

原 著

Mycobacterium intracellulare の中で特異な性状を示す
“Marks 株” についての研究

付. *M. intracellulare* と *M. scrofulaceum* の関係について

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

斉 藤 肇

島根医科大学微生物学・免疫学教室

山 岡 弘 二

広島大学医学部細菌学教室

受付 昭和 51 年 5 月 4 日

STUDIES ON 'MARKS' STRAINS WHICH SHOW SEVERAL UNUSUAL
CHARACTERISTICS AMONG *MYCOBACTERIUM INTRACELLULARE*

—Some Observations on the Relationship between *M. intracellulare*
and *M. scrofulaceum*—

Michio TSUKAMURA*, Hajime SAITO and Koji YAMAOKA

(Received for publication May 4, 1976)

A taxonomic study was carried out on ten 'Marks' strains which had been named as 'Provisional species 1' by Birm et al. (J. Hyg., 65 : 575, 1967) and later were identified as *M. intracellulare* (Marks' personal communication). Numerical classification was carried out using 88 characters (Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bact., 25 : 329, 1975), of which 28 characters were effective for differentiation of test strains, 'Marks' strains, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and *M. gordonae*. Serotyping was made according to the method of Saito and Kubica (Amer. Rev. Resp. Dis., 98 : 47, 1968).

1. 'Marks' strains.

The 'Marks' strains formed a cluster together with some strains of *M. intracellulare* and were considered as members of *M. intracellulare* (Figs. 1 and 2). Among this cluster, the 'Marks' strains formed a subcluster and could be differentiated from other *M. intracellulare* strains showing the following characteristics: (1) The 'Marks' strains grow at 45°C; (2) form wet, smooth, slightly yellow-pigmented, nonphotochromogenic colonies; (3) show a positive three day-arylsulfatase activity; (4) are sensitive to ethambutol (5 µg/ml) or, if any, partially resistant, while other *M. intracellulare* strains are resistant to this agent; (5) show a negative acid phosphatase activity; (6) do not belong to any known serotype of *M. avium*, *M. intracellulare* and *M. scrofulaceum*.

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 and Department of Microbiology and Immunology, Shimane Medical College, Izumo, Shimane 693 Japan.

2. Relationship between *M. intracellulare* and *M. scrofulaceum*.

M. intracellulare strains were shown to be relatively heterogeneous. Of 19 strains tested, 12 formed a cluster together with 'Marks' strains, 5 formed a cluster together with *M. scrofulaceum* strains, and 2 occupied an intermediate position between the above two clusters. It was noticed that some strains of *M. intracellulare* was closely related to *M. scrofulaceum*. Taxonomic position of *M. intracellulare* should be a subject of further studies.

1967年に、Birn, Schaefer, Jenkins, Szulga & Marks¹⁾ は、Group III²⁾ に属する病原株4株が、他の株と若干異なる性状と lipid pattern をもつことを観察し、これを "Provisional species 1" と呼んだ。この4株は、45°C に発育可能で、2週 arylsulfatase 陽性、cycloserine 感受性、ethionamide 耐性と記載され、一見通常の *M. intracellulare* と変わりばえがしないようにみえるが、特異な lipid pattern (pattern B) を示す故をもつて、他の株と区別されたという。今日、Marks (personal communication) は、これらの株をすべて *M. intracellulare*

と考えているが、この特異な lipid pattern B を示す株が、他の株と区別できる生物学的・生化学的性状を有するか否か検討するために、私共の許へ送られてきた。以下、この lipid pattern B を示す株を 'Marks 株' と呼ぶことにする。類似の株は、その後にも分離され、計10株が私共の所へ送られてきた。

