

原 著

Mycobacterium avium Complex の菌が他の遅発育性抗酸菌よりも長生きする可能性について

東 村 道 雄 ・ 一 山 智

国立療養所中部病院内科

受付 昭和 63 年 3 月 31 日

MYCOBACTERIUM AVIUM COMPLEX BACTERIA PROBABLY LIVE LONGER THAN OTHER SLOWLY GROWING MYCOBACTERIA

Michio TSUKAMURA* and Satoshi ICHIYAMA

(Received for publication March 31, 1988)

Mycobacterium avium complex, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium marinum* strains were cultivated in a 10 ml-sample of Dubos liquid medium and the amount of growth and the number of viable units per mg wet weight of these bacteria were determined in two days-intervals. *M. avium* complex strains contained 10^8 - 10^9 viable units per mg wet weight, whereas other mycobacteria 10^6 - 10^7 . The factors influencing this number of viable units per mg should be as follows: 1) The viability duration of individual bacteria; 2) the size of bacteria; 3) the clumping of bacteria; 4) the specific weight of bacteria. *M. kansasii* exhibited long rods but the length of rods was at most twofold. The clumping of *M. tuberculosis* was most marked but this was until a clumping of several bacteria. The specific weight of bacteria differed not so significantly from each other ranging from 0.93 to 1.11. Therefore, the greatest number of colony-forming units of *M. avium* complex strains was considered to be due to their longer viability duration. Other bacteria probably die soon after their multiplication, but the *M. avium* complex bacteria might live longer than the others even after multiplication.

Key words : *Mycobacterium avium* complex, viability duration

キーワードズ : *Mycobacterium avium* complex, 菌の生存期間

緒 言

現在、抗酸菌感染症の治療にたずさわる者にとって、最も困難な問題は、*Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex (*M. avium* complex) による肺感染症の治療であろう。この治療

の困難さは、菌の抗結核剤に対する自然耐性および宿主の免疫力低下に関係しているものと思われるが、我々は、現在、この菌について結核菌について有するほどの知識をもたないことも事実である。従って、向後、この菌の生理学、生化学についての知識を蓄積していくことが必要ではないかと思われる。そのような研究の一端として、

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

本報では、この菌の発育の生理について、他の遅発育性抗酸菌、*Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium marinum* と比較してみた。

実験方法

次の5株を使用した。*M. tuberculosis* 05001 (H37 Rv) 株, *M. kansasii* 07002 (Bostrum D35) 株, *M. marinum* 08010 (ATCC 927), *M. avium* complex E12101 および E12102 株。最後の2株は、我々のもとで患者の喀痰から分離し、既報¹⁾の方法で同定した。

培地: Dubos 液体培地を使用した。作製法は、次のとおりである。Difco Dubos Broth Base (dehydrated) (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U. S. A.) を1.3gとり、180mlの蒸留水に溶解して121°Cで15分間滅菌した。これを50°Cに冷やし、20mlの栄研牛血清20mlを無菌的に添加し、よく混ぜた後、165×16.5mmの試験管に10mlずつ分注した。分注後、24時間37°Cに保って無菌であることを確かめた。

発育量および生菌単位の測定: 小川培地に7日 (*M. kansasii* および *M. marinum*) または14日 (*M. tuberculosis* および *M. avium* complex) 培養して発育した集落を1白金耳(湿菌量1mg)とて、Dubos 液体培地に接種した。接種後、37°C (*M. marinum* は28°C) に7日間培養したものを、接種源とした。すなわち、培地の0.1mlずつを、滅菌ピペットで、上記のDubos 液体培地に、各株6本ずつ接種した。このDubos 液体培地を37°C (*M. marinum* は28°C) に培養し、2日間隔で、各株の培地1本を取って、発育量と生菌単位を測定した。まず、ピペットで培地を5分間pumpingして比濁度を測定し、あらかじめ作ってある菌量(mg 湿菌量/ml) 対比濁度の曲線に合わせて、発育量(mg/ml)を測定した。次に、0.1% Tween 80 水溶液で培地の10倍希釈液 10^{-1} ~ 10^{-6} を作った。各希釈液から渦巻白金耳で1白金耳ずつ(0.02ml)をとって、小川培地に接種した。発育集落数は、被検株の発育速度に応じて、14日、21日、または28日培養後に測定した。この結果から、湿菌量mgあたりに含有される生菌単位を計算した。*M. marinum* は14日後、*M. tuberculosis* と *M. kansasii* は21日後、*M. avium* complex は28日後に集落数を数えることができた。

なお、生菌単位測定に使用した「小川培地」の組成は次のとおりである。原液(1% KH_2PO_4 および1% sodium glutamate), 100ml; 全卵液, 200ml; glycerol, 6ml; 2% malachite green 水溶液, 6ml (pHは自然に6.8となる)。培地を、165×16.5mmの試験管に7mlずつ分注し、90°C 60分加熱することにより斜面培地とした。

