

Butanol 利用能による *Mycobacterium avium* と
Mycobacterium intracellulare の区別

—*M. intracellulare* の日本分離株と米国外分離の比較—

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和 46 年 1 月 22 日

DIFFERENTIATION OF *MYCOBACTERIUM AVIUM* AND
MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE BY
UTILIZATION OF BUTANOLS AS
CARBON SOURCE*

—Comparison between Japan Isolates and United
States Isolates of *M. intracellulare*—

Michio TSUKAMURA and Shoji MIZUNO

(Received for publication January 22, 1971)

Utilization of carbon compounds for growth of mycobacteria was studied by many investigators already in early days of study on mycobacteria¹⁾⁻¹¹⁾. A number of investigations on this subject were carried out recently with the aim of identifying various species of mycobacteria¹²⁾⁻²³⁾. Most of the studies, however, related to the differentiation of rapid-growing mycobacteria, and only a few papers²²⁾⁻²⁴⁾ have dealt with the differentiation of slow-growing mycobacteria. It was desired to detect some methods to differentiate slow-growing mycobacteria. In the course of studies on nutritional requirements of mycobacteria conducted in this laboratory, utilization of *n*-butanol and *iso*-butanol for growth was found to be useful for differentiation of *M. avium* and *M. intracellulare*, which was considered to be important and was studied by many workers²⁴⁾⁻²⁶⁾.

Methods

Utilization of butanols for growth as the sole source of carbon was tested in the following basic medium: $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2.64 g; KH_2PO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; purified agar, 20.0 g; distilled water, 1,000 ml. The medium was adjusted to pH 7.0 by addition of 10% KOH solution and was poured in 8 ml quantities into tubes, 17 by 170 mm, and sterilized by heating at 100°C for 15 minutes for two days. This medium was used as control medium. *n*-Butanol and *iso*-butanol were added to the above medium at a final concentration of 0.1 M (7.4 ml/liter), respectively. A set of three medium, control medium, *n*-butanol medium and *iso*-butanol medium, were inoculated with one loopful of test organism and incubated at 37°C for 4 weeks. Growth was read in comparison with growth on the control medium, which showed usually no growth. The strains used are listed in Table 1.

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

Results

1. Differentiation of *M. avium* and *M. intracellulare*

Differentiation of these two organisms, which are closely related to each other, was studied by many investigators (refer to references 24 and 26). The results obtained in this study seems to contribute to the differentiation of these two organisms (Table 1).

The majority of *M. avium* are able to grow at 45°C but able to utilize neither *n*-butanol nor *iso*-butanol (Table 1). On the other hand, about one half of *M. intracellulare* are able to grow at 45°C but this type of *M. intracellulare* are able to utilize both *n*-butanol and *iso*-butanol (Table 1).

Strains capable of utilizing either or both of *n*-butanol and *iso*-butanol are found at a rate of 6.9% in *M. avium*, while those are found at a rate of 48.0% in *M. intracellulare* (Table 2). This great difference between the rates of these two organisms indicates that *M. avium* and *M. intracellulare* are different organisms. This character is considered to be useful, together with other characters reported until now, for differentiation of these organisms, especially for those growing at 45°C.

2. Correlation of utilization of butanols with growth temperature in *M. intracellulare*

The strains of this organism, which are able to grow at 37°C but unable to grow at 45°C, do not utilize usually *n*-butanol and *iso*-butanol (Table 1). On the other hand, the strains of this organism, which are able to grow at 45°C, usually are able to utilize both *n*-butanol and *iso*-butanol (Table 1). Therefore, the utilization of butanols is, to some extent, correlated with growth temperature.

3. Comparison of Japan isolates and U. S. A. isolates of *M. intracellulare*

Previously, the present authors²⁷⁾²⁸⁾ did not find any significant difference between Japan isolates and U. S. A. isolates of *M. intracellulare*. However, it was found that these are different with respect to the utilization of butanols. Ca. 51% of the Japan isolates could grow at 45°C and utilize both butanols, while only 5% of the U. S. A. isolates could do the same (Table 3).

79.5% of the U. S. A. isolates could grow at 37°C and utilize neither *n*-butanol nor *iso*-butanol, whereas 50.9% of the Japan isolates could grow at 45°C and did utilize both butanols (Table 3). Furthermore, it was shown that 71.5% of the Japan isolates utilized either or both of *n*-butanol and *iso*-butanol, while only 10.2% of the U. S. A. isolated could do the same (Table 4). This finding suggests that the Japan isolates and the U. S. A. isolates are slightly different from each other, though it is sure that both belongs to the same species.

