

Group II Scotochromogens の分類についての知見補遺

東村道雄・水野松司・外山春雄

国立療養所中部病院

受付 昭和43年10月28日

SUPPLEMENT OF THE CLASSIFICATION OF GROUP II
SCOTOCHROMOGENS*

Michio TSUKAMURA, Shoji MIZUNO and Haruo TOYAMA

(Received for publication October 28, 1968)

Previously, Tsukamura and his associates¹¹⁾⁻¹⁵⁾ stated that all of multiple human isolates, sporadic human isolates and soil isolates of slowly growing scotochromogens belong to one species, *Mycobacterium scrofulaceum* (*M. marianum* or *M. aquae* might be suitable for the species name). On the other hand, Wayne et al.¹⁰⁾ stated that pathogenic scotochromogens (scrofula type) and tap water scotochromogens (aquae type) may be different species. To test these two possibilities, the present study was made on the tap water scotochromogens received from Dr. Lawrence G. Wayne, Veterans Administration Hospital, San Fernando, California, in respect to 97 characters previously described¹¹⁾ as well as other 5 characters.

In comparison of the tap water scotochromogens with "Hypothetical Mean Organisms" (HMOs)¹⁶⁾ of various mycobacterial species or their subgroups, the tap water scotochromogens showed the highest S-value to the HMO of the sporadic human isolate-scotochromogens (according to Tsukamura, a subgroup of *M. scrofulaceum*). However, these showed also high S-values as high as entering the permissible low limit of some species of Group II and Group III (Tables 1 and 2).

These results showed that, although the tap water scotochromogens most resembled the sporadic human isolate-scotochromogens, there remained a possibility that they can belong to other species of the Group II or Group III. It was noteworthy that the S-values for the tap water scotochromogens to the HMO of the sporadic human isolate-subgroup were only 1 per cent higher than those to the HMO of the multiple human isolate-subgroup (Table 1). The absence of clear-cut separation in a numerical comparison between the tap water scotochromogens and the other scotochromogens seem to indicate that these all are regarded as a species.

The tap water scotochromogens showed similar features with other scotochromogens in respect to the "distinguishing characters of the Group II and Group III, excluding *M. flavescens*"¹⁶⁾ (Table 3).

The tap water scotochromogens showed similar features with other scotochromogens in respect to the "characters useful for differentiation between subgroups of the Group II and Group III"¹⁶⁾ (Table 4).

In view of the results obtained, except for *M. xenopei* and *M. flavescens*, six subgroups from *M. scrofulaceum* (reference strains) to *M. aquae* shown in Table 4 seem to be gathered to one species, *M. scrofulaceum* (or, according to Tsukamura's recent proposal, *M. avium* subsp. *scro-*

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Chita-gum, Aichi-ken 474 Japan.

*fulaceum*¹⁰⁾).

However, the tap water scotochromogens or the sporadic human isolate-scotochromogens were differentiated from the multiple human isolate-scotochromogens (pathogenic scotochromogens) by their high susceptibility to ethambutol (Table 4).

It is certain that this sporadic human isolate or tap water-subgroup is differentiated from the multiple human isolate-subgroup not only by tween hydrolysis reported by Wayne et al.¹⁰⁾ but also by ethambutol susceptibility. Other characters are not yet distinct for differentiation between these two subgroups.

However, this separation of two subgroups does not yet mean that these two subgroups are different species. These two subgroups showed a high similarity as seen in the high S-values between them^{11), 12)}. Until a more clear-cut separation, as statistically significant, is made by a numerical classification, these two subgroups, the sporadic human isolate- and multiple human isolate-subgroups (or the scrofula and aquae types) should remain still as two subgroups or two varieties of the same species *M. scrofulaceum*. Previously, the present authors¹⁰⁾ reported that these two subgroups differ in their virulence for mice. Further investigations on this problem are expected.

