

ナイアシン・テスト陽性の劣性発育抗酸菌
二宮 S₁ 株に関する知見補遺

占部 薫・齋藤 肇・藤原 誠

広島大学医学部細菌学教室

受付 昭和 43 年 5 月 30 日

FURTHER STUDIES ON THE MYCOBACTERIUM, STRAIN
NINOMIYA S₁, SHOWING A POSITIVE NIACIN
TEST AND DYSGONIC GROWTH*

Kaoru URABE, Hajime SAITO and Makoto FUJIWARA

(Received for publication May 30, 1968)

In order to identify the Ninomiya S₁ strain of a mycobacterium associated with pulmonary disease in man (Urabe and Kawai, 1957), various biological and biochemical characteristics were investigated.

The cultures used in this study were Ninomiya S₁ strain, and H₃₇Rv strain of *Mycobacterium tuberculosis*, Ravenel strain of *M. bovis*, Kirchberg strain of *M. avium* and Okayama strain of *M. intracellulare* as the control.

The Ninomiya S₁ strain showed the following characteristics: Colonies on 1% Ogawa egg medium and 7H₁₀ medium were nonphotochromogenic, small, flat, thin and smooth in appearance, but not easily emulsifiable (Sr-type). In Kirchner's liquid medium, the growth remained on the bottom of the test tube and pellicles were not formed after six weeks' incubation at 37°C. The growth in Tween-albumin broth was to some extent better than that in Kirchner's liquid medium.

The organism gave a positive cord formation and neutral red test. Growth was observed at 33°C and 37°C, and not at 22°C and 42°C. The organism was susceptible to 125 mcg per ml of hydroxylamine, 1 per cent of sodium desoxycholate and 0.1 M of sodium nitrite, whereas resistant to 62.5 mcg per ml of hydroxylamine, 0.05 per cent of pyronin, 0.5 per cent of sodium desoxycholate, 10 mcg per ml of TCH and 1,000 mcg of PAS. PAS was not decomposed.

The organism gave a positive niacin test, a positive nitrate reductase, a weakly positive semiquantitative catalase, a negative 68°C heat stable catalase, a negative acid phosphatase and a negative 70°C heat stable acid phosphatase. None of three-day, 2-week and 3-week arylsulfate tests were positive. The amidase was positive for urease and nicotinamidase, while negative for acetamidase, benzamidase, isonicotinamidase, pyrazinamidase, salicylamidase, allantoinase, succinamidase, malonamidase, acrylamidase and propionamidase. Of 16 carbohydrates, only trehalose was decomposed. Of 10 organic acid salts, sodium (sod.) acetate, sod. pyruvate, sod. propionate, and sod. lactate were utilized.

The Ninomiya S₁ strain is differentiated from *M. avium* and Battey bacillus in respect of cord formation, neutral red test, growth temperature, susceptibility to hydroxylamine and sod.

* From Department of Bacteriology, Hiroshima University School of Medicine, Hiroshima, Japan.

desoxycholate, and 68°C heat stable catalase.

Also, the organism is differentiated from *M. bovis* in a positive niacin test, growth on 10 mcg TCH medium, a positive nicotinamidase and a negative arylsulfatase.

When the present results on 67 characters studied were analyzed according to the method proposed by Sneath, similarity values of the Ninomiya S₁ strain with *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium* and Battey bacillus were 90%, 58%, 45% and 31%, respectively.

These findings mentioned above would support that the Ninomiya S₁ strain might be a human type of mycobacteria. Moreover, considering from a standpoint of its colonial morphology and growth characteristics, the Ninomiya S₁ strain was likely to be a variant of *M. tuberculosis*.

