

Mycobacterium phlei. その性状と同定

東村道雄・外山春雄・水野松司

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12日

MYCOBACTERIUM PHLEI. ITS CHARACTERS
AND IDENTIFICATION*Michio TSUKAMURA, Haruo TOYAMA, Shoji MIZUNO
and Sumio TSUKAMURA

(Received for publication September 12, 1966)

Biochemical and morphological characters of *M. phlei* were studied on twenty strains that were recognized as a cluster by numerical taxonomy. The results are shown in Tables 1 and 2. Morphology: Usually rough, thin, spreading colonies on Sauton agar and on egg media. The colonies become yellow and thick after 7 days. Growth at 3 days on egg media and 3 to 4 days on Sauton agar. Nonphotochromogenic. About 20% of the test strains showed smooth colonies. Acid-fast rods or short rods. No mycelium formed. Non-motile.

Growth at 28°C, 37°C, 45°C and 52°C. About 20% of the test strains failed to grow at 52°C.

Three-day-arylsulfatase: Negative. Two-week-arylsulfatase: Positive. PAS degradation: Negative. Salicylate degradation: Negative. Peroxidase: Negative. Catalase: Positive.

Nitrate reduced to nitrite.

Growth on 0.1% and 0.2% picric acid in Sauton agar: Positive. Growth on 0.2% Na-*p*-aminosalicylate in Ogawa egg medium: Positive. Growth on 0.1% Na-salicylate in Ogawa egg medium: Positive. Growth on 0.5 mg./ml. NH₂OH·HCl in Ogawa egg medium: Negative. Growth on 10 μg./ml. thiophen-2-carbonic acid hydrazide in Ogawa egg medium: Positive. Niacin: Negative. Amidases. Urease, nicotinamidase and pyrazinamidase: Positive. Acetamidase occasionally positive. Benzamidase, isonicotinamidase, salicylamidase, allantoinase, succinamidase and malonamidase: Negative.

Acid formation. Only occasionally, acid formed from glucose, mannose, mannitol and sorbitol. Usually no acid formed from galactose, arabinose, xylose, rhamnose, trehalose, raffinose, and inositol.

Utilization of carbohydrates as sole carbon source for growth. Glucose, mannitol and sorbitol utilized; mannose, arabinose, trehalose and fructose usually utilized; galactose, xylose and sucrose occasionally utilized; rhamnose, raffinose and inositol not utilized. Ethanol and propanol utilized; 1,3- and 2,3-butylene glycols utilized by many strains; propylene glycol utilized by some strains; 1,4-butylene glycol not utilized.

Utilization of organic acids as sole carbon source for growth. Acetate, succinate, malate, pyruvate, malonate and fumarate utilized; citrate utilized occasionally; benzoate not utilized.

Utilization of nitrogen compounds as sole nitrogen source for growth. L-Glutamate, acetamide,

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

urea, pyrazinamide, nicotinamide and nitrate utilized; nitrite utilized usually; L-serine and L-methionine utilized by about one half of strains; benzamide, isonicotinamide and succinamide not utilized. Utilization of nitrogen compounds as sole, simultaneous nitrogen and carbon source. L-Glutamate, acetamide and trimethylene diamine utilized; glucosamine utilized only occasionally; L-serine, benzamide and monoethanolamine not utilized.

Differentiation of *M. phlei* from other mycobacteria (identification) is done as shown in Table 3.

Identification of *M. phlei*.

At present, only two mycobacterial species that can grow at 52°C are *M. phlei* and *M. thermoresistibile*. Accordingly, *M. phlei* is usually identified by the following three features:

- (1) growth at 52°C; (2) utilization of acetamide as simultaneous nitrogen and carbon source;
- (3) utilization of trimethylene diamine as simultaneous nitrogen and carbon source.

As shown in this paper, there are some strains of *M. phlei* that can grow at 45°C but are unable to grow at 52°C. To differentiate this type of *M. phlei* from other mycobacteria capable of growing at 45°C, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* (a variety), *M. avium* and nonphotochromogens, not only the above second and third conditions but also the following features are to be shown; (4) growth at 45°C; (5) negative utilization of monoethanolamine and benzamide as simultaneous nitrogen and carbon source; (6) utilization of malonate as sole carbon source.

