

Slowly Growing Mycobacteria の分類と同定

(第4報) *Mycobacterium avium*

東村道雄・水野松司・外山春雄

国立療養所中部病院(院長 勝沼六郎博士)

東村純雄

名古屋大学医学部細菌学教室(主任 小笠原一夫教授)

受付 昭和41年9月4日

CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION OF
SLOWLY GROWING MYCOBACTERIA*IV. *Mycobacterium avium*Michio TSUKAMURA, Shoji MIZUNO, Haruo TOYAMA
and Sumio TSUKAMURA

(Received for publication September 4, 1966)

Physiological characters of *Mycobacterium avium* are described based on data of fourteen strains.

Colonial morphology : Smooth, wet, white colonies on egg media and on Sauton agar. Nonphotochromogenic.

Colonial pigmentation : Negative.

Nitrate not reduced. Two-week-arylsulphatase : Negative. Catalase : Positive. Peroxidase : Negative.

Urease : Negative. Nicotinamidase : Positive in 7 of 14 strains.

Pyrazinamidase : Positive in 6 of 14 strains. Other amidases of Bönicke's amidase series, acetamidase, benzamidase, isonicotinamidase, salicylamidase, allantoinase, succinamidase and malonamidase : Negative.

Tolerance to 0.1% picric acid : Negative.

Growth on 0.2% Na-PAS-Ogawa egg medium : Positive.

Growth on 0.25 mg/ml NH₂OH-HCl-Ogawa egg medium : Positive.

Growth on 0.25 mg/ml 8-azaguanine-Ogawa egg medium : Positive.

Growth on 1.0 mg/ml salicylate-Ogawa egg medium : Positive.

Growth on 10 μg/ml thiophen-2-carbonic acid hydrazide-Ogawa egg medium : Positive.

Growth on 0.2 mg/ml sodium thiocetate-Ogawa egg medium : Positive.

Niacin : Negative.

Growth rate : Slow ; growth at 7 days on egg media ; growth at 7 to 14 days on Sauton agar.

Growth at 28°C and 37°C; usually grow at 45°C; no growth at 52°C. No survival at 60°C for 60 minutes.

Utilization of carbohydrates as sole carbon source (Positive growth after incubation at 37°C for 4 weeks was regarded as positive utilization, utilization of other compounds also being decided similarly) : Acetate and pyruvate utilized usually ; succinate, citrate, malate, benzoate, malonate and fumarate not utilized ; Glucose, fructose, sucrose, mannose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, raffinose, trehalose, inositol, mannitol and sorbitol not utilized ; ethanol and propanol utilized usually ; propylene glycol, 1,3-, 1,4- and 2,3-butylene glycols not utilized.

No acid formed from glucose, mannose, galactose, rhamnose, arabinose, xylose, raffinose, trehalose, inositol, mannitol and sorbitol.

* From National Sanatorium, Chubu Central Hospital, Obu, Aichi-Pref., Japan.

Utilization of nitrogen compounds as sole, simultaneous nitrogen and carbon source : L-Glutamate, L-serine, glucosamine-HCl, acetamide, benzamide, monoethanolamine and trimethylene diamine not utilized.

Utilization of nitrogen compounds as sole nitrogen source : L-Glutamate, urea, pyrazinamide, nicotinamide, succinamide and nitrate utilized ; L-serine, L-methionine, acetamide and isonicotinamide utilized only occasionally.

According to similarity values to each other, 14 strains tested could be divided into two subgroups, but the grouping was not distinctive. Six strains showed high similarity values and seemed to be "typical" *M. avium* strains. This group usually utilized acetate and propanol as sole carbon source and had positive nicotinamidase and pyrazinamidase activities. On the other hand, another group showed low similarity values, and lacked usually nicotinamidase and pyrazinamidase and often did not utilize acetate.

Based on the data described in this study, differentiation of *M. avium* from other mycobacteria has been discussed.

