

日本分離の非定型抗酸菌の細菌学的研究
第5報 米国分離の Group III Nonphotochromogens の性状

束 村 道 雄・束 村 純 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)
名古屋大学医学部日比野内科教室(主任 日比野 進教授)
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

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON ATYPICAL MYCOBACTERIA
ISOLATED IN JAPAN*

Report V. Characters of the Group III
Nonphotochromogens Isolated in U. S. A.

Michio TSUKAMURA, Sumio TSUKAMURA, Shoji MIZUNO
and Haruo TOYAMA

(Received for publication November 7, 1966)

In an aid to compare with the characters of the group III nonphotochromogens isolated in Japan, which was described in the Report IV of this study, characters of the nonphotochromogens isolated in the United States were studied.

Biological and biochemical characters of twenty-two strains of the nonphotochromogens isolated in U. S. A. are shown in Table 2. A comparison between the characters of the nonphotochromogens isolated in Japan and those of the same organisms isolated in U. S. A. was made and revealed that there was no significant difference between them, except that the United States strains utilized more frequently L-glutamate as simultaneous nitrogen and carbon source than did the Japanese strains.

Comparisons between the nonphotochromogens (Japanese strains) and the *M. avium*, *M. terrae* and *M. aquae* strains also were done (Table 3).

Similarity and difference between the *M. avium* strains and the nonphotochromogens were discussed also by literatures, and considering the authors' results and the literatures' results, a clear-cut solution of the problem of the identification of *M. avium* and the nonphotochromogens seemed to need still time.

The nonphotochromogens have many characters similar to those of *M. avium*, *M. terrae* and *M. aquae*, and it occupies an important key position for solution of the taxonomy of these more clearly defined species. It was noticed that the nonphotochromogens are more heterogeneous in respect to the characters tested than are *M. avium*, *M. terrae* and *M. aquae*, especially, the latter two.

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

日本分離の slowly growing, nonphotochromogenic mycobacteria (nonphoto と略す) の性状について第4報¹⁾に記載したので、本報では前者と比較のため、米国で分離された nonphoto について同様な検査を行なつた結果を報告し、あわせて nonphoto の分類学的地位について考察する。

実験方法

被検株とその由来は、表1に示すとおりで、検査の方法は既報²⁾のごとくである。

実験成績

表2に一括した。これを要約すれば次のごとくである。なお()内には陽性反応を示した菌株数の率を示した。被検菌株は22株。

集落形態：クリーム色ないし白色，湿潤，平滑な集落を Sauton 寒天および卵培地に作る。

硝酸還元：陰性 (0/22=0%)。Catalase：陽性 (22/22=100%)。Peroxidase：陰性 (0/22=0%)。Arylsulfatase 3日試験：陰性 (0/22=0%)。

2週 arylsulfatase：大概陽性 (17/22=77%)

Salicylate 分解：陰性 (0/22=0%)

PAS 分解：陰性 (0/22=0%)

Niacin：陰性 (0/22=0%)

Amidases：9/22=41% は nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性；2/22=9% は nicotinamidase

のみ陽性；残りの 11/22=50% は Bönicke³⁾ の 10 種の amidases がすべて陰性である。

0.2% PAS 含有 1% 小川培地に発育する。(20/22=91%)

0.25 mg/ml NH₄OH·HCl 含有 1% 小川培地に発育する。(22/22=100%)

0.5 mg/ml Na-salicylate 含有 1% 小川培地に発育する。(22/22=100%)

1.0 mg/ml Na-salicylate 含有 1% 小川培地に発育する。(21/22=95%)

10 μg/ml thiophen-2-carbonic acid hydrazide(TCH) 含有 1% 小川培地に発育する。(22/22=100%)

0.1% picric acid 含有 Sauton 寒天培地に発育しない。(3/21=14% が発育した)

