

日本分離の非定型抗酸菌の細菌学的研究

第6報 Rapid Growers の性状とその分類学

東村道雄・東村純雄

国立療養所中部病院(院長勝沼六郎博士)
 名古屋大学医学部第一内科教室(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)

板坂安修

名古屋大学医学部第二外科教室(主任星川信教授)

受付 昭和42年2月16日

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON ATYPICAL MYCOBACTERIA
ISOLATED IN JAPAN*

Report VI. Taxonomy of Pathogenic Rapidly Growing Mycobacteria

Michio TSUKAMURA, Sumio TSUKAMURA and
 Yasunobu ITASAKA

(Received for publication February 16, 1967)

Bacteriological and biochemical characters of rapidly growing mycobacteria that caused pulmonary disease were studied in comparison with three *Mycobacterium runyonii* strains and ten *Mycobacterium fortuitum* strains. Pathogenic rapid growers tested were one strain from patient Yamamoto (Urabe & Kawai, 1957), one strain from patient Sato (Konno *et al.*, 1964) and six strains from patient Yoshida. The third case was found in our hospital and described firstly in this paper. The patient is a forty-year old woman and had a large cavity in her left upper lobe. In spite of the presence of drug resistances to all antituberculous drugs (streptomycin, PAS, isoniazid, kanamycin, ethionamide, cycloserine and ethambutol), the cavity was closed by a six-month-regimen of the chemotherapy with streptomycin, PAS and isoniazid, but leaving a continuous excretion of a small number of acid-fast bacilli other than tubercle bacilli in her sputum.

All of the above patient strains were identified as *Mycobacterium fortuitum*, a number of discrepancies being observed from the characters of reference strains of *M. fortuitum*. The strains seemed to have their taxonomic position between the *M. runyonii* proposed by Bojalil *et al.* as a new species and the *M. fortuitum*, and the strains rather more resembled to *M. runyonii* than *M. fortuitum*. However, considering a close similarity of *M. runyonii* with *M. fortuitum*, we propose to name these strains with *M. runyonii* strains as *Mycobacterium fortuitum* subsp. *runyonii* and to name the typical *M. fortuitum* strains as *Mycobacterium fortuitum* subsp. *fortuitum*. A numerical classification with much more strains will be reported elsewhere.

In contrast to *M. fortuitum* subsp. *fortuitum*, *M. fortuitum* subsp. *runyonii* represented, generally, the following differences:

- (i) nitrate not reduced or only weakly reduced;

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

- (ii) no acid formed from glucose, mannose and trehalose ;
- (iii) ethanol, propanol, propylene glycol and 1,3- and 2,3-butylene glycols not utilized as the sole source of carbon for growth ;
- (iv) glucosamine not utilized as the sole, simultaneous sources of carbon and nitrogen for growth ;
- (v) allantoinase activity not shown.

However, none of these characters were distinct for differentiation of subspecies *runyonii* from subspecies *fortuitum*. Both subspecies seemed to be differentiated only by a combination of these characters.

In addition to the above, the patient strains showed a remarkable character in blackening the Sauton agar containing 0.2% sodium p-aminobenzoate. Such character was not observed in all mycobacteria until now tested including Bojalil's "*M. runyonii*" strains. Bojalil's "*M. runyonii*" strains showed a negative or only a weakly positive three-day-arylsulfatase activity, a negative salicylate degradation test and no growth on egg media containing 0.5 mg/ml hydroxylamine, which were the reactions characteristic for *M. fortuitum*, and they seemed to occupy their position at the end of a broad spectrum of *M. fortuitum*.