実験方法

1. 菌株。Birn et al.¹⁾ がかつて "Provisional species 1" と呼んだ菌株すなわち 'Marks 株' は10株、それに

Table 1. List of Strains

Strain*	Name as received	Source	Clin. sig. **	Strain*	Name as received	Source	Clin. sig. **
E7741	M4130	man	+	13016	NJ 2 (IV) #	man	+
E7742	M10499	man	+	13019	NJ18 (Boone) #	man	+
E7743	M13444	man	+	13022	NJ16 (Arnold) #	man	+
E7744	M18730	man	-	13023	NJ 7 (Watson) #	man	+
E7745	M23774	man	+	13024	NJ 8	man	+
E7746	M24657	man	+	13032	NJ10 (Howell) #	man	+
E7747	M25356	man	+	13038	NJ 6 (Altman) #	man	+
E7748	M28659	sewage	-	13039	NJ17 (Altman) #	man	+
E7749	M28660	?	-	12002	P-6	man	+
E7750	M28661	bird	-	12004	SJ 8	man	+
E7954	A-1 (Davis) (a)	swine	+	12007	SJ 5	man	+
E7957	TS-H (IIIa) (a)	swine	+	12008	SJ 9	man	+
E7958	TS-L (IV) (a)	swine	+	12009	SJ13	man	+
E7959	TS-P (Davis) (a)	swine	+	12012	SJ 3	man	+
E7960	No. 6 (IV) (a)	swine	+	12014	SJ 1	man	+
E7961	No. 23 (IIIa) (a)	swine	+	12017	SJ12	man	+
13009	NJ9 (Yandle) #	man	+	12018	SJ14	man	+
13011	NJ3 (Yandle) #	man	+	12019	SJ15	man	+
13013	NJ1 (Altman) #	man	+	12020	SJ16	man	+
13014	N302	man	-	12016	SJ 6	man	+ ?
13015	N303	man	-				

* Strain number of the Culture Collection of the National Chubu Hospital, Obu, Aichi.

** Clinical significance in man or swine.

Serotype was determined by H. Nemoto, Animal Health Institute, Kodaira, Tokyo.

® Strains were received from Dr. K. Shimizu, Department of Microbiology, Obihiro Veterinary College, Obihiro, Hokkaido (Serotype was determined by K. Shimizu).

Strains with designation M were received from Dr. J. Marks, Tuberculosis Reference Laboratory, University Hospital of Wales, Heath Park, Cardiff, CF4 4XW, South Wales. Strains with designations NJ, SJ or N were received from Dr. M. Yamamoto, Department of Medicine, Medical School, Nagoya University, Nagoya.

Strain P-6 was received from Dr. K. Takeya, Department of Bacteriology, Medical School, Kyushu University, Fukuoka (the strain belonged to the collection of Dr. E. H. Runyon).

All strains were identified in the National Chubu Hospital (M. Tsukamura). As to the identification, refer to Figs. 1 and 2.

対照として使用した株が, *M. intracellulare* 19株 (人由来13株, 豚由来6株), *M. scrofulaceum* 11株, *M. gordonae* 1株である。したがって, 計41株を使用した。これらの株の由来を表1に示す。#12016株は, はじめ *M. scrofulaceum* と同定したが, 後に *M. gordonae* と再同定した。

2. 生物学的・生化学的性状。88性状について検査した。これらの性状の種類および検査法に関する文献は, 既報した³⁾。

3. 血清型。Saito & Kubica⁴⁾の方法に従って検査した。血清型の種類の呼称は, Schaefer⁵⁾の命名によつた。検査に用いた血清の種類は, 24種である。

(a) *M. avium*: Avium 1, Avium 2, Avium 3.

(b) *M. intracellulare*: IIIa, IIIb, IV, V, VI, VII; Howell, Chance, Altman, Darden, Yandle, Wilson, Davis, Watson, Boone, Dent, Arnold, 21.

(c) *M. scrofulaceum*: Scrofulaceum, Gause, Lunning.