発育温度：(1) 28°C および 37°C に発育し，45°C に発育しないものは 18/22=82%；(2) 45°C まで発育するが，52°C に発育しないものは 4/22=18%。すなわち 37° 発育株は 82% で，45° 発育株は 18%。

有機酸の単一C源としての発育への利用：Acetate を利用するものは 21/22=95%；pyruvate を利用するものは 21/22=95%；succinate を利用するものは 4/22=18%；malate を利用するものは 4/22=18%；fumarate を利用するものは 3/22=14%；他の citrate, benzoate, malonate は全株これを利用しない。(0/22=0%)

炭水化物(有機酸以外)の単一C源としての発育への利用：Glucose は 14/22=64%，propanol は 15/22=68%，fructose は 6/22=27%，sucrose は 5/22=23%，1,4-butylene glycol は 3/22=14% の株により利用された。他の炭水化物すなわち mannose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, trehalose, raffinose, inositol, mannitol, sorbitol, ethanol, propylene glycol, 1,3-butylene glycol, 2,3-butylene glycol は利用されなかつた。(0/22=0%)

炭水化物からの酸形成：Glucose, mannose, galactose, arabinose, xylose, rhamnose, trehalose, raffinose, inositol, mannitol, sorbitol のいずれからとも酸を形成しない。(0/22=0%)

N化合物の単一N源としての発育への利用：L-Glutamate は全株 (22/22=100%) により，NaNO₃ は 20/22=90% の株により，L-serine は 6/22=27% の株により，acetamide は 15/22=68% の株により，urea は 4/22=18% の株により，pyrazinamide は 9/22=41% の株により，nicotinamide は 11/22=50% の株により，iso-nicotinamide は 12/22=54% の株により，succinamide は 16/22=73% の株により，benzamide は 1/22=5% の株により，それぞれ利用された；L-methionine および nitrite は利用されなかつた。(0/22=0%)

N化合物の同時NC源としての発育への利用；L-Glu-

Table 1. History of Test Strains

Strain	History
P-40, P-41, P-42, P-48, P-51, P-54	E.H. Runyon - K. Takeya (1960) - M. Tsukamura (1965)
N 100616, N 121326	E.H. Runyon - K. Takeya (1960) - M. Tsukamura (1961)
P-7	E.H. Runyon-K. Takeya - K. Urabe (1959) - M. Tsuka- mura (1966)
P-25, P-23, 586	E.H. Runyon - G.P. Kubica (1957-1959) - H. Saito (1964)- M. Tsukamura (1966)
194 (L. Hutson) 196 (J. A. Gibbs) 355 (C. Williamson) 372 (W. Turner) 377 (E. Smith) 378 (G. Lanier) 380 (R. Copeland) 384 (J. Raymond) 386 (I. Spivey) 391 (J.R. Gavin)	G.P. Kubica-H. Saito (1964) - M. Tsukamura (1966)

Table 2. Characters of Group III Nonphotochromogens Isolated in U. S. A.

Strain	Colonial morph.	Colonial pigment	Nitrate reduction	2-week-aryl sulf.	Tolerance to 0.25% $\text{NH}_4\text{OH-HCl}$	Growth at 37°C	Growth at 45°C	Amidases (*2)	Utilization of organic acids as sole C source (*3)	Acid formation (*4)	Utilization of carbohydrates as sole C source (*5)	Utilization of N-compounds as sole N source for growth (*7)	Niacin	Tolerance to 0.2% Na-As	Tolerance to 0.1% picric acid	Tolerance to salicylate	
																0.05%	0.1%
P-40	S	-	-	+	+	+	-	-	A	P	F S P 14	G	-	+	-	+	+
P-41	S	-	-	+	+	+	-	N P	A M P F	-	S P 14	G	-	+	-	+	+
P-42	S	-	-	+	+	+	-	N P	A S M P F	-	S P 14	G	-	+	-	+	+
P-48	S	-	-	+	+	+	-	-	A S P F	-	S P	G	-	+	-	+	+
P-51	S	-	-	+	+	+	-	-	A P	-	F P	G	-	+	-	+	+
P-54	S	-	-	+	+	+	-	-	A P	-	F S	G	-	+	-	+	+
P-7	S	-	-	+	+	+	+	N P	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
P-23	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
P-25	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
377	S	-	-	+	+	+	+	N P	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
380	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
384	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
386	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
194	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
355	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
372	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
378	S	-	-	+	+	+	+	N P	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
391	S	-	-	+	+	+	+	N P	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
586	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
196	S	-	-	+	+	+	+	-	A P	-	G	G	-	+	-	+	+
N100616	S	-	-	+	+	+	+	N P	A S M P	-	G	G	-	+	-	+	+
N121326	S	-	-	+	+	+	+	N P	A S M P	-	G	G	-	+	-	+	+

