

Slowly Growing Mycobacteria の分類と同定

第5報 *Mycobacterium terrae* の記載

東 村 道 雄

国立療養所中部病院 (院長 勝沼六朗博士)

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 11 月 7 日

CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION OF SLOWLY
GROWING MYCOBACTERIA*Report V. Description of *Mycobacterium terrae*

Michio TSUKAMURA and Sumio TSUKAMURA

(Received for publication November 7, 1966)

Further notes on a new species *Mycobacterium terrae* (1-4) have been provided based on the observations of 93 strains. In the following description, the percentage in parentheses indicates the percentage of strains showing the positive reaction in each described character.

Origin: Isolated from soil by mouse body passage method (isolated from mouse organs after intraperitoneal inoculation of alkali-treated and neutralized soil samples to mice).

Morphological: Acid-fast rods or short rods; mycelium not formed; branch not formed; cord not formed; non-motile. Colonial morphology: White or creamy, wet, smooth colonies on Sauton agar and on egg media; nonphotochromogenic.

Growth rate: Slow; growth at 7 to 10 days on egg media and growth at 10 to 14 days on Sauton agar (9 strains obtained directly from soil grew faster and showed a stronger 2-week-arylsulfatase). Nitrate not reduced (29% of strains showed a positive reaction after a few minutes). Three-day-arylsulfatase: Negative (0%). Two-week-arylsulfatase: Positive (80%).

Salicylate degradation: Negative (0%). PAS degradation: Negative (0%).

Amidases: No amidase activity was found in all strains in respect to acetamidase, benamidase, urease, isonicotinamidase, nicotinamidase, pyrazinamidase, salicylamidase, allantoinase, succinamidase and malonamidase (0%).

Growth on Ogawa egg medium containing 0.2% Na-PAS: Positive (96%). Growth on Ogawa egg medium containing 0.25 mg./ml. $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$: Positive (100%). Growth on Sauton agar containing 0.1% picric acid: Variable (40%). Growth on Sauton agar containing 0.2% picric acid: Negative (1%). Growth on Ogawa egg medium containing 0.1% sodium salicylate: Positive (100%). Niacin: Negative (0%).

Growth at 28°C and 37°C (100%), but no growth at 45°C (2%). Utilization of organic acids as sole carbon source for growth: Acetate (76%) and pyruvate (61%) utilized; others, citrate, succinate, malate, benzoate, malonate and fumarate not utilized (0%).

Utilization of carbohydrates as sole carbon source for growth: Propanol utilized only occasionally (28%); glucose, mannose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, trehalose,

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Chita-gun, Aichi-ken, Japan.

raffinose, inositol, mannitol, sorbitol, fructose, sucrose, ethanol, propylene glycol, 1,3-, 2,3- and 1,4-butylene glycols not utilized (0%).

No acid formed from glucose, mannose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, raffinose, trehalose, inositol, mannitol and sorbitol (0%).

Utilization of nitrogen compounds as simultaneous nitrogen and carbon source for growth : Only L-glutamate was utilized by a few strains (5%) ; L-serine, glucosamine, acetamide, benzamide, monoethanolamine and trimethylene diamine not utilized (0%).

Utilization of nitrogen compounds as sole nitrogen source for growth : L-Glutamate utilized by all strains (100%) ; L-serine utilized usually (60%) ; L-methionine not utilized (13%) ; acetamide not utilized usually (16%) ; urea utilized (94%) ; pyrazinamide utilized (79%) ; isonicotinamide utilized (85%) ; nicotinamide utilized (79%) ; succinamide utilized (81%) ; nitrate utilized usually (60%) ; benzamide and nitrite not utilized (0%).

Virulence for mice : When observed from the viable number in lungs and spleen after intravenous inoculation, slightly or moderately virulent for mice and less virulent than *M. avium*. Virulence for white leghorn (chickens) : not virulent.

Mycobacterium terrae seemed to be divided into subgroups according to their pattern of utilization of carbohydrates in the presence of ammoniacal nitrogen. Fifty strains utilized acetate and pyruvate and did not utilize other carbohydrates. Nine strains utilized only acetate. One strain utilized only succinate. Two strains utilized acetate and propanol, and eight strains utilized acetate, pyruvate and propanol. Sixteen strains utilized only propanol. Seven strains utilized none of the carbohydrates tested except for glycerol. Thus, 75 of the 93 strains could be divided into two subtypes ; one utilizing acetate and pyruvate or acetate and 59 strains belonged to this type ; another utilizing only propanol and 16 strains belonged to this type. Only 10 strains utilized two or all of acetate, pyruvate and propanol.

