

原 著

Tween 80 の殺菌作用に関する知見補遺

東 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臨床研究部

受付 平成2年6月6日

SOME OBSERVATIONS ON THE MECHANISM OF BACTERICIDAL
ACTIVITY OF TWEEN 80 ON MYCOBACTERIA

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication June 6, 1990)

In 0.1% Tween 80 aqueous solution or in 0.1% Tween 80-containing saline (0.9% NaCl aqueous solution), *Mycobacterium smegmatis* strain Jucho bacteria were alive for 3 days, whereas, in 0.1% Tween 80-containing phosphate buffer solution (pH 7.1), the bacteria died rapidly. Since it was shown previously that *M. smegmatis* is one of the mycobacteria most susceptible to Tween 80 (Tsukamura, M. : Kekkaku 63 : 695-699, 1988), the 0.1% Tween 80 aqueous solution or 0.1% Tween 80-containing saline may be used for suspending mycobacteria in order to prevent the clumping. Incorporation of ^{32}P -ortho-phosphate to the nucleic acid fraction was most markedly inhibited by the presence of 0.5% Tween 80 in 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1). The finding shows that Tween 80 inhibits directly or indirectly the synthesis of nucleic acids. Tween 80 was not bactericidal in an aqueous solution but acted bactericidally in the co-existence of phosphate, and such bactericidal activity was completely diminished by adding an ammoniacal nitrogen compound (Tsukamura, M. : Medicine and Biology (Tokyo) 96 : 159-161, 1978). These findings suggest that Tween 80 does not simply act as a detergent but interferes with some metabolic way in the synthesis of nucleic acids.

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

キーワード : Tween 80, 殺菌作用, 燐酸塩, *Mycobacterium smegmatis*

緒 言

Tween 80 は polyoxyethylene sorbitan mono-oleate であり, 結核菌の均等培養を得るために培地に添加された¹⁾。Tween 80 は, oleic acid の誘導体であ

り, oleic acid 自体は結核菌の発育を阻止することが知られており, この阻止作用は, albumin の存在によって消失することが知られている²⁻⁴⁾。しかし, Tween 80 自体は, 結核菌によってC源として利用されることが報告された⁵⁾⁶⁾。

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

最近になって、Tween 80 の作用は、改めて注目されるようになった。1977年に、Huiら⁷⁾は、*Mycobacterium avium* - *Mycobacterium intracellulare* complex (MAI complex) の rifampicin (RFP) 感受性を Tween 80 が高めることを観察し、これを Tween 80 による permeability barrier (PB) の減弱化によると考えた。一方、東村⁸⁾は、*Mycobacterium smegmatis* に対して Tween 80 だけでは弱い殺菌作用しか示さないが、磷酸塩が存在すると強い殺菌作用を示すことを見出した。この所見は、Tween 80 の殺菌作用が単純な性質のものではなく、菌の代謝と密接に関係していることを示している。1970年に東村ら⁹⁾は、Tween 80 が MAI complex の発育を促進することを報告し、また、水野・東村¹⁰⁾は、Tween 80 が種々の抗酸菌のC源としてすぐれた物質であることを報告した。

このように、Tween 80 の作用は複雑で、ある場合は殺菌的に、ある場合は発育促進的に働く。また、殺菌作用についても、MAI complex は、他の抗酸菌よりも抵抗が強いことが観察された¹¹⁾。以上のような研究に続いて、本報では、Tween 80 の殺菌作用の本態について観察することを試みた。

方 法

被検株としては、*Mycobacterium smegmatis* 17023 株 (獣調株) を使用した。この株は、1947年、当時の東京大学伝染病研究所の長谷川研究室から筆者が受領し保存している株である。筆者により *M. smegmatis* と同定された。