(*1) Colonial morphology. R=rough, S=smooth.

(*2) Amidases. The following were tested: Acetamidase (A), benzamidase (B), urease (U), isonicotinamidase (I), nicotinamidase (N), pyrazinamidase (P), salicylamidase (Sa), allantoinase (Al), succinamidase (Su) and malonamidase (M).

(*3) Utilization of organic acids as sole carbon source for growth. The following were tested: Acetate (A), citrate (C), succinate (S), malate (M), pyruvate (P), benzoate (B), malonate (Mo) and fumarate (F).

(*4) Acid formation from carbohydrates. The following were tested: Glucose (G), mannose (M), galactose (Ga), arabinose (A), xylose (X), rhamnose (Rh), trehalose (T), raffinose (Ra), inositol (I), mannitol (Mt) and sorbitol (So).

(*5) Utilization of carbohydrates as sole carbon source for growth. The following were tested: Glucose (G), mannose (M), galactose (Ga), arabinose (A), xylose (X), rhamnose (Rh), trehalose (T), raffinose (Ra), inositol (I), mannitol (Mt), sorbitol (So), fructose (F), sucrose (S), ethanol (E), propanol (P), propylene glycol (Pro), 1,3-butylene glycol (13), 2,3-butylene glycol (23) and 1,4-butylene glycol (14).

(*6) Utilization of nitrogen compounds as simultaneous nitrogen and carbon source for growth. The following were tested: L-Glutamate (Gt), L-serine (S), glucosamine (Gc), acetamide (A), benzamide (B), monoethanolamine (M) and trimethylene diamine (T).

(*7) Utilization of nitrogen compounds as sole nitrogen source for growth. The following were tested: L-Glutamate (G), L-serine (S), L-methionine (M), acetamide (A), benzamide (B), urea (U), pyrazinamide (P), isonicotinamide (I), nicotinamide (N), succinamide (Su), nitrate (NO_3) and nitrite (NO_2).

Table 3. Comparison between the Characters of Group III Nonphotochromogens Isolated in Japan and the Characters of *M. avium*, *M. terrae* and *M. aquae*

Character showing a significant difference between two groups*	Rate of strains showing the positive reaction	
	Nonphoto	<i>M. avium</i>
1. Utilization of glucose as sole C source	27/37 (73%)	0/14 (0%)
2. Two-week-arylsulfatase	23/37 (62%)	1/14 (7%)
	Nonphoto	<i>M. terrae</i>
1. Growth at 45°C	20/37 (54%)	1/93 (1%)
2. Positive nicotinamidase and pyrazinamidase	14/37 (38%)	0/93 (0%)
3. Utilization of glucose as sole C source	27/37 (73%)	0/93 (0%)
	Nonphoto	<i>M. aquae</i>
1. Colonial pigmentation	0/37 (0%)	22/22 (100%)
2. Growth at 45°C	20/37 (54%)	2/22 (9%)
3. Positive urease	0/37 (0%)	8/22 (36%)

* Significant difference in the positive rate at a 5% level by the χ^2 -test.

tamate を利用したものは 11/22=50% であった；他の L-serine, glucosamine, acetamide, benzamide, monoethanolamine および trimethylene diamine は利用されなかつた。(0/22=0%)