Runyon¹⁾の群別という Group II Scotochromogens に属する菌種としては、次のものが知られている。(1) *M. marianum* Suzanne & Penso (1953)²⁾, (2) *M. paraffinicum* Davis, Chase & Raymond (1956)³⁾, (3) *M. scrofulaceum* Prissik & Masson (1957)⁴⁾, (4) *M. xenopei* Schwabacher (1959)⁵⁾, (5) *M. aquae* (Galli-Valerio) Bönické (1962)⁶⁾, (6) *M. gordonae* Bojalil et al. (1962)⁷⁾, (7) *M. flavescens* Bojalil et al. (1962)⁷⁾, (8) *M. kansasii* var. *aurantiacum*^{8) 9)}.

この中で *M. kansasii* Hauduroy (1955) はすでに確立された species であり, *M. flavescens* も独立の species であることに異論はない^{10) 11)}。したがって問題は上記の (1)~(6) の分類にしばられてくる。

これらの Group II scotochromogens に対する考え方には、大別して2つの流れがある。東村および共同研究者¹²⁾は日本分離の病原性 scotochromogens を一つの species と認めると共に、さらに土壌から分離された1群の scotochromogens および患者喀痰から散発的に分離される scotochromogens も同一 species に入るとし、これらを *M. scrofulaceum* と同定した^{13) 14)}。また東村¹¹⁾によれば, *M. marianum*, *M. aquae*, *M. gordonae* も *M. scrofulaceum* と同一 species に入る。東村¹¹⁾が、これらを同一 species としたのは、numerical classification で、同一 cluster に入ることに基づく。誤解を避けるために一言すれば、同一 species に入るということは、すべての性状が同一であるということではない。たとえば、amidase pattern にしても, *M. marianum* の type strain は urease, nicotinamidase および pyrazinamidase が陽性であるが, *M. scrofulaceum* は通常

urease のみ陽性であるか, Bönické⁶⁾の10種の amidase 反応全部が陰性である。

以上の東村などの考えに対して、Wayne など¹⁰⁾は *M. marianum* と *M. scrofulaceum* とは同一菌種と認めているが, *M. aquae* および “tap water scotochromogens” は別個の species であろうと述べている。

そこで本報では、Wayne から “tap water scotochromogens” を分与されたのを機会に, *M. scrofulaceum* と “tap water scotochromogens” が果たして同一 species か、あるいは2つの species と考えるべきかを検討してみることとした(注:最近、東村¹⁰⁾は *M. avium*-group に属する species—*M. avium*, *M. nonchromogenicum* (= *M. terrae*), *M. gastri*, *M. xenopei*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*—を合して one species (*M. avium*) とし、以上の species 名を subspecies 名とすることを提唱した。この提唱に従えば、上記の “species” は “subspecies” とかきかえるべきである)。

実験方法

我々は前に病原性 scotochromogens, 散発性分離 scotochromogens, および土壌分離 scotochromogens をすべて *M. scrofulaceum* と同定したが^{12) 14)} 本研究では (1) 病原性 (multiple human isolates), (2) 散発性分離株, (3) 土壌分離株に分けて検討することとした。被検株数は、(1) 26 株, (2) 49 株, (3) 10 株である。これに Dr. L. G. Wayne からの “tap water scotochromogens” 4 株 (ATCC 19277, ATCC 23283, ATCC 23284, ATCC 23285) および Dr. R. Bönické からの *M. aquae* 4 株 (SN 601, SN 645, SN 651, SN 703) を

加えた。ちなみに Wayne など¹⁰⁾によれば, *M. aquae* と “tap water scotochromogens” とは同一であるという。なお他に ATCC 供与の標準株若干を使用した。

検査項目は既報¹¹⁾の 97 性状のほかに, 最近 *M. avium*-group 内の区分に有用と分かつた次の 4 性状を追加した。すなわち (a) ethambutol (EB) 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性, (b) EB 5.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 耐性, (c) 0.1% NaNO_2 耐性, (d) 0.2% NaNO_2 耐性で, 前二者 (EB 耐性) は 1% 小川培地で, 後二者 (NaNO_2 耐性) は Sauton 寒天培地で検した。いずれも上記の培地に薬剤を含ませ対照を加えて 1 組とし, おおのに被検株を 1 白金耳ずつ塗抹接種し, 37°C 4 週後に発育を判定した。検査培地に対照と大差がない発育を示すものを陽性とした。対照には膜状融合発育が認められるので, 被検培地に数十程度の分離集落を示す例は陰性と判定した (これらの分離

