

原 著

市販 Dubos 培地の抗酸菌発育支持能の比較

佐藤 勝昌・斎藤 肇
富岡 治明・渡辺 隆司

島根医科大学微生物・免疫学教室

受付 昭和63年1月11日

COMPARISON OF GROWTH OF MYCOBACTERIA IN COMMERCIALY
AVAILABLE DUBOS TWEEN®-ALBUMIN LIQUID MEDIAKatsumasa SATO*, Hajime SAITO, Haruaki TOMIOKA
and Takashi WATANABE

(Received for publication January 11, 1988)

Growth of transparent, opaque and rough variants of *Mycobacterium avium* complex (N-260, N-275) and *M. tuberculosis* (H37Rv, TB-20) was compared in two commercially available Dubos Tween®-albumin liquid media (E-Dubos, D-Dubos; see Table). The growth of the test organisms in D-Dubos was superior to that in E-Dubos. However, the growth of the organisms in E-Dubos was enhanced by exchange of albumin. Growth rate (K value; see Fig. 2) of transparent, opaque and rough variants of *M. avium* complex in D-Dubos was nearly the same. However, in the case of E-Dubos the rate of growth in rough variant was the highest, followed by transparent and opaque variants.

Key words : Dubos Tween®-albumin medium, *M. avium* complex, *M. tuberculosis*, Growth

キーワードズ : Dubos 培地, *M. avium* complex, *M. tuberculosis*, 増殖性

はじめに

Mycobacterium tuberculosis を始め抗酸菌の多くは発育に際して、それほど栄養要求性の強い菌ではなく、適当な炭素源と窒素源を与えると、ビタミンなどの発育素の添加なしに十分に発育することができる¹⁾²⁾。

最近、我々は *M. avium* complex (MAC) の SmD variant (smooth, opaque, dome-shaped colony)³⁾ が、E 社製 Dubos 液体培地 (E-Dubos) ではそれほど良好な発育を示さないことを経験した。そこで、今

回我々は MAC の SmD variant に加えるに SmT (smooth, transparent) 及び RG (rough, granular) variant 並びに *M. tuberculosis* に対する Dubos 液体培地の増殖支持能を、E 社製培地と D 社製培地 (D-Dubos) とを用いて比較検討したので以下報告する。

材料と方法

1. 供試菌

MAC 感染症患者より分離された MAC N-260 株並びに N-275 株の SmT, SmD 及び RG variant, 並びに

* From the Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical University, Izumo 693, Japan.

M. tuberculosis の業室株 (H37Rv 株) 及び臨床分離株 (TB-20 株) を用いた。いずれも D-Dubos 中で増殖させた後、4°C に保存した。供試菌液は次のようにして調製した。D-Dubos 培養菌を一度 1% 小川培地に移し、37°C、10 日間培養した後、発育菌をガラス玉入り試験管にとり、0.1% Tween 80 加蒸留水を加えて振盪して菌塊を破碎し、静置後得られた菌浮遊液を Handy Sonic (Model UR-20P: Tomy Seiko, 東京) の最強パワーで 15 秒間処理後、150×g、5 分間遠心し、その上清を別の試験管に移して再び 5 秒間超音波処理した。このようにして得られた比較的均等な菌浮遊液を $OD_{540nm} = 0.1$ に調製し、更に 0.1% Tween 80 加蒸留水で 100 倍希釈したものを供試菌液として用いた。

2. Dubos 培地の調製

E-Dubos は本培地粉末 11.3 g を蒸留水 900 ml に溶解後、121°C、15 分滅菌し、約 50°C に冷却してから 100 ml の E 社製「結核培地用アルブミン」を無菌的に加え、5 ml ずつスクリュウキャップ付試験管 (145×15 mm) へ分注した。D-Dubos は本培地粉末 6.5 g を蒸留水 900 ml に溶解後高圧滅菌し、冷却してからアルブミン (Bovine albumin, Fr. V; Sigma Chemical Co., U. S. A.) を用いて自家調製した D-Dubos 用アルブミン溶液 100 ml を加えて上記同様試験管へ分注した。両 Dubos 基礎培地とも、滅菌前の pH を pH メーター

で 6.8 に調整した。両基礎培地並びにアルブミン溶液の組成は Table に示すようである。また、E-Dubos の場合、D-Dubos 用アルブミン溶液の調製に用いたと同一のアルブミンを用いて Table の組成に従って自家調製したアルブミン溶液を用いた場合もある。

