

原 著

Mycobacterium avium Complex における集落形態, 抗結核剤感受性,
発育速度および Dubos 液体培地中での発育能力の相互関係

束 村 道 雄

藤田学園保健衛生大学医学部微生物学教室

国立療養所中部病院抗酸菌研究施設

受付 平成元年5月8日

INTERRELATIONSHIP AMONG COLONIAL MORPHOLOGY, SUSCEPTIBILITY
TO ANTITUBERCULOSIS DRUGS, GROWTH RATE, AND VIABILITY IN DUBOS
LIQUID MEDIUM IN *MYCOBACTERIUM AVIUM* COMPLEX STRAINS

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication May 8, 1989)

Interrelationship among colonial morphology, susceptibility to antituberculosis drugs, growth rate, and viability in Dubos liquid medium were studied in *Mycobacterium avium* complex strains, which were not exposed to any antituberculosis drugs. All five strains that were relatively susceptible to the majority of antituberculosis drugs formed smooth, opaque, domed colonies (SmD) on 7H10 agar medium, and all five strains that were naturally resistant to those drugs formed smooth, transparent, flat colonies (SmT). The SmD colony-forming strains showed small, domed, smooth colonies (DS-type) on Ogawa egg medium, and the SmT colony-forming strains usually large, flat, wrinkled colonies (FW-type) on Ogawa egg medium. However, there was one exceptional strain (11004) that formed DS-type colonies on Ogawa egg medium and SmT-type on 7H10 agar medium. Accordingly, the SmD morphology correlated with drug susceptibility and the SmT colonial morphology with drug resistance. All six DS-colony-forming strains had slow growth rates on Ogawa egg medium, whereas all four FW-colony-forming strains had rapid growth rates on Ogawa egg medium. However, such correlation was not observed in Dubos liquid medium. When the viability was defined as a ratio of the number of colony-forming units contained in 1 mg wet weight of bacteria, the five drug-susceptible strains usually showed low viability and the five drug-resistant strains showed high viability in the Dubos liquid medium.

The above four characteristics, colonial morphology, drug susceptibility, growth rate on Ogawa egg medium, and viability in Dubos liquid medium, usually correlated with each other. The colonial morphology on the 7H10 agar medium correlated with the drug susceptibility or resistance, although the colonial morphology on Ogawa egg medium did not always correlate with it. The colonial morphology on Ogawa egg medium always

* From the Department of Microbiology, Fujita-Gakuen Health University School of Medicine, Toyoake, Aichi 470-11 Japan.

correlated with the growth rate on Ogawa egg medium. The viability in Dubos liquid medium usually correlated with the drug susceptibility and to the colonial morphology on 7H10 agar medium. Naturally drug-resistant strains retained high viability in Dubos liquid medium.

Key word : *Mycobacterium avium* complex, Colonial morphology, Susceptibility to anti-tuberculosis drugs, Growth rate, Viability, Dubos liquid medium

キーワード : *Mycobacterium avium* complex, 集落形態, 抗結核剤感受性, 発育速度, 発育能力, Dubos 液体培地

緒言

Mycobacterium avium complex が、ほとんど全部の抗結核剤に耐性を示し、治療が困難であることは、周知の事実である。この多剤耐性を説明するために、plasmids の存在および permeability barrier の存在が仮設として出されたが、その本質が明らかになったとはいえない。この多剤耐性が、この菌の他のいかなる性状に結びつくかは、多剤耐性の本質に迫るための1つの重要な過程であると思われる。文献的には、Moehring and Solotorovsky¹⁾ が見出した集落形態と毒力との関係の毒力を多剤耐性に置き換えた関係が指摘されている。すなわち、Moehring and Solotorovsky¹⁾ は、*M. avium* complex に4つの集落形態があることを記載したが、その主たるものは、smooth, domed, opaque (SmD) と smooth, flat, transparent (SmT) の2型である。彼らは、前者がニワトリの雛に対して毒力が弱く、後者が強いと報告した。その後、この集落形態は、抗結核剤感受性にも関係があることが、Rynearson et al.²⁾, Kajioka and Hui³⁾, Mizuguchi et al.⁴⁾, Kuze and Uchihara⁵⁾ によって報告された。すなわち、SmD 株は、RFP, SM, KM, CPM, VM に感受性が高く、SmT 株は低いと報告された。われわれは、本報で、抗結核剤に多剤耐性を示す株は、Dubos 液体培地中で長く発育能力を保持し、比較的感受性の株は、比較的速く発育能力を失うことを観察した。また、たいいていの場合、前者は、小川培地での発育速度が速く、後者は遅いことも観察された。

