

日本分離の非定植抗酸菌の細菌学的研究
 第8報 Sporadic isolate-scotochromogens の *Mycobacterium*
scrofulaceum (*Mycobacterium aquae*) との同定

東村道雄・東村純雄
 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 42 年 6 月 30 日

BACTERIOLOGICAL STUDIES ON ATYPICAL MYCOBACTERIA
 ISOLATED IN JAPAN*

Report VIII. Identification of Sporadic Isolate-Scotochromogens
 as *Mycobacterium scrofulaceum* (*Mycobacterium aquae*)

Michio TSUKAMURA, Sumio TSUKAMURA, Shoji MIZUNO
 and Haruo TOYAMA

(Received for publication June 30, 1967)

Introduction

In the previous report (Tsukamura et al. : Kekkaku, 41 : 401, 1966), the present writers stated that pathogenic scotochromogens isolated in Japan showed fairly uniform characters and were to be recognized as a species. These pathogenic scotochromogens were shown to be identical as *Mycobacterium scrofulaceum* (Tsukamura et al. : Kekkaku, 42 : 219, 1967). On the other hand, slowly growing scotochromogens occurring in the soil showed similar characters with the pathogenic scotochromogens and were considered to belong to the same species (Tsukamura et al. : Kekkaku, 42 : 15, 1967). These results suggest a hypothesis that the scotochromogens occurring in the soil or water (*M. scrofulaceum*) enter the human body and, if there exist some strains with high virulence among them, they cause an infection in the human, being influenced by the condition of the host. If this hypothesis is correct, it would be expected that sporadic isolates of the scotochromogens occurring in sputa are *M. scrofulaceum* and their virulence is weaker than that of the pathogenic scotochromogens (multiple isolates). The present paper dealt with the characters and virulence of the sporadic isolate-scotochromogens.

Methods

The methods were described previously (Tsukamura et al. : Kekkaku, 41 : 395, 1966). One hundred characters previously described were tested. In addition, ten characters, utilization of ten carbohydrates in the presence of glutamate nitrogen (glucose, fructose, sucrose, acetate, citrate, succinate, malate, pyruvate, malonate and fumarate), were newly added to the 100 characters. Numerical classification was done according to the method previously described (Tsukamura : J. Gen. Microbiol., 45 : 255, 1966). Two schedules were used ; one consisting of

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

the tests of 100 characters and another consisting of the tests of 110 characters (100 characters plus 10 characters of the utilization of ten carbohydrates in the presence of glutamate nitrogen).

Results

Isolation of slow-growing scotochromogens

Sixty-six strains of slow-growing scotochromogens were isolated sporadically from the patients hospitalized in the Chubu Chest Hospital during 4 years (from April 1961 to March 1965). Frequency of isolation was 66/35, 565 cultures (0.186%) (Table 1).

Characters of the sporadic isolate-scotochromogens

Forty-nine of 66 strains were tested for their biological and biochemical characters, and the results obtained are shown in Tables 2 and 3. Characters of *Mycobacterium aquae* also are shown in Table 2.

Numerical classification

The results of the numerical classifications made according to the schedule I (100 characters) and to the schedule II (110 characters) are shown in Fig. 1 and 2. The sporadic isolate-scotochromogens showed S-values of more than 91% to the *M. scrofulaceum* and *M. aquae*, and they formed a compact cluster with these organisms.

Comparison of the virulence for mice between the multiple isolate-, sporadic isolate- and soil isolate-scotochromogens

The results are shown in Table 4. The virulence of the sporadic isolate-scotochromogens is less than the virulence of the multiple isolate-scotochromogens (pathogenic scotochromogens).

Conclusion

Slow-growing scotochromogens isolated from sputa of tuberculous patients as sporadic isolates were identified as *Mycobacterium scrofulaceum*. *Mycobacterium scrofulaceum* and *Mycobacterium aquae* were shown to be identical.

Multiple isolate-scotochromogens (pathogenic scotochromogens), sporadic isolate-scotochromogens and soil isolate-scotochromogens are *M. scrofulaceum* (*M. aquae*). The virulence for mice of the sporadic isolate-scotochromogens was weaker than the virulence of the multiple isolate-scotochromogens.

From the results obtained in the present study and in the previous studies, it is supposed that *M. scrofulaceum* (*M. aquae*) occurring in the soil and water enter the human body as sporadic isolates and, if the strains are virulent, they cause infection in human being influenced also by the host condition.