Rapidly growing mycobacteria (rapid growers) が人体に感染することは、Cruz¹⁾の *Mycobacterium fortuitum* 以来多くの報告がある。その大部分は *M. fortuitum* と同定されているか^{2)~4)}、または未同定のままである。わが国における rapid growers 感染例の報告は、占部、河合⁵⁾による「山本株」と今野ほか⁶⁾による「佐藤株」の2例にすぎない。今回、われわれは第3例として、国立療養所中部病院入院患者の症例1例を追加するとともに、これら3患者の菌株について検討した結果を報告する。

実験材料および方法

人由来の rapid growers は、山本株、佐藤株、西脇株各1株と、吉田株6株、計9株を検討した。山本株(RJ-1)は、占部、河合⁵⁾により1957年に報告されたもの、佐藤株(RJ-2)は今野ほか⁶⁾により1964年に報告されたものである。西脇株ははじめ感染を起こしたのものとして、名古屋大学日比野内科に送られたが、その感染の成立が確実でないので、RJの番号を付されなかつた株である。吉田株は国療中部病院に1966年3月入院した40才の女子の患者から分離された株である。この患者ははじめ左上葉に大空洞(50×60 mm)を有し、全抗結核剤(SM, PAS, INH, KM, TH, CS, EB)に耐性の抗酸菌を少量排泄していた。はじめ手術予定であつたが、耐性があるにもかかわらず、SM・PAS・INH 併用療法を行なう間に急速に空洞が縮小し、6カ月後にはほとんど消失してしまつた。しかし微量の抗酸菌の排菌は、検査の度に数コロニー程度証明されている。この抗酸菌は初回分離では4週後にはじめて集落が認められたが、

継代すれば3~4日で1%小川培地に発育した。この菌以外の遅発育性抗酸菌や結核菌は全く認められず、上記の速発育性抗酸菌は、分離のために唯一の培養菌として認められた。この患者は人型結核菌にも弱陽性の反応を示したが、患者自身の8月分離菌のSauton培養から作製したツベルクリン液に対して、1,000倍希釈液0.1 mlの皮内接種で48時間後に8×8 mmの発赤を示した。対象とした他の結核患者5名および健康者2名は、吉田株ツベルクリンに対しては全く陰性の反応を示した。以上のごとくこの患者は、頻回に発育の速い抗酸菌を単一菌として排泄しているので、毎回の排菌量は少ないが、rapid grower による感染例と考えた。症例の詳細は別報する。

以上の病原性 rapid growers の対照として、*M. runyonii* (Bojalil et al.⁷⁾)「380」「481」「518」の3株(Dr. Runyon, E.H. から九大武谷教授に分与され、武谷教授からさらにわれわれに分与された)および *M. fortuitum* 10株を用いた。この *M. fortuitum* 中6株は標準株として、ATCC または NCTC に保存されているものであり、R記号の2株は Dr. R.E. Gordon により同定されたものである。いずれも Dr. R.E. Gordon のご好意で入手した(ただし ATCC 19709 を除く)。他の2株はわれわれの研究室で分離同定されたものである。ATCC または NCTC 株は *M. fortuitum* の標準株であり、「1701」株もわれわれが分離同定した100株以上の株の中から定型的性状を示すものとして選んだ。「1261」株は45°Cに発育できる株の代表として、「R-1025」株および「R-1277」株は、Dr. R.E. Gordon により *M. fortuitum* と同定された株の中で *M. runyonii* に近い

Table 2. Characters of Rapid Growers

Strain	Utilization of organic acids as sole C source (66)						Utilization of carbohydrates as sole C source (66)													Utilization of nitrogen compounds as simultaneous N and C source (67)						Utilization of nitrogen compounds as sole N source (68)																																
	A	C	S	M	P	B Mo F	Glucose	Fructose	Sucrose	Mannose	Galactose	Arabinose	Xylose	Rhamnose	Trehalose	Rafinose	Inositol	Mannitol	Sorbitol	Ethanol	Propanol	Propyl.	13 bg	14 bg	23 bg	G	S	Gc	A	B	MEA	TMD	G	S	M	A	B	U	P	I	N	Su	NO ₃	NO ₂														
380	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+										
481	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+							
518	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
Yamamoto	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
Sato	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
Yoshida-1	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
Yoshida-2	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						
Yoshida-3	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+					
Yoshida-4	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Yoshida-5	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Yoshida-6	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
Nishiwaki	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
1261	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+				
NCTC 8697	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ATCC 19709	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ATCC 6841	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1701	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
ATCC 11440	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
ATCC 14467	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
NCTC 1542	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
R-1277	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+		
R-1025	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

As to designations, see Table 1.