研究方法

菌株 : 抗結核剤未使用の患者の喀痰から分離された9株と、ニワトリの病巣から分離された1株(11004)の合計10株を使用した。いずれも *M. avium* complex と同定され、その血清型は、農林省家畜衛生試験場の根本久、抽木弘之両博士によって1974年に決定された。菌株は、同定の前に単個集落分離によって純化され、

-20°C に凍結保存されてきた。本実験の前に、もう一度、7H10 寒天培地で単個集落分離を行って、単個集落から継代培養した。この際、13022 株は、2 種の形態の菌の混合であると分かったので、その中の SmT 集落を継代した。他の9株は均一集落と考えられた。

(注) 集落形態は、環境条件によって多少の「みかけ上の変異」を示すと思われた。例えば、SmT 株を 7H10 寒天培地に単個集落を作るように接種した場合、大部分は SmT 型集落を示すが、中には、一見、SmD にみえる集落が少数生じた。しかし、この SmD とみえる集落を継代し、同じようにして集落形態をみると、ほとんど大多数が SmT 型で、ごく少数の SmD 型が現れた。これらの SmT 型集落も、一見、一時的に SmD 型であるかにみえる集落も、抗結核剤感受性は同じである。したがって、一見、SmD 型にみえた集落は、環境の変化で一時的にそうだったので、本質的に SmD 型に変わったのではないと思われた。

集落形態 : 集落形態は、「7H10 寒天培地 (Difco Lab., Detroit, Michigan, USA) 平板」, 「1% 小川培地平板」, 「1% 小川培地斜面」の3種の培地で観察した。小川培地に10日間培養した集落をガラス玉コルベ中で5分間振盪して均一化し、0.1% Tween 80 水溶液に、10 mg 湿菌量/ml の割合に浮遊させ、これを 10^{-7} まで10倍希釈した。その 10^{-4} - 10^{-7} 菌液を0.1 ml ずつピペットで平板培地に接種し、また、0.02 ml ずつを渦巻白金耳で小川培地斜面に接種した。平板は、ビニール袋に入れ、斜面培地には、ゴム栓を覆せて37°C に培養した。なお、平板は直径9 cm のものを使用し、培地は20 ml ずつ分注した。斜面培地は、165×16.5 mm の試験管に、培地7 ml ずつを入れて作った。集落形態は、7H10 寒天培地では、14~21 日後に、5~6 倍の拡大鏡で観察し、小川培地では、21~28 日後に肉眼で観察した。集落形態の記載法は、7H10 培地では、Moehring and Solotorovsky¹⁾ によった。小川培地での集落形態の分類法は、Table 1 の注のごとくに行った。

Generation time (世代時間) : 測定は、Youmans

Table 1. Correlation of Colonial Morphology Form of *Mycobacterium avium* Complex Strains to the Susceptibility to Antituberculosis Drugs

