

原 著

Mycobacterium nonchromogenicum Complex (*M. nonchromogenicum*,
M. terrae および *M. triviale*) を他の遅発育性抗酸菌
から区別するための NaNO_2 -小川培地

束 村 道 雄・村 田 浩

国立療養所中部病院

受付 昭和 53 年 12 月 12 日

NITRITE-OGAWA EGG MEDIUM FOR DIFFERENTIATING STRAINS
OF *MYCOBACTERIUM NONCHROMOGENICUM* COMPLEX
(*M. NONCHROMOGENICUM*, *M. TERRAE* AND *M. TRIVIALE*)
FROM OTHER SLOWLY GROWING MYCOBACTERIA

Michio TSUKAMURA* and Hiroshi MURATA

(Received for publication December 12, 1978)

*Mycobacterium nonchromogenicum*¹⁾, *M. terrae*²⁾ and *M. triviale*³⁾ are regarded as nonpathogens belonging to the Group III of Runyon⁴⁾. Several authors⁵⁾⁻⁹⁾ have reported that these be differentiable from each other, while it is also true that these resemble each other and form a complex, *M. nonchromogenicum* complex¹⁰⁾⁻¹²⁾. Recently, several papers appeared, informing that these organisms caused infections in human¹³⁾⁻¹⁸⁾. It is noteworthy that there are papers reporting that all these three have caused arthritis¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾. It is desired to detect a simple method for identifying and differentiating these organisms from other slowly growing mycobacteria.

Previously, Tsukamura and Tsukamura¹⁹⁾ reported that *M. nonchromogenicum* and *M. terrae* could grow on a modified Sauton agar medium containing 0.1% NaNO_2 after incubation for 4 weeks, and Abbott *et al.*²⁰⁾ reported that *M. terrae* and *M. triviale* grew on oleic acid-albumin agar medium containing nitrite. However, there were a considerable number of strains that did not grow on these media.

In the present study, the present authors have presented a selective medium for the *M. nonchromogenicum* complex. It is an Ogawa egg medium containing 0.2% NaNO_2 . The nitrite-Ogawa egg medium and the Ogawa egg medium (control) were inoculated with one loopful of test organisms, and growth on these media were observed after incubation at 37°C for 2 weeks. It has been shown that all strains tested belonging to the *M. nonchromogenicum* complex grew on the nitrite-Ogawa egg medium, while other slowly growing mycobacteria did not grow on it (Table 1).

緒 言

M. terrae Wayne 1966²⁾, *M. triviale* Kubica *et al.* 1970³⁾ の 3 者は、Runyon⁴⁾ の Group III に属する非発色性の遅発育性抗酸菌である。これら 3 者は互いに区別

* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

可能とされているが⁵⁷⁻⁹⁾、一方、互いに類似していることも確かで、*M. nonchromogenicum* complex とするのが妥当とされている¹⁰⁾⁻¹²⁾。

M. nonchromogenicum complex は通常、非病原性抗酸菌と考えられているが、少数ではあるが、肺、関節、骨に感染したという報告がある¹³⁾⁻¹⁸⁾。特に、3者ともに関節炎を起こしたという報告があるのが注目される¹⁵⁾¹⁷⁾¹⁸⁾。したがって、これらの抗酸菌を他の抗酸菌特に Group III のそれから区別することは臨床的に重要

と思われる。著者は、今回、以下に述べる簡単な培地が *M. nonchromogenicum* complex の選択培地として有用であることを見出したので報告する。