緒 言

Mycobacterium avium は numerical taxonomy で nonphotochromogens, scotochromogens, *M. terrae* とともに *M. avium*-group とでも呼ぶべき一群を形成する¹⁾。すなわち最近問題となつている Runyon²⁾ の group III nonphotochromogens および group II scotochromogens と類似している点で、分類学的にも疫学的にも興味深い存在である。したがつて「非定型」抗酸菌の nonphoto. および scoto. との比較のためにも *M. avium* の性状を明らかにしておくことが必要と思われる。とくにわが国では、過去に *M. avium* の同定に問題があつただけに³⁾、このさい *M. avium* の定義を明らかにしておくことが有用と思われる。

実験方法

被検株として用いた *M. avium* は次の 14 株である。A 71, 3717, 4110, 4121, Kirchberg, Flamingo, 11755, Nagoya-59, 獣疫, Sheard, Av-59 A 479, SA-16, W-297, W-300. はじめの 8 株は、東北大学今野淳博士のご好意により入手した。獣疫は広島大学齊藤肇博士から分与された。残りの 5 株は Dr. G. P. Kubica から齊藤博士に分与されたものである。

検査方法は第 1 報¹⁾に述べた。

実験成績

1. *Mycobacterium avium* の性状

実験結果は表 1 に示した。*M. avium* の一般的性状として次の事項があげられる (下記には、第 1 報¹⁾ に示した 43 性状のほかには若干の追加を加えた)。

集落形態：平滑、湿潤、無色の集落を卵培地および Sauton 寒天に作る。nonphotochromogenic.

発育速度：遅発育性、卵培地に約 7 日、Sauton 寒天に 7~14 日で発育する。

発育温度：28°C, 37°C で発育する。大部分 (10/14) は 45°C でも発育する。52°C には発育せず、60°C 60 分の加熱で死滅する。

硝酸還元：陰性。

2 週 arylsulfatase : 陰性 (1 株のみ陽性)。

Urease : 陰性。

Nicotinamidase : 約半数 (7/14) が陽性。

Pyrazinamidase : 約半数 (6/14) が陽性。

Acetamidase, benzamidase, isonicotinamidase, salicylamidase, allantoinase, succinamidase, malonamidase は陰性。

Catalase : 陽性。

Peroxidase : 陰性。

0.2% PAS 含有 1% 小川培地に発育する。

0.1% sodium salicylate 含有 1% 小川培地に発育する。

NH₄OH-HCl, 250 μg/ml 含有 1% 小川培地に発育する。

8-azaguanine, 250 μg/ml 含有 1% 小川培地に発育する。

Thiophen-2-carbonic acid hydrazide, 10 μg/ml 含有 1% 小川培地に発育する。

0.1% picric acid 含有 Sauton 寒天培地には発育しない。

炭水化物の C 源としての利用 (前報¹⁾のごとく発育を示すものを利用するとした)。大部分の菌株は、acetate, pyruvate, ethanol, propanol を利用する。しかし citrate, succinate, malate, benzoate, malonate, fumarate, glucose, fructose, sucrose, mannose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, trehalose, raffinose, inositol, mannitol, sorbitol, propylene glycol, 1,3-, 1,4- および 2,3-butylene glycols のいずれをも単一 C 源として利用しない。

炭水化物からの酸形成。glucose, mannose, galac-

Table 1. Physiological Characters of *Mycobacterium avium*

Character	Strain*													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Colonial morphology	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Colonial pigmentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Photochromogeneity	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Two-week-arylsulphatase	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Acetamidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nicotinamidase	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-
Pyrazinamidase	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Allantoinase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Niacin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerance to 0.1% picric acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tolerance to 0.25 mg/ml NH ₄ OH·HCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerance to 0.25 mg/ml 8-azaguanine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerance to 0.5 mg/ml salicylate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerance to 1.0 mg/ml salicylate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerance to 0.2% Na-PAS	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Tolerance to 10 µg/ml TCH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Utilization of carbohydrates as sole carbon source :														
Acetate	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
Succinate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Malate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pyruvate	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Malonate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fumarate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ethanol	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+
Propanol	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-
Utilization as simultaneous nitrogen and carbon source :														
L-Glutamate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of nitrogen compounds as sole nitrogen source :														
L-Glutamate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Serine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
L-Methionine	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
Acetamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
Urea	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Pyrazinamide	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Isonicotinamide	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Nicotinamide	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	+
Succinamide	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Benzamide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 28°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 45°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Growth at 52°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* 1=A 71, 2=3717, 3=4110, 4=4121, 5=Kirchberg, 6=Flamingo, 7=11755, 8=Nagoya-59, 9=Jueki, 10=Sheard, 11=Av-59 A 479, 12=SA-16, 13=W-297, 14=W-300.