集落は通常耐性菌であつて, 一般的な発育とは認められない)。今までも頻々強調したごとく, 白金耳は被検菌に軽くふれて塗抹し, 可視できる菌体を被検培地にもちこんではいけない。菌量を mg であらわして定量接種する方法は労のみ多くして効が少なく, 実験誤差は上記の白金耳接種より少なくはならない。

1963 年に Liston, Wiebe & Colwell¹²⁾ は, species の性状を記載するのに “Hypothetical Median Organisms” を用いることを提唱した。この方法は species の半数以上の菌株が示す陽性性状で species の性状を記録する方法である。この方法は理論的にも優れた方法と思われるので, 若干の修飾を加えて本報でも用いることとした。すなわち我々は species (または菌群) の菌株が示す陽性性状の平均値をとり, この平均値に一致する数の陽性性状で species または菌群の性状を記録した。

Table 1. Comparison of Some Scotochromogens with HMOs of Various Mycobacterial Species

HMO	Permissible low limit of species* (%)	S-value (%) for test scotochromogen to HMO									
		Scotochromogens tested †									
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
<i>M. bovis</i>	97	77	82	78	74	72	73	73	72	74	76
<i>M. tuberculosis</i> (wild)	96	76	81	77	73	71	72	72	71	73	75
<i>M. tuberculosis</i> (labor)	100	75	80	76	72	74	73	71	70	72	76
<i>M. novum</i>	97	81	80	82	82	76	81	83	82	82	82
<i>M. kansasii</i>	93	79	82	78	82	82	83	79	80	82	84
<i>M. avium</i>	90	93	88	92	92	86	89	93	92	90	90
<i>M. nonchromogenicum</i>	91	93	88	90	94	88	93	95	94	94	94
<i>M. gastri</i>	91	90	91	87	91	87	92	92	91	91	93
<i>M. intracellulare</i>	88	91	86	90	94	90	91	93	94	92	90
<i>M. scrofulaceum</i>											
Multiple human isol.	91	92	87	93	97	89	94	96	97	95	93
Sporadic human isol.	95	91	86	92	96	92	95	97	98	95	94
Soil isolates	94	92	87	91	95	87	94	94	95	95	93
<i>M. marinum</i>	86	82	81	81	85	87	86	86	87	85	87
<i>M. thermoresistibile</i>	88	78	77	79	79	77	78	80	81	77	77
<i>M. chitae</i>	94	80	77	77	83	81	82	82	83	81	81
<i>M. borstelense</i>	89	69	70	70	74	72	75	73	74	74	78
<i>M. abscessus</i>	86	71	68	70	76	74	79	75	76	78	76
<i>M. fortuitum</i> (thermophil)	91	66	63	67	69	67	70	70	71	69	67
<i>M. fortuitum</i> (fortuitum)	83	62	59	63	67	65	68	68	69	67	65
<i>M. phlei</i>	89	63	62	60	64	68	65	65	66	64	64
<i>M. aurum</i>	84	61	56	60	64	64	63	65	66	62	62
<i>M. parafortuitum</i>	80	59	58	56	60	62	61	61	62	60	58
<i>M. lacticola</i>	93	47	44	44	48	50	49	49	50	48	50
<i>M. smegmatis</i>	93	42	41	39	43	45	44	44	45	43	41

* Permissible low limit of species was determined as a S-value (%), $\{(\text{mean intraspecies S-value}) - 2 \times (\text{standard deviation})\}$. Since the limits of $\{(\text{mean intraspecies S-value}) \pm 2 \times (\text{standard deviation})\}$ actually included 95% of the membership of a species, a range over the permissible low limit also has to contain 95% of the membership.