Tween 80 の殺菌作用

小川培地に 37°C 5日間培養した被検株を「ガラス玉コルベン」中で5分間振盪して均一化し、2mg~10mg (湿菌量)/ml の濃度に、0.9% NaCl 液または M/15 phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.1)、または、これらに 0.1% および 0.5% Tween 80 を含む液に浮遊させた。この菌液を 5.0ml ずつ試験管 (165×16.5 mm) に分注し、0, 24, 48, 72 時間培養後に菌液中の生菌単位 (colony-forming units, CFU) を調べた。菌液を滅菌ピペットで pumping した後、0.9% NaCl 水溶液で 10⁻⁵ まで希釈した。これら希釈液の 0.02ml を渦巻白金耳で小川培地に接種し、37°C 5日間培養した後、集落数を数えた。Table または Fig. には、菌液 0.02ml 中の CFU で成績を示した。

Tween 80 存在下での ³²P- phosphate のとりこみ

実験には、次の反応系を使用した。M/15 phosphate buffer solution (PBS) (pH 7.1) + 5μCi/ml ³²P-ortho-phosphoric acid (carrier-free, 日本原子力研究所) + 菌 25mg/ml (4.0ml)。以上の反応系を対照とし、別に 0.5% Tween 含有の反応系を作った。菌は

小川培地 5日間培養菌をガラス玉コルベン中で振盪して均一化した後、生理食塩水 (0.9% NaCl 水溶液) で 2回洗浄して使用した。以上の反応系は各々 5つずつ作り、日数を追って使用して行った。

反応系を 37°C に 0, 1, 2, 3 日間培養し、1,500 G 15分間遠心して菌体を集め、氷冷した PBS 4.0ml で 3回洗浄した後、Schneider 法¹²⁾ で分画した。まず氷冷した 10% 三塩化酢酸水溶液 (TCA) 2.0ml で 10分間ずつ 2回抽出して、これを TCA 可溶画分とした。

次に、ethanol 2.0ml で 5分間ずつ 2回抽出し、さらに、ethanol-ethyl ether (1:1 容) 混合液 3.0ml を加え、5分間加熱沸騰させつつ 1回抽出し、上記の抽出液を合せて脂質画分とした。

次いで、5% TCA 水溶液 2.0ml で 90°C に加熱しつつ (湯煎) 15分間ずつ 2回抽出し、抽出液を合せて核酸画分とした。残渣に 1% NaOH 水溶液 2.0ml を加え、100°C 5分間加熱融解し、これを蛋白画分とした。

各画分からサンプル 0.2ml ずつを取って測定皿に入れ、赤外線ランプで乾燥した後、放射能を神戸電気製 2π gas flow counter で測定した。測定した counts per minute (cpm) と各画分の容積から、各画分に含まれた放射能値を計算した。

研究成績

Tween 80 の殺菌作用と磷酸塩の関係

菌を 0.1% Tween 80 水溶液に浮遊させた場合は、3日後でも殺菌作用は現れなかったが、0.1% Tween 80 含有 PBS に浮遊させた場合は、菌は急速に死滅した (集落形成能力を喪失した) (Fig. 1)。

次に、菌を 0.1% Tween 80 含有生理食塩水に浮遊させた場合は、48時間後でも菌の死滅は起こらなかった。しかし、0.5% Tween 80 含有生食水に浮遊させると殺菌が起こった。一方、菌を 0.1% Tween 80 または 0.5% Tween 80 を含む PBS に浮遊させた時は、より強い殺菌作用がみられた (Table)。

³²P- 磷酸取り込みに対する Tween 80 の効果

Tween 80 が存在しない時、³²P のとりこみは核酸画分で最も著明で、次いで TCA 可溶画分へのとりこみ、次いで蛋白画分へのとりこみがみられたが、脂質画分へのとりこみは著明には起こらなかった。Tween 80 を加えた場合、TCA 可溶画分へのとりこみ阻害は、ほかより遅く 2日後から起こった。一方、核酸画分および蛋白画分へのとりこみ阻害は直ちに起こった。最も著明にみられたのは、核酸画分へのとりこみ阻害であった (Fig. 2)。