tose, arabinose, xylose, rhamnose, trehalose, raffinose, inositol, mannitol および sorbitol のいずれからも酸を形成しない。

7種N化合物のN, C源としての利用。L-glutamate, L-serine, glucosamine-HCl, acetamide, benzamide, monoethanolamine, trimethylene diamine のいずれをも利用しない。

N化合物の単一N源としての利用。L-glutamate, nitrate は全株に利用された。urea, pyrazinamide, nicotinamide, succinamide は大部分の株によつて利用された。L-serine はまれにのみ利用される。L-methionine, acetamide, isonicotinamide は少数株によつてのみ利用される。benzamide, nitrite は利用されない。

Niacin : 陰性。

2. *Mycobacterium avium* の2型

被検 *M. avium* を第1報の方法により, 42性状を用いて Similarity value table (S-value table) を作ると, 表2のごとくなる。42性状は表1の性状から acetamidase, allantoinase, benzamide のN源としての利用を省いた項目である。

S-value table は表2に示すように *M. avium* をおおよそ2群に分かつ。第1群は A71 から Flamingo にいたる6株で互いに S-value が高い(91%以上)。第2群は 11755 から W-300 にいたる8株で, さきの第1群に対しても, またお互い同志の間でも S-value が比較的低い群である。後者はすべての菌株に対して比較的低い S-value を示すから, *M. avium* の代表株または定型株とはいいがたい。前者は共通性の高い一群なので, *M. avium* の標準的な性状は, これらの菌株の性状から抽出されるべきであると思われる。そこで第1群 (Type I) と第2群 (Type II) に分けて, 性状を比較してみると, 両者の著明な差は表3に示す項目についてみられ, そのうち pyrazinamide, acetate のC源としての利用の2項目の頻度については, 両群に有意差がみられた。

考 察

Mycobacterium avium については, Bergey's Manual⁴⁾の記載も主として形態的記載に止まり, その診断の

Table 2. S-value Table of *Mycobacterium avium*

Strain	S-values (%)													
	I						II							
	A71	3717	4110	4121	Kirchberg	Flamingo	11755	Nagoya 59	Jueki	Sheard	Av-59 A	SA-16	W-297	W-300
A 71	100													
3717	91	100												
4110	98	98	100											
4121	96	96	98	100										
Kirchberg	91	100	98	96	100									
Flamingo	91	91	91	91	91	100								
11755	84	84	86	88	84	88	100							
Nagoya59	84	84	81	84	84	93	91	100						
Jueki	79	88	86	84	88	91	86	86	100					
Sheard	84	88	91	88	88	84	86	76	86	100				
Av-59 A	81	81	86	81	81	88	88	88	84	84	100			
SA-16	81	86	88	86	86	76	79	74	88	88	81	100		
W-297	79	81	79	76	81	86	74	79	84	84	81	84	100	
W-300	76	86	81	79	84	84	86	86	86	81	91	79	84	100

□ : more than 91% of S-value

The test strains are divided into two groups; the first from A71 to Flamingo that show S-values more than 91% to each another and the second from 11755 to W-300.

Table 3. Differentiation between Two Types of *Mycobacterium avium*

Character showing a difference more than 50% at appearance rate between 2 types	Percentage of strains showing a positive feature		χ ² -test	P(%)
	Type I (6 strains)	Type II (8 strains)		
Growth at 45°C	6/6(100%)	4/8(50%)	2.15	<25%
Methionine as N source	0/6(0)	4/8(50)	2.15	<25
Nicotinamidase	5/6(83)	2/8(25)	2.62	<25
Pyrazinamidase	5/6(83)	1/8(13)	4.43	< 5
Acetate as C source	6/6(100)	2/8(25)	5.11	< 2.5
Propanol as C source	6/6(100)	3/8(38)	3.43	< 7

Characters showing a significant difference in their appearance rate between two types are (1) pyrazinamidase and (2) utilization of acetate as sole carbon source.