† 1. *M. xenopei* ATCC 19250

2. *M. xenopei* ATCC 19970

3. *M. paraffinicum* ATCC 12670

4. “Gause” scotochromogen ATCC 15078

5. *M. marianum* ATCC 19275

6. *M. scrofulaceum* ATCC 19981

7-10. Tap water scotochromogens ATCC 19277, ATCC 23283, ATCC 23284, ATCC 23285

この性状を“Hypothetical Mean Organism” (HMO) と呼ぶこととする¹⁰⁾。

菌株同志の比較または菌株と HMO との比較は、次の式で S-value を計算して表わした。なお使用性状は、今までの成績と比較するために EB 耐性および NaNO₂ 耐性を除いて 97 性状とした。

$$S\text{-value (\%)} = \frac{\text{[(同一性状の数) + (全検査性状数)]}}{\text{全検査性状数}} \times 100\%$$

成 績

1. Tap water scotochromogens および ATCC 株の既知抗酸菌 HMO との比較

Tap water scotochromogens (以下 Wayne など¹⁰⁾ の“aqueae type”の記載に従って aqueae 型と呼ぶ) および若干の ATCC 供与標準株と既知抗酸菌種の HMO とを比較した結果を表 1 に示す。この結果から、最も高い S-value を示す既知抗酸菌種を選べば、表 2 のごとくなる。

表 1 に各菌種の members の 95% を含む限界を「許容下限」(permissible low limit of species) として示したが、被検 scotochromogens は *M. avium*-group の 2, 3 の菌種の「許容限界」内に入る。このような所見は Group II および Group III (*M. avium*-group) 全体を一つの species とみなす東村¹⁰⁾の考えの妥当性を示すように思われる。しかし最も高い S-value を示す菌種(またはその亜群)をとれば、aqueae 型の scotochromogens は、「人から散発的に分離された scotochromogens」に最も近いといえる(表 2)。しかし「病原性 scotochromogens」に入ると期待された *M. scrofulaceum* ATCC 19981 も同じ結果を示している(表 2)。これらの結果は

3 群(病原性、散発性分離、土壌分離)の scotochromogens を判然と分かちにくいことを示しているといえよう。

2. Group II scotochromogens の subgroups 間の比較

表 3 に我々が通算 754 株の抗酸菌株を 97 性状に亘って検査した結果から、*M. avium*-group (または東村¹⁰⁾の提唱する意の *M. avium*) の区別に有用な 9 性状¹⁰⁾を示す。*M. avium*-group はこの中で acetate 利用, pyruvate 利用, propanol 利用の 3 者のみ(2 者のことも多い)陽性で、他は陰性を示す菌として特徴づけられる。今 Group II の各群の結果をみると、aqueae 型も他の subgroups と同様の性状を示しており、差は認められない。*M. flavescens* (または *M. acapulcensis*) は *M. avium*-group には入らないので、他とは違つた態度を示している。

次に表 4 に *M. avium*-group 内の subgroups の区分に有用な 14 性状¹⁰⁾を示す。この中で glutamate-N 存在での glucose 利用, EB 耐性および NaNO₂ 耐性に關する 5 性状は、先の S-value 比較および HMO 作製には用いられていない。

この表 4 の 14 性状で比較すると、aqueae 型は、EB 耐性を示さない点で、明らかに「散発的人体分離 scotochromogens」と似た性状を示している。

Wayne など¹⁰⁾の記載をみると、明らかに aqueae 型を *scrofula* 型から区別できる性状は、Tween 水分解能唯一であるごとく思われる。そうすると、今ここに EB 耐性を欠く点をあげても、両者を分かち性状は事実上 2 性状ということになる。更に先に東村など¹⁰⁾が報告したマウスに対する毒力の差があるが、これも明確な差とはいえ

Table 2. Comparison between the Species Name Received and the Species of Which HMO Showed the Highest S-value to the Test Scotochromogens

