

## Ethambutol 耐性による病源性および非病源性抗酸菌 (Group II および Group III) の区別

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 45 年 4 月 10 日

### DIFFERENTIATION BETWEEN PATHOGENIC AND NONPATHOGENIC MYCOBACTERIA OF GROUP II AND GROUP III BY SUSCEPTIBILITY TO ETHAMBUTOL\*

Michio TSUKAMURA

(Received for publication April 10, 1970)

Pathogenic scotochromogens (Group II), *M. scrofulaceum* and *M. xenopei*, and pathogenic nonphotochromogens (Group III), *M. avium* and *M. intracellulare*, were resistant to ethambutol, whereas nonpathogenic scotochromogens, tap water scotochromogens and *M. flavescens* and nonpathogenic nonphotochromogens, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. novum* and *M. gastri*, were susceptible to ethambutol.

The susceptibility to ethambutol was determined by a simple method such as inoculating one loopful of the test organism to the Ogawa's egg medium\*\* containing 5 µg/ml ethambutol and comparing the growth on the ethambutol medium with growth on the control medium (Ogawa's egg medium containing no agent). By comparison with the growth on the control medium, no growth or, if any, scant growth (much less than the growth on the control medium) on the ethambutol medium was read as "negative growth" after incubation at 37°C for 2 weeks.

---

非定型抗酸菌の ethambutol (EB) 感受性については、Karlson<sup>1)</sup>, Bönicke<sup>2)</sup>, Meissner<sup>3)</sup> などの報告があるが、EB 感受性 (EB 耐性) の検査が非定型抗酸菌の区別に役立つという報告はなかつた。これは、当時検査の対象となつた非定型抗酸菌が病源性のあるものに限られていたためと思われる。その後、水野など<sup>4)</sup> は非病源性抗酸菌を含めて検討を行ない、Group III に属する *M. avium* (病源性菌) と *M. nonchromogenicum* (= *M. terrae*, 非病源性菌) の EB 感受性が異なり、前者は EB 耐性、後者は EB 感性であることにより両者を区別できると報告した。

その後、非定型抗酸菌の分類は進歩し、種々の菌種が知られるにいたつたが、最も頻りに分離され、最も重要なものは Group III に属する抗酸菌であり、ついで Group II に属する抗酸菌であると思われる。

われわれは Group III および Group II の抗酸菌の EB 感受性を検した結果、これらの菌の EB 耐性度と病源性との間にきわめて密接な関係があることを見出した。すなわち Group III の病源性菌である *M. avium*, *M. intracellulare* は EB 耐性、非病源性菌である *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. gastri*, *M. novum* は EB 感性であつた。また Group II の病源

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

\*\* Composition of the Ogawa egg medium: Glycerol, 6 ml; 2% malachite green solution, 6 ml; Whole eggs, 200 ml; Basic solution (1% sodium glutamate and 1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>), 100 ml (made as slopes by sterilization at 90°C for 60 minutes).

Table 1. Differentiation between Pathogenic and Nonpathogenic Mycobacteria of Group II and Group III by Susceptibility to Ethambutol

Species	Number of strains tested	Number of strains showing positive growth on Ogawa egg medium containing 5 $\mu$ g/ml ethambutol
<i>M. avium</i>	26	23 (89%)
<i>M. intracellulare</i>	76	54 (71%)
<i>M. xenopei</i>	4	4 (100%)
<i>M. scrofulaceum</i>	29	22 (76%)
<i>M. nonchromogenicum</i>	93	0 (0%)
<i>M. terrae*</i>	15	0 (0%)
<i>M. triviale**</i>	22	1 (5%)
<i>M. novum***</i>	26	0 (0%)
<i>M. gastri</i>	8	0 (0%)
Tap water scotochromogens****	54	1 (2%)
<i>M. flavescens#</i>	5	0 (0%)

Upper part: Pathogenic mycobacteria of Group II and Group III

Lower part: Nonpathogenic mycobacteria of Group II and Group III

- \* This may be identical with *M. nonchromogenicum*.
- \*\* This seems to be a rough colony-mutant (prototrophic mutant) of *M. novum*, which is closely related to *M. nonchromogenicum*.
- \*\*\* This seems to be closely related to *M. nonchromogenicum*.
- \*\*\*\* Include scotochromogens sporadically isolated from sputum specimens.
- # This seems to belong to Group IV.