4. 計数分類 (Numerical Classification)

前記の88性状の結果を+, -の符号で記入し, 次の式で matching coefficient (*M*-value) を計算した。

$$M(\%) = \{n_s / (n_s + n_d)\} \times 100\%$$

n_s は, 任意の2菌株の比較で, 同じ符号 (同じ結果) を示した性状の数, *n_d* は異なる符号を示した性状の数である。

本研究で対象とした菌株は, 近縁の菌種⁶⁾⁻⁸⁾のみであったため, ineffective characters が60 (positive match 15, negative match 45) に達し, effective characters は28となった。Clustering (dendrogram 作製) は single linkage 法⁹⁾によつた。

実験結果

1. 計数分類

計数分類の結果を, 図1および2として示す。図1は dendrogram, 図2は *M*-value table の図示である。

Dendrogram (図1) をみると, 'Marks 株' 10株, *M. intracellulare* 19株, *M. scrofulaceum* 11株の計40株は, a large cluster を形成し, *M. gordonae* と区別される。すなわち, この3者は互いに近縁で, *M. gordonae* のみは, これらと離れている。この40株の large cluster をA群と呼ぶことにする。このA群の中に, 更に2群BおよびCがみられる。この間に, B群にもC群にも入らない2株と (E7954 と E7960) がみられる。

B群は, 'Marks 株' 全部と *M. intracellulare* 12株の計22株よりなる。このB群の中で, 'Marks 株' は1株 (E7742) を除いて, 他は a small cluster を作っている。一方, *M. intracellulare* も12株中10株は, 他の small cluster を作っている。すなわち 'Marks 株' は *M. intracellulare* とともにB群を作り, 一応 *M. intra-*

cellulare の members と考えられるが, *M. intracellulare* の中でも, 他と区別される亜群を作っている。

C群は, *M. scrofulaceum* 11株の全部と *M. intracellulare* 5株からなりたつ。この中で, *M. scrofulaceum* は compact な small cluster となつている。このように, *M. scrofulaceum* はそれ自体, 他と区別される1群を作っているが, dendrogram 全体を通してみると, *M. intracellulare* の一部と密接に融合している。

2. 'Marks' 株と *M. intracellulare* の比較

上に述べたように, 'Marks' 株は, *M. intracellulare* の1群とともに cluster B (B群) を作るが, このB群の中に 'Marks' 株の sub-cluster がみられ (図1), *M. intracellulare* とある程度区別できると思われる。実際に, 'Marks' 株と通常の *M. intracellulare* を比較してみると, 表2に示す区別点がみられる。すなわち,

(1) 'Marks' 株は, 集落が平滑, 潤湿している点では *M. intracellulare* と同じであるが, 集落が淡黄色に着色している (計数分類の際は, この色の差は差異に数えてない)。この着色は, 通常の *M. intracellulare* にみられるクリーム色ではなく, はつきりとした黄色調である。

(2) 'Marks' 株は arylsulfatase 3日反応が (+) であ

Fig. 1. Dendrogram Prepared by Numerical Classification Using 88 Characters (28 effective characters)

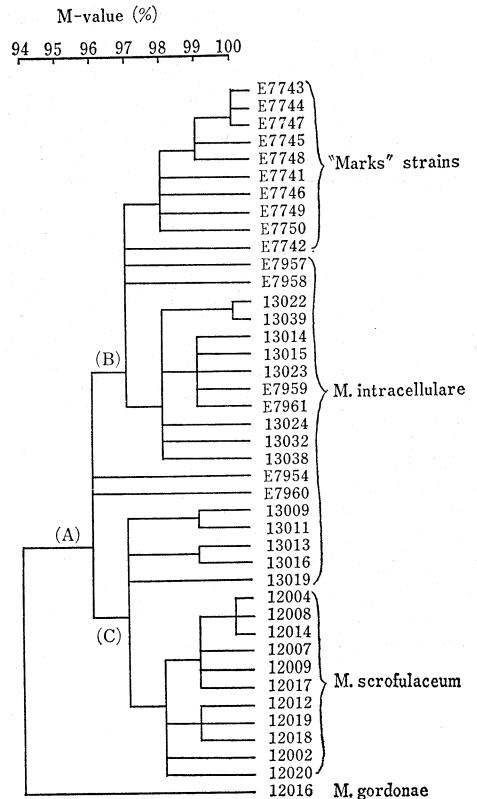


Fig.2. Schematic Representation of a *M*-value Table Prepared by Numerical Classification Using 88 Characters (28 effective characters)