Drug	Minimal inhibitory concentration ($\mu\text{g/ml}$)									
	13008 DS	13016 DS	13021 DS	13038 DS	13887 DS	11004 DS*	13022 FW	13032 FW	13033 FW	13034 FW
RFP	0.8	0.8	6.25	12.5	6.25	>200.	>200.	>200.	>200.	50.
SM	3.13	12.5	12.5	200.	25.	25.	200.	200.	200.	50.
TH	25.	100.	50.	25.	50.	100.	100.	50.	50.	25.
INH	1.6	6.25	>200.	50.	6.25	25.	3.13	1.6	1.6	12.5
EB	0.8	0.8	1.6	6.25	1.6	12.5	25.	12.5	25.	6.25
KM	6.25	12.5	12.5	200.	25.	100.	200.	200.	200.	100.
EVM	6.25	25.	50.	100.	50.	50.	100.	100.	200.	100.
SX	12.5	25.	> 50.	3.13	12.5	3.13	12.5	6.25	6.25	25.
KT	12.5	12.5	6.25	> 50.	25.	> 50.	> 50.	> 50.	> 50.	50.
MC	3.13	3.13	6.25	50.	6.25	25.	> 50.	> 50.	> 50.	25.

DS : Domed, smooth, small colony on Ogawa egg medium (SmD colony on 7H10 agar medium).

FW : Flat, wrinkled, large colony on Ogawa egg medium (SmT colony on 7H10 agar medium).

* This strain formed DS-type colonies on Ogawa egg medium, but it formed small, smooth, flat, transparent colonies on 7H10 agar medium. In contrast to that other naturally resistant strains formed SmT colonies (large, smooth, flat, transparent colonies) on the 7H10 agar medium, the colonies of this strain 11004 were small and appeared as if SmD colonies. However, the colonies were not opaque but transparent. Therefore, the strain was belonged to SmT-type. The classification of the colonial morphology was different on this strain according to the medium, Ogawa egg medium or 7H10 agar medium.

Abbreviations : RFP, Rifampicin ; SM, streptomycin sulfate ; TH, Ethionamide ; INH, Isoniazid ; EB, Ethambutol ; KM, Kanamycin sulfate ; EVM, Enviomycin sulfate ; SX, sulfadimethoxine ; KT, Kitasamycin ; MC, Minocycline hydrochloride.

and Youmans⁶⁾の方法により、小川培地(1%小川培地)を用いて測定した。小川培地10日培養菌をガラス玉コルベンで10分間振盪して均一化し、0.1% Tween 80水溶液に浮遊させて10 mg/ml(湿菌量)の菌液とした。これを 10^{-6} まで希釈し、 $10^0 \sim 10^{-6}$ の7種の菌液の各々から渦巻白金耳で1白金耳(0.02 ml)ずつ小川培地に接種し、集落発生を肉眼で毎日観察した。菌液濃度の対数を縦軸にとり、日数を横軸にとり、初発集落発見までの日数をグラフに書き、曲線が直線を示す部分で、 $\{(\log a - \log b)/t\} = K$, $G = \log 2/K$ の式により世代時間Gを計算した。aおよびbは菌液の希釈度である。

抗結核剤感受性：小川培地(1%小川培地)を用い、10種の抗結核剤に対する感受性を測定した。方法は既報した⁷⁾。ただし、薬剤濃度は、次のごとくに変えた。2倍希釈列で、Kanamycin (KM) および Enviomycin (EVM), 400–3.13 $\mu\text{g/ml}$; Rifampicin (RFP), Streptomycin (SM), Isoniazid (INH), Ethionamide (TH), 200–0.8 $\mu\text{g/ml}$; Ethambutol (EB), Minocycline (MC), Sulfadimethoxine (SX), Kitasamycin (KT), 50–0.4 $\mu\text{g/ml}$ 。以上10種の希釈列の各々に、薬剤なしの対照培地を加えた。最小発育