3. 生菌単位 (CFU) の測定

上記 Dubos 培地に各菌液の 0.1 ml を移植し、37°C、10 あるいは 14 日間にわたって培養した。その間、日に 1~2 回試験管を手振りし、所定日後における CFU を 7H10 寒天平板上で測定した。

結 果

Fig.1 は、MAC N-260 株の E-Dubos 及び D-Dubos 中における増殖曲線を示した。前述したように SmD variant (B) の E-Dubos 中における増殖の良くないことは本実験においても確認されたが、D-Dubos ではこれに比して、明らかに良好な増殖が見られた。また、他の variant (SmT, RG) においても D-Dubos の増殖支持能は E-Dubos より優れていることが分かった。

次に、D-Dubos あるいは E-Dubos 中におけるこれら variant の増殖速度を比較検討した (Fig. 2)。E-Dubos の場合 (B), RG variant が最も速い増殖を示し、そのピークは培養 5 日目であり、次いで SmT,

Table Formula of Dubos Tween[®]-albumin medium

Ingredient	Dubos Tween [®] -albumin medium	
	E-Dubos	D-Dubos
A ^{a)} . Casitone	—	0.5 g
Peptone	5.2 g	—
Asparagine	2 g	2 g
Monopotassium phosphate	1.3 g	1 g
Disodium phosphate	2.2 g	2.5 g
Ferric ammonium citrate	10 mg	50 mg
Magnesium sulfate	0.1 g	10 mg
Calcium chloride	0.5 mg	0.5 mg
Zinc sulfate	0.1 mg	0.1 mg
Copper sulfate	0.1 mg	0.1 mg
Malachite green	2 mg	—
Tween [®] 80	0.5 g	0.2 g
B ^{b)} . Albumin solution		
Albumin (Fr. V)	5 %	5 %
Dextrose	7.5 %	7.5 %
Glycerol	5 %	—
Sodium chloride	0.9 %	0.85 %

a) Ingredients per liter.

b) Each Dubos base medium was supplemented with 10% albumin solution.

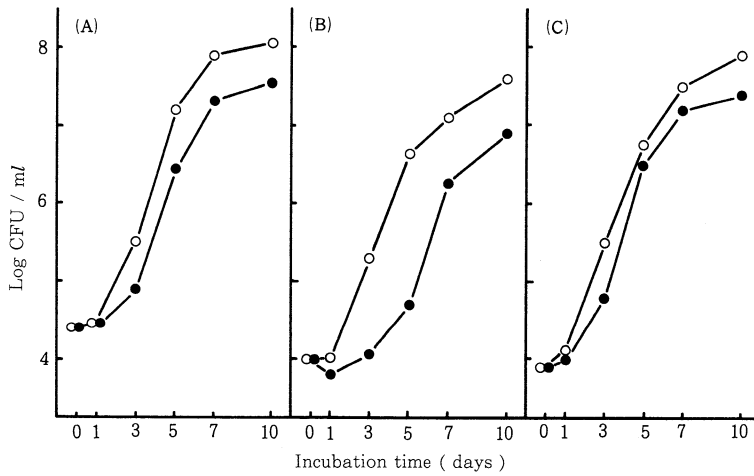


Fig. 1. Growth curves of SmT (A), SmD (B) or RG (C) variant of *M. avium* complex N-260 in D-Dubos (○) or E-Dubos (●) medium

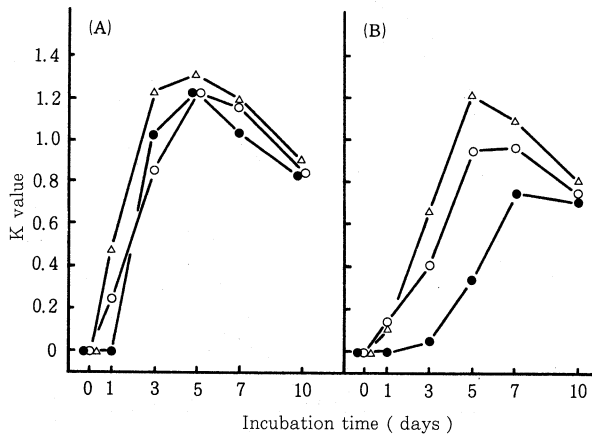


Fig. 2. Growth rates of SmT (○), SmD (●) or RG (△) variant of *M. avium* complex N-260 in D-Dubos (A) or E-Dubos (B) medium. The growth rates were calculated from the formula $K = (\ln N_t - \ln N_0) / (t - t_0)$, where N_t and N_0 are the number of CFUs at times t and t_0 , respectively^{3) 4)}.