考 察

われわれは、種々の目的で、抗酸菌の生菌単位

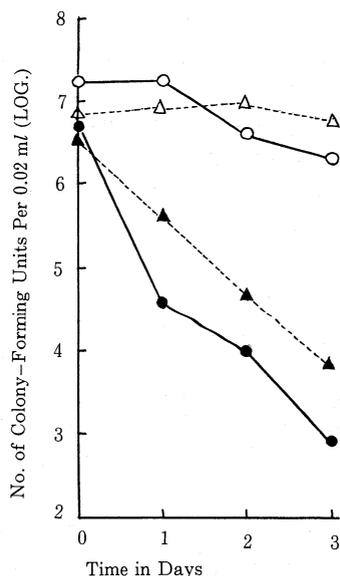


Fig. 1. Comparison of Killing Effect of Tween 80 on *Mycobacterium smegmatis* strain 17023 (Jucho) suspended in 0.1% Tween 80 aqueous solution and in a 0.067 M Phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 0.1% Tween 80.

Open circles and triangles, 0.1% Tween 80 aqueous solution; closed circles and triangles, 0.1% Tween 80-containing phosphate buffer solution. The bacteria were suspended to a concentration of 10 mg wet weight/ml. The figure shows the results of two determinations made independently.

(CFU) を数えてきた。このための最大の困難は、抗酸菌の中には clumping を起こすものが多いことであった。その最もはなはだしい例は、いうまでもなく結核菌である。この clumping を減少させるために、われわれは、菌の浮遊に 0.1% Tween 80 水溶液を使用してきた。

本報で示したように、この溶液中では、短時間の間に抗酸菌が死ぬことはないので、0.1% Tween 80 水溶液の使用は目的にかなっていない。特に、CFU 算定に「小川培地」を使用する場合は、小川培地中では Tween 80 によって発育が促進されることはあっても、阻害されることはないので、全く目的にかなっているといえる。Hui ら⁷⁾ は、7H10 寒天培地中では、MAI complex の RFP 感受性が増加することを観察しているが、小川培地では、全くそのような現象は認められない(われわれの未発表成績)。

以上のように、CFU 算定のための菌浮遊のために、0.1% Tween 80 水溶液または 0.1% Tween 80 含有生食水を使用するのが適切であると思われる。

しかしながら、結核菌の均等浮遊液を作るためには、0.1% Tween 80 水溶液を用いても、必ずしも十分とはいえない。他の抗酸菌では、これでも十分と思われるが。これについて、われわれは、前に、燐酸緩衝液に sodium glutamate を加えておくと、阻害は全く起こらず、良い発育のみが起こることを観察した⁸⁾¹⁰⁾。したがって、次の溶液が適当であると思われる。M/15 PBS (pH 6.8 または 7.1) + 0.4% sodium glutamate + 0.5% または 1% Tween 80。この溶液中には、N 源が含まれているので、Tween 80 の殺菌作用は起こらない。

次に、Tween 80 の殺菌作用について考えてみる。観

Table Effect of Tween 80 on *Mycobacterium smegmatis* Strain 17023 (Jucho)

Bacterial suspension	Number of colony-forming units in 0.02 ml-sample of bacterial suspension	
	Time of incubation	
	0 hours	48 hours
Saline	$(55.6 \pm 21.2) \times 10^4$	$(67.0 \pm 2.5) \times 10^4$ (120%)
Saline + 0.1% Tween 80	$(50.6 \pm 10.3) \times 10^4$	$(49.3 \pm 9.2) \times 10^4$ (97%)
Saline + 0.5% Tween 80	$(60.3 \pm 18.0) \times 10^4$	$(4.3 \pm 0.6) \times 10^3$ (0.7%)
Phosphate buffer	$(61.3 \pm 18.7) \times 10^4$	$(27.3 \pm 9.0) \times 10^4$ (45%)
Phosphate buffer + 0.1% Tween 80	$(48.6 \pm 9.7) \times 10^4$	$(45.7 \pm 11.5) \times 10^2$ (0.9%)
Phosphate buffer + 0.5% Tween 80	$(60.7 \pm 12.4) \times 10^4$	$(2.8 \pm 0.8) \times 10^2$ (0.05%)

The bacteria were suspended to a concentration of 2 mg wet weight/ml.

