

Subgroup "V" 抗酸菌の分類学的研究

東村道雄・水野松司

国立療養所中部病院

受付 昭和43年10月26日

TAXONOMY OF SUBGROUP "V" OF THE GROUP III
NONPHOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIA*

Michio TSUKAMURA and Shoji MIZUNO

(Received for publication October 26, 1968)

Twenty-two strains of Subgroup "V" of the Group III nonphotochromogens, received from Dr. G. P. Kubica, Gerogia, U. S. A., were tested on 97 characters.

Frequency of positive characters in the strains and "Hypothetical Mean Organism" (HMO)¹¹⁾ prepared from the results of the tests are shown in Table 1.

In comparison of this HMO of the V-subgroup with the HMO of various other mycobacterial species, the HMO of the V-subgroup showed the highest S-value (92%) with the HMO of *M. nonchromogenicum*⁸⁾. When a permissible low limit of the mean intraspecies S-value for the membership of each species to its own HMO was calculated as a range of S-values more than the value {(mean intraspecies S-value) - 2 × (standard deviation)} (this range contains theoretically 95% of the membership), the S-value for the HMO of the V-subgroup to the HMO of *M. nonchromogenicum*, 92%, was inside the permissible low limit for the species *M. nonchromogenicum*, 91%. On the other hand, the S-values for the V-subgroup to the other HMOs were outside the permissible low limit of the other species (Table 2). Thus, the V-subgroup was identified as *M. nonchromogenicum*.

Although some minor differences were observed between *M. nonchromogenicum* and the V-subgroup, these two organisms showed similar features in the majority of the characters tested, including resistance to ethambutol and tolerance to sodium nitrite that were newly added to the 97 characters previously studied (Table 3).

In view of the above results, the V-subgroup is considered to be a variety of *M. nonchromogenicum*.

The method shown in this study makes possible an automatic identification ("numerical identification"). Application of this method using HMOs is recommended as a method of identification.

緒言

いわゆる "atypical mycobacteria" は Runyon¹⁾ によつて 4 群 (Group I-IV) に分けられている。Group I は *M. kansasii* および *M. marinum* よりなり、Group IV

は今のところ *M. fortuitum* (および *M. abscessus*) よりなるとされている。Group II および Group III の分類学はなお研究続行の段階にあるが、漸次その様相が明らかにされつつある^{2)~7)}。Group III の subgroups の一つに subgroup "V" (以下 "V" 亜群) と名づけられる群

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-Prefecture 474 Japan.

がある。この群は、Communicable Disease Center (CDC) の Kubica など^(6,7) によつて研究報告された。彼らは、“V” 亜群が従来記載されたいずれの菌種とも異なると主張しつつも^(6,7)、さりとて、これを新菌種として命名することをちゆうちよしている。この原因の一つはおそらく次の点にあると思われる。東村⁽⁸⁾ は先に土壌から分離した1群の nonphotochromogenic mycobacteria を新菌種として報告し、これを *M. nonchromogenicum* と命名した。その後、この菌が土壌に常在するところから、これを *M. terrae* と改めたが⁽⁹⁾、この改名が承認される前に、Wayne⁽³⁾ が喀痰から分離された菌群に *M. terrae* と命名したので、一時混乱が起こつた。したがつて我々の菌の名をもとの *M. nonchromogenicum* とすることとした。その後の研究によれば、我々の *M. nonchromogenicum* と Wayne の *M. terrae* は同一であることが判明したので、この菌群の呼称としては、*M. nonchromogenicum* が採用されるべきと思われる。さて我々が *M. nonchromogenicum* (= *M. terrae*) を発表した直後 Dr. Kubica の“V” 亜群と我々の菌とが類似しているとの Dr. Wayne の私信を受けた。そのため、

Dr. Kubica と菌株の交換を行なつて検討した結果、この両者が近似していることを認め、Dr. Kubica に私信で所見を報告した。

本報では、“V” 亜群に関する研究成績を述べて、“V” 亜群についての我々の考えを述べたい。

研究方法

菌株は CDC の Dr. G. P. Kubica から 1966 年 10 月に受領した 22 株で次のごとくである。

Alb-2386, DT-67-4, C-1614, C-5181 (= ATCC 19386), T-20-5, T-39-4, T-40-4, T-75-4, T-80-4, T-81-4, T-240-4, T-248-1, T-254-3 (= ATCC 19387), T-255-3, T-319-3, T-340-3, T-435-5, T-452-4, WX-2191, WX-2199, WX-2336, WX-2938 (いずれも Dr. Kubica の命名のまま)。