阻止濃度の判定は、37°C 14日培養後に行った。本報の方法による最小発育阻止濃度の測定誤差については、前に記載した⁸⁾。

Dubos 液体培地における発育曲線と菌の発育能力 (Viability)：本報で使用した Dubos 液体培地は、次のごとく調製した。1.3 g の Dubos Broth Base (Difco Lab., Detroit, Michigan) を 180 ml の蒸留水に溶解し、120°C 15分滅菌した後、牛血清(栄研、東京) 20 ml を無菌的に添加し、165×16.5 mm の試験管に 10 ml ずつ分注した。菌株は、小川培地(1%小川培地)に 37°C 10日間培養し、ガラス玉コルベンで振盪(10分間)した後、0.1% Tween 80水溶液に浮遊させて 1 mg/ml(湿菌量)の菌液とした。上記の Dubos 液体培地 10 ml に、この菌液 1.0 ml ずつを接種した。各株について 10本の aliquots を作り、37°C 培養後、日数を追って1本ずつとって、比濁度と mg(湿菌量)当たりの生菌単位(colony-forming units=CFU)を測定した。各株について予め測定した比濁度・重量曲線から mg(湿菌量)/ml の値を測定して発育曲線画いた。一方、残りの Dubos 液体培地をピペットで pumping して均一化し、0.1% Tween 80水溶液で 10^{-6} まで希釈し、各希釈液の 0.02 ml ずつを渦巻白金

耳で「1%小川培地」に接種し、37°C 21~28 日培養後に集落数を数えた。この集落数と希釈度と mg/ml の値から、mg (湿菌量) あたりの生菌単位 (CFU) を計算した。

研 究 成 績

集落形態と抗結核剤感受性

被検株 10 株は、その抗結核剤感受性によって 2 群に大別できた。(Table 1)。5 株 (13008~13887) は、TH と INH と SX (sulfadimethoxine) を除く 7 種の抗結核剤に感受性が高く、他の 5 株 (11004~13034) は、感受性が低かった。感受性の高い 5 株の集落形態は、小川培地では、小さく盛り上がった平滑な集落 (DS 型) であり、7H10 寒天培地では、SmD 型 (smooth, domed, opaque form) であった。一方、感受性の低い 5 株の中の 4 株は、小川培地で、大きく平たい皺のよった集落 (FW 型) を作り、7H10 寒天培地では、SmT 型 (smooth, flat, transparent form) の集落を作った。耐性株の中の 1 株 (11004 株) は、小川培地では感性株と同じ DS 型集落を作り、7H10 寒天培地でも、一見、SmD 型の集落を作った。したがって、11004 株の集落形態は、いったん、SmD 型と判定したが、その後、観察を繰り返すと、集落は小さいが平たく透明なので、非定型的な SmT 型と判定した。したがって、11004 株の集落形態を SmT の変異型と考えると、一応、感受性株は SmD 型、耐性株は SmT 型と考えられた。われわれは、SmT 型から SmD 型を得ようと、紫外線照射や mitomycin C 処理を繰り返したが、ついに安定した変異株を得ることはできなかった。一時的に集落形態が変異したかのごとく見えることはあったが、これは、実験条件の変化による非遺伝的変異と分かった。

集落形態と発育速度

小川培地で観察した集落形態は、同培地での発育速度と密接に関係するように思われた (Table 2)。小川培地で DS 型集落を示した 6 株の発育速度 (generation time として測定した) は、FW 型集落を示す 4 株の発育速度よりも明らかに遅かった。7H10 寒天培地で、SmD 型集落を作る株の発育速度も、SmT 型集落株よりも遅いが、SmT 型株全部が必ず発育が速いとはいえなかった。ただし、例外の 11004 株を除くと、一般的には、SmT 型の株は発育が速く、SmD 型の株は発育が遅いと思われた。

Dubos 液体培地中の Viability と抗結核剤感受性

小川培地で観察した集落形態は、小川培地での発育速度と密接に関係するように思われたが、集落形態と Dubos 液体培地での発育速度とは関係がないように思われた (Fig. 1 および Fig. 2)。また、抗結核剤感受性と Dubos 液体培地中の発育速度も関係がなかった。特

Table 2. Comparison of the Generation Time (hours) between DS-colony forming strains and FW-colony forming strains of *Mycobacterium avium* Complex.