緒 言

抗酸菌による炭水化物の発育への利用については、ふるくから多くの研究がある^{1)~11)}。しかし、それが抗酸菌の分類・同定に使用されるようになったのは比較的最近のことである^{12)~25)}。

抗酸菌のC源についての重要な所見の一つは、Long¹⁾²⁾によつて迅速発育性抗酸菌 (rapid-growing mycobacteria) が単一アミノ酸を同時にN源およびC源として利用することである。すなわち、ある種の抗酸菌は、炭水化物を添加しなくても、アミノ酸を分解して、そのNH₂

基をN源とし、そのカルボン酸をC源として発育する。したがつて、以後、抗酸菌の炭水化物利用の研究は、NH₃性N源を使用して行なわれてきた。また、最近、迅速抗酸菌が上述のアミノ酸だけでなく、アミドおよびアミンを分解して同時にN源およびC源として利用することも見出され、この利用パターンが同定に利用された²⁰⁾²¹⁾。

最近の抗酸菌のC源利用の研究は、主として迅速発育性抗酸菌に関するものであつて^{12)~20)}、遅発育性抗酸菌 (slow-growing mycobacteria) に関するものはきわめて少ない^{22)~24)}。

一般に、遅発育性抗酸菌（病源性抗酸菌の大部分はこれに入る）に関しては、分類・同定の方法が十分確立されておらず、向後、遅発育性抗酸菌を区分する有用な方法が積み重ねられることが望まれる。われわれは、この目的で種々の炭水化物のC源利用について研究を続けてきたが、最近、*n*-butanolおよび*iso*-butanolの利用が、*M. avium*と*M. intracellulare*の区別に役立つことが分かったので報告する。また、*M. intracellulare*の感染症は、非定型抗酸菌感染症の中で最も高頻度に見出されるものであるが、この菌の日本分離株と米国分離株との間に若干性状の差があることが見出されたのであわせ

て報告する。

方 法

n-Butanol および *iso*-butanol の C 源としての利用は、既報の方法²⁰⁾によった。すなわち、基礎培地としては、次の組成の培地を用いた。(NH₄)₂SO₄, 2.64 g; KH₂PO₄, 0.5 g; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g; 精製寒天, 20.0 g; 蒸留水, 1,000 ml。これを 10% KOH で pH 7.0 に修正し、170×17 mm の試験管に 8 ml ずつ分注し、100°C 15 分ずつ 2 日間滅菌した。*n*-butanol 培地および *iso*-butanol 培地は、上記の基礎培地に、*n*-butanol

Table 1. Growth Temperature and Utilization of Butanols as Sole Carbon Source for Growth by *Mycobacterium Avium* and *Mycobacterium Intracellulare*

Species	Growth temperature*	Number of strains showing positive feature (%)			
		Utilization of butanol (B) as sole carbon source			
		<i>n</i> -B (-) <i>iso</i> -B (-)	<i>n</i> -B (+) <i>iso</i> -B (-)	<i>n</i> -B (-) <i>iso</i> -B (+)	<i>n</i> -B (+) <i>iso</i> -B (+)
<i>M. avium</i>	37°C	7 (87.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (12.5%)
	45°C	20 (95.2%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (4.8%)
<i>M. intracellulare</i>	37°C	45 (80.3%)	2 (3.6%)	1 (1.8%)	8 (14.3%)
	45°C	8 (17.4%)	4 (8.7%)	0 (0.0%)	34 (73.9%)

* Growth temperature was tested at 28°C, 37°C, 45°C and 52°C.

M. avium

(A) Growth at 37°C but not at 45°C.

(1) Neither *n*-butanol nor *iso*-butanol utilized.

ATCC 15976, ATCC 17938, ATCC 19174, Av-59A-479, SA-16, W-297 and W-300.

(2) Both *n*-butanol and *iso*-butanol utilized.

ATCC 17940.

(B) Growth at 45°C.

(1) Neither *n*-butanol nor *iso*-butanol utilized.

ATCC 15759, ATCC 15773, ATCC 15977, ATCC 17941, ATCC 17942, ATCC 17944, ATCC 19075, A-71, #3717, #4110, #4121, #11755, Kirchberg, Flamingo, Nagoya-59, Nagoya-389, Jueki, Sheard, G and MLG.

(2) Both *n*-butanol and *iso*-butanol utilized.

ATCC 17939.

M. intracellulare

(A) Growth at 37°C but not at 45°C.