性菌である *M. scrofulaceum*, *M. xenopei* (*M. xenopei* を Group III に入れている研究者もある) は EB 耐性、非病原性菌の Tap water scotochromogens および *M. flavescens* は EB 感性であつた。注: これらの菌については文献 5 参照。

#### 実験方法

使用した菌種と菌株数は表 1 に示した。これらの菌株の大部分は、American Type Culture Collection (ATCC) から直接受領したものであり、*M. intracellulare* (Battley) の一部と *M. scrofulaceum* の一部はわが国で分離されたものである。*M. terrae* および *M. gastri* は Dr. L. G. Wayne から、*M. triviale* は Dr. G. P. Kubica から直接受領した。Tap water scotochromogens の中の 5 株は ATCC から受領し、残りの 49 株は、われわれが喀痰から sporadic isolates として分離したものである。菌株の大部分は前に記載した<sup>9)</sup>。

EB 耐性は 1% 小川培地で検査した。すなわち中試験管に 8 ml 分注して斜面にかためた 1% 小川培地を対照とし、EB 5  $\mu$ g/ml を含む 1% 小川培地を検査培地とした。この対照培地と EB 培地に被検株を 1 白金耳塗抹接種し、37°C 2 週後に発育を観察した。まれに遅発性で 2 週後に発育の悪い株があつたが、これらの菌株で

Table 2. Relationship between Susceptibility to Ethambutol and Pathogenicity to Human in Group II Scotochromogens

ATCC number of strains	Resistance to ethambutol	Information of strain*			ATCC number of strains	Resistance to ethambutol	Information of strain*		
		Source	Probable clinical significance	Comments			Source	Probable clinical significance	Comments
12670	+	Soil	-	<i>M. paraffinicum</i>	23408	-	Sputum	+	
15078	+	Cerv. node	+	"Gause"	23409	-	Tonsil	-	
15079	+	Cerv. node	+	"Bridge"	23410	+	Tonsil	-	
15081	+	Sputum and lung	+	P-6	23411	-	Tonsil	-	
15978	+	Abscess	+	<i>M. scrofulaceum</i>	23412	-	Sputum	-	
19073	+	Sputum	+	<i>M. scrofulaceum</i>	23415	+	Tap water	-	
19277	-	Tap water	-		23416	-	Tap water ?	-	
19981	+	Cerv. node	+	<i>M. scrofulaceum</i>	23417	-	Tap water ?	-	
23284	-	Sputum	-		23418	+	Cerv. node	+	<i>M. scrofulaceum</i>
23285	-	Tap water	-		23419	+	Cerv. node	+	<i>M. scrofulaceum</i>
23286	-	Sputum	-		23420	+	Cerv. node	+	<i>M. scrofulaceum</i>
23395	-	Gastric	-		23421	+	Cerv. node	+	<i>M. scrofulaceum</i>
23398	-	Tap water	-	Tap water scoto	23425	+	Sputum ?	Possible	
23399	-	Sputum	-		23427	+	Sputum	+	
23400	+	Sputum	-		23428	-	Sputum	Possible	
23401	-	Sputum	-		23429	+	Sputum	+	
23402	-	Gastric	-		23430	+	Sputum	+	
23403	-	Gastric	-		23431	+	Sputum ?	Possible	
23405	-	Sputum	-		23432	+	Sputum	+	
23407	+	Sputum and lung	+	P-31	23433	+	Sputum	Possible	

\* Susceptibility to ethambutol was decided blindly by making the origin of strains unknown to the investigators. Information of the strains were obtained from Dr. L. G. Wayne.  
Cerv. node=Cervical node.