SmD variantの順であった。他方、D-Dubosでは(A) RG variantにおいてSmD及びRG variantにおけるよりも若干優れた増殖速度を示したが、これら3者間にさしたる差は見られず、いずれもそのピークは培養5日目であることが分かった。

上述のFig. 1に示した成績はMAC N-260株のみならず、MAC N-275株についても同様であった(図

省略)。

次に、D-Dubos及びE-Dubosの*M. tuberculosis*業室株(H37Rv)(Fig. 3A)並びに臨床分離株(TB-20)(Fig. 3B)の増殖支持能について検討したところ、両菌株に対してD-DubosがE-Dubosよりも幾分優れていることが分かった。

D-DubosとE-Dubosの基礎培地の組成と量には

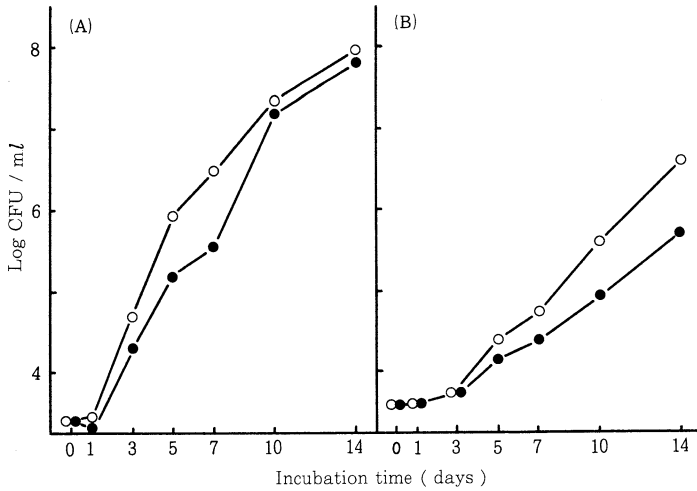


Fig. 3. Growth curves of H37Rv (A) or TB-20 (B) strain of *M. tuberculosis* in D-Dubos (○) or E-Dubos (●) medium

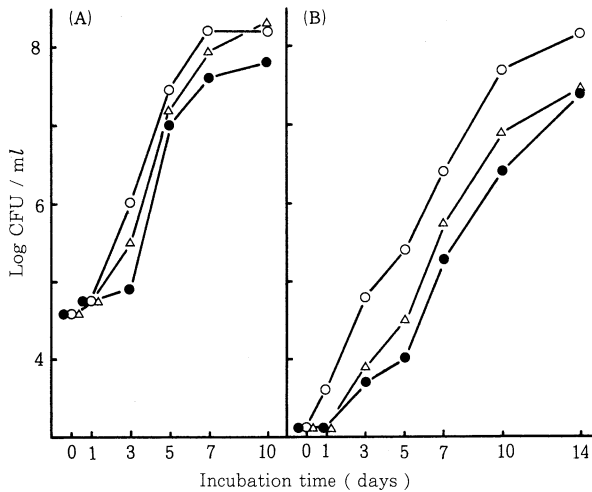


Fig. 4. Growth curves of *M. avium* complex N-260 (SmT) (A) or *M. tuberculosis* H37Rv (B) in D-Dubos (○), E-Dubos (●) or recombined E-Dubos (Δ) medium

若干の違いはあるものの、基本的には同様であるといえよう (Table 参照)。しかし、これらに添加するアルブミン溶液の組成についてみると、E-Dubos では炭素源として dextrose と glycerol の両者が加えられ、D-Dubos では dextrose のみで glycerol は加えられていないという違いはあるが、中でもアルブミンの品質が培地の発育増殖支持能を大きく左右するであろうことは想像に難くない。そこで E-Dubos へ E 社製結核培地用