Runyon¹⁾ の group II scotochromogens に類似する抗酸菌を、健康人の胃液、水、土壌から分離したという報告は多いが²⁻¹⁵⁾、これらはたんに集落形態の類似に基づくもので、細菌学的な検討を経たものではなかつた。われわれは前に土壌分離の slow-growing scotochromogens が人体分離の pathogenic scotochromogens に一致することを報告し¹⁶⁾¹⁷⁾、さらに日本分離の group II scotochromogens (pathogenic scotochromogens) が *Mycobacterium scrofulaceum* Prissick et Masson¹⁸⁾¹⁹⁾

に一致することを認めた²⁰⁾。

以上の所見から、土壌ないし環境中の *M. scrofulaceum* の中の毒力の強いものが、人体の条件とあいまつて感染をひき起こすことが想像された。もし、この仮定が正しければ、人体から sporadic isolates として頻々に分離される scotochromogens も *M. scrofulaceum* に属するはずである。そして土壌、sporadic isolates および病原性を発揮した multiple isolates のいずれもが *M. scrofulaceum* であると証明されれば、pathogenic

scotochromogens の起原を土壌ないし水に求める考えに大きい支持を与えることにならう。本報では、このような意図のもとに sporadic isolate-scotochromogens の細菌学的検討を行なった。

実験方法

菌株。国立療養所中部病院（旧大府荘病棟）に入院中の肺結核患者について、昭和36年4月から昭和40年3月までの間、毎月、結核菌の培養検査を行なったさいに、sporadic isolates として分離された scotochromogens (以下 scoto.) を菌株として保存した。多くは単一集落として分離されたが、2集落以上排泄されたものは、その中の一集落を保存菌株とした。

喀痰の採取にあたっては、滅菌スピッツグラスに喀痰をとらせ、これに等量の5% KOHを加えて37°Cに30分保つて溶解し、その0.02 mlを渦巻白金耳でLöwenstein-Jensen培地(LJ培地)に接種培養した。菌の発育の有無は8週まで観察した。

分離した菌株はLJ培地または1%小川培地に培養した後、これに10% glycerolを重畳し、-20°Cに保存した。

菌の性状の検討は昭和40年4月に開始し、保存菌株から1%小川培地上に継代培養して使用に供した。

使用にさいしては、まず1%小川培地およびSauton寒天培地に培養して、その発育速度を観察するとともに、初発集落および十分発育した集落の菌をとつてZiehl-Neelsen法で染色鏡検し、菌糸が存在しないことおよび抗酸性を確かめた。保存された菌株は計70株であったが、(No. 594株からNo. 663株まで)、うち4株は部分抗酸性で発育初期に菌糸が認められたので除外し、のこりの67株が抗酸菌(*Mycobacterium*)と考えられた。しかし、その中の1株は発育速度が速く、rapid growerに属すると考えられたので、結局、slow-growing scoto.として観察の対象となつたのは66株であった。これら

Table 1. Mode of Excretion of Sporadic Isolates of the Scotochromogens

Number of colonies per culture	Number of cases	Frequency of excretion of scotochromogens	Number of patients
1	54	Once	59
2	7	Twice	2
3~4	2	Three times	1
5~10	1	Total	62
11~20	1		
More than 100	1		
Total	66		

Examination period: From April 1961 to March 1965 (4 years). Frequency (The number of cultures in which the scotochromogens were found/The number of total cultures)=66/35,565=0.186%.

66株のscoto.の分離の状況を表1に示す。分離の頻度は延べ35,565回の培養につき、66回で、その頻度は0.186%となる。

検査方法および毒力の検定法は既報によつた²¹⁾²²⁾。

Numerical classification (数的分類)

数的分類は既報²¹⁾の100性状について行なつたが、さらにこれら100性状に、glutamateをN源としたさいの10種炭水化物の利用の10性状を加えて110性状を用いる方法も併用した。追加の10性状は、glutamateをN源としたときにglucose, fructose, sucrose, acetate, citrate, succinate, malate, pyruvate, malonate, fumarateをC源として発育に利用するか否かの検討で、さきに東村²³⁾が*M. avium*とgroup III nonphotochromogensを区別する方法として発表したものである。