Mycobacterium phlei の形態学的観察および炭水化物利用および炭水化物からの酸形成に関する記載は、Gordon & Smith¹⁾ および Gordon & Mihm²⁾ によつて行なわれているが、*M. phlei* の性状についてのまとまつた記載は少ない。ただ 1, 2 の株についての比較的簡単な記載がある文献に散見される。たとえば N 源利用に関する Long³⁾ の観察、C 源利用に関する Thompson⁴⁾, Gordon & Hagen⁵⁾, Gordon⁷⁾ の観察などである。

最近 Bönicke⁶⁾ は amidase pattern が抗酸菌の同定に有用であることを報告し、東村⁹⁾ もまた N 化合物の同時 NC 源としての利用の型が抗酸菌の同定、区分に有用であることを報告した。これらの 2 つの方法は、単独でもある程度の同定が可能な点で、従来の方式よりもすぐれている。また malonate が *M. phlei* によつて C 源として利用されることが見出され¹⁰⁾、以上の Bönicke⁶⁾ および東村⁹⁾ の 2 方式とあわせて、*M. phlei* の特徴を総括する必要が感じられるにいたつた。

一方 *M. phlei* は従来 52°C に発育する唯一の菌種と考えられていたのに²⁾¹¹⁾、最近、東村¹²⁾ によつて 52°C に発育可能な他の菌種、*M. thermoresistibile* が報告されるにいたり、従来のごとく (たとえば Bergey's Manual¹¹⁾)、52°C に発育可能なことをもつてただちに *M. phlei* と同定するわけにはいかななくなつた。また、*M. phlei* は従来すべて 52°C に発育可能とされているが²⁾¹¹⁾、本報に示すごとく *M. phlei* の全部が必ずしも 52°C に発育するわけではないので、*M. phlei* の同定の問題は

従来考えられていたよりも複雑なものとなつた。本報の目的は authentic な *M. phlei* の性状を明らかにするとともに、その同定法を確立することにある。

実験方法

使用した *M. phlei* は 20 株で、94 性状を用いる numerical classification により、*M. phlei* と分類されたものである¹³⁾。菌株名はつぎのごとくである。SN 101, SN 102, SN 103, SN 104, SN 105, SN 106, SN 107, SN 108, SN 109, SN 110, Wa 40, Wa 60, Wa 289, Wa 366, Trudeau, SP-11, CDC, 5, 九大, 伝研。以上のうち SN 101 ないし SN 110 の 10 株は、1965 年 4 月に Dr. R. Bönicke (Forschungsinstitut Borstel, Borstel, ドイツ) より分与されたもの、Wa 40 ないし 5 の 8 株は、Dr. G. P. Kubica (Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, U. S. A.) の菌株を 1965 年 8 月に広島大学齋藤肇博士を通じて分与された。九大株は九州大学武谷健二教授より分与された。菌株を分与された方々に誌上で謝意を表する。

性状の検査方法は前報した¹⁴⁾。

実験成績および考察

Mycobacterium phlei の性状

M. phlei 20 株の性状は表 1 および 2 に一括した。これらの性状を *M. phlei* に関する過去の記載^{1)~13)} と比較して、新たに追加すべき事項はつぎのごとくである。

- (1) 集落形態は R 型 (rough type) とされている

Table 1. Physiological Characters of *Mycobacterium phlei*

Property	No. of strains showing positive feature	Property	No. of strains showing positive feature
Colonial morphology	Rough (16/20)	Acetamidase	± (6/20)
Colonial pigmentation	± (20/20)	Benzamidase	— (0/20)
Photochromogenity	— (0/20)	Urease	+
Growth rate*	Rapid (20/20)	Isonicotinamidase	— (0/20)
Growth at 28°C	+	Nicotinamidase	+
Growth at 37°C	+	Pyrazinamidase	+
Growth at 45°C	+	Salicylamidase	— (0/20)
Growth at 52°C	+	Allanoinase	— (0/20)
3-day-arylsulfatase	— (0/20)	Succinamidase	— (0/20)
2-week-arylsulfatase	+	Malonamidase	— (0/20)
Nitrate reduction	+	Acid from :	
Salicylate degradation	— (0/20)	Glucose	— (2/20)
PAS degradation	— (0/20)	Mannose	— (2/20)
Tolerance to 0.1% picric acid (Sauton agar)	+	Galactose	— (0/20)
Tolerance to 0.2% picric acid (Sauton agar)	+	Arabinose	— (0/20)
Growth on 0.2% Na-PAS**	+	Xylose	— (0/20)
Growth on 0.1% salicylate**	+	Rhamnose	— (0/20)
Growth on 0.5 mg/ml NH ₂ OH**	— (0/20)	Trehalose	— (0/20)
Growth on 10 µg/ml thiophen-2-carbonic acid hydrazide**	+	Raffinose	— (0/20)
Niacin	— (0/20)	Inositol	— (0/20)
		Mannitol	— (2/20)
		Sorbitol	— (2/20)

* Growth at 3 days on egg media, and growth at 3 to 4 days on Sauton agar.