検査方法は既報⁽⁸⁾によつた。検査項目は 97 性状である。今回は、これに次の4項目を加えた(事実上2性状)。これらは最近 Group II および Group III の subgroups の区分に有効と思われたものである。すなわち、(1) ethambutol (EB) 2.5 μg/ml 耐性、(2) EB 5.0 μg/ml

Table 1. Frequency of Positive Characters and “Hypothetical Mean Organism” (HMO) of the “V”-subgroup (Part 1)

Character	Frequency	HMO	Character	Frequency	HMO
Gram stain	22/22	+	Acetamidase	0/22	-
Acid-fastness	22/22	+	Benzamidase	0/22	-
Rod shape	22/22	+	Urease	2/22	-
Compact grouping	22/22	+	Isonicotinamidase	0/22	-
Colony morphology R	22/22	+	Nicotinamidase	0/22	-
Colony pigmentation	0/22	-	Pyrazinamidase	0/22	-
Photochromogenicity	0/22	-	Salicylamidase	0/22	-
Rapid growth	0/22	-	Allantoinase	0/22	-
Catalase	22/22	+	Succinamidase	0/22	-
Nitrate reduction	(20/22)	(+)	Malonamidase	0/22	-
3-day arylsulfatase	9/22	+	Acetate as C source	18/22	+
2-week arylsulfatase	22/22	+	Citrate as C source	0/22	-
Salicylate degradation	0/22	-	Succinate as C source	0/22	-
PAS degradation	0/22	-	Malate as C source	0/22	-
PAS (0.2%) resistance	22/22	+	Pyruvate as C source	20/22	+
Growth on NH ₂ OH (62.5)*	22/22	+	Benzoate as C source	0/22	-
Growth on NH ₂ OH (125)*	22/22	+	Malonate as C source	0/22	-
Growth on NH ₂ OH (250)*	22/22	+	Fumarate as C source	0/22	-
Growth on NH ₂ OH (500)*	21/22	+	Acid from glucose	0/22	-
0.1% picric acid tolerance	6/22	-	Acid from mannose	0/22	-
0.2% picric acid tolerance	0/22	-	Acid from galactose	0/22	-
Growth at 28°C	22/22	+	Acid from arabinose	0/22	-
Growth at 37°C	22/22	+	Acid from xylose	0/22	-
Growth at 45°C	0/22	-	Acid from rhamnose	0/22	-
Growth at 52°C	0/22	-	Acid from trehalose	0/22	-

* μg/ml (Ogawa egg medium) (): Weakly positive

ml 耐性, (3) NaNO₂ 0.1% 耐性, (4) NaNO₂ 0.2% 耐性の4つである。前2者は1%小川培地で、後2者は Sauton 寒天培地で検査した。検査は、上記の培地および薬剤を含まない対照培地(1%小川培地および Sauton 寒天培地)に被検株を1白金耳塗抹接種して37°Cに3週(1%小川培地)または4週(Sauton 寒天培地)培養後に、対照と発育を比較した。対照は融合発育を示すので、被検培地に分離集落が100以下認められる程度のもは(一)と判定した。接種に際しては、被検株に白金耳を軽くふれた後に新鮮培地に塗抹することが重要である。この方法は、定量的接種法とほとんど差がない結果を与える。

菌株と菌株との S-value は、{(同一記号を示す性状数) ÷ (全性状数)} × 100% で表した。

Species の性状は、Liston, Wiebe & Colwell¹⁰⁾ の "Hypothetical Median Organism" を Modify した "Hypothetical Mean Organism" (HMO)¹¹⁾ で表した。HMO と HMO との比較も、菌株の場合と同様にして S-value を計算した。

成績および考察

1. "V" 亜群の "Hypothetical Mean Organism"

Table 1. Frequency of Positive Characters and "Hypothetical Mean Organism" (HMO) of the "V"-subgroup (Part 2)

Character	Frequency	HMO	Character	Frequency	HMO
Acid from raffinose	0/22	-	L-Glutamate as N and C	0/22	-
Acid from inositol	0/22	-	L-Serine as N and C	0/22	-
Acid from mannitol	0/22	-	Glucosamine as N & C	0/22	-
Acid from sorbitol	0/22	-	Acetamide as N & C	0/22	-
Glycerol as C source	22/22	+	Benzamide as N & C	0/22	-
Glucose as C source	0/22	-	Monoethanolamine as N & C	0/22	-
Mannose as C source	0/22	-	Trimethylene diamine as N & C	0/22	-
Galactose as C source	0/22	-	L-Glutamate as N source	22/22	+
Arabinose as C source	0/22	-	L-Serine as N source	9/22	+
Xylose as C source	0/22	-	L-Methionine as N source	0/22	-
Rhamnose as C source	0/22	-	Acetamide as N source	1/22	-
Trehalose as C source	0/22	-	Benzamide as N source	0/22	-
Raffinose as C source	0/22	-	Urea as N source	21/22	+
Inositol as C source	0/22	-	Pyrazinamide as N source	2/22	-
Mannitol as C source	0/22	-	Isonicotinamide as N	2/22	-
Sorbitol as C source	0/22	-	Nicotinamide as N source	0/22	-
Fructose as C source	0/22	-	Succinamide as N source	4/22	-
Sucrose as C source	0/22	-	Nitrate as N source	0/22	-
Ethanol as C source	0/22	-	Nitrite as N source	0/22	-
Propanol as C source	1/22	-	Niacin	0/22	-
Propylene glycol as C	0/22	-	Growth on TCH medium	22/22	+
1,3-Butylene glycol as C	0/22	-	Growth on salicylate (500)*	22/22	+
1,4-Butylene glycol as C	0/22	-	Growth on salicylate (1,000)*	22/22	+
2,3-Butylene glycol as C	0/22	-			