アルブミンの代わりに D-Dubos 用のアルブミン溶液調製に用いたアルブミンを用いて E-Dubos 用のアルブミン溶液を自家調製して用い、アルブミンの品質の違いによる増殖支持能を検討した (Fig. 4)。その結果、自家調製した E-Dubos 用アルブミン溶液を添加した E-Dubos の MAC 並びに *M. tuberculosis* に対する増殖支持能は D-Dubos よりも若干劣りはしたが、E 社製結核培地用アルブミン添加 E-Dubos におけるよ

りも幾分優れ、両者の中間的支持能を有することが分かった。

考 察

今回の実験において供試した E-Dubos は Dubos 原法培地を改良し、アルカリで前処理した病的材料を中和することなくそのまま直接接種するように作られたものであるため (pH 6.2), 緩衝能を強くしてあり、また雑菌による汚染を防ぐためにマラカイト緑が添加してある点が D-Dubos と大きく異なっている点である。従って、今後これらの点についても十分検討する余地があるが、アルブミンの種類をかえることのみによって培地の増殖支持能が幾分とも改善されることが今回の実験によって分かった。Dubos 基礎培地への血清アルブミンの添加は、培地中の Tween 80 の水解によって生じるオレイン酸の菌に対する発育阻止作用を中和し、菌の増殖支持能を高めることが知られている⁵⁾。従って、添加されるアルブミンの品質の違いによってその支持能が異なるであろうことは論をまつまでもなからう。

従来、我々は E-Dubos を用いた薬剤感受性試験も行ってきたが、D-Dubos に比べて増殖支持能の劣るこの培地による感受性試験成績は若干低めに出ることも考えられるところである。

MAC 感染症患者より分離された MAC は、SmT の集落形態を有するが、継代を繰り返すことによって SmD 集落へと変異し、それに伴って、抗菌剤に対する感受性の増大、マウスに対する病原性の喪失あるいはプラスミドの喪失などが報告されている^{6)~8)}。そのほかに SmD への変異に伴って増殖速度が増大する³⁾とするものと、逆に低下する⁴⁾とする相反する成績も報告されているが、今回の我々の成績は後者の知見を支持するものである。しかしながら、培地の組成によっては SmT 並びに SmD variant の増殖速度はほとんどかわらない (Fig. 2 A) ことから、SmT variant から SmD variant への変異に伴う増殖速度の変化は菌側よりもむしろ培地組成、あるいは成分の方がより重要な要因を成しているのではないかと思われる。

ま と め

MAC 並びに *M. tuberculosis* の E 社製 Dubos 培

地 (E-Dubos) 並びに D 社製 Dubos 培地 (D-Dubos) 中における増殖能を比較検討した。その結果、両菌株とも、また MAC の variant (SmT, SmD 及び RG) の別なく D-Dubos の増殖支持能が E-Dubos のそれよりも優れていた。E-Dubos の場合も添加するアルブミンをかえることによって増殖支持能の亢進がみられた。D-Dubos 中における SmT, SmD 及び RG variant の増殖速度はほぼ同程度であったが、E-Dubos 中においては $RG > SmT > SmD$ であった。

文 献

- 1) 山村雄一：結核菌の生化学，共立出版，p.56, 1955.
- 2) 工藤祐是：結核病学，I. 基礎・臨床編，岩井和郎編，結核予防会，p.35, 1987.
- 3) Kajioka, R., and Hui, J. : The pleiotropic effect of spontaneous single-step variant production in *Mycobacterium intracellulare*, Scand J Resp Dis, 59 : 91, 1978.
- 4) Woodley, C. L., and David, H. L. : Effect of temperature on the rate of the transparent to opaque colony type transition in *Mycobacterium avium*, Antimicrob Agents Chemother, 9 : 113, 1976.
- 5) Dubos, R. J. and Davis, B. D. : Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media, J Exp Med, 83 : 409, 1946.
- 6) Schaefer, W. B. et al. : Pathogenicity of transparent, opaque and rough variants of *Mycobacterium avium* in chickens and mice, Am Rev Respir Dis, 102 : 499, 1970.
- 7) Franzblau, S. G. et al. : Mycobacterial plasmids : Screening and possible relationship to antibiotic response in *Mycobacterium avium/Mycobacterium intracellulare*, Microbiol Immunol, 30 : 903, 1986.
- 8) Mizuguchi, Y. et al. : Plasmid deoxyribonucleic acid and translucent-to-opaque variation in *Mycobacterium intracellulare* 103, J Bacteriol, 146 : 656, 1981.