緒 言

占部・河合¹⁾ および河合²⁾ により臨床上およびX線所見上肺結核が疑われたヒトの喀痰から分離された抗酸菌二宮 S₁ 株の所属に関してはいまだ異論のあるところであり、いわゆる非定型抗酸菌とするもの¹⁾²⁾ と結核菌の変異株とするもの³⁾ とがある。

先に、占部・斎藤⁴⁾ は本菌株の所属を明らかにしようとしてその生物学および生化学的諸性状ならびに実

験動物に対する病原性を追究したところ、2, 3の培地における発育がヒト型結核菌のそれとかなり趣を異にする点を除いてはこれと極めて近似した諸性状を示したことについて報告したが、いまだその所属を明らかにするには至らなかった。

そこで、今回は前回の報告におけるよりも更に検査性状をふやして追究するとともに、対照として代表的な白色系遅育抗酸菌数株をも供試してそれら菌株との間の性状の近似性を Sneath の Adanson 分類法⁵⁾ によつて検

Table 1. Biological Characteristics

Characters		Cultures					
		Ninomiya S ₁	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	<i>M. bovis</i> Ravenel	<i>M. avium</i> Kirchberg	Battey bacillus Okayama	
Cord formation		+	+	+	-	-	
Neutral red test		+	-(+)*	+	-	-	
Growth temperature (°C)	22	-	-	-	+	+	
	33	+	+	+	+	+	
	37	+	+	+	+	+	
	42	-	-	-	+	+	
	45	-	-	-	-	-	
Sensitivity to various drugs	Hydroxylamine (mcg/ml)	62.5	+	+	+	+	+
		125	-	-	+	+	+
		250	-	-	-	+	+
		500	-	-	-	+	+
	Pyronin (%)	0.03	+	+	+	+	-
		0.05	+	+	+	+	-
	Sod. desoxycholate (%)	0.5	+	+	-	+	+
		1.0	-	-	-	+	+
	Sod. nitrite (M)	0.1	-	-	-	-	-
		0.15	-	-	-	-	-
	TCH (10 mcg/ml)		+	+	-	+	+
	PAS (1,000 mcg/ml)	Growth	-	-	-	-	+
		Degradation	-	-	-	-	-

* The neutral red test of H₃₇Rv strain received from Dr. Michio Tsukamura, Chubu-Byoin National Sanatorium, was negative, while the stock culture in our laboratory was positive for this test.

討したので以下報告する。

1. 供試菌

喀痰系二宮 S₁ 株¹⁾²⁾のほかに、対照としてヒト型結核菌 H₃₇Rv 株、ウシ型結核菌 Ravenel 株、トリ型菌 Kirchberg 株および Battey 菌岡山株を供試した。

2. 各種培地における発育状態

二宮 S₁ 株は1%小川培地上で発育は極めて緩徐であり発生集落は微小、扁平で nonphotochromogenic であり、菌苔は培地地面にごく薄く発育するにとどまり、一見 S 型に見えるがスライド上では均等菌液化しにくい (S_R 型)。7H10 培地上では1%小川培地上におけると近似の集落性状を示したが、多少とも R 型の度が強かった。10% ウシ血清加 Kirchner 培液中では 37°C、6 週後に至るもなお管底発育にとどまり、菌膜の形成は全くみられず、この点ヒト型菌と甚しく趣きを異にした。なお Dubos 培液中における発育は Kirchner 培液中におけるよりも多少とも良好のようであった。

3. 生物学的性状

これは一括して表 1 に示した。

1) コード形成性：Kirchner 培液培養 7 日菌について

て検討したところ、菌塊はなお小さかつたが、定型的なコード形成がみられた。

2) 中性紅反応 (小酒井らの方法⁶⁾)：陽性。

3) 発育可能温度域：Dubos 培液培養 10 日菌の 1 白金耳量を 1% 小川培地上に塗抹し、4 週後に判定したところ、22°C および 42°C では発育不能であつたが、33°C および 37°C では可能であつた。

4) 各種薬剤に対する抵抗性：Dubos 培液培養 10 日菌の 1 白金耳量を下記の各種薬剤含有 1% 小川培地ならびに非含有同種対照培地上に塗抹し、37°C、4 週間後に成績を読みとつた。

① ヒドロキシルアミン：塩酸ヒドロキシルアミンの 62.5, 125, 250 および 500 mcg/ml 各含有培地上での発育は 62.5 mcg/ml においてのみ陽性であつた。