束村(道)は1960年に土壌から分離保存中の抗酸菌の性状を検討しつつある中に、10株の発育の遅い non-photochromogenic 抗酸菌を新菌種と考えて1965年に記載した¹⁾。はじめこの菌種を *Mycobacterium non-chromogenicum* と仮称したが、group III nonphotochromogens との混同を避けるため、後に *Mycobacterium terrae* と命名し、holotype strain を National Collection of Type Cultures, London, に送った (NCTC 10424)²⁾³⁾。*M. terrae* の命名の由来は、文字通り、その分離源が土壌であることによる。一方われわれは土壌から発育の遅い抗酸菌を分離することが比較的困難な原因は、発育の速い抗酸菌や比較的アルカリや酸に抵抗の強い fungi による overgrowing であると考え、発育の遅い抗酸菌を選択的に分離する方法を考案した。すなわち発育の遅い抗酸菌はマウス体内で長期間生存する事実を利用し、マウス体内による選択法で多数の発育の遅い nonphotochromogens を分離した。これらの nonphotochromogens の大部分は *M. terrae* と同定された⁴⁾。*M. terrae* は本研究の第1報⁵⁾で示した numerical classification でも、one cluster を形成し、一応新しい species と考えられた。本報ではその後分離同定した菌株を加

え、93株の *M. terrae* について得られた知見を記載する。

1966年、米国の Wayne⁶⁾はわれわれとは全く別個に一群の nonphotochromogens を分離して新菌種と考え、同じく *M. terrae* と命名した。われわれは Dr. Wayne から3株を譲り受けてその性状を調べたが、偶然にもわれわれの *M. terrae* と同一菌種と考えられた。

実験方法

被検株93株で、うち9株は1960年に直接土壌から分離し保存したもの、81株は1965年にマウス通過法⁴⁾で土壌より分離されたもの、3株は1966年 Dr. L. G. Wayne (Veterans Administration, San Fernando, California, U. S. A.) から分与されたものである。いずれも既報⁵⁾の項目について性状を調べ、a small schedule-numerical classification で over-all similarity により同定した。

実験成績

93株について得られた性状を概括すれば次のごとくなる。すなわち以下に記載するのは type strain の性

状ではなく、*M. terrae* の一般的性状である。また () 内に示す%は 93 株中で各性状について「陽性反応」を与える菌株数の%である。

形態：抗酸性桿状菌ないし短桿状菌で、菌糸および分枝を示さない。cord 形成も示さない。

集落形態：白色ないしクリーム色の湿潤平滑な集落を、卵培地および Sauton 寒天上に作る。nonphotochromogenic。発育が遅発育性で、Sauton 寒天上では 10~14 日、卵培地上では 7~10 日で発育する。ただし 1960 年の old isolates は概して発育が速い。

硝酸還元陰性（ただし 29% の菌株は遅延反応を示す。すなわち nitrite を証明する試薬を加え、数分後にはじめて発色する反応を示す）。Catalase 陽性（100%）。Peroxidase 陰性（0%）。Niacin 陰性（0%）。Arylsulfatase 3 日反応陰性（0%）。Arylsulfatase 2 週反応陽性（80%）。Salicylate 分解陰性（0%）。PAS 分解陰性（0%）。Amidases. 次の 10 種の amidases はすべて陰性（0%）。Acetamidase, benzamidase, urease, isonicotinamidase, nicotinamidase, pyrazinamidase, salicylamidase, allantoinase, succinamidase, malonamidase.

全株が 250 $\mu\text{g/ml}$ $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ に耐性（1% 小川培地）。96% の株が 0.2% Na-PAS-1% 小川培地に発育する。全株が 0.1% Na-salicylate-1% 小川培地に発育する。

Sauton 寒天培地で 0.1% picric acid に耐性の株は 40%。0.2% picric acid 耐性の株は 1 株のみ（約 1%）。

発育温度：28°C および 37°C に発育する（100%）；45°C には発育しない（2%）。

有機酸の単一 C 源としての発育への利用。Acetate および pyruvate は大部分の菌株により利用される（おのおの 76%, 61%）。他の citrate, succinate, malate, benzoate, malonate, fumarate は利用されない（0%）。ただし 1 株が succinate を利用する）。

炭水化物の単一 C 源としての発育への利用。glycerol が全株により propanol が 28% の菌株によつて利用されるほかはすべて利用されない。すなわち次の化合物は利用されない。glucose, fructose, sucrose, mannose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, raffinose, inositol, mannitol, sorbitol, ethanol, propylene glycol, 1,3-, 1,4- および 2,3-butyleneglycols (%)。

