

## 短 報

*Mycobacterium kansasii* の溶血能について

花 田 敬 吾

島根医科大学微生物・免疫学教室

受付 平成2年2月17日

HEMOLYTIC ACTIVITY OF *MYCOBACTERIUM KANSASII*

Keigo HANADA \*

(Received for publication February 17, 1990)

*Mycobacterium kansasii* has a strong virulence as compared with those of "mycobacteria other than tubercle bacilli". In this study, hemolytic activities of several strains of *M. kansasii* were investigated. Secretion of hemolytic factor from these strains was not observed, since no hemolytic zone was found around the colonies grown on the 7H11 agar plate when 5% rabbit blood agar was overlaid. On the other hand, weak hemolytic activities were detected after treatment of sonication and trypsin-digestion of *M. kansasii* cells. They were also heat-resistant. These results indicate that endogenous nonproteinaceous factor was involved in the hemolytic activity of *M. kansasii*. Moreover, these activities were not species-specific in respect to the kind of target erythrocytes used for the assay. However, hemolytic activity of *M. kansasii* was not increased in spite of the change of culture conditions or supplement of nutrients into the medium. It is unlikely that this hemolytic activity is directly associated with a pathogenesis of *M. kansasii*, but detailed studies were needed to clarify on this point.

**Key words :** *Mycobacterium kansasii*, hemolytic activity

**キーワード :** *Mycobacterium kansasii*, 溶血能

## 緒 言

*Mycobacterium kansasii* は、“非定型”抗酸菌のなかでも、ヒトに対する病原性が最も強いとされている<sup>1)</sup>。本菌は主として肺結核類似症をひき起こし<sup>2)</sup>、その発生は、わが国では従来稀な疾患とされていたが、近年になって漸増の傾向にあり、非定型抗酸菌症の第2位の座を占めている<sup>1)</sup>。本研究では、*Mycobacterium kansasii* の病原性解明の一助として、本菌の溶血活性

について検討した。

## 材料と方法

## 1. 供試菌株

*M. kansasii* 7菌株 (ATCC 12478株, 木村株, 梅田株, 亀谷株, 前島株, 沢田株, 甲田株) の1%小川培地上14日培養菌。

## 2. 赤血球

0.4%ウサギ赤血球 (RRBC), ヒツジ赤血球 (SRBC)

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

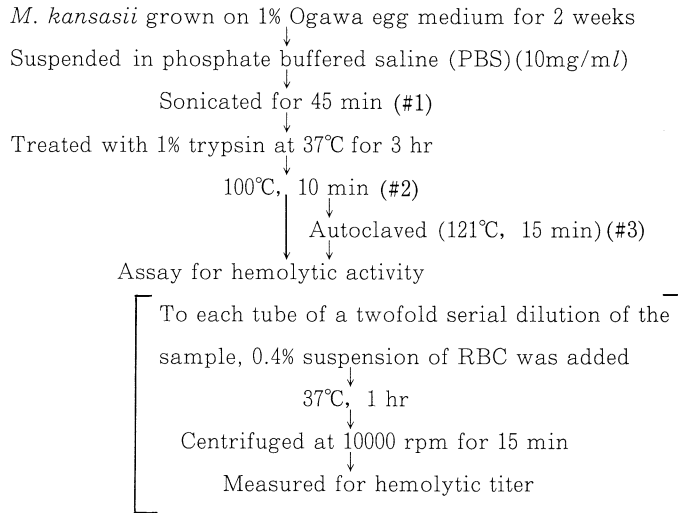


Fig. Measurement for Cell-associated Hemolytic Activity of *M. kansasii*

およびヒト赤血球 (HRBC, type O) の PBS (-) 浮遊液。

### 3. 溶血能の測定

#### (1) 可溶性溶血活性物質の測定

上記供試菌株を Middlebrook 7H11 寒天 (Difco) 平板上で 14 日間培養後, 5% ウサギ血液加寒天を静かに重層し, 1~24 時間後の溶血の有無を判定した。

