml}$ ).

The concentration of rifampicin shows the minimal inhibitory concentration of rifampicin in Ogawa egg medium.

(一種の detergent) による permeability barrier の破壊と考えた。そして、*M. avium* complex の RFP 自然耐性も permeability barrier の存在によるものと想像した。

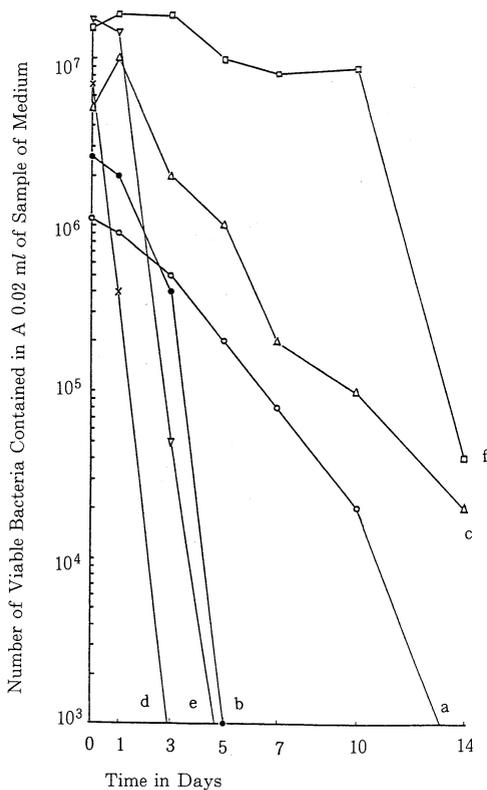


Fig. 3. Change of number of viable bacterial units contained in 0.2 mg wet weight of bacteria which were suspended in a 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 5% Tween 80.

- a *M. tuberculosis* strain 05001 (H37Rv);
- b *M. kansasii* strain 07002 (ATCC 12478);
- c *M. marinum* strain 08010 (ATCC 927);
- d *M. nonchromogenicum* strain 09003 (ATCC 19533);
- e *M. goodii* strain T 12109 (ATCC 14470);
- f *M. scrofulaceum* 12359 (ATCC 23403).

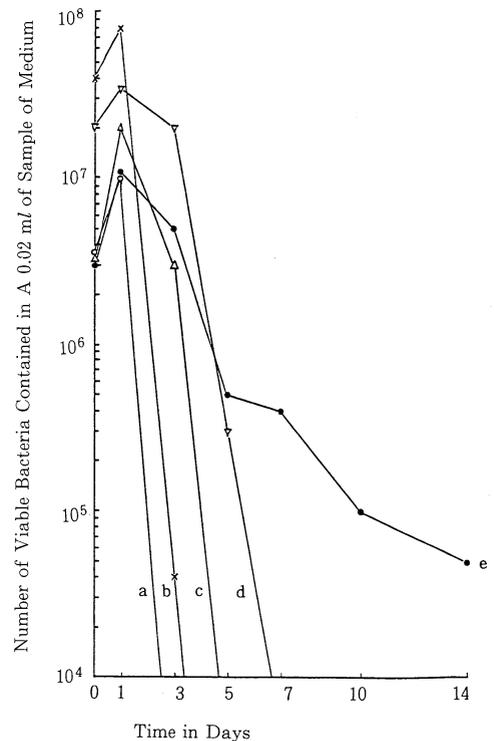


Fig. 4. Change of number of viable bacterial units contained in 0.2 mg wet weight of bacteria which were suspended in a 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 5% Tween 80.

- a *M. smegmatis* strain 17023 (Jucho);
- b *M. parafortuitum* strain 16002 (NCTC 10411; ATCC 19686);
- c *M. chelonae* subsp. *chelonae* strain 19009 (ATCC 19235);
- d *M. aurum* strain 15006 (ATCC 23366; NCTC 19437);
- e *M. fortuitum* strain 18112 (ATCC 6841).