② ピロニン：0.03 および 0.05% 各含有培地上での発育陽性。

③ デゾキシコール酸ソーダ：デゾキシコール酸ソーダの 0.5% 含有培地上での発育は陽性であつたが、1.0% 含有培地上での発育は陰性であつた。

④ 亜硝酸ソーダ：0.1 および 0.15 M 各含有培地上での発育陰性。

⑤ TCH：Thiophen-2-carbonic acid hydrazide 10 mcg/ml 含有培地上での発育陽性。

Table 2. Biochemical Characteristics

Characters	Cultures				
	Ninomiya S ₁	<i>M. tuberculosis</i> H ₃₇ Rv	<i>M. bovis</i> Ravenel	<i>M. avium</i> Kirchberg	Battey bacillus Okayama
Niacin test	+	+	-	-	-
Nitrate reductase	+	+	+	-	-
Semiquantitative catalase (mm)	+(2)	+(17)	+(8)	+(10)	+(4)
68°C heat stable catalase	-	-	-	+	+
Acid phosphatase	-	-	-	+	+
70°C heat stable acid phosphatase	-	-	-	-	-
3-day arylsulfatase test	-	-	-	-	-
2-week arylsulfatase test	-	-	+	-	+
3-week arylsulfatase test	-	-	+	-	+
Amidases	Acetamidase	-	-	-	-
	Benzamidase	-	-	-	-
	Urease	+	+	-	-
	Isonicotinamidase	-	-	-	-
	Nicotinamidase	+	+	-	+
	Pyrazinamidase	-	-	-	+
	Salicylamidase	-	-	-	-
	Allantoinase	-	-	-	-
	Succinamidase	-	-	-	-
	Malonamidase	-	-	-	-
	Acrylamidase	-	-	-	-
Propionamidase	-	-	-	-	

⑥ PAS : 1,000 mcg/ml 含有培地上での発育ならびに培地の黒変陰性。

4. 生化学的性状

これは一括して表 2 に示した。

1) ナイアシン・テスト (今野の方法⁷⁾) : アニリンブROOMシアン法およびベンジジブROOMシアン法のいずれによつても陽性であつた。

2) 硝酸塩還元作用 (Virtanen の方法⁸⁾) : 1% 小川培地培養 14 日菌について検討したところ陽性であつた。

3) カタレース (Wayne の方法⁹⁾) : 1% 小川高層培地上 14 日培養菌について 4 回各 3 本宛を供試して行なつたところ、泡沫の高さの平均はわずかに 2 mm であり、極めて弱いカタレース活性しか示さなかつた。

4) 68°C 耐熱性カタレース (Kubica らの方法¹⁰⁾) : 1% 小川培地培養 14 日菌について検討したところ陰性であつた。

5) 酸性フォスファテース (占部らの方法¹¹⁾) 陰性。

6) 70°C 耐熱性酸性フォスファテース (斎藤らの方法¹²⁾) : 陰性

7) アリルサルファテース : Tripotassium phenolphthalein disulfate の 0.001 M (3 日法) および 0.003 M (2 週間法および 3 週間法) 各含有 Dubos 液体培地“栄研”の 3 ml に Dubos 培液中 10 日培養菌の 0.3 ml を移植し、3 日、2 週間および 3 週間後に 2M Na₂CO₃ 0.2 ml を添加して遊離フェノールフタレインの検出を行なつたがいずれも陰性であつた。

8) アミデース (北村の方法¹³⁾) : 7 H 10 培地上 3 週

間培養菌についてアセトアミデースほか計 11 種のアミデースを検討したところ、ユリエースおよびニコチンアミデースが陽性であつた。

9) 含水炭素分解能 (表 3 参照) : グルコースほか 15 種の含水炭素分解能を Gordon ら¹⁴⁾にならつて調製した Ayar らの変法培地を用いて 4 週間に亘り観察したところ、トレハロースからのみ酸産生がみられた。

10) 有機酸利用能 (表 4 参照) : 酢酸ソーダほか 9 種の有機酸利用能を Gordon ら¹⁴⁾による Koser 変法培地を用いて 4 週間に亘り観察したところ、酢酸ソーダ、焦性ブドウ酸ソーダ、プロピオン酸ソーダおよび乳酸ソーダの利用がみられた。