Table 3. Relationship between Susceptibility to Ethambutol and Pathogenicity in Group II Scotochromogens

	Number of strains	
	Probable or possible clinical significance	No clinical significance
Resistant to ethambutol	18	4
Susceptible to ethambutol	2	16

Refer to table 2.

は3週後に観察した。通常、対照培地には膜状発育がみられるので、EB培地にも膜状全面発育を示すものを、発育陽性すなわちEB 5 $\mu$ g/ml 耐性と判定した。EB培地にほとんど発育しないか、発育しても明らかに僅少の発育を示すにすぎないものは、発育陰性すなわちEB 5 $\mu$ g/ml 感性とした。

たとえば対照培地に全面発育がみられる場合、EB培地に発育面積が1/3で発育量も僅少で薄膜にすぎない場合は、EB感性とした。EB培地全体にわたって痕跡的発育を示す場合もEB感性とした。

EB耐性検査は実用的なものとするために、あえて定量的接種を行わず、1白金耳接種法を用いたが、判定に迷う場合はまれであつた。接種にさいしては、被検株に白金耳を軽くふれて、対照培地およびEB培地に丹念に塗抹接種した。接種後に肉眼で接種菌が培地面にみえるようなheavy inoculationは行なわないように留意した。接種を終えた培地はただちにゴム栓を施して試験管立てに立てて培養した。

### 実験成績

#### 1. Group II scotochromogens と Group III non-photochromogens の EB 感受性

結果は表1に示すごとくで、*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopei*, *M. scrofulaceum* など、pathogenic mycobacteria として知られるものは大部分がEB耐性であつた。一方、*M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. novum*, *M. gastri*, tap water scotochromogens, *M. flavescens* など、非病原性抗酸菌として知られるものは、ほとんど全部がEB感性であつた。すなわちGroup II と Group III の病原性菌と非病原性菌とが、EB耐性の有無で明確に区別できた。

非病原性菌はほとんど全部EB耐性がない。一方、病原性菌には若干の例外がある。したがってEB耐性を示すものはまず「病原性菌」と考えて間違いない。

#### 2. EB 感受性による病原性および非病原性 scotochromogens の区別

私は昭和43年から始まつたGroup II 研究のInternational Working Group for Mycobacterial Taxonomy の一員として加わつたので、ATCCから約50株のscoto-

Table 4. Relationship between Susceptibility to Ethambutol and Tween Hydrolysis

Species	Resistance to ethambutol	Tween hydrolysis
<i>M. avium</i>	+	-
<i>M. intracellulare</i>	+	-
<i>M. xenopei</i>	+	-
<i>M. scrofulaceum</i>	+	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	-	+
<i>M. terrae</i>	-	+
<i>M. triviale</i>	-	+
<i>M. novum</i>	-	+
<i>M. gastri</i>	-	+
Tap water scotochromogens	-	+
<i>M. flavescens</i>	-	+

Symbol of character is expressed as "hypothetical median organism". This table was prepared from the data of Dr. Wayne and the present author.

chromogens を番号だけを付した状態で受けとつた。これらの菌株についてEB耐性を検した。のちに世話役のDr. Wayne から受けとつた菌株の由来表で、病原性菌として人体に意義があつたかどうか明らかに記載してあつた40株を表2に示した。