数的分類の方法は既報した²⁴⁾。

実験成績および考察

Sporadic isolate-scotochromogensの性状

3年間に分離したsporadic isolate-scotochromogensの66株の中で、49株について詳細な性状の検討を行なつた。この49株は番号の若い株から49名の患者の株をとつたもので、特別の選択を行なつたものではない。同一患者から2回または3回排泄した例では、最初の排泄の株を検査対象に入れた。

49株の性状を一括して示せば、表2および表3のごとくである。sporadic isolates 49株の性状はきわめてよく類似している。

Small schedule-numerical classification

数的分類の結果を図示すれば、図1および図2のごとくなる。図1は100性状を用いた場合、図2は110性状を用いた場合である。この数的分類には、*M. xenopei*⁽²⁵⁾²⁶⁾、*M. aquae*⁽²⁷⁾²⁸⁾、*M. scrofulaceum*⁽¹⁸⁾¹⁹⁾、*M. aurum*⁽²⁴⁾²⁹⁾を組み入れた。*M. aquae*はDr. R. Bönickeより、*M. xenopei*および*M. scrofulaceum*はDr. E. F. Lessel (ATCC=American Type Culture Collection)より分与された。

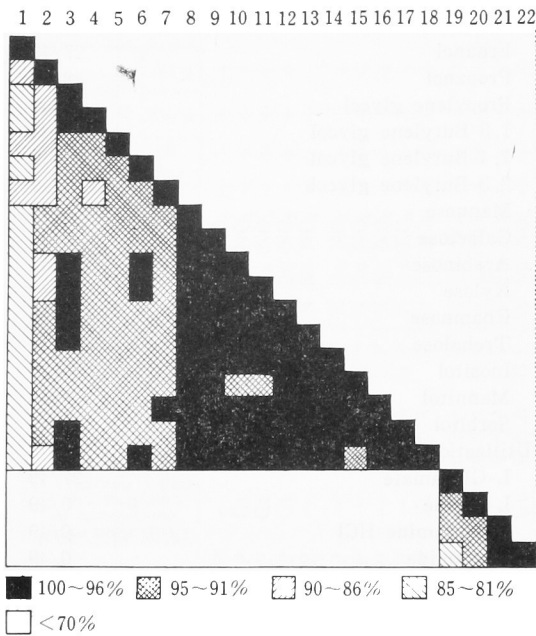
数的分類の結果、sporadic isolate-scotochromogensは、*M. scrofulaceum*および*M. aquae*とともに、S-value 91%以上のcompactなclusterを形成する。とくに*M. scrofulaceum* ATCC 15978との類似性が高い。すなわちsporadic isolatesは*M. scrofulaceum*と同定されるとともに、*M. scrofulaceum*と*M. aquae*とは同一speciesであることが示された。

一群の菌株がspeciesを形成するか否かは、他のspeciesとの比較のうえで決定されるべきで、S-valueが91%以上ということだけでは十分な条件とはいえない。しかし*M. scrofulaceum*の場合、別報のごとく、*M. tuberculosis*および*M. bovis*に対するS-valueは