Strain	Colonial morphology type	Generation time (hours)
13008	DS	14.4
13016	DS	16.8
13021	DS	14.4
13038	DS	14.4
13887	DS	21.8
11004	DS	14.4
		16.0±3.0
13022	FW	7.2
13032	FW	9.6
13033	FW	10.8
13034	FW	9.6
		9.3±1.5

The generation time was determined according to the method of Youmans and Youmans (Youmans, G. P., and Youmans, A. S.: J Bacteriol, 58: 247-253, 1949).

There is a statistically significant difference between the generation times of DS-colony-forming strains and of FW-colony-forming strains ($P<0.01$ by the t-test).

に目立ったのは、SmD 型に属する 13887 株が、Dubos 液体培地中ではほとんど発育しないことであった。

次に、Dubos 液体培地中での mg 当たりの生菌単位数 (colony-forming units=CFU) をみると、感受性の高い 5 株の CFU/mg の値が 5×10^7 /mg を超えなかったのに対し (Fig. 3), 感受性の低い 5 株のそれは、ほとんど常に 5×10^7 /mg 以上であった (Fig. 3 および Fig. 4)。

考 察

集落形態と抗結核剤感受性の間には、密接な関係があることが、すでに報告されている²⁾⁻⁵⁾。過去の研究者は、RFP, SM, KM, CPM, VM 感受性が集落形態と関連し、SmT 型の株は、一般に、これら抗結核剤に耐性で、SmD 型の株は感受性であるとしている。しかし、今回のわれわれの研究結果では、すべての抗結核剤について関連性が見られるわけではなく、TH, INH と SX に関しては、集落形態との関連性が判然としなかった。また、上記の抗結核剤のほか、EVM, EB, MC (minocycline) および KT (kitasamycin) 感受性についても、集落形態との関連性がみられた。

このような *M. avium* complex の多剤耐性が、他のいかなる性状と結びつくかは、興味深い問題と思われる。

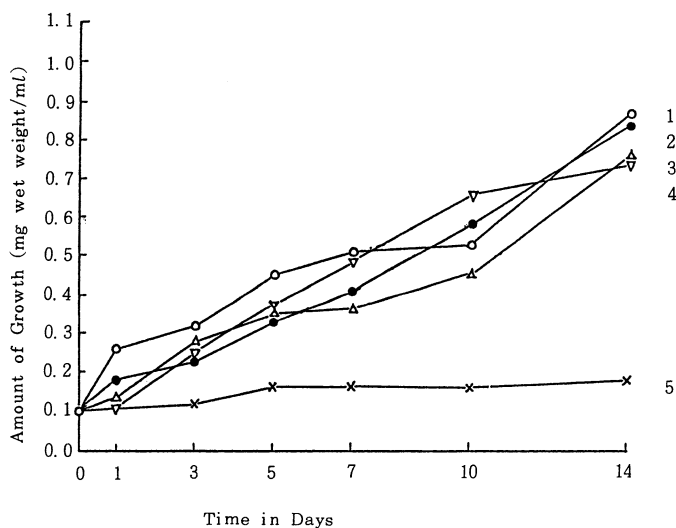


Fig. 1. Growth curves in Dubos liquid medium of naturally relatively susceptible strains of *Mycobacterium avium* complex.

1. 13008 ; 2. 13016 ; 3. 13021 ; 4. 13038 ; 5. 13887.

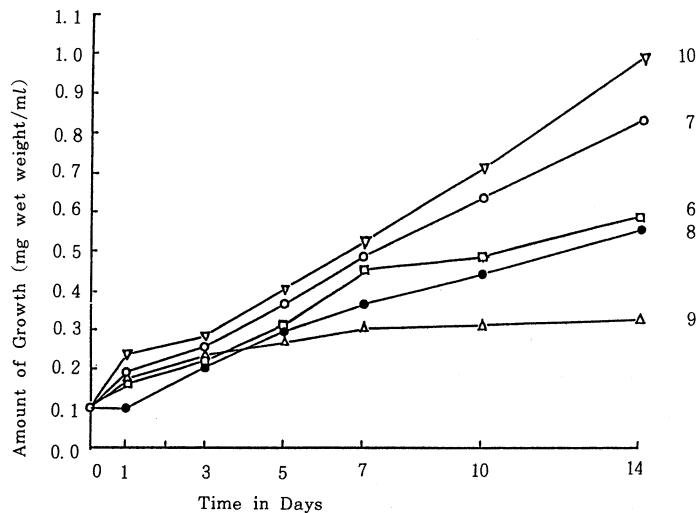


Fig. 2. Growth curves in Dubos liquid medium of naturally multi-drug resistant strains of *Mycobacterium avium* complex.