根拠は大部分「病原性」におかれているごとくにみえる。この病原性の定義はかなりあいまいで, 非病原性抗酸菌といえども大量接種すれば局所に結節様病変を呈することは多くの実験者の経験するところで, ここに同定の誤りが起こる可能性がある。*M. avium* の同定には, 菌自体の生理学的, 生化学的性状が明らかにされるべきであるのに, *M. avium* については従来資料が乏しい。*M. avium* の生化学的性状は, ふるく Kondo⁵⁾ によつてかなり詳細に研究され, さらに戸田⁶⁾ によつて urease 活性をかくことが報告されたにもかかわらず, その後の研究は中絶してしまつた。わずかに Merrill⁷⁾, Weinberg⁸⁾, Uesaka⁹⁾, Bojalil, Cerbón & Trujillo¹⁰⁾ による少数株についての断片的記載をみるのみである。最近, Bönicke¹¹⁾ が amidase pattern によつて抗酸菌の同定が

ある程度可能なことを示し、*M. avium* が nicotinamidase および pyrazinamidase が陽性で、他の amidases が陰性であることを示したことは、生化学的同定に大きい進歩をもたらしたものと見える。われわれの研究の目的は、われわれが工夫した検査およびC源およびN源要求の pattern によつて、同定を行なうことである。本報で明らかにしたごとく、*M. avium* の性状はかなり明確に定義しえたので、後述するごとくこの菌の同定が可能となつた。

なお Bönicke¹¹⁾ は *M. avium* の amidase pattern として nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性をあげているが、本報の成績では表に示すごとく、amidase 活性をすべて欠くものが半数に達した。しかし Biotype I に属する標準株 6 株では、6 株中 5 株が両 amidase 陽性であるので、やはり定型的 *M. avium* は nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性として差し支えないと思われる。

Mycobacterium avium の鑑別診断

(1) *M. tuberculosis* および *M. bovis*

これらの菌は通常 R 型集落を示し、NH₂OH 62.5 μg/ml に感性、8-azaguanine 培地に発育しない。また 0.2% PAS 培地および 0.1% salicylate 培地に発育しない。urease 陽性。C 源として、acetate, pyruvate, ethanol, propanol のいずれをも利用しない。また N 源として urea, pyrazinamide, nicotinamide, succinamide, nitrate のいずれをも利用しない。以上のほかに *M. tuberculosis* は硝酸還元陽性で niacin も陽性であり、*M. bovis* は TCH 培地に発育しない。以上の点で区別は容易。

(2) *M. kansasii*

通常 R 型集落で光発色性がある。硝酸還元陽性、NH₂OH 250 μg/ml 培地に発育しない。0.2% PAS 培地に発育不能。arylsulfatase 2 週反応陽性。C 源として acetate および pyruvate を利用せず、glucose を利用する。N 源として urea, pyrazinamide, nicotinamide を利用しない。また 45°C に発育することはない。以上の点で *M. avium* から区別できる。

(3) *M. marinum*

通常 R 型集落で硝酸還元陽性。2 週 arylsulfatase も陽性。urease 陽性。多くは allantoinase も陽性。45°C に発育しない。C 源として acetate も pyruvate も利用しない。

(4) *M. terrae*¹²⁾¹³⁾

45°C に発育せず、nicotinamidase および pyrazinamidase を欠く点で、定型的 *M. avium* (biotype I) とは区別できる。また 2 週 arylsulfatase 陽性で、N 源として serine を利用する。C 源として acetate および pyruvate を利用する型の *M. terrae* は propanol を利

用しない。また C 源として propanol を利用する型は、acetate および pyruvate を利用しない。*M. avium* は通常 3 者、または少なくとも acetate または pyruvate のいずれかと ethanol または propanol のいずれかを利用する。*M. terrae* には ethanol を利用するものではなく、またこれらの有機酸と alcohol をともに利用する株は少ない。また *M. terrae* のハツカネズミに対する virulence は、*M. avium* より低い¹⁴⁾。また *M. terrae* はニワトリに対する virulence が低い。(未発表成績)

(5) *M. aquae* (group II scotochromogens)¹⁵⁾

集落が初発集落から著明に着色している。2 週 arylsulfatase 反応陽性。45°C に発育しない。通常 glucose を C 源として利用し、また大部分が serine を N 源として利用する。

(6) group III nonphotochromogens

大多数が arylsulfatase 2 週反応陽性 (34/49)。またある株は serine を利用する (17/49)。約 60% の株が glucose を利用する (31/49)。したがってこれらの性状を示すものは、nonphoto. と診断できるが、分類学的な意味での区別は困難である。しかし最近の著者の方法¹⁶⁾によれば両者の鑑別は可能である。