考 察

1. 日本株と米国株との比較

第4報¹⁾に記載した日本分離の nonphoto と本報に記載した米国分離の nonphoto を比較すると, negative matches (表に示されていない)が多いとはいえ, 多数の positive matches があり, 両者がきわめて類似していることは明らかである。しかしさらに詳細に比較するために, 日本株の中で NJ 記号の付された 21 株 (第4報の表1) と本報の米国株 22 株を統計的に比較してみると (χ^2 -test), 両者に有意差 ($P<5\%$) がみられたのは次の性状である。

すなわち L-glutamate を同時 NC 源として利用するものは, 日本株で 2/21 (=9.5%), 米国株で 11/22 (=50%) で, $\chi^2=6.50$ ($P<2.5\%$) で有意差がある。しかし他の性状については有意差はなく, 日本株と米国株とはきわめてよく類似している。

2. Nonphotochromogens と *M. avium*, *M. terrae*, *M. aquae* (scotochromogens) との比較

(a) *M. avium* との比較。*M. avium* の性状は既報した⁴⁾。*M. avium* 14 株の性状と日本分離の nonphoto 37 株の性状を比較して, χ^2 -test で有意差を示すのは, (i) Glucose の C 源としての利用；(ii) 2 週 arylsulfatase である。(表3)

(b) *M. terrae*⁵⁾⁶⁾ との比較。*M. terrae* 93 株の性状と nonphoto 37 株を比較し, 性状 (陽性率) に有意

差を示すのは, (i) 発育温度: nonphoto では 45° に発育する株が 54% あるが, *M. terrae* では 1% しかない；(ii) nicotinamidase と pyrazinamidase の陽性率: *M. terrae* は amidase すべて陰性；(iii) glucose の C 源としての利用: *M. terrae* は glucose を利用しない, の3点である。(表3)

(c) *M. aquae* (仮称)⁷⁾⁸⁾ との比較。*M. aquae* 22 株との比較では, (i) *M. aquae* は集落が初発集落から橙色；(ii) *M. aquae* は 37° までしか発育しないが, nonphoto の 54% は 45° まで発育する；(iii) *M. aquae* には urease 陽性の株があるが, nonphoto には urease 陽性の株はない。(表3)

3. Nonphotochromogens の分類学的地位について

Nonphoto が *M. avium* と類似していることは早くから知られている。Durr et al.⁹⁾ は nonphoto と *M. avium* とがニワトリに対する毒力で差があると述べているが, 他の点ではよく似ていると述べ, Meissner¹⁰⁾ も nonphoto はニワトリに毒力の少ない *M. avium* の derivatives であろうと述べている。Takeya et al.¹¹⁾, Smith & Johnstone¹²⁾ は両者のツベルクリン反応の交叉について報告している。また Scammon et al.¹³⁾ も両者の類似性を支持する観察を記載している。一方 Bönicke⁹⁾ は amidase pattern が両者で同じであると報告している。しかし以上の類似性はたんに毒力, ツ反応, 形態的観察に基づいているので, 観察された所見からただちに両者を同一 species とみなすわけにはゆかないと思われる。両者が同一 species であるという主張は, Bojalil et al.¹⁴⁾ により 1962 年, 最近には Wayne¹⁵⁾ によつて行なわれた。微生物の分類学は混迷の中にあつたが, 最近にいたつてようやく混迷から脱出する時期に達したように思わ