(1) Neither *n*-butanol nor *iso*-butanol utilized.

ATCC 15985 (P-44), ATCC 15982, ATCC 15983 (P-36), ATCC 15984, ATCC 15986 (P-51), ATCC 19076, ATCC 19157, ATCC 19158, ATCC 19159, ATCC 19175, ATCC 19177, ATCC 19178, ATCC 19179, P-40, P-41, P-42, P-48, P-51, N 13616, N 121326, CDC-194, CDC-196, CDC-355, CDC-372, CDC-373, P-54, CDC-380, CDC-384, CDC-386, CDC-391, NJ-9 (Iijima), NJ-18 (Saito), NJ-21 (Okayama), NJ-22 (Kurosawa), NJ-24 (Saito), Uchida, Kawamori, Sasaki, Hitomi and Sasakawa.

(2) Only *n*-butanol utilized.

NJ-12 (Chikaoka) and NJ-13 (Hashimoto).

(3) Only *iso*-butanol utilized.

Tanaka-S.

(4) Both *n*-butanol and *iso*-butanol utilized.

NJ-7 (Hatsuno), Yoshida, Mochizuki, Hakamada, Ashizawa, Shibahara, Ishida and ATCC 19176.

(B) Growth at 45°C.

(1) Neither *n*-butanol nor *iso*-butanol utilized.

ATCC 19077, ATCC 19174, P-7, P-23, NJ-2 (Tagami), Terai, Tanaka-Y and Gamoh.

(2) Only *n*-butanol utilized.

P-25, Kanayubi, Kita and Matsuoka.

(3) Only *iso*-butanol utilized.

None.

(4) Both *n*-butanol and *iso*-butanol utilized.

ATCC 19078, CDC-377, NJ-6 (Suhara), NJ-8 (Minamisawa), NJ-10 (Onari), NJ-14 (Mitsui), NJ-15 (Shimamoto), NJ-16 (Saito), NJ-17 (Sakatani), NJ-19 (Yamaki), NJ-20 (Matsubara), Wakamatsu, Chikira, Kekkai, Shirokashi, Ichihara, Suzuki, Hasegawa, Niikura, Iwai, Kamise, Kawashima, Waseda, Murai, Miyatake, Takagi, Ishida (#4390), Yauchi, Wachi, Minobe, Takao, Matsui, Saito (#4453), and Oka.

または iso-butanol をそれぞれ 0.1 M (7.4 ml/liter) の割合に添加したものである。

上記 3 本の培地を 1 組として、これに 1% 小川培地に発育した被検菌 (4 週培養) を 1 白金耳ずつ塗抹接種し、ゴム栓を施し、37°C に 4 週培養後、n-butanol 培地および iso-butanol 培地の発育を基礎培地と比較して判定した。基礎培地には発育は認められない。

成績は、同一実験を 3 回繰り返して、2 回または 3 回 (+) または (-) と判定された場合、それぞれ (+) または (-) と決定した。再現性 (3 回とも同一成績を与えた菌株数の %) は、*M. avium* で 100%, *M. intracellulare* で 91% であった。

使用した菌株は表 1 に記載したが、ATCC 番号のものは、American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U. S. A. から直接受領したもの、CDC 番号のものは、Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, U. S. A. の Dr. G. P. Kubica (現在 Trudeau Institute) の菌株で、広島大学斉藤博士から受領した。NJ 番号のものは、日本で非定型抗酸菌症として登録された症例の菌株で名古屋大学山本正彦博士によって集められたものである。また、ATCC 由来以外の *M. avium* は、九州大学武谷健二教授、東北大学今野淳博士、家畜衛生研究所根本久博士から分与された。患者名のみで示した *M. intracellulare* の大部分は、国立療養所非定型抗酸菌研究班を通じて筆者が同定したものである。

実験結果および考察

1. *M. avium* と *M. intracellulare* の区別

M. avium の大部分、(21/29)=72.5%, は 45°C に発育する。そして 2 株の例外を除いてほとんど全部、(27/29)=93.0%, が n-butanol および iso-butanol を利用しない。45°C に発育する株のみについてみても、(20/21)=95.2% は n-butanol および iso-butanol をともに利用しない。(表 1)

Table 2. Comparison between *Mycobacterium Avium* and *Mycobacterium Intracellulare* in Respect of Utilization of Butanols

Species	Number of strains utilizing neither n-butanol nor iso-butanol	Number of strains utilizing either or both of n-butanol and iso-butanol
<i>M. avium</i>	27	2
<i>M. intracellulare</i>	53	49

Ratio of strains utilizing either or both of n-butanol and iso-butanol is 6.9% (2/29) in *M. avium* and is 48.0% (49/102) in *M. intracellulare*. A significant difference is found between them ($\chi^2=14.4$, P is less than 0.1%).