** Tested in Ogawa egg medium.

が、少数の菌株はS型である。本報の20株では3株(15%)がS型を示した。

(2) 2週 arylsulfatase¹⁶⁾は全株陽性(20/20)。

(3) 0.2% picric acid-Sauton agar¹⁷⁾に全株(20/20)発育する。

(4) 大部分(16/20)は52°Cに発育するが、少数(4/20)は45°Cに発育するが52°Cには発育しない。(52°C発育不能株は, Wa 60, Wa 40, SP-11, CDC)。

(5) Gordon & Mihm⁹⁾および Bergey's Manual¹¹⁾によれば, *M. phlei*は glucose, mannitol および sorbitol から酸を形成するとされているが, われわれの成績では酸形成を示すものは少数株のみであった。

(6) Bönicke⁸⁾によれば *M. phlei*は10種の amidase の中で, urease, nicotinamidase, pyrazinamidase の3種が陽性であるとされているが, 以上の3種のほかに acetamidase 陽性の株が6株(6/20=30%)あった。

(7) 東村⁹⁾が *M. phlei*の7種N化合物のNC源利用型として報告したのは, L-glutamate, acetamide, trimethylene diamine (TMD)の3種であるが, 本報で示す20株中4株が, 以上のほかに glucosamine を利用し, 1株は L-serine を利用した。こうした例外はあるが, *M. phlei*の型は L-glutamate, acetamide, TMD

の3者の利用であるといえる。

(8) *M. phlei*の大多数(18/20=90%)が malonate をC源として利用した。malonate をC源として利用する菌株は抗酸菌には比較的まれで, *M. phlei*のほかに *M. smegmatis*の大多数と *M. thermoresistibile*の一部および *M. parafortuitum*によつて利用されるのみである。*M. fortuitum*はこれを利用しないので, 区別点の一つとなる。(後述)

本報に使用した20株は, いずれも標準株として保存されていたものであるが, われわれが最近土壌から分離した *M. phlei*と同定せざるをえない菌株は malonate を利用しない。しかしこれら新分離株の同定については, なお検討を続けたい。

(9) ほとんど全部の株が, 従来知られる glucose, trehalose, mannitol および sorbitol のほかに, ethanol, propanol 1,3-および 2,3-butylene glycols をC源として利用した。glycolsのC源としての利用は, *M. phlei*のほかに *M. smegmatis* および *M. fortuitum*に限られるので, これも重要な性状の一つといえる。

*Mycobacterium phlei*の同定法

*M. phlei*はその大多数が52°Cに発育し, 全株が少なくとも45°Cに発育するので, 同定は比較的容易であ

Table 2. Physiological Characters of *Mycobacterium phlei*

Property	No. of strains showing positive feature	Property	No. of strains showing positive feature
Utilization as sole C source for growth :		Benzoate	— (0/20)
Glucose	+ (20/20)	Fumarate	+ (18/20)
Mannose	+ (17/20)	Malonate	+ (18/20)
Galactose	± (13/20)	Utilization as N source for growth:	
Arabinose	+ (16/20)	L-Glutamate	+ (20/20)
Xylose	± (10/20)	L-Serine	± (10/20)
Rhamnose	— (1/20)	L-Methionine	± (12/20)
Trehalose	+ (16/20)	Acetamide	+ (20/20)
Raffinose	— (0/20)	Benzamide	— (0/20)
Inositol	— (0/20)	Urea	+ (20/20)
Mannitol	+ (20/20)	Pyrazinamide	+ (20/20)
Sorbitol	+ (20/20)	Nicotinamide	+ (20/20)
Fructose	+ (18/20)	Isonicotinamide	— (1/20)
Sucrose	± (10/20)	Succinamide	— (1/20)
Ethanol	+ (20/20)	Nitrate	+ (20/20)
Propanol	+ (20/20)	Nitrite	+ (17/20)
Propylene glycol	∓ (8/20)	Utilization as simultaneous N and C source for growth :	
1,3-butylene glycol	+ (16/20)	L-Glutamate	+ (20/20)
1,4-butylene glycol	— (1/20)	L-Serine	— (0/20)
2,3-butylene glycol	+ (16/20)	Glucosamine-HCl	∓ (4/20)
Acetate	+ (20/20)	Acetamide	+ (20/20)
Citrate	∓ (4/20)	Benzamide	— (0/20)
Succinate	+ (20/20)	Monoethanolamine	— (0/20)
Malate	+ (20/20)	Trimethylene diamine	+ (20/20)
Pyruvate	+ (20/20)		