N 化合物の同時単一 N, C 源としての発育への利用。L-glutamate が 5 株（約 5%）によつてのみ利用されるほかは、L-serine, glucosamine-HCl, acetamide, benzamide, monoethanolamine, trimethylene diamine のいずれも利用されない（0%）。

N 化合物の単一 N 源としての発育への利用。次の化合物は大部分の菌株により利用される：L-glutamate (100

%); L-serine (60%); urea (94%); pyrazinamide (79%); isonicotinamide (85%); nicotinamide (79%); succinamide (81%); nitrate (60%)。一方、次の化合物は利用されない：L-methionine (13%); acetamide (16%); benzamide (0%); nitrite (0%)。

Virulence. mice に対する virulence については既報⁷⁾した。中等度ないし軽度の virulence があるが *M. avium* より弱い。ニワトリに対する virulence はなく、この点 *M. avium* と異なる。すなわち 10 mg 湿菌量を体重 1.5 g の White Leghorn に筋注した後、3 週後に肺、脾、肝の生菌数を調べると、*M. avium* (A71, Kirchberg, 4121, 獣疫, Sheard) は肺、脾、肝、とくに脾には必ず生菌が証明できたが、*M. terrae* (1711, 1712, 1723, 1724, 1807) 注射群では、肺、脾、肝のいずれにも生菌を証明できなかった。また脾重も *M. avium* 注射群で 5.40 ± 0.82 g であつたのに対して、*M. terrae* 注射群では 4.30 ± 0.76 g であつた。臓器の肉眼的病変は両群とも明らかでなかつた。

なお *M. terrae* は少数の炭水化物しか発育に利用しないこと上述のとおりであるが、一般に (1) acetate および pyruvate を利用して、propanol を利用しない群と、(2) propanol を利用して acetate および pyruvate を利用しない群があるごとく思われる。しかし 3 者とも利用するものおよびいずれも利用しないものもある。炭水化物の中で単一 C 源として発育に利用されたものは、glycerol が全株に利用されたほかは、acetate, pyruvate, propanol (および例外的に 1 株だけにより succinate) だけであつて、単一 C 源利用の pattern によつて区分すると次のごとくである。

- (i) acetate と pyruvate を利用するもの：50 株。
- (ii) acetate のみ利用するもの：9 株。
- (iii) propanol のみ利用するもの：16 株 (Wayne の W-45 および W-511 はこれに入つた)。
- (iv) acetate, pyruvate, propanol の 3 者を利用するもの：8 株 (Wayne の W-523 はこれに入つた)。
- (v) acetate と propanol を利用するもの：2 株。
- (vi) いずれの C 源も利用しないもの (glycerol のみ利用)：7 株。

考 察

Mycobacterium terrae の同定は、上述の性状との総合的類似性によるべきであるが、他の抗酸菌との鑑別を考えると、次の性状が重要であると思われる：(1) 発育の遅い nonphotochromogens; (2) 硝酸還元陰性; (3) 2 週 arylsulfatase 陽性（ただし 20% は陰性）; (4) 発育温度が 37°C までで、45°C に発育しない; (5) 0.2% PAS 耐性; (6) 0.1% salicylate 耐性; (7) 0.25 mg/ml の $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 耐性（大部分は 0.5

mg/ml にも耐性)；(8) Bönicke の 10 種の amidase がすべて陰性；(9) glycerol 以外の炭水化物で単一C源として利用されるのは、acetate, pyruvate, propanolに限る、glucose は利用されない；(10) 単一N源として urea, pyrazinamide, nicotinamide, succinamide の 2 以上を利用する。なお人体由来の「病源性」non-photochromogens との区別には、glutamate を N 源としての 10 種炭水化物の利用 pattern が有用である⁹⁾。

他の遅発育性抗酸菌との鑑別は次のごとくである。

(1) *M. tuberculosis* および *M. bovis* : 0.2% PAS 培地, 0.1% salicylate 培地, 0.25 mg/ml NH_2OH 培地に発育しない。2 週 arylsulfatase (aryl) 陰性, acetate, pyruvate, propanol を C 源として利用しない, urea (U), pyrazinamide (P), isonicotinamide (I), nicotinamide (N), L-serine (S) を単一N源として利用しない。

(2) *M. kansasii*⁹⁾ : 通常 R 型集落で, 0.2% PAS 培地および 0.25 mg/ml NH_2OH 培地に発育しない。glucose を単一C源として利用する。硝酸還元陽性。urease および nicotinamidase 陽性。U, P, I, N を単一N源として利用しないか, しても 1 つだけである。acetate および pyruvate を単一C源として利用しない。光発色性。