Saline, 0.9% NaCl solution; Phosphate buffer, 0.067 M phosphate buffer solution (pH 7.1).

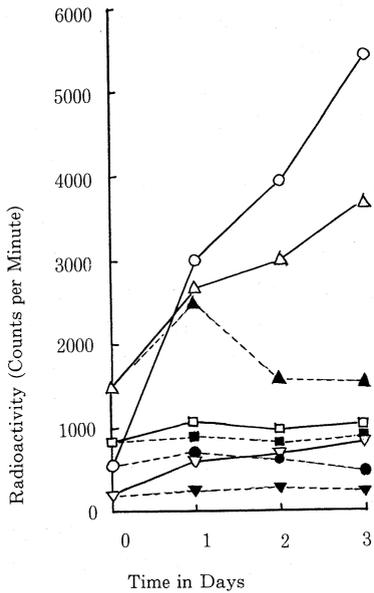


Fig. 2. Effect of Tween 80 on the uptake of ^{32}P -ortho-phosphate by various fractions of *Mycobacterium smegmatis* strain 17023 (Jucho).

The bacteria were suspended in a phosphate buffer solution (pH 7.1) containing $5\mu\text{Ci/ml}$ ^{32}P -phosphate, to which no Tween 80 was added or Tween 80 was added. The bacteria were fractionated according to the method of Schneider. Open symbols, no Tween 80; closed symbols, 0.5% Tween 80. Trichloroacetic acid-soluble fraction (triangles \triangle - \triangle \blacktriangle - \blacktriangle); lipid fraction (cubes \square - \square \blacksquare - \blacksquare); nucleic acid fraction (circles \circ - \circ \bullet - \bullet); protein fraction (reverse triangles ∇ - ∇ \blacktriangledown - \blacktriangledown).

察事項を列記すると、次のごとくである。

(1) Tween 80 水溶液, Tween 80 生食水では, Tween 80 の殺菌作用は弱い。0.1% では殺菌は起こりにくく, 0.5% ではじめて殺菌的となる。これに対して, 磷酸塩が存在すると, 0.1% でも強い殺菌が起こる。この結果は, Tween 80 の殺菌作用が, たんに detergent として菌の表層部すなわち細胞壁を障害するものではなく, 磷酸代謝と関連して殺菌作用が発揮されることを示している。

(2) Tween 80 と磷酸塩の共存では殺菌が起こるが, これに Mg イオンと N 源 (sodium glutamate, 硫酸安門など) を加えると, 殺菌は全く起こらず, 逆に Tween 80 を単一 C 源として良好な発育が起こる⁹⁾¹⁰⁾。

(3) ^{32}P -磷酸を用いる実験でみると, ^{32}P が最も多く取り込まれるのは核酸画分で, ^{32}P が DNA, RNA

合成の材料になっていることが分かる。Tween 80 を加えると, この核酸画分への取り込みが直ちに抑制される。この所見は, Tween 80 が直接的または間接的に核酸の合成阻害を起こすことを示している。しかも, この Tween 80 の作用は, 磷酸代謝と深く関係していると思われる。磷酸塩があると, Tween 80 単独でよりも強い殺菌作用が起こるのであるから, この Tween 80 の作用は, たんに detergent としての作用ではなく, N 源欠如という栄養源の "unbalance state" で, 磷酸代謝と深く関係して起こる現象といわねばならない。

