

原 著

³⁵S-Methionine 摂取後の薄層クロマトグラフィーからみた
Mycobacterium avium, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*
 および *M. gordonae* の関係

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和 52 年 6 月 27 日

RELATIONSHIP AMONG *MYCOBACTERIUM AVIUM*, *M. INTRACELLULARE*,
M. SCROFULACEUM, AND *M. GORDONAE* OBSERVED BY THIN-LAYER
 CHROMATOGRAPHY OF LIPIDS AFTER UPTAKE OF ³⁵S-METHIONINE

Michio TSUKAMURA* and Shoji MIZUNO

(Received for publication June 27, 1977)

Previously, the present authors¹⁾ observed that mycobacterial species showed various patterns of the distribution of radioactive spots in thin-layer chromatography of lipids after uptake of ³⁵S-methionine. The majority of the species showed their unique patterns for the species. However, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, and *M. flavescens* showed two or more patterns. Further studies on *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and *M. gordonae* showed that these organisms shared the same patterns, and that the patterns of the former three were found in those of *M. gordonae*.

A total of 105 strains of slowly growing mycobacterial species were tested. These are as follows: *M. tuberculosis* (5 strains), #05001 (H₃₇Rv), #05002 (Aoyama-B); #05003 (Frankfurt); #05009; #05037; *M. bovis* (5 strains), #06001 (Ravenel); #06002 (Denken); #06003 (BCG); #06005 (D-4); #06006; *M. kansasii* (5 strains), #07001 to #07005; *M. marinum* (5 strains), #08002 to #08006; *M. gastri* (5 strains), #25001 to #25005; *M. nonchromogenicum* (5 strains), #09001 to #09003; #09023; #09033; *M. novum* (5 strains), #24018 to #24022. These strains were tested in comparison with the strains of *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and *M. gordonae*, which are shown in Table 1.

The method used is described in the previous paper¹⁾. ³⁵S-L-methionine was a product of the New England Nuclear Co., Boston, U.S.A. Its specific activity was 390.0 mCi/m mol.

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. novum*, and *M. gastri* showed single patterns (Fig. 1). The pattern of *M. bovis* was equal to the pattern of *M. tuberculosis*.

M. avium also showed single pattern (Table 1 and Fig. 2). In contrast to the above species, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and *M. gordonae* showed various patterns (Table 1 and Fig. 2). The patterns of *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum* could be observed in the patterns of *M. gordonae*.

* Request for reprints should be addressed to Dr. M. Tsukamura, the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Main pattern of *M. avium* was type A (and A'), patterns of *M. intracellulare* A', B, and C, those of *M. scrofulaceum* E (and D), and those of *M. gordonae* A, B, B', D, and E (Fig. 2 and Table 1). However, a little overlaps were observed among these species, and the patterns of *M. gordonae* contained all (Table 1).

The finding suggests, in accordance with our previous report²⁾, that these four species may phylogenically be closely related to each other and the pathogens, *M. avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum* may be originated from a non-pathogen *M. gordonae*.

Reference

- (1) Tsukamura, M. and Mizuno, S. 1975. Differentiation among mycobacterial species by thin-layer chromatography. *Int. J. Syst. Bact.*, 25: 271~280.
- (2) Tsukamura, M. 1976. Numerical classification of slowly growing mycobacteria. *Int. J. Syst. Bact.*, 26: 409~420.

前にTsukamura and Mizuno¹⁾は、³⁵S-methionine とりこみ後に、抗酸菌の脂質の薄層クロマト (thin-layer chromatography) を行ない、その放射性スポットの分布が菌種によつて種々のパターンを示すことを観察した。大部分の菌種では、菌種特有のパターンがみられたが、*Mycobacterium scrofulaceum*, *M. gordonae* および *M. flavescens* では菌株により異なる2つ以上のパターンがみられた。その後、*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* および *M. gordonae* のパターンについて観察を続けたところ、*M. gordonae* が菌株によつて異なる最も多くの異なるパターンを示し、前3者の示すパターンは *M. gordonae* のこれらパターンに含まれることがわかつたので報告する。

実験材料および方法

被検株は遅発育性抗酸菌の105株で次の菌種である。*M. tuberculosis*, 5株 (#05001 (H₃₇Rv), #05002 (青山B), #05003 (Frankfurt), #05009, #05037); *M. bovis*, 5株 (#06001 (Ravenel), #06002 (伝研), #06003 (BCG), #06005 (D-4), #06006); *M. kansasii*, 5株 (#07001~#07005); *M. marinum*, 5株 (#08002~#08006); *M. gastri*, 5株 (#25001~#25005); *M. nonchromogenicum*, 5株 (#09001~#09003, #09023, #09033); *M. novum*, 5株 (#24018~#24022); *M. avium*, 10株 (表1参照); *M. intracellulare*, 15株 (表1参照); *M. scrofulaceum*, 16株 (表1参照); *M. gordonae*, 29株 (表1参照)。