* μg/ml (Ogawa egg medium)

"V" 亜群 22 株の検査性状の陽性頻度と HMO を表 1 に示す。1 株当りの陽性性状の頻度は 24.4 ± 1.29 (平均値および標準偏差) で、はじめ 24 性状で HMO を構成しようとしたが、高頻度のものから順次性状を選んで 23 に達すると、次には頻度 9/22 のものが 2 性状となった (3 day-arylsulfatase と N 源としての serine 利用)。これを入れると性状数は 25 となり、除けば 23 となるが、25 の方が平均値 24.4 に近いので 25 をとつた。したがって HMO は頻度 9/22 以上の 25 性状をとつて構成した。Liston, Wiebe & Colwell¹⁰⁾ の Hypothetical Median Organism は、頻度 50% 以上の性状をとるので、この "V" 亜群の場合、性状数 23 となる。

2. "V" 亜群の HMO と他の抗酸菌種の HMO との比較

"V" 亜群の HMO と他の抗酸菌 species の HMO との S-value を計算すると表 2 のごとくなる。すなわち *M. nonchromogenicum* の HMO に対する S-value が 92% で最も高い。

種々の抗酸菌 species の mean intraspecies S-value およびその標準偏差は既に計算されているので¹¹⁾、その {(平均値) ± 2 × (標準偏差)} の領域には、その species の菌株の 95% が含まれるはずである。これは実際に測

Table 2. Comparison of the HMO of the "V"-subgroup with the HMO of Various Mycobacterial Species

HMO	Permissible low limit of species*	S-value to the HMO of the "V" subgroup	HMO	Permissible low limit of species*	S-value to the HMO of the "V" subgroup
<i>M. bovis</i>	97%	82%	<i>M. marinum</i>	86%	81%
<i>M. tuberculosis</i> (wild)	96	83	<i>M. thermoresistibile</i>	88	75
<i>M. tuberculosis</i> (laboratory)	100	82	<i>M. chitae</i>	94	75
<i>M. novum</i>	97	90	<i>M. borstelense</i>	89	80
<i>M. kansasii</i>	93	86	<i>M. abscessus</i>	86	79
<i>M. avium</i>	90	90	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>thermophilum</i>	91	65
<i>M. nonchromogenicum</i>	91	92	<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	83	61
<i>M. gastri</i>	91	87	<i>M. phlei</i>	89	58
<i>M. intracellulare</i>	88	88	<i>M. aurum</i>	84	52
<i>M. scrofulaceum</i> (soil isolates)	94	89	<i>M. parafortuitum</i>	80	52
<i>M. scrofulaceum</i> (multiple human isolates)	91	89	<i>M. lacticola</i>	93	44
<i>M. scrofulaceum</i> (sporadic human isolates)	95	81	<i>M. smegmatis</i>	93	35

* $\{(\text{Mean intraspecies S-value}) - 2 \times (\text{standard deviation})\} \%$

Table 3. Comparison of Characters among Subgroups of Group II and Group III Mycobacteria