Table 3. Characters of Sporadic Isolates of the Slow-growing Scotochromogens

Character	Number of strains showing the positive reaction	Character	Number of strains showing the positive reaction
Rough colonial morphology	0/49	Sucrose	0/49
Colonial pigmentation	49/49	Ethanol	27/49
Photochromogenicity	0/49	Propanol	48/49
Growth rate (rapid growth)	0/49	Propylene glycol	0/49
Nitrate reduction	0/49	1,3-Butylene glycol	0/49
3-day-arylsulfatase	0/49	1,4-Butylene glycol	0/49
2-week-arylsulfatase	42/49	2,3-Butylene glycol	0/49
Salicylate degradation	0/49	Mannose	0/49
PAS degradation	0/49	Galactose	0/49
Growth on PAS medium (0.2%)	45/49	Arabinose	0/49
Growth on NH ₂ OH medium		Xylose	0/49
62.5 μ g/ml	49/49	Rhamnose	0/49
125 μ g/ml	49/49	Trehalose	0/49
250 μ g/ml	48/49	Inositol	0/49
500 μ g/ml	34/49	Mannitol	0/49
Growth on 0.1% picric acid	0/49	Sorbitol	0/49
Growth on 0.2% picric acid	0/49	Utilization as N and C sources	
Growth at 28°C	49/49	L-Glutamate	27/49
Growth at 37°C	49/49	L-Serine	0/49
Growth at 45°C	0/49	Glucosamine-HCl	0/49
Growth at 52°C	0/49	Acetamide	0/49
Acetamidase	0/49	Benzamide	0/49
Benzamidase	0/49	Monoethanolamine	0/49
Urease	47/49	Trimethylene diamine	0/49
Isonicotinamidase	0/49	Utilization as N source	
Nicotinamidase	0/49	L-Glutamate	49/49
Pyrazinamidase	0/49	L-Serine	49/49
Salicylamidase	0/49	L-Methionine	4/49
Allantoinase	0/49	Acetamide	48/49
Succinamidase	0/49	Benzamide	1/49
Malonamidase	0/49	Urea	16/49
Utilization as C source		Pyrazinamide	49/49
Acetate	49/49	Isonicotinamide	49/49
Citrate	0/49	Nicotinamide	49/49
Succinate	0/49	Succinamide	49/49
Malate	0/49	Nitrate	49/49
Pyruvate	49/49	Nitrite	0/49
Benzoate	0/49	Niacin	0/49
Malonate	0/49	Growth on TCH medium (10 μ g/ml)	49/49
Fumarate	0/49	Growth on salicylate medium	
Acid formation		0.05% salicylate	49/49
Glucose	0/49	0.1% salicylate	48/49
Mannose	0/49	Utilization as C source in the presence of glutamate nitrogen	
Galactose	0/49	Glucose	44/49
Arabinose	0/49	Fructose	35/49
Xylose	0/49	Sucrose	6/49
Rhamnose	0/49	Acetate	47/49
Trehalose	0/49	Citrate	1/49
Inositol	0/49	Succinate	26/49
Mannitol	0/49	Malate	6/49
Sorbitol	0/49	Pyruvate	46/49
Utilization as C source		Malonate	4/49
Glucose	47/49	Fumarate	3/49
Fructose	4/49		

Fig.1. Diagrammatic Representation of the S-value Table of the Scotochromogenic Mycobacteria, Obtained by Shading the Squares of the S-value between the Strains. Schedule I (100 characters)

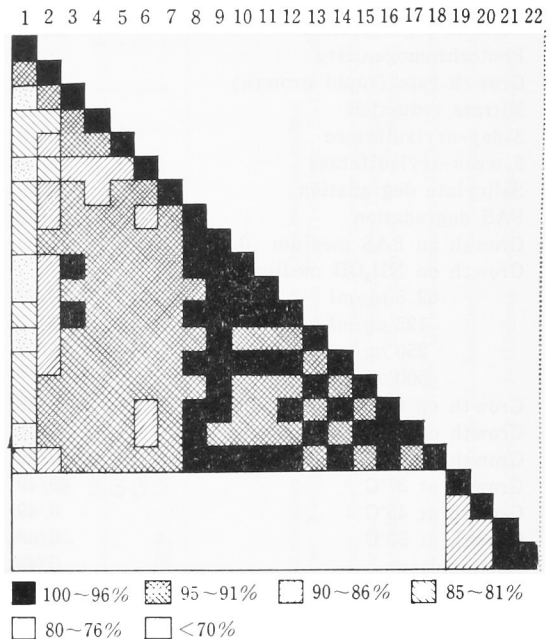


The order of strains is as follows (from the top (left) to the bottom (right)):

(1) *M. xenopei* ATCC 19156; (2) *M. xenopei* ATCC 19276; (3) *M. aquae* SN 601; (4) *M. aquae* SN 645; (5) *M. aquae* SN 651; (6) *M. aquae* SN 703; (7) *M. scrofulaceum* ATCC 19073; (8) *M. scrofulaceum* ATCC 15978; (9) Sporadic isolate No.622; (10) Sporadic isolate No.623; (11) Sporadic isolate No.625; (12) Sporadic isolate No.626; (13) Sporadic isolate No.628; (14) Sporadic isolate No.629; (15) Sporadic isolate No.630; (16) Sporadic isolate No.631; (17) Sporadic isolate No.632; (18) Sporadic isolate No.633; (19) *M. aurum* NCTC 10437; (20) *M. aurum* NCTC 10438; (21) *M. aurum* NCTC 10439; (22) *M. aurum* NCTC 10440.