これに対して、*M. intracellulare* では、その 45.0% (46/102) が 45°C に発育し、45°C 発育菌株の大部分、(34/46)=73.9%, が n-butanol および iso-butanol を利用する。(表 1)

また、*M. avium* および *M. intracellulare* 全体について比較してみても、*M. avium* で n-butanol および iso-butanol を利用するものはまれで、一方、*M. intracellulare* では利用するものが多い。(表 2)

以上の結果から次のことがいえる。

(1) *M. avium* の大部分は 45°C に発育する。一方、*M. intracellulare* では 45°C に発育する菌と 37°C に発育する菌 (45°C には発育しない) とはほぼ半数ずつである。したがって、37°C しか発育しない菌は *M. intracellulare* である可能性が高い。しかし、37°C 発育菌は、*M. avium* も *M. intracellulare* も n-butanol および iso-butanol を利用しない場合が多いので、これによつて両者を区別することは困難である。

(2) 45°C 発育菌については、*M. avium* はほとんど全部が n-butanol および iso-butanol をともに利用しないのに対して、*M. intracellulare* は通常 n-butanol および iso-butanol の両方または一方を利用する。したがって、n-butanol および iso-butanol の利用の有無によつて両者を区別できる。

2. *M. intracellulare* の 2 亜型

表 3 に、*M. intracellulare* の日本分離株と米国分離株

Table 3. Comparison between Japan Isolates and the United States Isolates of *Mycobacterium Intracellulare*

	Growth temperature*	Number of strains showing positive feature (%)			
		Utilization of butanols (B) as sole carbon source			
		n-B (-) iso-B (-)	n-B (+) iso-B (-)	n-B (-) iso-B (+)	n-B (+) iso-B (+)
Japan isolates	37°C	14 (22.2%)	2 (3.2%)	1 (1.6%)	7 (11.1%)
	45°C	4 (6.3%)	3 (4.7%)	0 (0.0%)	32 (50.9%)
U. S. A. isolates	37°C	31 (79.5%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	1 (2.6%)
	45°C	4 (10.2%)	1 (2.6%)	0 (0.0%)	2 (5.1%)

* The highest temperature at which the organism can grow. Tested at 28°C, 37°C, 45°C and 52°C.

Remark. Total number of strains: Japan isolates, 63; U. S. A. isolates, 39.

It is noted that 50.9% of the Japan isolates are able to utilize both n-butanol and iso-butanol, but only 5.1% of the U. S. A. isolates can utilize both butanols.

を分けて、発育温度と *n*-butanol および *iso*-butanol 利用能を示した。日本株および米国株を通じて 37°C 発育菌は *n*-butanol および *iso*-butanol を利用しないものが多く、一方、45°C 発育菌は両者を利用するものが多い。この所見は、発育温度域と *n*-butanol および *iso*-butanol 利用能とがある程度相関関係にあることを示唆するもので、*M. intracellulare* にも 2 つの亜型があるのではないかと想像される。しかし、現段階の成績で決定的なことはいえないのはもちろんで、向後、この問題について検討されることが望ましい。

3. *M. intracellulare* の日本分離株と米国分離株の比較

前に筆者など^{27,28}は *M. intracellulare* の日本分離株と米国外分離株を比較して、両者に差を見出しえないことを報告したが、今回の研究で若干差があることが見出された。

表3にみるごとく、日本分離株では 37°C 発育株は 38.1% (24/63)、45°C 発育株は 61.9% (39/63) で、45°C 発育株のほうが多い。しかも、米国外分離株では 37°C 発育株が 82.1% (32/39)、45°C 発育株が 17.9% (7/39) で、37°C しか発育しない株が著しく多い。(表3)

この発育温度と関連していると思われるが、日本株では 50.9% が 45°C に発育し、しかも *n*-butanol および *iso*-butanol を利用する。一方、米国外株では、このような株はわずか 5.1% しかない。すなわち、この比は 10:1 に近い。

また、発育温度に関係なく、*n*-butanol および *iso*-butanol の利用能についてみても、この両者または一方を利用する菌株の比率は、日本株では 71.5% であるのに対して、米国外株では 10.2% にすぎない(表4)。すなわち、この比は約 7:1 と格段の差がある。