Strain	Species name received	Species name of HMO to which the test scotochromogen showed the highest S-value
ATCC 19250	<i>M. xenopei</i> ‡	<i>M. avium</i> , <i>M. nonchromogen</i> (93%)*
ATCC 19970	<i>M. xenopei</i> ‡	<i>M. gastri</i> (91%)*
ATCC 12670	<i>M. paraffinicum</i> ‡	<i>M. scrofulaceum</i> (multiple) (93%)*
ATCC 15078	“Gause” scotochromogen	<i>M. scrofulaceum</i> (multiple) (97%)*
ATCC 19275	<i>M. marianum</i>	<i>M. scrofulaceum</i> (sporadic) (92%)*@
ATCC 19981	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i> (sporadic) (95%)*
ATCC 19277	Tap water scotochromogen	<i>M. scrofulaceum</i> (sporadic) (97%)*
ATCC 23283	Tap water scotochromogen	<i>M. scrofulaceum</i> (sporadic) (98%)*
ATCC 23284	Tap water scotochromogen	<i>M. scrofulaceum</i> (multiple, sporadic, and soil) (95%)*
ATCC 23285	Tap water scotochromogen	<i>M. scrofulaceum</i> (sporadic) (94%)*@

* The highest S-value shown by the test scotochromogen.

‡ HMO of *M. xenopei* and HMO of *M. paraffinicum* were not tested, as they had not yet been prepared.

@ Out of the permissible low limit.

Abbreviation. multiple= multiple human isolates
sporadic= sporadic human isolates
soil= soil isolates

ない。したがって、両者を比較的明確に分かつ性状が2性状であるとする、両者は2つの species とするよりは、一つの species の subtypes としておく方が妥当であると思われる。

なお表4には *M. avium*-group に属さない *M. flavescens* (*M. acapulcensis* と同一) を加えたが、この菌は

EB 耐性がなく、かつ NaNO_2 耐性がある点で、他の scotochromogens とは区別できる。

M. flavescens を他の抗酸菌から分かつ特徴は表3および表4の結果から次のごとく要約される。(1) 比較的発育の遅いR型の scotochromogen である(発育速度は中間型)。(2) 0.2% picric acid 含有 Sauton 寒天に発

Table 3. Response to the Characters Distinguishing the Group II and Group III Mycobacteria from the Other Mycobacteria

Character	Number of strains showing a positive character							
	xen	scrofula	multi	sporadic	soil	tap	aquae	flav
Number of strains tested	4	3	26	49	10	4	4	2
Rapid growth	0	0	0	0	0	0	0	0
Tolerance to 0.2% picric acid	0	0	0	0	0	0	0	0
Acetate as C source	3	3	25	49	8	4	4	2
Pyruvate as C source	3	3	24	49	6	4	4	2
Succinate as C source	0	0	2	0	0	0	0	(2)
Fumarate as C source	0	0	0	0	0	0	0	0
Malate as C source	0	0	0	0	0	0	0	0
Propanol as C source	2	1	16	48	5	2	0	2
Nitrate reduction	0	0	0	0	0	0	0	2

xen=*M. xenopei* (ATCC 19156, ATCC 19250, ATCC 19276, ATCC 19970)

scrofula=*M. scrofulaceum* (ATCC 15978, ATCC 19073, ATCC 19981)

multi=Multiple human isolate-scotochromogens (pathogenic scotochromogens; identified as *M. scrofulaceum* by Tsukamura et al.¹⁴⁾)

sporadic=Sporadic human isolate-scotochromogens (identified as *M. scrofulaceum* by Tsukamura et al.¹⁵⁾)

soil=Soil isolate-scotochromogens (identified as *M. scrofulaceum* by Tsukamura et al.¹⁵⁾)

tap=Tap water scotochromogens (ATCC 19277, ATCC 23283, ATCC 23284, ATCC 23285)

aquae=*M. aquae* (SN 601, SN 645, SN 651, SN 703)

flav=*M. flavescens* (*M. acapulcensis* also showed the same characters)

Table 4. Response of Various Scotochromogens to the Characters Useful for Differentiation between Subgroups of the Group II and Group III