4. 二宮 S₁ 株と供試対照菌株との間の Similarity value

上述の計 67 項目に亘る生物学的ならびに生化学的検査性状について、二宮 S₁ 株と対照供試菌株との間の Similarity value を Sneath の Adanson 分類法⁵⁾で求めたところ、ヒト型菌 H₃₇Rv 株とは 90%、ウシ型菌 Ravenel 株とは 58%、トリ型菌 Kirchberg 株とは 45%、また Battey 菌岡山株とは 31% であつた。したがつて、二宮 S₁ 株には、H₃₇Rv 株との間に最も高い近似性のあることが分かつた。

総括ならびに考案

占部・河合¹⁾ および河合²⁾ は結核症の疑われていた患者の喀痰より分離された白色系抗酸菌株二宮 S₁ 株は抗煮沸性、中性紅反応、一次抗結核剤に対する感受性ならびにマウスに対する毒力などの諸点においてはヒト型結核菌とほとんど違ふところがなかつたが、他方その集落は S 型で、コード形成性は弱く、かなり強盛なカタレース活性を有し、低温 (24°C) 環境にも発育可能であつたこと、さらにモルモットに対しても極めて微弱な病原性しか示さなかつたことなどよりしていわゆる非定型抗酸

Table 3. Acid Formation from Carbohydrates

Cultures	Nino-miya S ₁	M. tuberculosis H ₃₇ Rv	M. bovis Ravenel	M. avium Kirchberg	Battey bacillus Okayama
Glucose	-	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Fructose	-	-	-	+	+
Mannose	-	-	+	-	+
Galactose	-	-	-	-	+
Xylose	-	-	-	-	-
Arabinose	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-
Raffinose	-	-	-	-	-
Maltose	-	-	-	-	-
Inocitol	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-

Table 4. Utilization of Organic Acids

Cultures	Nino-miya S ₁	M. tuberculosis H ₃₇ Rv	M. bovis Ravenel	M. avium Kirchberg	Battey bacillus Okayama
Sod. acetate	+	+	+	+	+
Sod. pyruvate	+	+	+	+	+
Sod. propionate	+	+	+	+	+
Sod. lactate	+	+	+	+	+
Sod. fumarate	-	-	-	+	+
Sod. citrate	-	-	-	-	-
Sod. tartrate	-	-	-	-	-
Sod. oxalate	-	-	-	-	-
Sod. benzoate	-	-	-	-	-
Sod. succinate	-	-	-	-	-

菌所属の1菌株として報告している。これに対して松村³⁾は本菌株は一次抗結核剤およびネオテトラゾリウムに対して感受性であり、またモルモットに対してもかなりの毒力を示したことで定型的なヒト型菌と区別できなかったが、集落性状においてはヒト型菌とは明らかに異なることより結核菌の変異株と考えられると述べている。

ところで、これらの報告における二宮 S_1 株の分類ないし同定に用いられた検査性状はいまだ十分とはいえないところから、その後占部・斎藤⁴⁾はさらに詳細な検討を試みたところ、卵培地上における発育は極めて劣性であり、また Kirchner Sy-Ser 中では管底発育にとどまり菌膜の形成がみられなかつた点は人型菌と趣を異にしたが、コード形成性、中性紅反応およびナイアシン・テスト陽性という点ではヒト型菌を疑わせる性状を検知したものの未だその所属を明らかにするには至らなかつた。

そこで今回は前回の報告におけるよりもさらに検査性状をふやして検討するとともに、対照菌株としてヒト型菌 $H_{97}Rv$ 株、ウシ型菌 Ravenel 株、トリ型菌 Kirchnberg 株および Battey 菌岡山株をも供試して二宮 S_1 株とこれらの菌株との間の性状の近似性を Sneath の Adanson 分類法⁵⁾によつて検討したのでその成績について若干の考察を加えてみたい。