#### (2) 菌体内溶血活性物質の測定<sup>3)</sup>

その概略は Figure に示すようである。すなわち, 上記供試菌株の PBS (-) による 10 mg/ml 浮遊液を 45 分間超音波処理 (#1) 後, これに等量の 1% トリプシン液を混和し, 37°C, 3 時間作用後, 加熱 (100°C, 10 分) し (#2), さらにこれを 121°C, 15 分処理した (#3)。これらの各試料の PBS (-) による 2 倍階段希釈液 1.5 ml に等量の 0.4% RBC を添加し, 37°C, 1 時間反応後, 10,000 rpm, 15 分間遠心し, 得られた上清の OD<sub>540nm</sub> 値を測定し, OD 値が 0.24 より大きい値 (25% 溶血) を示した最終希釈倍数で力価を表した。

### 4. 培養条件による溶血能の検討

#### (1) 温度

上記供試菌株を 33°C, 37°C 並びに 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 環境 (CO<sub>2</sub> ふらん器) 下で, 1% 小川培地上 14 日培養後, #3 の試料について溶血能を測定した。

#### (2) 培地組成

上記供試菌株を Sauton 培地あるいはカザミノ酸 (1 mg/ml, Difco), 酵母エキス (3 mg/ml, Difco), 1% 単糖類 (グルコース, ガラクトース, キシロース, アラビノース, ソルビトール, マンノース), ビタミン (リボフラビン 0.5 mg/ml, p-アミノ安息香酸 0.1 mg

/ml, ニコチン酸 0.1 mg/ml, イノシトール 1 mg/ml, パントテン酸 0.1 mg/ml) の各々を含む Sauton 培地に浮上培養し, 37°C, 3 週間培養後, 高压滅菌し, 10,000 rpm, 15 分遠心処理によって回収された菌の #3 の試料について溶血能を測定した。

## 結 果

*M. kansasii* の溶血能: 7H11 寒天培地を用いて, 菌体外に分泌されるような可溶性溶血活性物質の有無について調べたが, そのような物質は見出せなかった。次に,

Table 1. Cell-associated Hemolytic Activity of *M. kansasii* Strains

| Strains    | Hemolytic titer* |    |    |
|------------|------------------|----|----|
|            | #1               | #2 | #3 |
| Kimura     | 0                | 2  | 2  |
| ATCC 12478 | 0                | 2  | 2  |
| Umeda      | 0                | 4  | 4  |
| Kametani   | 0                | 2  | 2  |
| Maejima    | 0                | 2  | 2  |
| Sawada     | ND <sup>#</sup>  | 4  | 4  |
| Kohda      | 0                | 4  | 4  |

\* Reciprocal of the highest dilution of the sample which causes hemolysis giving OD<sub>540nm</sub> > 0.24 (25% hemolysis).

# ND, not done.

**Table 2.** Effect of Nutrient-supplementation on the Hemolytic Activity of *M. kansasii*

| Strains    | Hemolytic titer |                          |                          |                        |           |
|------------|-----------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|-----------|
|            | None            | Casamino acids (1 mg/ml) | Yeast extracts (3 mg/ml) | Mono-saccharides* (1%) | Vitamins# |
| Kimura     | 2               | 8                        | 2                        | 8                      | 2         |
| ATCC 12478 | 2               | 4                        | 4                        | 2                      | 2         |
| Umeda      | 2               | 2                        | 2                        | 2                      | 2         |

\* Glucose, galactose, xylose, arabinose, sorbitol and mannose.

# Riboflavin (0.5 mg/ml), *p*-aminobenzoic acid (0.1 mg/ml), nicotinic acid (0.1 mg/ml), inositol (1 mg/ml) and pantothenic acid (0.1 mg/ml).