- (a) 'Marks' strains: 1. E7743, 2. E7744, 3. E7747, 4. E7745, 5. E7748, 6. E7741, 7. E7746, 8. E7749, 9. E7750, 10. E7742.
- (b) *M. intracellulare*: 11. E7957, 12. E7958, 13. #13022, 14. #13039, 15. #13014, 16. #13015, 17. #13023, 18. E7959, 19. E7961, 20. #13024, 21. #13032, 22. #13038, 23. E7954, 24. E7960, 25. #13009, 26. #13011, 27. #13013, 28. #13016, 29. #13019.
- (c) *M. scrofulaceum*: 30. #12004, 31. #12008, 32. #12014, 33. #12007, 34. #12009, 35. #12017, 36. #12012, 37. #12019, 38. #12018, 39. #12002, 40. #12020.
- (d) *M. gordonae*: 41. #12016.

Table 2. Comparison of the Characters among 'Marks' Strains, *M. intracellulare* and *M. scrofulaceum*

Character	Number of strains showing the positive character		
	'Marks' strains	<i>M. intracellulare</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
Colony pigmentation in dark	0*	0	11
Acid phosphatase	1	18	11
Catalase (semiquantitative)	0	1	9
Three day-arylsulfatase	9	0	0
Two week-arylsulfatase	10	14	11
Urease	0	0	6
Nicotinamidase	0	11	0
Pyrazinamidase	0	11	0
Growth at 45°C	10	16	1
Glucose as C source (NH ₃ -N)	9	8	11
<i>n</i> -Butanol as C source (NH ₃ -N)	10	12	0
<i>iso</i> -Butanol as C source (NH ₃ -N)	9	11	0
Succinate as C source (glutamate-N)	0	12	10
Resistance to ethambutol (5 µg/ml)	2	19	11
Number of strains tested	10	19	11

* Slightly yellowish pigmented.

Table 3. Comparison of the Characters between *M. intracellulare* and *M. scrofulaceum*

Character	Number of strains showing the positive character			
	<i>M. intracellulare</i>			<i>M. scrofulaceum</i>
	Cluster B*	Intermediate*	Cluster C*	
Colony pigmentation in dark	0	0	0	11
Catalase (semiquantitative)	0	1	0	9
Growth at 45°C	12	2	2	1
Urease	0	0	0	6
Nicotinamidase	8	1	2	0
Pyrazinamidase	8	1	2	0
<i>n</i> -Butanol as C source (NH ₃ -N)	11	1	0	0
<i>iso</i> -Butanol as C source (NH ₃ -N)	10	1	0	0
Number of strains tested	12	2	5	11

* Grouping according to numerical classification (refer to Fig.1).

る。この点が、通常の *M. intracellulare* との著しい差異である。

(3) 'Marks' 株は ethambutol (5 μ g/ml) に感性的か、または少しく発育する程度の部分耐性を示す。これに対して、通常の *M. intracellulare* は完全耐性を示す。

(4) 'Marks' 株は、acid phosphatase(-)であるが、通常の *M. intracellulare* は(+)である。

(5) 'Marks' 株は、nicotinamidase および pyrazinamidase (-)であるが、*M. intracellulare* は通常(+)である。

3. 'Marks' 株の血清型

'Marks' 株10株は、既知の24種のいずれの血清型にも属さない。すなわち24種の血清のいずれとも凝集反応を起こさなかつた。

この結果は、Birn et al.¹⁾が E7744 (Marks 18730), E7745, (Marks 23774), E7746 (Marks 24657) がそれぞれ Boone 型, VI型, II+VI型であるとしているのと違った結果が得られた。これらの血清型は、いずれも通常の *M. intracellulare* にみられるものなので、既知のいずれの血清型にも入らないとする成績の方が、前述の 'Marks' 株の特異な性状とよく一致するように思われる。

4. *M. intracellulare* と *M. scrofulaceum* の比較

図1の dendrogram にみられるごとく、*M. intracellulare* 株が2群に分かれて、1群はB群に入り、他の群は *M. scrofulaceum* とともにC群を作つた。したがつてB群に入つた株とC群に入つた株を分けて、*M. scrofulaceum* の性状と比較した結果を表3に示す。