これらの菌株におけるEB耐性の有無と臨床的意義(病原性)の関係をまとめると表3のごとくなる。すなわちEB耐性は病原性と、EB感性は非病原性と密接に相関している。

### 考 察

Group II および Group III の抗酸菌で得たEB耐性の検査結果を"hypothetical median organism" (HMedO) で示すと表4のごとくなる。HMedO は菌種の性状を記載するのに合理的な方法としてListon, Wiebe & Colwell<sup>7)</sup> によつて発表された方法である。一方、Group II および Group III 内の区分に有用な方法として発表されたWayne, Doubek & Russel<sup>8)</sup> のTween水解の結果を、Wayne<sup>9)</sup> および Wayne, Doubek & Diaz<sup>10)</sup> の成績からHMedOにまとめて記載すると表4のごとくなる。表4の結果は、EB耐性とTween水解とが密接な関係があることを示している。すなわちEB耐性はTween水解(-)と、EB感性はTween水解(+)とよく一致している。

私が全国12の国立療養所と共同研究した結果によれば<sup>11)</sup>、わが国で人体から分離されるGroup III の病原性菌は*M. intracellulare*に限られ、非病原性菌は*M. nonchromogenicum* (*M. terrae*)に限られる。*M. terrae* は*M. nonchromogenicum* の同義語と考えてよさそうである<sup>12)</sup>。*M. triviale* は*M. novum* のR型集落変異株と考えられる<sup>12)</sup>。*M. novum* が*M. nonchromo-*

*genicum* と同一菌種の subspecies か、または別の species かは現在結論できないが、きわめて近縁のものであることは確実である<sup>10)</sup>。*M. gastri* はまだ日本では分離されていない。以上の状況を考案すれば、Group III nonphotochromogens で、EB 耐性の菌は *M. intracellulare*、EB 感性の菌は *M. nonchromogenicum* (*M. terrae*) と考えてよさそうである。ただし *M. xenopei* の一部は nonphotochromogenic であるので、*M. intracellulare* と区別する必要がある。この区別は、*M. intracellulare* が、glutamate を N 源として glucose および succinate またはそのいずれかを発育に利用するのに対して、*M. xenopei* は両方とも利用しないことによつて区別できる<sup>11)</sup>。

日本で分離される Group II scotochromogens のほとんど全部は、*M. scrofulaceum* か tap water scotochromogens である<sup>11)</sup>。この両者は、前者が EB 耐性、後者が EB 感性であることによつて区別できる。

#### 結 論

Group III および Group II の病原性抗酸菌である *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopei* は ethambutol (EB) 耐性である。一方、Group III および Group II の非病原性抗酸菌である *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. triviale*, *M. novum*, *M. gastri*, tap water scotochromogens は EB 感性である。

すなわち EB 耐性の有無によつて、Group III と Group II の病原性菌と非病原性抗酸菌とを区別できる。

#### 文 献

- 1) Karlson, A. G. : Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 905, 1961.
- 2) Bönicke, R. : Beitr. Klin. Tuberk., 126 : 108, 1962.
- 3) Meissner, G. : Ergeb. Inn. Med. u. Kind., 20 : 36, 1963.
- 4) 水野松司・外山春雄・東村道雄 : 日本細菌学雑誌 21 : 672, 昭 41.
- 5) Wayne, L. G., Runyon, E. H. & Kubica, G. P. : Amer. Rev. Resp. Dis., 100 : 732, 1969.
- 6) Tsukamura, M. : Tubercle, 48 : 311, 1967.
- 7) Liston, J., Wiebe, W. & Colwell, R. R. : J. Bact., 85 : 1061, 1963.
- 8) Wayne, L. G., Doubek, J. R. & Russel, R. L. : Amer. Rev. Resp. Dis., 90 : 588, 1964.
- 9) Wayne, L. G. : Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 919, 1966.
- 10) Wayne, L. G., Doubek, J. R. & Diaz, G. A. : Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 88, 1967.
- 11) 国立療養所非定型抗酸菌研究班 : 第 20 回国際結核会議報告, New York, 1969 年 9 月.
- 12) Tsukamura, M. : Report at the meeting of the Committee of Bacteriology and Immunology, the International Union against Tuberculosis, New York, August-September 1969.
- 13) 東村道雄・水野松司・外山春雄・東村純雄 : 結核, 43 : 119, 昭 43.