Character	Subgroup	Percentage of strains showing a positive character										
		<i>M. avium</i>	<i>M. nonchromogenicum</i>	<i>M. gastri</i>	<i>M. xenopet</i>	<i>M. paraffinicum</i>	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i> (M)	<i>M. scrofulaceum</i> (Sp)	<i>M. scrofulaceum</i> (So)	<i>M. broncae</i>	"V" subgroup
No. of strains tested		26	93	8	4	2	76	26	49	10	3	22
Growth at 28°C*		85	100	100	25	0	97	100	100	100	0	100
Growth at 37°C*		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Growth at 45°C*		77	0	0	100	0	42	8	0	0	100	0
Two-week-arylsulfatase		4	80	100	100	0	71	92	86	90	100	100
Colony pigmentation**		0	0	0	75	100	0	100	100	100	0	0
Growth on 0.5 mg/ml NH ₂ OH-HCl*		58	100	0	0	?	84	73	69	0	67	95
Utilization of glucose for growth as sole C source in the presence of glutamate-N		(8)	0	0	0	0	98	100	100	100	100	14
Urease		0	0	75	0	0	4	42	96	20	0	9
Nicotinamidase		35	(14)	100	75	0	43	4	14	0	100	0
Pyrazinamidase		27	(25)	0	75	0	40	4	14	0	100	0
Growth on ethambutol (2.5 µg/ml)*		96	0	0	100	100	88	85	4	60	100	73
Growth on ethambutol (5.0 µg/ml)*		89	0	0	100	100	71	73	0	50	100	5
Growth on 0.1% NaNO ₂ **		4	84	0	0	0	4	0	0	0	0	46
Growth on 0.2% NaNO ₂ **		0	70	0	0	0	0	0	0	0	0	14
Nitrate reduction		0	(29)	(13)	0	0	1	0	0	0	0	(91)

* Tested on Ogawa egg medium

** Tested on Sauton agar

(M)=Multiple human isolates

(Sp)=Sporadic human isolates

(So)=Soil isolates

定しても証明され、{(平均値)-2×(標準偏差)}以上の%の菌株をとると、speciesの95%がこれに入る。したがって mean intraspecies S-value (%) から、その標準偏差の2倍を引いた値を、その species の『許容下限』(permissible low limit) とした。

M. nonchromogenicum の自己 HMO に対する S-value の『許容下限』は 91% であるから、“V”亜群 HMO の *M. nonchromogenicum*-HMO に対する S-value 92% はこれより上で、“V”亜群を *M. nonchromogenicum* の中に入れてよいことになる。一方、“V”亜群 HMO の他の species の HMO に対する S-value をみると、いずれも各 species の『許容下限』の外にある。以上の所見は、“V”亜群が *M. nonchromogenicum* と同定されることを示している。

3. “V”亜群と Group II および Group III の subgroups との比較

“V”亜群を含めて、Group II および Group III の subgroups 内の区分に有用な性状を示すと表3のごとくなる。ここに示す以外の性状では各亜群の頻度に大差がない。この表をみても、“V”亜群と *M. nonchromogenicum* はよく類似している。

今回、新たに加えた EB 耐性および NaNO_2 耐性についても両者はよく似ている。他の大部分の subgroups (species) は EB 耐性であるのに、“V”亜群と *M. nonchromogenicum* は感受性が高い(ただし、“V”亜群の方が比較的耐性)。また NaNO_2 耐性についても“V”亜群と *M. nonchromogenicum* だけが耐性を示す。

両者の著明な相違点は、(1) “V”亜群は R 型集落を示し、顕微鏡的にも compact grouping の傾向が強い。(2) “V”亜群は硝酸還元能が強い。(3) “V”亜群は、pyrazinamide, isonicotinamide, nicotinamide, succinamide, nitrate を N 源として利用しない。

これを要するに、“V”亜群は *M. nonchromogenicum*

の R 型変異株と考えると差支えないと思われる。“V”亜群を *M. nonchromogenicum* と同定する最大の根拠は、両者が高い S-value を示し、この値が *M. nonchromogenicum* の許容範囲に入ることである。そして“V”亜群の HMO の他の species の HMO に対する S-value が許容限界の外にあることである。

結 論

Kubica およびその協同研究者によつて報告された“V”-subgroup は、*M. nonchromogenicum* の a variety (おそらく R 型変異株) と同定された。

菌株を供与された Dr. G. P. Kubica, Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia に謝意を表する。

文 献

- 1) Runyon, E. H.: Med. Clin. North America, 43: 273, 1959.
- 2) Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol., 45: 253, 1966.
- 3) Wayne, L. G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93: 919, 1966.
- 4) Wayne, L. G., Doubek, J. R. & Diaz, G. A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96: 88, 1967.
- 5) Tsukamura, M.: Japan. J. Microbiol., 12: 63, 1968.
- 6) Jones, W. D. Jr., Abbott, V. D., Vestal, A. L. & Kubica, G. P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94: 790, 1966.
- 7) Kestle, D. G., Abbott, V. D. & Kubica, G. P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 95: 1041, 1967.
- 8) 東村道雄: 医学と生物学, 71: 110, 昭 40.
- 9) 東村道雄: 医学と生物学, 72: 292, 昭 41.
- 10) Liston, J., Wiebe, W. & Colwell, R. R.: J. Bact., 85: 1061, 1963.
- 11) Tsukamura, M. & Mizuno, S.: Japan. J. Microbiol., 12: 371, 1968.