実験成績および考察

成績をFig. 1 および2に示す。

M. marinum が最も速く発育し、次いで、*M. kansasii*, 次に *M. tuberculosis* の順で、*M. avium* complex が最も緩徐に発育した (Fig. 1)。10日後の発育量の大きさも、この順となった (Fig. 1)。ところが、湿菌量mgあたりの生菌単位をみると、各株がそれぞれ違った経過を示した。*M. marinum* は、6日まで、mgあたり生菌単位が増加したが、以後、急に減少した。これは、この菌の発育が最も速やかであったために、10日後に対数期の終わりまたは停常期のはじめに入って、生菌単位が減少したものと思われる。*M. kansasii* は、6日以後でもmgあたり生菌単位も、発育量も増加している。*M. tuberculosis* も、より緩やかではあるが、同じ傾向を示した。*M. avium* complex は、発育も最も緩徐であり、mgあたりの生菌単位も横這いまたは漸増の傾向を示した。Fig. 2の成績をみて、一見、明らかなことは、他の抗酸菌が、終始、mgあたり 10^6 ないし 10^7 生菌単位を含有したのに対して、*M. avium* complex のそれは、mgあたり 10^8 ~ 10^9 で、はるかに生菌単位が多い (Fig. 2)。

この結果は、いかに解釈すべきであろうか。mgあたりの生菌単位測定に影響する因子として、次のことが考えられる。(1) 菌が長く生きておれば、mgあたり生菌単位の数値は大きくなる。一方、菌が速やかに死ぬようであると、死菌含有率が大きくなるので、mgあたり生菌単位の値は小さくなるはずである。(2) 菌の大きさが大きいほど、1mgに含有される菌数は小さくなるので、値は小さくなる。(3) 菌がclumpingを起こせば起こすほど、数個の菌が1生菌単位として数えられてしまうので、この値は小さくなる。(4) 菌の比重が重いと、1mgに含まれる菌数が小さくなるので、この値も小さくなる。

まず、第2の要因を考えてみると、*M. kansasii* はしばしば6 μm 以上の長桿菌型となることが多く、6 μm 以下の他の菌よりも大きいので、mgあたりの菌数が小となることが考えられる。しかし、*M. kansasii* が、いくら大きいといっても、長さは、せいぜい2倍どまりであるし、太さもやや太い程度にすぎない。従って、この要素で、10倍もの生菌単位の差が起ることは考えられない。

第3の要因のclumpingであるが、周知のごとく、*M. tuberculosis* が最もclumpingを起こしやすい。しかし、実際に鏡検してみると、*M. tuberculosis* のclumpingは、濃厚な原菌液でも2~6個程度で、10倍を超す生菌単位の差を説明するに至らない。

第4の要因の比重であるが、我々は、実際に、秤量した菌を目盛り付きの遠心管に入れて遠心し、容積を測っ

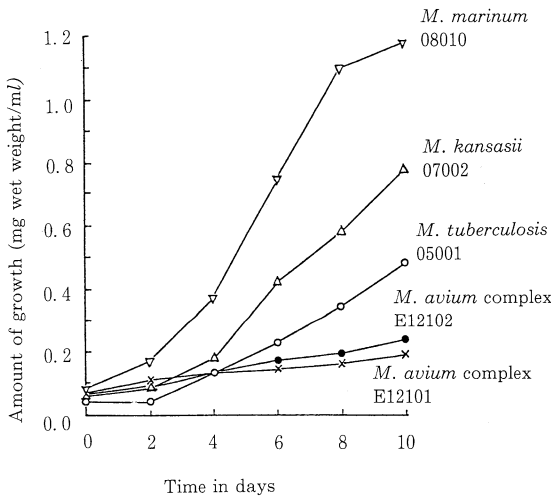


Fig. 1. Comparison of the Growth in Dubos Liquid Medium.

Each 10 ml sample of Dubos liquid medium was inoculated by a 0.1 ml-sample of 7 day-old Dubos liquid medium cultures and incubated at 37°C (*M. marinum* at 28°C). In two days intervals, one medium of each strain was used for determining the amount of growth (mg wet weight per ml) and the viable bacterial units per mg wet weight. The figure shows the growth rate in the term of mg wet weight per ml of medium. The strains used are as follows : *M. tuberculosis* 05001 (H37Rv), *M. kansasii* 07002 (Bostrum D-35), *M. marinum* 08010 (ATCC 927), and *M. avium* complex E12101 and E12102. The later two strains were identified in this laboratory according to the method described previously (1).