もし, Tween 80 が detergent として細胞壁の障害を起こすものであれば, TCA 可溶画分への ^{32}P 取り込み阻害が早期に起こってよさそうに思える。TCA 可溶画分の ^{32}P は, 核酸合成に使用される前段階の ^{32}P 化合物が pool されているものであろうから, 細胞壁の障害が起こると pool ができなくなり (leakage が起こる), 全体として TCA 可溶画分への取り込みが減少してよい。ところが, 実際には, TCA 可溶画分への取り込み減少は, 24 時間後には起こらず, 48 時間後以降になってはじめてみられた。これに対して, 核酸画分への ^{32}P 取り込み阻害は, 24 時間後でもすでに著明に起こっている。

以上の観察から, Tween 80 の殺菌作用は, たんなる detergent としての作用ではなく, 磷酸塩の代謝すなわち核酸合成と関与する何らかの代謝経路の障害によるものではないかと思われる。この阻害は, 磷酸塩と Tween 80 だけが存在し, N 源が欠乏するという栄養源の unbalance state でのみ起こるものと思われる。

結 論

0.1% Tween 80 水溶液または 0.1% Tween 80 含有生理食塩水を抗菌菌の浮遊液作製に用いることは目的にかなっていない。しかし, 0.1% Tween 80 含有磷酸緩衝液は, この目的には適さない。Tween 80 と磷酸塩が共存すると殺菌作用がみられるからである。

Tween 80 の殺菌作用は, 磷酸塩は存在するが, N 源は存在しないという栄養源の unbalance state で起こり, 直接または間接的に核酸合成阻害を起こすことによると思われる。少なくとも, 殺菌作用が磷酸代謝と深く関係することは確かである。

文 献

- 1) Dubos, R. J. and Middlebrook, G. : Media for tubercle bacilli, Am Rev Tuberc, 56 : 334-345, 1947.
- 2) Dubos, R. J. and Davies, B. D. : Factors affecting the growth of tubercle bacilli in liquid media, J Exper Med, 83 : 409-423, 1946.

- 3) Dubos, R. J. : The effect of lipids and serum albumin on bacterial growth, J Exper Med, 85 : 9-22, 1947.
- 4) Sattler, T. H. and Youmans, G. P. : The effect of Tween 80, bovine albumin, glycerol, and glucose on the growth of *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* (H37Rv), J Bacteriol, 56 : 235-243, 1948.
- 5) Yamane, I., Minami, K. and Yasui, T. : Tween 80 as a metabolite for tubercle bacilli. II. Culture medium containing Tween 80 as a sole source of carbon, Fukushima J Med Sci, 1 : 105-112, 1954.
- 6) Stinson, M. W. and Solotorovsky, M. : Interaction of Tween 80 detergent with mycobacteria in synthetic medium. I. Effect of Tween 80 on the growth and turbidimetric response of *Mycobacterium avium* culture, Am Rev Respir Dis, 104 : 717-727, 1971.
- 7) Hui, J., Gordon, N. and Kajioka, R. : Permeability barrier to rifampin in mycobacteria, Antimicrob Agents Chemother, 11 : 773-779, 1977.
- 8) 束村道雄 : 磷酸存在下における 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.
- 9) 束村道雄, 水野松司, 外山春雄 : Tween 80 による遅発育性 *Mycobacterium intracellulare* の発育促進, 結核, 45 : 195-197, 1970.
- 10) 水野松司, 束村道雄 : 遅発育性抗酸菌における C 源としての Tween 80 利用, 結核, 53 : 537-540, 1978.
- 11) 束村道雄 : 種々の抗酸菌に対する Tween 80 の殺菌作用, 結核, 63 : 695-699, 1988.
- 12) Schneider, W. C. : Phosphorus compounds in animal tissues. I. Extraction and estimation of desoxyribonucleic acid and of pentose ribonucleic acid, J Biol Chem, 161 : 293-303, 1945.