B群に入つた *M. intracellulare* の特徴は、45°Cに発育することと、*n*-および *iso*-butanols をC源として利用することである。これに反して、*M. scrofulaceum* と

ともにC群に入つた *M. intracellulare* の特徴は、この逆である(ただし、C群の *M. intracellulare* にも45°Cに発育するものがある)。

M. intracellulare と *M. scrofulaceum* の性状の比較は、もつと多くの株について論ずべきであるので、別報で取り扱うこととする。

計数分類の結果を、single linkageによつて dendrogram として表すときは、特定の株と株との偶然的な類似が群の相関関係を誇張して表す可能性があるもので、全体的な相関関係は、図2のごとき *M*-value table (図2では、みやすくするため図式化してある) で示す方が全体的な関係を正しく示すと思われる。

図2でみると、'Marks' 株と *M. scrofulaceum* とは compact な cluster を作つているのに対して、*M. intracellulare* は比較的不均一であることがわかる。これらの結果は、前に Tsukamura⁶⁾が指摘した結果と同じである(ただし、このときは、まだ *M. intracellulare* 菌種名が提唱されていなかったため、"non-photochromogens from human sources" として、現在の *M. intracellulare* を示している)。

考 察

1. 'Marks' 株の分類学的地位

計数分類の結果をみると、まず、dendrogram (図1) で 'Marks' 株は、*M. intracellulare* とともに one cluster (B群)を作るので、一応 *M. intracellulare* の中に入れるべきであると思われる。しかし、図1にみるように、B群の中で、'Marks' 株は a subcluster になつているし、また図2の *M*-value table をみても1つの compact な集団となつている。したがつて、'Marks' 株は、*M. intracellulare* の中の1つの亜型 (a distinct subgroup)

であると思われる。‘Marks’ 株が特異な group であることは、血清学的に既知のいずれの血清型にも属さないという結果からも支持される。

2. *M. intracellulare* と *M. scrofulaceum* の関係についての分類学的考察

図1の dendrogram をみても、また図2の *M*-value table をみても、*M. scrofulaceum* は compact な cluster となっており、比較的均一な集団であるとみなしうる。問題は、*M. intracellulare* で、この研究で使用した19株の行方をみても、12株は‘Marks’ 株とともにB群を作り、5株は *M. scrofulaceum* とともにC群を作り、2株はB, C群の中間的存在であるように思われる(図1)。*M*-value table (図2) でも *M. intracellulare* は *M. scrofulaceum* ほど均一ではない。計数分類の結果でみる限りでは、*M. intracellulare* の一部は、他の *M. intracellulare* の株よりも、むしろ *M. scrofulaceum* に似ていることになる。このC群に入つた株は、いかなる点で *M. scrofulaceum* に似ているのであろうか。表3に示したように、C群の *M. intracellulare* と *M. scrofulaceum* の相違点は、主として集落色素の有無と catalase 活性の強弱にあり、他の点では、全体として互いに似ているのである。C群の *M. intracellulare* と他の *M. intracellulare* の相違点は、主として45°Cの発育の有無と butanols のC源としての利用能にある(表3)。

元々、*M. intracellulare* (かつての病原性 Group III) が、あまり均一な性状を示さないことは、前に Tsukamura⁶⁾ によつて指摘され、後に東村・水野¹⁰⁾ によつて45°C発育の有無と butanols 利用によつて大まかに2群に分けられることが報告されている。この所見が、本報の結果によつても支持された。

世界各地で分離された *M. intracellulare* が地域により性状の差を示すことも興味がある。東村・水野¹⁰⁾ は、米国株に45°Cに発育しないものが多いことを観察しているが、アフリカの Rhodesia で分離された株も米国株に近い¹¹⁾。Birn et al.¹⁾ も英国で分離された株の大部分が45°Cに発育しないことを認め、45°Cに発育する‘Marks’ 株をむしろ特殊なものとしてみている。これに反して、日本株では、むしろ45°Cに発育できる方が普通である¹⁰⁻¹²⁾。このような地理的な差異は、血清型についても¹³⁾、また rifampicin 感受性についても認められる¹⁴⁾。