Table 3. Differentiation of *Mycobacterium phlei* from Other Mycobacteria (Identification of *Mycobacterium phlei*)

	No. of strains tested	No. of strains showing positive feature						
		Character						
		Growth at 52°C	Acetamide as N C source	Trimethylene diamine as N C source	Growth at 45°C	Monoethanolamine as N C source	Benzamide as N C source	Malonate as C source
<i>M. phlei</i>	20	16	20	20	20	0	0	18
<i>M. thermoresistibile</i>	44	39	0	0	44	0	0	13
<i>M. smegmatis</i>	24	0	24	24	24	23	23	22
<i>M. fortuitum*</i>	63	0	61	63	63	63	0	0
<i>M. avium</i>	14	0	0	0	10	0	0	0
Nonphotochromogens	48	0	0	0	22	0	0	0

* Only *M. fortuitum* strains that can grow at 45°C are shown in this table.

る。抗酸菌で 45°C に発育する菌種は限定されるからである。

被検菌が 52°C に発育すれば、52°C 発育菌は *M. phlei* と *M. thermoresistibile* の 2 種のみであるから、この両者を区別すればよい。*M. phlei* は acetamide と TMD を NC 源として利用するが、*M. thermoresistibile* は利用しないので、両者の区別は容易である。(表 3)

大部分の *M. phlei* は 52°C に発育するので、*M. phlei* の同定には上記 3 性状の証明で通常十分である。したがって *M. phlei* 同定の 3 大性状としてつぎの 3 点をあげる。(1) 52°C 発育。(2) acetamide を NC 源として利用する。(3) TMD を NC 源として利用する。

本報に示したごとく *M. phlei* の全部が 52°C に発育するわけではなく、中には 45°C にしか発育しない株も

ある。このような株を同定するにはさらに若干の検査を追加する必要がある。表3には45°C以上に発育可能な抗酸菌を一括した。表3に示すごとく *M. phlei*, *M. thermoresistibile* のほかに, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* の一部, *M. avium*, nonphotochromogens (Runyon's group III) の一部も45°Cに発育する。これらと *M. phlei* を区別するには, monoethanolamine (MEA) と benzamide の NC 源としての利用および malonate の C 源としての利用を検討すればよい。表3に示すごとく *M. smegmatis* および *M. fortuitum* は MEA を NC 源として利用する。このほかに *M. smegmatis* は benzamide を利用する点で *M. phlei* と区別され, *M. fortuitum* は malonate を C 源として利用しない点で区別される。このほか *M. fortuitum* には容易に区別できる特異な性状がある¹⁸⁾。 *M. avium* および nonphotochromogens は発育も遅いし, acetamide および TMD を NC 源として利用しないし, また malonate も C 源として利用しないので区別は容易にできる。

Bönicke⁹⁾ の amidase pattern は抗酸菌の同定に最も有用な方法の一つであるが, *M. phlei* の同定には必ずしも満足すべき結果を与えない。 *M. phlei* は urease, nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性であるが, *M. thermoresistibile*, *M. smegmatis* および *M. fortuitum* も同じ反応を与える。もつとも *M. smegmatis* はこのほかに benzamidase, isonicotinamidase および succinamidase も陽性なので容易に区別できる。しかし *M. fortuitum* との区別は必ずしも容易でない。一般に *M. fortuitum* は acetamidase と allantoinase も陽性であるが, *M. phlei* でも acetamidase 陽性のものがあり (Wa 40, Wa 289, Trudeau, SP-11, CDC, 伝研の6株), *M. fortuitum* でも allantoinase を欠くものが少なからずある。したがって, amidase pattern だけでは両者を区別できない場合がある。 *M. phlei* と *M. thermoresistibile* とは同一 amidase pattern で両者の区別はできない。