てみた。その結果は、抗酸菌の比重は、0.93~1.11で、菌種差は認められなかった。

以上のように、第2ないし第4の要因は、mgあたり生菌単位の菌種差を説明するには不十分で、結局、我々は、菌種による菌の生存期間の長短が、この差の主因であると考えざるをえない。

東村^{2)~4)}がかって *Mycobacterium smegmatis* を使用して研究した結果によれば、桿状菌は次々と伸張によって新しい桿状菌を生じてゆくが、これらの桿状菌がすべて発育能力をもつものではない。陳旧培養になると発育不能の菌が生じていく。このような過程は、おそらく、すべての抗酸菌に存在しても不思議ではなく、発育を続ける一方では、次々と死菌を生じていくものと考えてよい。菌種によって、分裂増殖を続けるかたわらから死んでゆくものもあり、一方では、比較的長く生存して発育能力を保持している菌がいても不思議ではない。*M. avium* complex が、単位重量に比較的多くの生菌単位を含有しているのは、後者の菌に相当するのではあるまいかと思われる。これに対して、他の抗酸菌では、比較

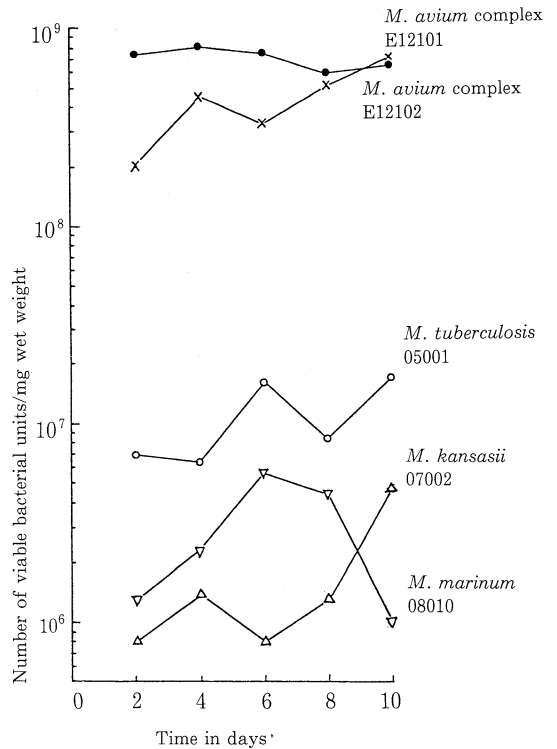


Fig. 2. Comparison of the Number of Viable Bacterial Units determined in one milligram of wet weight of bacteria.

One medium from each strain was vigorously mixed by pumping with a pipette and diluted by a 0.1 % Tween 80 aqueous solution until 10^{-6} . Each 0.02 ml-sample of these diluted bacterial suspensions was inoculated onto one Ogawa egg medium slant by a spiral loop which can deliver a 0.02 ml-sample by one inoculation. The slants inoculated were stoppered by a gum cap with a 3 mm-cut in the bottom and incubated at 37°C (*M. marinum* at 28°C). The number of colony-forming units was determined by counting the number of colonies after incubation for 14 days (*M. marinum*), for 21 days (*M. tuberculosis* and *M. kansasii*), or for 28 days (*M. avium* complex).

的に速く菌の死滅が起こるものと考え、上記の現象がよく理解できる。ある種の菌では、死滅の過程が非常に速く起こり、集落のほとんど全部が死菌という状態も起こり得るであろう。

総 括

M. avium complex, *M. tuberculosis*, *M. kansasii* および *M. marinum* を Dubos 液体培地に培養して、発育量と mg あたりの生菌単位数を測定してみると、*M. avium* complex は、mg あたり $10^8 \sim 10^9$ の生菌単位を含んでいたが、他の3者は mg あたり 10^6

～ 10^7 生菌単位しか含有していなかった。mgあたり生菌単位数の大小を規制する要素としては、(1)菌の生存能力、(2)菌の大きさ、(3)菌の clumping の程度、(4)菌の比重などが考えられる。しかし、菌長最大の *M. kansasii* でも、菌長は他の菌の2倍程度にとどまり、clumping の最も大きい *M. tuberculosis* でも数個にとどまる。また、比重については菌種間で著明な差はない。従って、mgあたりの生菌単位が、他の菌の10倍に達する *M. avium* complex は、個々の菌が比較的長く生存するという特徴を有しているものと考えられる。他の菌が、分裂後、比較的速く死滅するのに対して、*M. avium* complex の菌は、分裂が緩徐で、分裂後も比較的長い間、発育能力を保持しているものと思われる。

文 献

- 1) Tsukamura, M. : Numerical identification of slowly growing mycobacteria, *Microbiol Immunol*, 29 : 1039, 1985.
- 2) 束村道雄 : 結核菌の発育環に関する研究, 第1報, 結核, 26 : 315, 1951.
- 3) 束村道雄 : 結核菌の発育環に関する研究, 第5報, 非抗酸化陳旧集落からの発育過程について, 医学と生物学, 23 : 198, 1952.
- 4) 束村道雄 : 結核菌の発育環に関する研究, 第7報, 遊離顆粒について, 医学と生物学, 24 : 183, 1952.