(7) *M. smegmatis*

速発育性抗酸菌を *M. avium* から区別することは容易であるので、ここには記さないが、ただ *M. smegmatis* については過去に混同された事実があるので、われわれの成績から得た鑑別点を記述する。*M. smegmatis* は 45°C で発育する点は *M. avium* と似ているが、多くの点で区別できる。発育が速く、卵培地にも Sauton 寒天にも 3 日以内で発育する。硝酸還元陽性。2 週 arylsulfatase 陽性。acetamidase, benzamidase, isonicotinamidase, succinamidase 陽性。C 源として、benzoate, citrate, succinate, malate, malonate, fumarate, glucose, mannose, galactose, rhamnose, arabinose, xylose, inositol, mannitol, sorbitol, fructose, sucrose, trehalose, propylene glycol を利用する。N 源として benzamide および nitrite を利用する。同時 NC 源として L-glutamate, L-serine, glucosamine, acetamide, benzamide, monoethanolamine, trimethylene diamine を利用する。glucose, mannose, galactose, rhamnose, arabinose, xylose, inositol, mannitol および sorbitol から酸を形成する。ハツカネズミおよびニワトリに対して virulence が低い¹⁰⁾(静注した場合に、肺、脾から急速に消失する意。組織学的な変化は起こる)。

M. avium と *M. terrae* との関係

M. terrae は東村^{12),13)}が土壌から分離した遅発育性 nonphotochromogenic な抗酸菌で、土壌に広く分布していると考えられる。今日まで、その存在が知られなかつたのは分離方法が悪かつたためと考えられる。上述し

たごとく、*M. terrae* と定型的 *M. avium* との区別は可能であるが、ここに biotype II としてあげた「定型的でない」*M. avium* との区別は必ずしも明確ではない。とくに 37°C までしか発育せず、nicotinamidase および pyrazinamidase を欠如する *M. avium* においてそうである。このように、*M. avium* および Runyon の group III nonphoto. のあるものと非常に類似した菌が、われわれの環境に広く分布していることは、*M. avium* および nonphoto. の起源について多くの示唆を与えているごとく思われる。

総 括

Mycobacterium avium の生化学的性状について従来知られるところが少なかったので、主としてC源およびN源要求の性状を中心として、生化学的性状を明らかにし、他の菌種との鑑別法を明らかにした。本報に記述した性状により、*M. avium* の同定が可能である。

また S-value table の成績から、被検 14 株の *M. avium* を Biotype I と Biotype II に分けた。前者は「定型的」、後者は「定型的でない」*M. avium* と考えられる。したがって標準的な *M. avium* の性状としては、ここに示す Biotype I の性状が考慮されるべきである。

文 献

1) 東村道雄・東村純雄：日細，21：271，1966.

- 2) Runyon, E. H.: Amer. Rev. Tuberc., 72: 866, 1956.
- 3) 東村道雄・外山春雄・水野松司：日細，19：469, 1964.
- 4) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed. (edited by Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R.) Williams & Wilkins, Baltimore, p. 694, 1957.
- 5) Kondo, S.: Biochem. Z., 153: 302, 1924.
- 6) 戸田忠雄：日微病学誌，22：1877，1928，(戸田忠雄：「結核菌とBCG」，南山堂，1944，p. 45より引用)。
- 7) Merrill, M. H.: J. Bact., 21: 361, 1931.
- 8) Weinberg, E. D.: Amer. Rev. Tuberc., 67: 503, 1953.
- 9) Uesaka, I.: Jap. J. Tuberc., 4: 1, 1956.
- 10) Bojalil, L. F., Cerbón, J. & Trujillo, A.: J. Gen. Microbiol., 28: 333, 1962.
- 11) Bönicke, R.: Bull. Union Internat. Tuberc., 32: 13, 1962.
- 12) 東村道雄：医学と生物学，71：110，1965.
- 13) 東村道雄：医学と生物学，72：292，1966.
- 14) 東村道雄・外山春雄・東村純雄：医学と生物学，72：118，1966.
- 15) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄：結核，41：401，1966.
- 16) 東村道雄：日本結核病学会総会，1966年.