この考えは、われわれによって最も大きな問題である *M. avium* complex の抗結核剤抵抗性を説明する一つの仮説として興味を引いた。この考えによれば、permeability barrier がないか、あっても希薄な感性菌は、Tween 80 の殺菌作用を強く受け、一方、barrier が厚い耐性菌は殺菌作用に比較的抵抗するはずである。Tween 80 が *M. smegmatis* に殺菌作用を示すことは、前に東村<sup>4)</sup> により報告され、その作用は菌膜に対する傷害と考えられていたからである。

しかしながら、本報の研究による結果は、RFP 感受性または耐性によって Tween 80 抵抗性に差があると

は思われなかった。むしろ、Tween 80 抵抗性は、抗結核剤感受性 (RFP 自然耐性株は、INH と sulfadimethoxine を除く他の抗結核剤にも耐性のことが多い<sup>3)</sup>) とは無関係の、ある要素によるものであることが想像された。

Tween 80 に対する抵抗性について考えてみると、この抵抗性は、*M. avium* complex の抗結核剤感受性とは関係は薄い、*M. avium* complex 全体としてみると、他の抗酸菌よりも Tween 80 抵抗性が強いことが示唆された。他の抗酸菌の中で、*M. avium* complex と計数分類学的に近縁と思われる *M. scrofulaceum*<sup>5)</sup> は

比較的抵抗が強い。また、*M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. fortuitum* も比較的抵抗力が強い。一方、*M. kansasii*, *M. gordonae*, *M. nonchromogenicum*, *M. chelonae* subsp. *chelonae*, *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. parafortuitum* は、Tween 80 の存在で急速に発育能力を喪失した。以上のように、Tween 80 の殺菌効果は、菌種により異なることが示唆された。なお、Tween 80 の殺菌作用は、リン酸の存在下で強く発揮されることが知られている<sup>4)</sup>。

*M. fortuitum* と *M. chelonae* は、ここに使用した2株を含め、ほとんど全株が RFP 200 µg/ml によっても発育を阻止されない。しかし、*M. fortuitum* 18112 株は、比較的 Tween 80 に抵抗が強く、*M. chelonae* 19009 株は、抵抗が弱い。この所見も、Tween 80 の影響を根拠とする permeability barrier 説を支持しない。さらに、別報するように、Tween 80 の存在による RFP 感受性の増加という Hui et al.<sup>1)</sup> の観察自体も正しいかどうかはなはだ疑わしいことが分かった。

以上のように、われわれは、Hui et al.<sup>1)</sup> の Tween 80 の影響を根拠とした permeability barrier 説への興味から、この実験を行ったのであるが、この説を支持するような所見を得ることはできなかった。しかし、代わりに、Tween 80 の抗酸菌に対する殺菌効果が、菌種によって異なることが示唆され、抗酸菌の膜構造の菌種差の問題が浮上してきた。われわれは、この課題と次に取り組みたい。

## 結 論

5% Tween 80 含有 phosphate buffer solution 中の抗酸菌の生菌単位の消長を観察した。*M. avium* complex の RFP 自然耐性株と感受性株の間では、Tween 80 に対する抵抗性の差はみられなかった。Tween 80 の殺菌効果に対して、*M. avium* complex,

*M. scrofulaceum*, *M. tuberculosis*, *M. marinum*, *M. fortuitum* は比較的抵抗が強く、7日間の浸漬で  $10^{-1}$  程度の生菌単位減少が起こっただけであった。一方、*M. kansasii*, *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae*, *M. smegmatis*, *M. aurum*, *M. parafortuitum*, *M. chelonae* subsp. *chelonae* に対しては、強い殺菌効果がみられ、7日間で  $10^{-3}$  程度の生菌数減少が起こった。

## 文 献

- 1) Hui, J., Gordon, N. and Kajioka, R. : Permeability barrier to rifampin in mycobacteria, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 11 : 773-779, 1977.
- 2) 東村道雄 : *Mycobacterium avium* complex と *Mycobacterium fortuitum* 及び *Mycobacterium chelonae* の抗結核剤感受性の比較, *結核*, 63 : 563-568, 1988.
- 3) Tsukamura, M. : Two groups of *Mycobacterium avium* complex strains determined according to the susceptibility to rifampicin and ansamycin, *Microbiol Immunol*, 31 : 615-623, 1987.
- 4) 東村道雄 : リン酸存在下における Tween 80 の *Mycobacterium smegmatis* (獣調株) にたいする殺菌効果, *医学と生物学*, 96 : 159-161, 1978.
- 5) Tsukamura, M. : Numerical classification of 280 strains of slowly growing mycobacteria. Proposal of *Mycobacterium tuberculosis* series, *Mycobacterium avium* series, and *Mycobacterium nonchromogenicum* series, *Microbiol Immunol*, 27 : 315-334, 1983.