M. intracellulare を45°Cの発育の有無で2群に分けても、他の性状と関連がなければ無意味であるが、45°Cの発育は butanols の利用能と相関している点に意義がある¹⁰⁾。*M. scrofulaceum* は通常45°Cに発育しないが、butanols も利用しない。この点は、*M. intracellulare* の37°C発育株とよく似ている。*M. scrofulaceum* と *M. intracellulare* の45°C(-)株との性状は、実際よく似

ており、集落色素の有無と catalase 活性の有無でしか区別されない。*M. scrofulaceum* に紫外線を照射すると容易に nonphotochromogenic な株が得られる¹⁵⁾、また catalase 活性の強い *M. intracellulare* もまれにみられる¹⁶⁾。このようにみると、*M. intracellulare* と *M. scrofulaceum* は本当に分類学的に明確に区別される2菌種かどうか疑わしいように思われる。果たしてそうであろうか。この問題は、将来解明されねばならぬ問題である。可能性としては、(1) *M. intracellulare* が2群に分かれて、*M. avium* 近似株と *M. scrofulaceum* 近似株とに分かれる、(2) *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* を合して a species または a series とみるということが考えられる。後者を支持する所見は、以前に発表されているが¹⁷⁾¹⁸⁾、これからの興味ある研究課題の1つである。

結 論

1. ‘Marks’ 株は、*M. intracellulare* に属すると考えられるが、*M. intracellulare* の中で、かなり明瞭な1亜群を作る。‘Marks’ 株は、次の点で、他の *M. intracellulare* と区別される。(1) 45°Cに発育する；(2) 集落が淡黄色に着色している；(3) arylsulfatase 3日反応が(+)である；(4) ethambutol (5 μ g/ml) 感性であるか、耐性であつても部分耐性で、完全耐性の他の株と区別される；(5) acid phosphatase(-)である；(6) 既知のいずれの血清型にも属さない。

2. *M. intracellulare* の菌株は比較的不均一で、本研究で使用した被検株の大部分は、計数分類で、‘Marks’ 株とともに1群を作つたが、一部は *M. scrofulaceum* とともに他の群を作つた。少数は、両者の中間に位した。

文 献

- 1) Birn, K.J., Schaefer, W.B., Jenkins, P.A., Szulga, T. and Marks, J.: J. Hyg., 65: 575, 1967.
- 2) Runyon, E.H.: Med. Clin. North Amer., 43: 273, 1959.
- 3) Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bact., 25: 329, 1975.
- 4) Saito, H. and Kubica, G.P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 98: 47, 1968.
- 5) Schaefer, W.B.: Amer. Rev. Resp. Dis., 92(part 2): 85, 1965.
- 6) Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol., 45: 253, 1966.
- 7) Tsukamura, M.: Tubercle, 48: 311, 1967.
- 8) Tsukamura, M.: Tubercle, 50: 51, 1969.
- 9) Sokal, R.R. and Sneath, P.H.A.: Principles of Numerical Taxonomy, W.H. Freeman and Co., San Francisco and London, pp.1~359, 1963.
- 10) 東村道雄・水野松司: 結核, 46: 197, 1971.
- 11) Tsukamura, M., Gane, N.F.F., Mills, A. and King, L.: Tubercle, 53: 205, 1972.

- 12) King, L. · 東村道雄 : 結核, 50 : 131, 1975.
- 13) Nemoto, H., Yugi, H. and Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 19 : 69, 1975.
- 14) Tsukamura, M.: Jap. J. Microbiol., 16 : 444, 1972.
- 15) Tsukamura, S.: Jap. J. Tuberc., 12 : 1. 1963.
- 16) 東村道雄 · 水野松司 : 医学と生物学, 87 : 375, 1973.
- 17) Tsukamura, M, Mizuno, S. and Tsukamura, S.: Amer. Rev. Resp. Dis., 99 : 299, 1969.
- 18) Marks, J., Jenkins, P. A. and Schaefer, W.B.: Tubercle, 52 : 219, 1971.