Character	Number of strains showing a positive character							
	xen	scrofula	multi	sporadic	soil	tap	aquae	flav
Number of strains tested	4	3	26	49	10	4	4	2
Growth at 28°C*	1	3	26	49	10	4	4	2
Growth at 37°C*	4	3	26	49	10	4	4	2
Growth at 45°C*	4	0	2	0	0	0	0	0
2-week arylsulfatase	4	3	24	42	9	4	2	2
Colony pigmentation**	3	3	26	49	10	4	4	2
Growth on 0.5 mg/ml NH_4OH *	0	3	19	34	0	4	2	0
Utilization for growth of glucose as C source (glutamate-N)	0	3	26	49	10	4	4	2
Urease	0	3	11	47	2	1	3	2
Nicotinamidase	4	1	1	7	0	0	0	2
Pyrazinamidase	4	1	1	7	0	0	0	2
Resistance to EB (2.5 $\mu\text{g/ml}$)*	4	3	22	2	6	1	2	0
Resistance to EB (5.0 $\mu\text{g/ml}$)*	4	3	19	0	5	1	1	0
Resistance to 0.1% NaNO_2 **	0	0	0	0	0	0	0	2
Resistance to 0.2% NaNO_2 **	0	0	0	0	0	0	0	2

* Tested on Ogawa egg medium

** Tested on Sauton agar

As to the abbreviation of the scotochromogens tested, see Table 3.

育する。(3) 硝酸還元陽性。(4) EB 耐性なし。(5) NaNO_3 耐性である。

M. avium-group に入らない *M. flavescens* を除くと、Group II には2つの species のみがあると考えるのが妥当である。すなわち *M. xenopei* と *M. scrofulaceum* の2種である。表4の *M. scrofulaceum* から *M. aquae* に至る6つの亜群は同一菌種と考えるべきである。

M. xenopei を *M. scrofulaceum* から分かつ性状は、(1) 28°C に発育しない。(2) 45°C に発育する。(3) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 1% 小川培地に発育しない(通常 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ にも発育しない)。(4) glutamate を N 源として, glucose を発育に利用しない。(5) urease (-) で, nicotinamidase および pyrazinamidase (+) である。

結 論

Tap water scotochromogens は、「散発的に喀痰から分離される scotochromogens」に最もよく似ている。両者はともに ethambutol に感性である点で、他の亜群と区別される。しかし Wayne などのいう Tween 水分解能の差を加えても、別の species とする程の差ではないと思われる。したがって, tap water scotochromogens は、現在のところ *M. scrofulaceum* の a variety とするのが妥当と思われる。

(菌株を供与していただいた Dr. L. G. Wayne, Veterans Administration Hospital, San Fernando, California に謝意を表する。)

文 献

- 1) Runyon, E. H. : Med. Clin. North Amer., 43 : 273, 1959.
- 2) Suzanne, M. & Penso, G. : Riass. Commun. VI Congr. Int. Microbiol. Roma, 2 : 658, 1953.
- 3) Davis, J. B., Chase, H. H. & Raymond, R. L. : Appl. Microbiol., 4 : 310, 1956.
- 4) Prissick, F. H. & Masson, A. M. : Cand. J. Microbiol., 3 : 91, 1957.
- 5) Schwabacher, H. : J. Hyg., 57 : 57, 1959.
- 6) Bönicke, R. : Bull. Union Inter. Tuberc., 32 : 13, 1962.
- 7) Bojalil, L. F., Cerbón, J. & Trujillo, A. : J. Gen. Microbiol., 28 : 333, 1962.
- 8) Tacquet, A., Tison, F. & Devulder, B. : Ann. Inst. Pasteur, 108 : 514, 1965.
- 9) Hauduroy, P., Hovanessian, A. & Roussianos, D. : Ann. Inst. Pasteur, 109 : 142, 1965.
- 10) Wayne, L. G., Doubek, J. R. & Diaz, G. A. : Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 88, 1967.
- 11) Tsukamura, M. : Japan. J. Microbiol., 12 : 63, 1968.
- 12) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 41 : 401, 昭 41.
- 13) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 42 : 15, 昭 42.
- 14) 東村道雄・東村純雄・水野松司 : 結核, 42 : 219, 昭 42.
- 15) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 43 : 1, 昭 43.
- 16) Tsukamura, M. : Tubercle, 48 : 311, 1967.
- 17) Liston, J., Wiebe, W. & Colwell, R. R. : J. Bact., 85 : 1061, 1963.
- 18) Tsukamura, M. & Mizuno, S. : Japan. J. Microbiol., 12 : 371, 1968.