性状を示す株の例として対照に加えた。

検査の方法は既報⁹⁾のとおりで、発育の有無の判定は特記しないかぎり、37°C 2週培養後に行なつた。

実験成績ならびに考察

実験成績を表1および2に一括した。

山本株、佐藤株および吉田株の分類学的地位

実験成績に示すように、山本株、佐藤株、吉田株は、*M. fortuitum* および *M. runyonii* の両者に類似し、どちらかといえば *M. runyonii* の3株および *M. fortuitum* 中の R-1025 および R-1277 株により近い。*M. runyonii* が公認されていない現在、既知菌種と同定しようとするれば、*M. fortuitum* 以外に同定される菌種はない。*M. fortuitum* について先駆的研究をした Gordon, R. E. によつて同定された菌株中にも、山本株などときわめて類似する株がある。一方、山本株、佐藤株、吉田株が *M. runyonii* とされた3株に類似していることも確実である。最近、中山⁹⁾は山本および佐藤の両株を *M. runyonii* と同定するとともに、*M. runyonii* が *M. fortuitum* から区別される点として、硝酸還元陰性、citrate を利用しない、allantoinase を欠くなどの点をあげた。

問題は *M. runyonii* が果たして独立の菌種として成立するか否かであるが、もともと *M. runyonii* は Bojalil, Cerbón & Trujillo⁷⁾ が numerical classification (数的分類法) によつて発見提唱したものであるが、Bojalil et al. の行なつた「数的分類」は、使用された性状の数が少なく、その結果にはなお検討の余地があるとされている¹⁰⁾。したがつて現在 *M. runyonii* を確立された菌種として受け入れることは問題が多い。最近、東村¹¹⁾が“*M. runyonii*” 3株を組み込んで行なつた数的分類では“*M. runyonii*” と「定型的」*M. fortuitum* の中間に、1群の中間株が見出された。すなわち“*M. runyonii*” が独立の菌種である可能性はあるとしても、現在は *M. fortuitum* の広い spectrum の端に位する例外的な株と考へてもよい結果が得られた。以上の結果から、東村は一応“*M. runyonii*” を *M. fortuitum* の subspecies とし、*M. fortuitum* subsp. *runyonii* とすることを提唱した。本報には山本株、佐藤株、吉田株の性状とともに、“*M. runyonii*” および *M. fortuitum* 標準株の性状を示した。表にみられるごとくこれら人体分離株は、*M. fortuitum* 標準株と“*M. runyonii*” 株との中間的性状を示す。しいていえば“*M. runyonii*” に近い性状が多いので、現在のところ *M. fortuitum* subsp. *runyonii* とするのが適当と思われる。

Subspecies *runyonii* を標準株すなわち subspecies *fortuitum* から区別する性状としては次のものがあげられる(表1および2参照)。() 内の数字は、380, 481, 518, 山本, 佐藤, 吉田6株, 西脇, R-1025, R-1277 の

14株を subspecies *runyonii* とした場合に、該当する性状を示す菌株を示す。

- (1) 硝酸還元が弱いか陰性 (11/14)。
- (2) allantoinase を欠如する (14/14)。
- (3) glucose, mannose, trehalose からの酸形成を欠く (8/14)。
- (4) ethanol および propanol をC源として利用しない (9/14)。
- (5) propylene glycol, butylene glycols をC源として利用しない (10/14)。
- (6) glucosamine を同時 NC 源として利用しない (11/14)。また acetamide も利用しない (14/14)。

その他 Bojalil et al. の“*M. runyonii*” 3株は、(i) 集落形態がR型のものがある；(ii) arylsulfatase 3日反応が弱い；(iii) サリチル酸分解が陰性；(iv) NH₂OH, 500 r/ml, 培地に発育しない。