(3) *M. marinum*¹⁰⁾ : R 型集落が多く, 硝酸還元陽性。urease 陽性。acetate, pyruvate, propanol を単一C源として利用しない。

(4) *M. avium*¹¹⁾ : 最も *M. terrae* と類似し, あるものでは区別が困難である。定型的な *M. avium* は 45°C に発育し, 2 週 aryl 陰性で, nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性である。

(5) *M. microti* : 0.25 mg/ml NH_2OH 培地および 0.2% PAS 培地に発育しない。Sauton 培地にも発育しにくい。

(6) scotochromogens (*M. aquae*) : 「病源性」scotochromogens は一つの species を作ると考えられるが, *M. terrae* と類似している⁵⁾¹²⁾。scotochromogens は集落が橙色に着色し, しばしば 0.25 mg/ml NH_2OH 培地に発育せず, glucose を単一C源として利用するものが多い。urease 陽性のものがある。また 0.1% picric acid 耐性のものはほとんどない。

(7) 「病源性」nonphotochromogens : あるものは 45°C に発育し, nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性の点で異なるが, あるものは区別が困難である。しかし大部分は glucose を単一C源として利用する。

既報²⁾³⁾⁵⁾したごとく *M. terrae*, *M. avium*, scotochromogens および nonphotochromogens (後 2 者は, いわゆる「病源性」のもの)はおのおのが subclusters を作るとはいえ, とくに合して大きい cluster を numerical

classification で作り, 互いに近縁関係にあることを示している。*M. terrae* ははじめは 1960 年に分離した株を用いて, *M. avium* と区別される subcluster を作ると思われたが⁹⁾, その後 *M. terrae* を多数分離して性状を調べる間に, *M. avium* とされていた菌株との区別がはなはだ困難となつてきた。*M. avium* でも定型的な株は上述のごとく *M. terrae* と区別されるが, 従来 *M. avium* とされた株にも 37°C までしか発育しない株もあり, また amidase を全く欠くものもある¹¹⁾。一方 *M. terrae* にも 2 週 aryl 陰性のものがあつて, これらの両者の区別ははなはだ困難となつた。してみるとこの両者は同一 species である可能性もでてくる。たとえば *M. terrae* は *M. avium* の less virulent な菌株であるかもしれない。換言すれば *M. terrae* の中で比較的ニワトリに毒力の強いものが, ニワトリに感染を起こしているのかもしれない。ともかく *M. terrae* と *M. avium* の類似性はきわめて注目すべき問題で, さらに多数の *M. terrae* を探し求める間に, *M. avium* と一致する菌株が土中から得られるのではあるまいか。

他の問題点は, 1960 年に分離した old isolates と 1965 年にマウス通過法で分離した new isolates とが若干性状を異にすることである。すなわち前者は発育が速く, 一般に 2 週 arylsulfatase が強い。また L-glutamate を単一 NC 源として利用するものもある。現在のところわれわれが numerical classification の立場に立つ以上, この両群の S-value は 95% 以上で, 同一 species と認めるほかはない。しかし将来, 種々の性状がさらに明らかにされれば, あるいは両群が分割されることになるかもしれない。

総 括

Mycobacterium terrae の性状を, 93 株の成績に基づいて記載した。*M. terrae* と *M. avium* の類似性は注目すべきことで, *M. avium* の起源は *M. terrae* に求めるべきかもしれない。次の菌株が type strains として保存されている。

No. 317=NCTC 10424=ATCC 19530.

No. 1711=ATCC 19531=Lausanne 1898.

No. 1721=ATCC 19532.

No. 1731=ATCC 19533.

文 献

- 1) 東村道雄：医学と生物学, 17 : 110, 1965.
- 2) 東村道雄：医学と生物学, 72 : 75, 1966.
- 3) Tsukamura, M. : J. Gen. Microbiol., 45 : 253, 1966
- 4) 東村道雄：医学と生物学, 72 : 292, 1966.
- 5) 東村道雄・東村純雄：日細, 21 : 217, 1966.
- 6) Wayne, L.G. : Amer. Rev. Resp. Dis., 93 :

- 919, 1966.
- 7) 束村道雄・外山春雄・束村純雄：医学と生物学, 72 : 118, 1966.
- 8) 束村道雄・束村純雄：医学と生物学, 72 : 342, 1966.
- 9) 束村道雄・水野松司・束村純雄：日細, 21 : 284, 1966.
- 10) 束村道雄・水野松司・外山春雄・束村純雄：日細, 21 : 615, 1966.
- 11) 束村道雄・水野松司・外山春雄・束村純雄：結核, 41 : 525, 1966.
- 12) 束村道雄・束村純雄・水野松司・外山春雄：結核, 41 : 401, 1966.