全菌体より調製した3つの試料(#1, 2, 3)のRRBC溶血能を測定したところ、Table 1に示すように、#1(超音波処理)では、供試全菌株において溶血能を示さなかったが、#2(#1のトリプシン処理)では、2~4の低い溶血価を示し、この活性は#3(#2の高圧滅菌処理)でも失われなかった。以上の結果から、*M. kansasii*菌体内には非常に低い力価ながら、耐熱性、非タンパク性の溶血活性物質が存在することが示唆された。また、木村株、ATCC 12478株、梅田株の溶血活性は、ウサギ、ヒツジおよびヒト(O型)赤血球に対して、同程度の低い活性(2~4溶血価)しか示さなかったことから、用いた赤血球に特異的な現象でないといつてよいようである。

培養温度: 33°C, 37°Cおよび37°C(5% CO<sub>2</sub>下)のいずれの条件下においても低い活性(2~4溶血価)しか示さなかった。

培地組成: 各種栄養素(カザミノ酸, 酵母エキス, 単糖類あるいはビタミン)を含むSauton培地上で培養したところ、Table 2に示すように、いずれの培地上で培養しても、低い力価(2~8)を示すにすぎなかった。

## 考 察

正常赤血球は、細菌毒素によるほか、浸透圧やアルカリ、補体など諸要因によって溶血を起こす。今回、われわれが検討した*M. kansasii*の溶血活性は体液と等張のPBSを用いて行われた実験であるので、浸透圧の影響は除外できるし、また、トリプシンと赤血球の混液での溶血もまったくみられなかったことから、トリプシンによるものでないことも明らかである。したがって、*M. kansasii*自身が溶血能を有しているわけであるが、この活性物質の本体は蛋白性外毒素<sup>4)</sup>ではないと思われる。その理由としては、(1)供試菌を移植・培養した

7H11血液寒天培地上で、溶血斑がみられなかったこと、(2)この溶血活性は耐熱性、トリプシン抵抗性であること、(3)溶血価が非常に低いこと、などが挙げられよう。これらの性状は、むしろ内毒素様の菌体構成成分がこの溶血活性に関与していることを示唆しているものであろう。Takeyaら<sup>5)</sup>、Moriら<sup>6)</sup>は*M. phlei*の細胞壁成分(耐熱性、非蛋白性)が低い溶血活性を有することを報告しているが、これは今回のわれわれの*M. kansasii*における成績とよく一致するものと思われる。今後、*M. kansasii*の溶血活性の菌体内所在部位を明らかにすることが必要であろう。

*M. kansasii*は、非常に低い溶血価(2~4)しか示さず、また、培養温度や培地組成を変えてもその亢進はみられなかった。また、“saprophytic”と考えられている*M. phlei*も、比較的強いビルレンスを有する*M. kansasii*と同程度の溶血活性を示したことから、本菌の溶血活性とビルレンスとは、特に関連はないように思われた。しかしながら、*M. kansasii*の溶血活性が、生体内において何らかのビルレンス因子として働いている可能性もまったく否定しえないと思われるので、これらの点について、今後、詳細な検討を行いたい。

## 結 語

*M. kansasii*は、菌体内に、耐熱性、非蛋白性の溶血活性物質を有しているが、その活性は非常に低く(2~4力価)、今回の実験の限りでは、培養温度・培地組成を変えてもその亢進は認められなかった。本菌の溶血活性と病原性との間には直接的関連性はないことが示唆された。

## 文 献

- 1) 斎藤 肇: 非定型抗酸菌の分類, 臨床と細菌, 9:

- 35~43, 1982.
- 2) Wood, G. L. and Washington II, J. A. : Mycobacteria other than *Mycobacterium tuberculosis* : Review of Microbiologic and clinical aspects, Rev Infec Dis, 9 : 275-294, 1987.
  - 3) Takeya, K., Mori, R., Hisatsune, K. et al. : A simple hemolysis test for the classification of mycobacteria, Am Rev Respir Dis, 87 : 773-774, 1963.
  - 4) 村田良介 : 蛋白毒素の概説, 細菌毒素研究, 蛋白質核酸酵素, 共立出版, 東京, 5~8, 1976.
  - 5) Takeya, K. and Hisatsune, K. : Mycobacterial cell walls I. Methods of preparation and treatment with various chemicals, J Bacteriol, 85 : 16-23, 1963.
  - 6) Mori, R., Hisatsune, K. and Takeya, K. : Hemolytic activity of mycobacterial cell wall fraction, Japan J Microbiol, 8 : 1-10, 1964.