80% 以下, *M. novum*, *M. kansasii*, *M. marinum* に対する S-value は 85% 以下にとどまるので, これらの species との区別は明らかである。問題になるのは, “*M. avium*-group” を形成する *M. avium*, *M. terrae*, *M. gastri*, *M. intracellulare* (Battley) との区別が必ずしも明らかでないことで, とくに *M. intracellulare* との間で色素形成以外の明確な差があるかどうかが判然としない。*M. scrofulaceum* (*aquae*) と *M. avium* および *M. terrae* との区別については既報した¹⁶⁾。“*M. avium*-group” 内の相互の関係については, これが当面の最大の問題であることにかんがみ, 別の機会に詳述したい。とくに *M. scrofulaceum* (*aquae*) と *M. intracellulare* の関係は近い将来論議の対象となることと思われるが, もし将来, 両者が同一 species と考えられることがあれば, 命名の優先権は *M. scrofulaceum* (*aquae*) にあろう。

Fig.2. Diagrammatic Representation of the S-value Table of the Scotochromogenic Mycobacteria, Obtained by Shading the Squares of the S-value between the Strains. Schedule II (110 characters)



The order of strains is as follows (from the top (left) to the bottom (right)):

(1) *M. xenopei* ATCC 19156; (2) *M. xenopei* ATCC 19276; (3) *M. aquae* SN 601; (4) *M. aquae* SN 645; (5) *M. aquae* SN 651; (6) *M. aquae* SN 703; (7) *M. scrofulaceum* ATCC 19073; (8) *M. scrofulaceum* ATCC 15978; (9) Sporadic isolate No.622; (10) Sporadic isolate No.623; (11) Sporadic isolate No.625; (12) Sporadic isolate No.626; (13) Sporadic isolate No.628; (14) Sporadic isolate No.629; (15) Sporadic isolate No.630; (16) Sporadic isolate No.631; (17) Sporadic isolate No.632; (18) Sporadic isolate No.633; (19) *M. aurum* NCTC 10437; (20) *M. aurum* NCTC 10438; (21) *M. aurum* NCTC 10439; (22) *M. aurum* NCTC 10440.

今回のわれわれの研究では, *M. scrofulaceum* と *M. aquae* とは同一であると示されたが, 問題は pathogenic scotochromogens の species 名として, いずれが優先権があるかということである。Bönicke は, Galli-Valerio²⁷⁾ の記載に優先権を認めて *M. aquae* なる名称を提唱している²⁸⁾。しかし遺憾ながら今日 Galli-Valerio の original strain はなくなっている。Bönicke の私信によれば彼の意見は次のごとくである。“菌株の継代は往々にしてテクニシャンにまかされており, 必ずしも責任ある control をうけているとはいえない。まして 30 年以上前に寄託された菌株の継代には種々の誤りがあつた可能性が多い。したがって今日, Lausanne Collection に存する Galli-Valerio の株が *M. smegmatis* と変わつていても, はじめて scoto. による感染を記載した Galli-Valerio の priority を無視するわけにはいか

Table 4. Comparison of the Virulence for Mice between the Multiple Isolate-, Sporadic Isolate- and Soil Isolate-scotochromogens

	Number of strains tested	Number of strains				
		Grade 0	Grade 1	Grade 2	Grade 3	Grade 4
<i>M. scrofulaceum (aquae)</i>						
Multiple human isolates	9	0	0	4	4	1
Sporadic human isolates #	14	1	11	2	0	0
Soil isolates	7	0	4	2	1	0
<i>M. avium</i>	8	0	0	1	2	5
<i>M. intracellulare*</i>	15	0	5	2	4	4
<i>M. terrae</i> (Tsukamura's)	15	0	7	4	4	0

One milligram of the test organism was inoculated intravenously to ten mice of the CF1 strain weighing 22 to 24 g, and, counting the viable numbers in the spleen and in the lungs as a measure of the virulence, the virulence was grouped into five degrees, grade 4 being the most virulent and grade 0 being defined the less virulent. As to the definition of the virulence and the method, refer Jap. J. Tuberc., 13: 49, 1966.

* Pathogenic nonphotochromogens or Battey organisms (Runyon: Amer. Rev. Resp. Dis., 95: 861, 1967).