実験方法は前報¹⁾と同じであるが、以下簡単に記述する。被検株は1%小川培地に2週間培養し、集落を集めて生理食塩水で3回洗浄した。反応系は5 μCi/ml ³⁵S-L-methionine および 10 μg/ml sodium acetate を含む M/15 磷酸緩衝液 (pH7.1) 2.0 ml に被検菌 (湿菌量) 100 mg を浮遊させ、37°C で24時間培養して³⁵S-L-methionine をとりこませた。培養後、遠心して菌を集め、5 ml の

冷蒸留水で2回洗浄し、次いで2 ml の10%三塩化酢酸で2回抽出した。次に菌体を3 ml の ethyl ether-ethanol (1:1) 混液で10分ずつ2回抽出した。2回の ethyl ether-ethanol 抽出液を合わせて減圧濃縮し、0.1 ml とし、これを薄層クロマトに使用した。

薄層クロマトは Silica Gel H (Merck, Darmstadt, ドイツ) を使用し、20×20 cm, 厚さ 0.25 ml の薄層とし、溶媒 *n*-propanol-*n*-butanol-水-アンモニア (50:20:20:3, 容積) で展開した。薄層クロマトの放射能の測定、記録は、日本無線製薄層クロマト・スキャナーによつた。記録条件は、走行速度 300 mm/hour, 記録速度 150 mm/hour, slit 6×30 mm, range 1,000 counts/30 seconds で行なつた。³⁵S-L-methionine は、New England Nuclear Co., Boston, U.S.A. (比放射能, 390.0 mCi/m mol) を用いた。

実験成績および考察

M. tuberculosis, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. novum* および *M. gastri* に属する各菌株は、それぞれ各菌種に特有な単一のパターンを示した (図1)。ただし、*M. tuberculosis* と *M. bovis* のパターンは同一であり、区別できなかった。

M. avium も10株全部がほとんど同一パターンを示した (図2および表1)。これに対して、*M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* および *M. gordonae* では同一菌種でも菌株により異なる複数のパターンを示した (図2および表1)。*M. intracellulare* と *M. scrofulaceum* のパターンは一部互いに重複し、*M. gordonae* 全菌株についてのパターンには *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. scrofulaceum* にみられるパターンがほとんど全部みられた (表1)。

M. avium, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* のパターンは少しずつ違いが、互いに重複があり、これらの

Table 1. Pattern of Distribution of Radioactive Spots in Thin-layer Chromatograms of *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and *M. gordonae*

Pattern	<i>M. avium</i> 10 strains	<i>M. intracellulare</i> 15 strains	<i>M. scrofulaceum</i> 16 strains	<i>M. gordonae</i> 29 strains
A	#11016 #11017 #11018 #11019 #11020 #11021 #11023 #11026	#13024	#12340	T-12104 T-12180 #12016
A'	#11002 #11022	#13085 #13893 #13540 #13543	#12327	
B		#13033 #13080 #13542 #13891		T-12365 T-12357 T-12353
B'		#13890	#12329	T-12367 T-12361 T-12366 T-12303 T-12300 T-12299
C		#13022 #13032 #13038	#12323	T-12109
D		#13021 #13086	#12002 #12107	T-12103 T-12178 T-12179 T-12354 T-12302
E			#12012 #12320 #12321 #12322 #12327 #12330 #12328 #12003 #12004 #36001	T-12110 T-12177 T-12307 T-12308 T-12362 T-12363 T-12301 T-12356 T-12360 T-12358
F				T-12355

Refer to Fig. 2.

A' lacks a prominent spot at *Rf* 1.00 of pattern A. Accordingly, the pattern A' does not show any marked radioactive spot.

B' lacks a prominent spot at *Rf* 1.00 of pattern B.