補遺。7種のN化合物のNC源としての利用の型は, 発育の速い抗酸菌の区分および同定にきわめて有用である。その方法については前報したが⁹⁾, 記述に若干不足があるので本報で追加したい。検査方法はつぎのごとくである。

基礎培地は KH_2PO_4 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; 精製寒天 (和光または栄研), 20.0 g; 蒸留水 1,000 ml。これにつぎのN化合物の1つを加える。Sodium L-glutamate 3.4 g/l (水を含む市販品では 4.0 g/l); L-serine 2.1 g/l; glucosamine-HCl 2.5 g/l; acetamide, 1.2 g/l; benzamide 2.4 g/l; monoethanolamine (MEA) 6.1 g/l; trimethylene diamine (TMD) 7.4 g/l。すなわち前の5者は 0.02 M, 後の2者は 0.1 M

の割合である。後の2者は液体であるから秤量瓶で測る。以上の7種の培地に, N化合物を添加しない control を加えて8種の培地を一組とする。10% KOH を加えて培地の pH を 7.0 として, 8 ml ずつ試験管に分注して, 115°C 30 分蒸気滅菌する。ただし glucosamine の入った培地は高圧滅菌をすると培地が固まりにくくなるので, 100°C 15 分2日間の間欠滅菌とする。滅菌後の培地は斜面に仕上げる。以上の8種1組の培地に, 卵培地に発育した被検菌を1白金耳ずつ接種して 37°C に培養する。白金耳は外径 3.5 mm, 内径 2.0 mm のものを用いる。接種のさいは菌塊を新培地にもちこまぬように注意する。2週後に control と比較して明らかに発育を示すものを利用陽性とする (発育の遅い菌では4週後に判定する)。control 培地には発育をほとんど認めず発育の有無の判定は明瞭に行ないうる。各菌種の1~2株について一度テストしておく判定は容易である。

結 論

Numerical classification によつて分類された20株の *Mycobacterium phlei* の性状を記載した。

M. phlei の同定は (1) 52°C 発育, (2) acetamide の NC 源としての利用, (3) trimethylene diamine の NC 源としての利用の3性状により行ないうる。しかし *M. phlei* の中には 52°C に発育できないで, 45°C にしか発育できないものもある。このような菌を *M. phlei* と同定するには, 以上の (2), (3) のほかに, (4) monoethanolamine および benzamide を NC 源として利用しないことと, (5) malonate を C 源として利用することを証明すればよい。ただし, (5) の性状は必須ではない。

文 献

- 1) Gordon, R. E. & Smith, M. M.: J. Bact., 66: 41, 1953.
- 2) Gordon, R. E. & Mihm, J. M.: J. Gen. Microbiol., 21: 736, 1959.
- 3) Long, E. R.: Amer. Rev. Tuberc., 3: 86, 1920.
- 4) Long, E. R.: Amer. Rev. Tuberc., 5: 857, 1922.
- 5) Thompson, H. M.: Amer. Rev. Tuberc., 26: 162, 1932.
- 6) Gordon, R. E. & Hagen, W. A.: J. Bact., 36: 39, 1938.
- 7) Gordon, R. E.: J. Bact., 34: 617, 1939.
- 8) Bönicke, R.: Bull. Union Internat. Tuberc., 32: 13, 1962.
- 9) 東村道雄: 医学と生物学, 72: 32, 1966.
- 10) 東村道雄: 医学と生物学, 72, 187, 1966.
- 11) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed. ed. by Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R., Williams & Wilkins, Baltimore, 1957, p. 694.

- 12) 東村道雄：医学と生物学，71：336，1966.
- 13) 東村道雄：医学と生物学，73：27，1966.
- 14) 東村道雄・水野松司・外山春雄・東村純雄：結核 41：395，1966.
- 15) Cerbón, J. & Trujillo, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88：546，1963.
- 16) Kubica, G. P. & Beam, E.: Amer. Rev. Resp. Dis., 83：733，1961.
- 17) Tsukamura, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 92：491，1965.
- 18) 東村道雄：医学と生物学，70：364，1965.