6. 11004 ; 7. 13022 ; 8. 13032 ; 9. 13033 ; 10. 13034.

る。多剤耐性は、SmT型集落形態と結びつくようであるが、そのほかに、Dubos液体培地中での生存能力(viability)と関連すると思われる。Dubos液体培地中で、CFU/mgの値が高く維持されることは、個々の

菌が長く生きていることを示している。多剤耐性の菌は、このような能力を持っていると考えられる。多剤耐性とこのようなviability維持能とは、SmT型集落形態となんらかの関係で結びついているものと想像される。こ

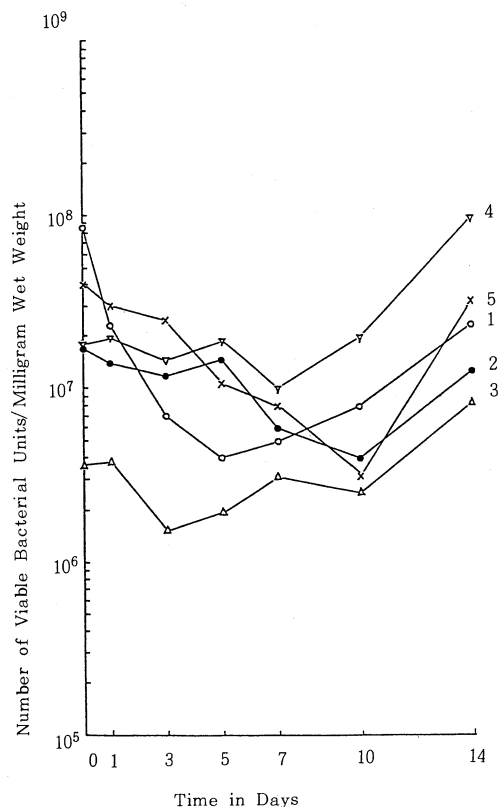


Fig. 3. Number of colony-forming units contained in one milligram wet weight of bacteria of relatively susceptible strains of *Mycobacterium avium* complex.

1. 13008; 2. 13016; 3. 13021; 4. 13038; 5. 13887.

のほかに、耐性株は、しばしば、感受性株よりも発育速度（小川培地）が速いが、必ずそうであるとはいえない。また、感受性と Dubos 液体培地中の発育速度とは、関係がなさそうである。

小川培地での発育速度は、小川培地での集落形態と関係がある。これは当然のことで、小さく盛り上がった集落を作る株は発育が遅く、大きい広がった集落を作る株は発育が速い、換言すれば、横に（水平方向）に広がらずに、縦の方向にしか発育しない株は、発育が遅い。そして、横の方向に広がって行く株は発育が速い。ちなみに、DS 株では、集落数（CFU）を算定するのに、3~4 週を要する。一方、FW 株では、2~3 週でよい。