以上にあげた性状は、一つ一つをみれば決して subspecies *runyonii* に特有な性状ではない。いずれの性状も *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* でもみられる。ただ前者では、これらの性状が頻回同時にみられるにすぎない。Bojalil et al.⁷⁾があげた citrate 不利用の性状は、subspecies *fortuitum* でもかなり頻回にみられる性状で、特徴とはいいがたいように思われる。いずれにしても、人体に感染した *M. fortuitum* が定型的な *M. fortuitum* とはかなり異つた性状を有することは確実で、この点にはなほ注目すべきことと思われる。

またいわゆる病原性 rapid growers の特異な性状として、これらが 0.2% sodium p-aminobenzoate を含有する Sauton 培地または Sauton 寒天を黒変することがあげられる。黒変は比較的長期間の培養の後に起こり、1~3週を要する。この性状はいまのところ他の抗酸菌には認められない。

結 論

わが国で分離された病原性 rapidly growing mycobacteria の性状を調べた結果、山本株、佐藤株、吉田株のいずれもが既知 species としての *Mycobacterium fortuitum* の範疇に入るものと認めた。しかしながらこれら菌株は、最近 Bojalil, Cerbón & Trujillo によつて新菌種として提唱された *Mycobacterium runyonii* に類似し、いわば *M. fortuitum* の定型的菌株と *M. runyonii* の中間型で、いずれかといえば *M. runyonii* に近い性状を有するものと認められた。現段階でいわゆる *M. runyonii* を独立の species と認めることは時期尚早と考えられるので、*M. runyonii* と山本株、佐藤株、吉田株および *M. fortuitum* の一部をあわせて subspecies とし、*Mycobacterium fortuitum* subsp. *runyonii* と呼ぶことを提唱した。

M. fortuitum subsp. *runyonii* と *M. fortuitum* subsp. *fortuitum* (定型株) の区別点としては、前者が (1) 硝酸還元が弱い; (2) allantoinase を欠く; (3) glycol, mannose, trehalose からの酸形成を欠く; (4) ethanol, propanol, propylene glycol, butylene glycols をC源として利用しない; (5) glucosamine を同時NC源として利用しない点があげられる。しかしこれら一つ一つは両 subspecies を分ける決め手ではない。被検株がこれらの性状の大部分を示すか示さないかによつてのみ、両者の区別が可能である。

なお山本株, 佐藤株, 吉田株は Sauton 培地または Sauton 寒天に発育するとき, p-aminobenzoate を黒変するという特異な性状を示した。吉田株はわが国における rapid growers 感染症の第3例と考えられる。

文 献

- 1) Cruz, J.C. : Acta med., Rio de Janeiro, 1 : 297, 1938.
- 2) Wells, A. Q., Aguis, E. & Smith, N. : Amer. Rev. Tuberc., 72 : 53, 1955.
- 3) Kushner, D. S., McMillen, S. & Senderi, M. : Amer. Rev. Tuberc., 76 : 108, 1957.
- 4) Dross, I. C., Abbatiello, A. A., Jenny, E. S. & Cohen, A. C. : Amer. Rev. Resp. Dis., 89 : 923, 1964.
- 5) 占部薫・河合恭幸 : 医学と生物学, 44 : 196, 1957.
- 6) 今野淳・大泉耕太郎・岡捨己 : 日本胸部臨床, 23 : 663, 1964.
- 7) Bojalil, L. F., Cerbón, J. & Trujillo, A. : J. Gen. Microbiol., 28 : 333, 1962.
- 8) 東村道雄・束村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核 41 : 395, 1966.
- 9) 中山雍子 : 日本細菌学会総会, 1966年4月.
- 10) Sneath, P. H. A. : Ann. Rev. Microbiol., 18 : 335, 1964.
- 11) Tsukamura, M. : Jap. J. Microbiol., in press.

1) Cruz, J.C. : Acta med., Rio de Janeiro, 1 :