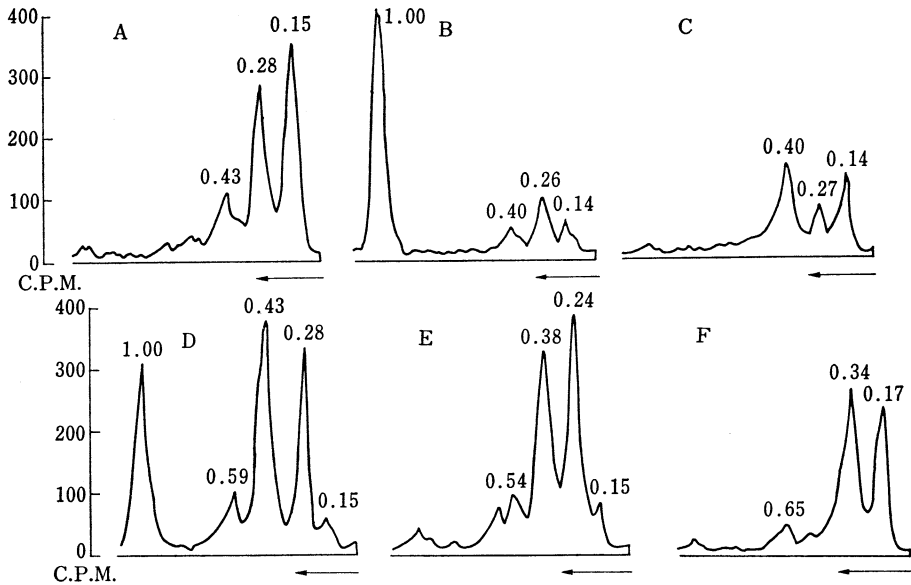


Fig. 1. Pattern of distribution of radioactive spots in thin-layer chromatograms. (A) *M. tuberculosis* #05001; (B) *M. kansasii* #07001; (C) *M. marinum* #08010; (D) *M. nonchromogenicum* #09023; (E) *M. novum* #24018; (F) *M. gastri* #25001.

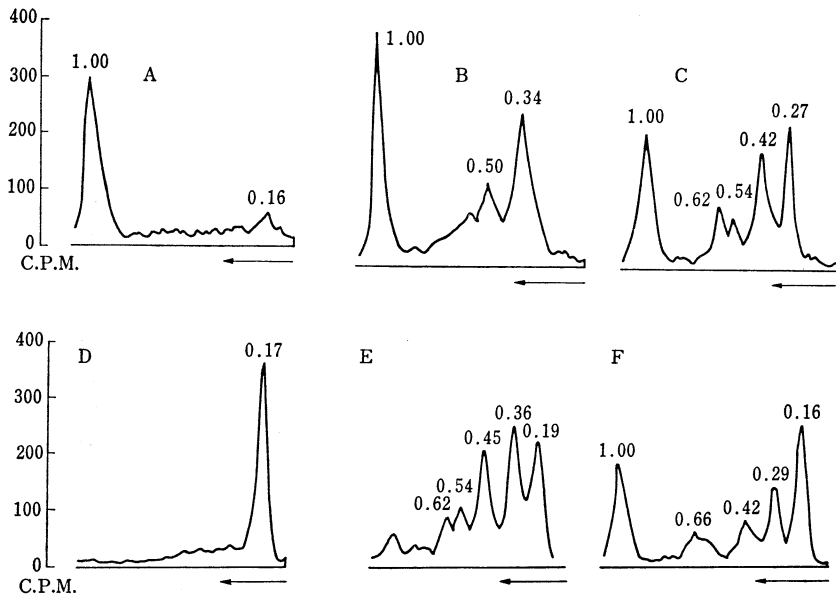


Fig. 2. Pattern of distribution of radioactive spots in thin-layer chromatograms. (A) to (F) show various patterns of *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, and *M. gordonae*. Refer to Table 1.

示すパターンは、すべて *M. gordonae* のパターンにみられるという関係がある。この4者は、計数分類学的研究でも互いに密接な関係にあることが指摘されている。特に、*M. avium*, *M. intracellulare* および *M. scrofulaceum* の3者は互いに密接な関係にあるという²⁾。本報で得られた結果は、これらの病原性3菌種が *M. gordonae* と祖先を同一にするのではないかと、という系統発生的関係を示唆するように思われる。

結 論

³⁵S-methionine とりこみ後の脂質を抽出して薄層クロマトを行なうと、放射性スポットの分布のパターンは、*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. nonchromogenicum*, *M. novum*, *M. gastri* では、それぞれ菌種特有のパターンを示した。*M. tuberculosis* のパターンと *M. bovis* のパターンは同一であった。

M. avium, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae* のパターンは互いに関係があつた。*M. avium* のパターンはほとんど単一であつたが, *M. intracellulare* と *M. scrofulaceum* のパターンは複数で一部互いに重複した。*M. gordonae* のパターンには *M. avium*, *M. intracellulare* および *M. scrofulaceum* が示すパターンのほとんど全部がみられた。

文 献

- 1) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Int. J. Syst. Bacteriol., 25 : 271, 1975.
- 2) Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bacteriol., 26 : 409, 1976.