まず二宮 S_1 株がトリ型菌や Battey 菌に所属する菌株でないことはそのコード形成性および中性紅反応陽性、22°C および 42°C で発育不能、125 mcg ヒドロキシルアミンおよび1%デゾキシコール酸ソーダに感受性、ナイアシン・テスト、硝酸塩還元作用およびユリエース陽性、68°C 耐熱性カタラーゼおよび酸性フォスファターゼ陰性ならびにグルコース分解能陰性であつたのに対してトリ型菌 Kirchnberg 株および Battey 菌岡山株ではその逆であり、67項目の検査性状についての Kirchnberg 株および岡山株の二宮 S_1 株との間の Similarity value はそれぞれ45%および31%と極めて低かつたことから明らかなところであろう。さらに二宮 S_1 株がニワトリおよびウサギに対して極めて弱い毒力しか示さなかつたという占部・斎藤⁴⁾の報告もまた本菌がトリ型菌でないことを示唆する有力な所見といえよう。

次に哺乳動物結核菌との異同性についてみると、二宮 S_1 株は1%小川培地上における集落性状が S_R 型であり、かつすでに十数年のながきに亘つて同種培地上に継代培養されてきたにもかかわらずその発育は著しく劣性であり、また Kirchner Sy-Ser においても管底発育にとどまり菌膜の形成が全くみられなかつたことは定型的なヒト型菌およびウシ型菌とは著しく趣を異にするところである。しかしながら他方、二宮 S_1 株はコード形成性および中性紅反応がともに陽性、22°C で発育不能、

250mcgヒドロキシルアミンおよび1%デゾキシコール酸ソーダとともに感受性ならびに68°C耐熱性カタラーゼ陰性であつたことは哺乳動物結核菌であろうことを疑わしめる所見であり、かつナイアシン・テスト陽性、10mcg TCH 培地上での発育可能、ニコチンアミデース陽性ならびにアリルサルファテース3週間法陰性であつたことによりウシ型菌との鑑別が可能であつたことなどを勧察するとき、二宮 S_1 株は人型菌の1変異株と考えて大過ないのではなからうか。ちなみにヒト型菌 $H_{97}Rv$ 株およびウシ型菌 Ravenel 株の二宮 S_1 株との Similarity value はそれぞれ90%および58%であつた。

ついでながら教室保存のウシ型菌 Ravenel 株は硝酸塩還元作用陽性およびユリエース陰性である点において定型的なウシ型菌とはいいがたいことも明らかにしえた。

なお氏家¹⁰⁾は小川培地上の集落が小さくて扁平、かつ発育不良で二宮 S_1 株に近似する8菌株について報告し、これらはヒト型結核菌のように思われると述べているが、今後このような菌株の本態ないし起源についてはさらに検討を要するものと思われる。

結 語

肺結核様疾患患者の喀痰から分離され、非定型抗酸菌の疑われた二宮 S_1 株はその諸種生物学的ならびに生化学的性状において一応ヒト型結核菌と最も近似することが明らかにされたが、その発育性状がヒト型菌のそれと、著しく趣を異にするところからすると、あるいはいまだその報告をみないところのヒト型菌の1変異株であるのかもしれない。

主 要 文 献

- 1) 占部薫・河合恭幸 医学と生物学, 44: 196, 昭32.
- 2) 河合恭幸: 原著広島医学, 6: 1415, 昭33.
- 3) 松村寿夫: 医学研究, 31: 229, 昭36.
- 4) 占部薫・斎藤肇・合田忠: 日本細菌学雑誌, 21: 70, 昭41.
- 5) Sneath, P. H. A.: J. gen. Microbiol., 17: 201, 1957.
- 6) 小酒井望・深沢義明: 結核の臨床, 2: 796, 昭29.
- 7) 今野淳: 日本臨床, 20: 1736, 昭37.
- 8) Virtanen, S.: Acta Tuberc. Scand., Suppl. 48: 1, 1960.
- 9) Wayne, L. G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 86: 651, 1962.
- 10) Kubica, G. P. and Pool, G. L.: Amer. Rev. Resp. Dis., 81: 387, 1960.
- 11) 占部薫・斎藤肇・田坂博信・松林昭春: 医学と生物学, 72: 127, 昭41.
- 12) 斎藤肇・細川英昭・田坂博信: 日本細菌学雑誌: 22, 519, 昭42.

- 13) 北村達明：胸部疾患，5：227，昭 36.
- 14) Gordon, R. E. and Smith, M. M.. J. Bact., 66 :
41, 1953.
- 15) 氏家淳雄・根元儀一・木下喜親：結核，39：374，
昭 39.