以上の所見は、日本分離株と米国外分離株の間に、ある程度、性状の差があることを示している。

Table 4. Comparison between the Japan Isolates and the United States Isolates *Mycobacterium Intracellulare*

	Japan isolates	U.S.A. isolates
Number of strains utilizing neither <i>n</i> -butanol nor <i>iso</i> -butanol	18	35
Number of strains utilizing either or both of <i>n</i> -butanol and <i>iso</i> -butanol	45	4
Total	63	39

Ratio of strains utilizing either or both of *n*-butanol and *iso*-butanol is 71.5% (45/63) in the Japan isolates, and is 10.2% (4/39) in the U. S. A. isolates. This difference is highly significant ($\chi^2=35.5$, P is less than 0.1%).

結 論

1. *M. avium* は大部分が 45°C に発育し、通常 *n*-

butanol および *iso*-butanol を C 源として利用しない。一方、*M. intracellulare* で 45°C に発育するものは、その大部分が *n*-butanol および *iso*-butanol を利用する。すなわち、45°C に発育可能な *M. avium* と *M. intracellulare* とは、*n*-butanol および *iso*-butanol の利用能の有無によつて区別できる。

2. *M. intracellulare* における *n*-butanol および *iso*-butanol の利用能と発育温度域とは、ある程度関係があるように思われる。37°C にしか発育しない菌は *n*-butanol および *iso*-butanol を利用しないことが多く、45°C に発育可能な菌の大部分が両者を利用できる。

3. *M. intracellulare* の日本分離株では、45°C に発育できるものが多く、同時に *n*-butanol および *iso*-butanol を利用するものが多い。一方、米国外分離株では、37°C にしか発育しないものが大部分で、かつ *n*-butanol および *iso*-butanol を利用しないものが多い。すなわち、日本分離株と米国外分離株の間には若干の性状の差がある。

文 献

- 1) Long, E. R.: Amer. Rev. Tuberc., 3: 86, 1920.
- 2) Long, E. R.: Amer. Rev. Tuberc., 5: 857, 1922.
- 3) Braun, H., Stamatelakis, A. and Kondo, S.: Biochem. Z., 145: 381, 1924.
- 4) Kondo, S.: Biochem. Z., 153: 302, 1924.
- 5) Kondo, S.: Biochem. Z., 155: 148, 1925.
- 6) Merrill, M. H.: J. Bacteriol., 21: 361, 1931.
- 7) Thomson, H. M.: Amer. Rev. Tuberc., 26: 162, 1932.
- 8) Gordon, R. E.: J. Bact., 34: 617, 1937.
- 9) Gordon, R. E. and Hagan, W. A.: J. Bact., 36: 39, 1938.
- 10) Wells, H. G. and Long, E. R.: The Chemistry of Tuberculosis, 2nd ed., The Williams & Wilkins, Baltimore, p. 24, 1932.
- 11) Long, E. R.: The Chemistry and Chemotherapy of Tuberculosis, 3rd ed., The Williams & Wilkins, Baltimore, p. 71, 1958.
- 12) Gordon, R. E. and Smith, M. M.: J. Bact., 66: 41, 1953.
- 13) Gordon, R. E. and Smith, M. M.: J. Bact., 69: 502, 1955.
- 14) Gordon, R. E. and Mihm, J. M.: J. Gen. Microbiol., 21: 736, 1959.
- 15) Bojalil, L. F., Cerbón, J. and Trujillo, A.: J. Gen. Microbiol., 28: 333, 1962.
- 16) Bojalil, L. F. and Cerbón, J.: J. Bact., 81: 338, 1961.
- 17) Cerbón, J. and Bojalil, L. F.: J. Gen. Microbiol., 25: 7, 1961.
- 18) Cerbón, J. and Trujillo, A.: Amer. Rev. Resp. Dis., 88: 546, 1963.
- 19) Tsukamura, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94:

- 796, 1966.
- 20) Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol., 45: 253, 1966.
- 21) Tsukamura, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 95: 307, 1967.
- 22) Tsukamura, M.: Tubercle, 48: 311, 1967.
- 23) Tsukamura, S., Mizuno, S. and Tsukamura, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96: 529, 1967.
- 24) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 96: 512, 1967.
- 25) Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 12: 534, 1968.
- 26) Runyon, E. H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 95: 861, 1967.
- 27) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄: 結核, 42: 49, 昭 42.
- 28) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄: 結核, 42: 105, 昭 42.