ない。”Bönicke の意見にはもつともな点が多いが、今日 Galli-Valerio の原株がないとすれば、*M. scrofulaceum* のほうが有力となるのもやむをえない気がする。われわれは向後 pathogenic scotochromogens を *M. scrofulaceum (aquae)* と記載することにする。

Multiple isolate-scotochromogens, sporadic isolate-scotochromogens および soil isolate-scotochromogens のマウスに対する毒力の比較。

結果を一括すれば表4のごとくで、sporadic isolates の毒力は multiple isolates よりも弱い。この結果は、動物に対する毒力がただちに人体に対する毒力に等しいといえるかどうかという問題はあるにしても、次の示唆を与える。すなわち人体には sporadic isolates としてみられるごとく、*M. scrofulaceum (aquae)* が侵入しているが、その毒力は弱く、感染が成立するにはいたらない。しかしたまたま毒力の強い株があると感染をひき起こすものであろう。感染の成立の条件としては、宿主(人体)の状態もさることながら、菌株自体の毒力が因子となつていることが示唆される。

結 論

Sporadic isolates として喀痰中に見出される slow-growing scotochromogens は、pathogenic scotochromogens すなわち *Mycobacterium scrofulaceum* と一致する。*Mycobacterium scrofulaceum* と *Mycobacterium aquae* とは同一である。

菌株を分与していただいた Dr. R. Bönicke (Forschungsinstitut Borstel, Borstel bei Bad Oldesloe, Deutschland) および Dr. E. F. Lessel (American Type Culture Collection) ならびに Dr. E. H. Runyon (Veterans Administration Hospital, Salt Lake City, Utah) に謝意を表する。

文 献

- 1) Runyon, E. H. : Med. Clin. North Amer., 43 : 273, 1959.
- 2) Runyon, E. H. : Amer. Rev. Resp. Dis., 80 : 277, 1959.
- 3) Edwards, L. B. & Palmer, C. E. Amer. Rev. Resp. Dis., 80 : 747, 1959.
- 4) Atwell, R. J. & Pratt, P. C. Amer. Rev. Resp. Dis., 81 : 888, 1960.
- 5) 占部薫 : 胸部疾患, 3 : 305, 昭 34.
- 6) 齊藤八重 : 原著広島医学, 7 : 2449, 昭 34.
- 7) 神本元一郎 : 原著広島医学, 8 : 3041, 昭 35.
- 8) 神本元一郎 : 原著広島医学, 8 : 3313, 昭 35.
- 9) 神本元一郎 : 原著広島医学, 8 : 3329, 昭 35.
- 10) 岩本敬之・原著広島医学, 8 : 3797, 昭 37.
- 11) 齊藤肇 : 胸部疾患, 7 : 898, 昭 37.
- 12) 戸田忠雄 : 第 16 回日本医学会総合学会術講演集, 2 : 91, 昭 38.
- 13) Kovacs, N. : Zentralbl. Bakt. I Orig., 184 : 46, 1962.
- 14) Kubica, G. P., Beam, R. E. & Palmer, J. W. : Amer. Rev. Resp. Dis., 88 : 713, 1963.
- 15) Chapman, J. S., Bernard, J. S. & Speight, M. : Amer. Rev. Resp. Dis., 91 : 351, 1965.
- 16) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 41 : 401, 昭 41.
- 17) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 42 : 15, 昭 42.
- 18) Prissick, F. H. & Masson, A. M. : Canad. M. A. J., 15 : 798, 1956.
- 19) Prissick, F. H. & Masson, A. M. : Canad. J. Microbiol., 3 : 91, 1957.
- 20) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 42 : 219, 昭 42.
- 21) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 41 : 395, 昭 41.
- 22) Tsukamura, M., Toyama, H. & Tsukamura, S. : Jap. J. Tuberc., 13 : 49, 1966.

- 23) 東村道雄：医学と生物学, 72 : 342, 昭 41.
- 24) Tsukamura, M. : J. Gen. Microbiol., 45 : 253, 1966.
- 25) Schwabacher, H. : J. Hyg., 57 : 57, 1959.
- 26) Beck, A., Keeping, J. A. & Zorab, P. A. : Tubercle, 44 : 378, 1963.
- 27) Galli-Valerio, B. & Bournand, M. Zentralbl. Bakt. I Orig., 101 : 182, 1927.
- 28) Bönicke, R. : Bull. Union Internat. Tuberc., 32 : 13, 1962.
- 29) 東村道雄・東村純雄：医学と生物学, 72 : 270, 昭 41.