れる。それは Sneath^{16)~18)} によつて導入された numerical classification の考えで、すべての性状を等価とみなして、数学的に分類を進めてゆこうとする考えである。この方法は Bojalil et al.¹⁴⁾ によつていち早く *Mycobacterium* の分類に応用されたが、惜しむらくは使用した性状数が少なすぎた¹⁹⁾。しかし Bojalil et al. の先駆的業績は高く評価されるべきで、nonphoto と *M. avium* の同定の問題についてようやく具体的な一歩が踏み出されたところに意義がある。その後 1966 年にいたつて東村など^{19)~22)} の一連の numerical classification の研究、Wayne¹⁵⁾ の研究が現われた。Wayne¹⁵⁾ は本年 nonphoto と *M. avium* とを同一 species とすべしという成績を発表したが、かれの研究もまた Bojalil et al. のそれと同じく、使用された性状がまだ少なすぎるという批判は免れないであろう。東村^{19)~21)} ははじめ 94 性状を用いて numerical classification を用い、nonphoto には *M. avium* と区別できない群と区別できる群があることを示した¹⁹⁾。この研究は抗酸菌の分野ではじめて所期の性状数を使用して行なわれた numerical classification であつたが、対象を発育の遅い抗酸菌にかざると、“differentiating characters” の数は 42 で²²⁾、なお満足すべき域には達していない。すなわちわれわれは Bojalil et al.¹⁴⁾ および Wayne¹⁵⁾ が nonphoto と *M. avium* とを同一 species とみなす考えはなお時期尚早であり、いましばらく新しい検査方法の集積を持つて再び numerical classification が行なわれるべきだと考える。しかし nonphoto と *M. avium* が同一 species であるが、少なくとも近縁の species であることは、いままで最多の性状を用いて研究した東村など^{19)~22)} の成績からも推察される。

Nonphoto と *M. avium* との差異に関する報告も最近あふる傾向にある。これも nonphoto の *M. avium* 同定説を時期尚早とみる一つの理由でもある。すなわち Durr et al.⁹⁾ および Meissner¹⁰⁾ によるニワトリに対する毒力の差のほかに、Kubica & Beam²³⁾ による 2 週 arylsulfatase の差、Urabe et al.²⁴⁾ による acid phosphatase の差、高橋²⁵⁾ による Sauton 培地での発育形態の差、木村、森²⁶⁾ による卵黄嚢内発育の差、Murohashi & Yoshida²⁷⁾ による紫外線照射時の抗酸性消失の差、東村²⁸⁾ による glutamate を N 源としたときの 10 種 C 源利用 pattern の差、東村による NH₃-N 源存在時の glucose 利用の差（本報）などがあげられている。このうちの大部分は単独では nonphoto と *M. avium* を区別できるほど信頼度は高くない。しかし Murohashi & Yoshida²⁷⁾ の方法はそれ単独で両者を区別できるもののごとくであり、東村²⁸⁾ の方法も単独で両者の区別が可能と思われる。これらの所見と上述の nonphoto-*M. avium* 同一説の根拠がまだ確実でない点とを考えあわせて、

nonphoto の分類学的地位についての結論はしばらく待つこととしたい。

Nonphoto と *M. avium* の関係についてはしばしば論じられたが、*M. terrae* および *M. aquae* との関係については報告がない。東村^{19)~22)} の numerical classification の結果によれば、nonphoto はこれら 2 者および *M. avium* と合して one large cluster を作りながらも、*M. terrae* および *M. aquae* と分かれて subcluster を作るごとくである。しかし clear-cut な区別は困難で、とくに nonphoto の一部と *M. aquae* との区別はより困難である。この点現時点では *M. terrae* および *M. aquae*（後者の命名については問題があるが⁹⁾、適当な命名が決まるまで *M. aquae* の仮称を使用する。この定義については文献 7, 8 参照）を独立の species として取り扱うが、これら 2 者と *M. avium* および nonphoto の分類の問題は、さらに検討を要するものであることはいうまでもない。