結 論

1) 7H10 寒天培地上の集落形態と *M. avium* complex の抗結核剤感受性の間には、密接な関係がある。

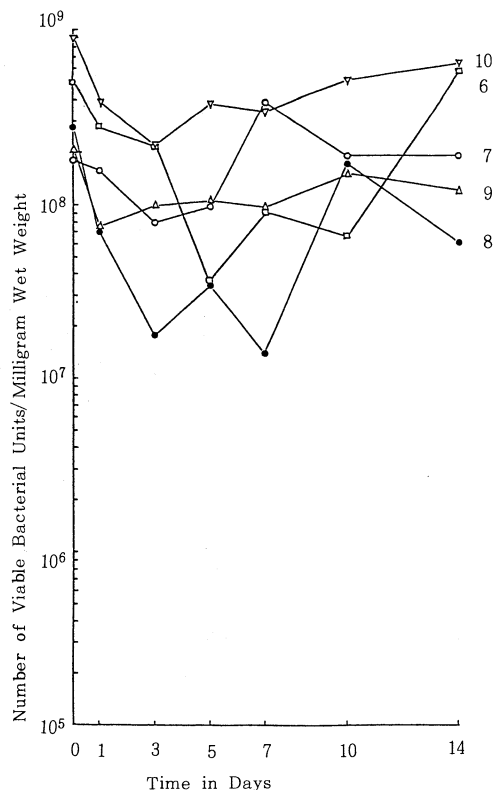


Fig. 4. Number of colony-forming units contained in one milligram wet weight of bacteria of naturally resistant strains of *Mycobacterium avium* complex.

6. 11004; 7. 13022; 8. 13032; 9. 13033; 10. 13034.

SmD 型集落形成株は、一般に感受性が高く、SmT 型集落形成株は、感受性が低い。以上の関係は、Rifampicin, Minocycline, Kitasamycin, Streptomycin, Kanamycin, Enviomycin, Ethambutol 感受性について認められたが、Isoniazid, Ethionamide および Sulfadimethoxine 感受性については、集落形態との関連性が判然としなかった。

2) *M. avium* complex の多剤耐性株は、Dubos 液体培地で長い間、高い viability を保持する。比較的感受性の株は、耐性株と比較すると、viability が早く失われる。

3) 多剤耐性株は、一般に、小川培地上で発育速度が速く、感受性株は、発育速度が遅い。しかし、この関連性は常にみられるわけではない。また、Dubos 液体培地での発育速度は、抗結核剤感受性とは関係がない。

4) 小川培地での集落形態と 7H10 寒天培地上の集落

形態を比較すると、たいていの場合に対応がみられるが、100%一致する対応がみられるわけではない。しかし、一般的には、SmD 株は、小川培地で、小さい、平滑な、盛り上がった集落を作り、SmT 株は、大きく平たい皺のよった集落を作る。

文 献

- 1) Moehring, J. M. and Solotorovsky, M. R. : Relationship of colonial morphology to virulence for chickens of *Mycobacterium avium* and the nonphotochromogens, *Am Rev Respir Dis*, 92 : 704-713, 1965.
- 2) Ryneerson, T. K., Shronts, J. S. and Wolinsky, E. : Rifampin : *in vitro* effect on atypical mycobacteria, *Am Rev Respir Dis*, 104 : 272-274, 1971.
- 3) Kajioka, R. and Hui, J. : The pleiotropic effect of spontaneous single-step variation in *Mycobacterium intracellulare*, *Scand J Respir Dis*, 59 : 91-100, 1978.
- 4) Mizuguchi, Y., Fukunaga, M. and Taniguchi, M. : Plasmid deoxyribonucleic acid and translucent-to-opaque variation in *Mycobacterium intracellulare*, *J Bacteriol*, 146 : 656-659, 1981.
- 5) Kuze, F. and Uchihara, F. : Various colony-formers of *Mycobacterium avium-intracellulare*, *Eur J Respir Dis*, 65 : 402-410, 1984.
- 6) Youmans, G. P. and Youmans, A. S. : A method for the determination of the rate of growth of tubercle bacilli by the use of small inocula, *J Bacteriol*, 58 : 247-253, 1949.
- 7) Tsukamura, M. : Two groups of *Mycobacterium avium* complex strains determined according to the susceptibility to rifampicin and ansamycin, *Microbiol Immunol*, 31 : 615-623, 1987.
- 8) Tsukamura, M. : Evidence that antituberculosis drugs are really effective in the treatment of pulmonary infection caused by *Mycobacterium avium* complex, *Am Rev Respir Dis*, 137 : 144-148, 1988.