とくに nonphoto の問題は *M. terrae* および *M. aquae* に比較して困難な問題を含んでいる。*M. terrae* および *M. aquae* は比較的均一な群で、とくに *M. terrae* の定義は比較的明確である⁵⁾⁶⁾。scotochromogens の分類および *M. aquae* の定義もかなり判然となつた⁷⁾⁸⁾。しかるに nonphoto は上記 2 者に比較して不均一である。nonphoto のみならず *M. avium* なる species も、現在同定されている菌株についてみるかぎり、かなり広い変異を許容したものである⁹⁾。たとえば、発育温度域にしても *M. avium* および nonphoto には、37° まで発育する株と 45° まで発育する株があり、amidase pattern にしても amidase をすべて欠くものと、nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性のものがある。その他の性状についても、nonphoto の不均一性は *M. avium* よりも著しい。この問題も species の範囲を決めるにあたつて解決しなければならぬ問題であろう。

総 括

米国分類の nonphoto 22 株の性状を記載するとともに日本分離株と比較し、両者の間にほとんど差がないことを認めた。

Nonphoto は *M. avium*, *M. terrae*, *M. aquae* と類似性があり、この 3 者を結合する要の立場にする。近時 nonphoto を *M. avium* と同定する報告が現われたが、nonphoto と *M. avium* の近縁性は疑いないとしても、現段階での同定は時期尚早のごとく思われる。

菌株を分与していただいた九州大学武谷健二教授ならびに広島大学斎藤肇博士に謝意を表する。

文 献

- 1) 束村道雄・束村純雄・水野松司・外山春雄：結核，42：49，1967.
- 2) 束村道雄・束村純雄・水野松司・外山春雄：結核，41：395，1966.
- 3) Bönicke, R. : Bull. Union Internat. Tuberc., 32 : 13, 1962.
- 4) 束村道雄・水野松司・外山春雄・束村純雄：結核，41：525，1966.
- 5) 束村道雄：医学と生物学，71：110，1965.
- 6) 束村道雄：医学と生物学，72：292，1966.
- 7) 束村道雄・束村純雄・水野松司・外山春雄：結核，41：401，1966.
- 8) 束村道雄・束村純雄・水野松司・外山春雄：結核，42：15，1967.
- 9) Durr, F.E., Smith, D.W. & Altman, D.P. : Amer. Rev. Resp. Dis., 80 : 876, 1959.
- 10) Meissner, G. : Zbl. Bakt. I Orig., 180 : 510, 1960.
- 11) Takeya, K., Zinnaka, Y., Yamaura, K. & Toda, T. : Amer. Rev. Resp. Dis., 81 : 674, 1960.
- 12) Smith, D.T. & Johnstone, W.W. : Amer. Rev. Resp. Dis., 90 : 899, 1964.
- 13) Scammon, L., Froman, S. & Will, D.W. : Amer. Rev. Resp. Dis., 90 : 804, 1964.
- 14) Bojalil, L. F., Cerbón, J. & Trujillo, A. : J. Gen. Microbiol., 28 : 333, 1962.
- 15) Wayne, L. G. : Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 919, 1966.
- 16) Sneath, P. H. A. : J. Gen. Microbiol., 17 : 184, 1957.
- 17) Sneath, P. H. A. : J. Gen. Microbiol., 17 : 201, 1957.
- 18) Sneath, P. H. A. : Ann. Rev. Microbiol., 18 : 335, 1964.
- 19) 束村道雄：医学と生物学，72：75，1966.
- 20) 束村道雄：医学と生物学，73：27，1966.
- 21) 束村道雄：医学と生物学，73：31，1966.
- 22) 束村道雄・束村純雄：日細，21：217，1966.
- 23) Kubica, G. P. & Beam, E. : Amer. Rev. Resp. Dis., 83 : 733, 1961.
- 24) Urabe, K., Saito, H., Tasaka, H. & Matsubayashi, A. : Amer. Rev. Resp. Dis., 91 : 279, 1965.
- 25) 高橋宏：結核，37：145，1962.
- 26) 木村元喜・森良一：結核，39，458，1964.
- 27) Murohashi, T. & Yoshida, K. : Amer. Rev. Resp. Dis., 92 : 817, 1965.
- 28) 束村道雄・束村純雄：医学と生物学，72：342，1966.