実験材料および方法

被験株は国療中部病院研究室保存株を用いた。培地は1%小川培地を用いた。

NaNO₂-小川培地の作製法は次の通りである。まず NaNO₂ を水に溶解して10%水溶液を作る。この10%

Table. Growth of Various Mycobacteria on Ogawa Egg Medium Containing 0.2% NaNO₂

Species	Number of strains tested	Growth after incubation at 37°C for 14 days		
		Number of strains		
		Negative growth	Residual growth*	Positive (good) growth
<i>M. tuberculosis</i>	20	20	0	0
<i>M. bovis</i>	20	20	0	0
<i>M. kansasii</i>	20	20	0	0
<i>M. marinum</i>	20	16	4	0
<i>M. scrofulaceum</i>	20	15	5	0
<i>M. szulgai</i>	10	10	0	0
<i>M. gordonae</i>	20	17	3	0
<i>M. xenopi</i>	10	10	0	0
<i>M. avium</i>	20	20	0	0
<i>M. intracellulare</i>	20	14	6	0
<i>M. gastri</i>	8	6	2	0
<i>M. nonchromogenicum</i>	20	0	0	20
<i>M. terrae</i> (<i>M. novum</i>)	20	0	0	20
<i>M. triviale</i>	20	0	0	20
<i>M. flavescens</i>	10	0	0	10
<i>M. thermoresistibile</i>	5	0	0	5
<i>M. fortuitum</i>	20	0	0	20
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	10	2	2	6
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	10	0	0	10
<i>M. phlei</i>	10	0	0	10
<i>M. smegmatis</i>	10	0	0	10
<i>M. parafortuitum</i>	5	0	0	5
<i>M. aurum</i>	10	0	0	10
<i>M. chitae</i>	5	0	0	5
<i>M. rhodesiae</i>	5	0	0	5
<i>M. obuense</i>	5	0	0	5
<i>M. agri</i>	10	0	0	10
<i>M. aichiense</i>	10	0	0	10
<i>M. chubuense</i>	5	0	0	5

Nitrite-Ogawa egg medium was prepared as follows. The composition of the Ogawa egg medium is as follows: Basic solution (1% KH₂PO₄ and 1% sodium glutamate), 100 ml; whole eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2% aqueous solution of malachite green, 6 ml. To 100 volumes of the Ogawa egg medium before sterilization, 2 volumes of 10% NaNO₂ solution were added. The medium was poured at 7 ml amounts into tubes, 165 by 16.5 mm, and made as slopes after sterilization at 90°C for 60 minutes. The nitrite-Ogawa egg medium and the Ogawa egg medium (control) were inoculated with one loopful of the test organism, respectively, and incubated at 37°C for 14 days.

* Causes change in colour of the medium but does not form elevated growth of colonies.

NaNO₂ 液 2 容を、滅菌前の 1% 小川培地 100 容に加えると、最終濃度 0.2% となる。NaNO₂-小川培地は、NaNO₂ を 0.2% の割合に含有する培地である。

対照とする 1% 小川培地 および NaNO₂-小川培地ともに、7 ml ずつ試験管 (165 × 16.5 mm) に分注し、90°C 60 分間滅菌して斜面とする。

被検株を 1 白金耳ずつ (約 0.1 mg 湿菌量) 上記の両培地に塗抹接種し、37°C 2 週後に集落発育の有無を観察する。

実験結果

遅発育性抗酸菌は、*M. nonchromogenicum* complex の 3 菌種を除いて、すべて NaNO₂-小川培地に発育しない。*M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. intracellulare* および *M. gastri* の中の少数株は、痕跡的な発育を示すことがある。しかし、*M. nonchromogenicum*, *M. terrae* および *M. triviale* の *M. nonchromogenicum* complex の 3 菌種は全面的な膜様発育を示すので、発育 (+) と (-) の区別は容易である (痕跡的な発育すなわち培地面の一部が変色するが、集落として盛り上がらない発育は (-) と判定する) (表)。

一方、迅速発育性抗酸菌は、*M. chelonae* subsp. *chelonae* の一部の菌株が例外的に発育しないことがあるが、他はすべて NaNO₂-小川培地によく発育する。

考察

1968 年に、Tsukamura and Tsukamura¹⁹⁾ は、*M. nonchromogenicum* および *M. terrae* の大部分の菌株が NaNO₂ を 0.1% の割合に含む Sauton 寒天培地に 4 週後に発育するが、他の遅発育性抗酸菌は、この培地に発育しないことを観察した。一方、Abbott *et al.*²⁰⁾ も時を同じくして、*M. terrae* および *M. triviale* の大部分の株が、NaNO₂ を含む oleic acid-albumin agar medium に発育することを観察した。しかし、上述の 2 つの方法とも、かなりの例外株があつたので、NaNO₂ 感受性自体を *M. nonchromogenicum* complex 同定の決定的な性状とするわけにはゆかなかつた。今回、寒天培地を用いずに、1% 小川培地を使用し、NaNO₂ 濃度を 0.2% とすることにより、ほぼ満足すべき *M. nonchromogenicum* complex の選択培地を作ることができた。

なお、NaNO₂ は、遅発育性抗酸菌と迅速発育性抗酸菌との区別にも用いうる。このためには、先に報告したごとく²¹⁾、0.1% NaNO₂ 含有 Sauton 寒天培地に、被検株を 1 白金耳塗抹し、37°C 2 週後に発育を判定するとよい。遅発育性抗酸菌は発育せず、迅速発育性抗酸菌は発育する。ただし、ごく少数の例外は免れがたい。

結 論

0.2% NaNO₂ 含有 1% 小川培地は、*M. nonchromogenicum*, *M. terrae* および *M. triviale* の *M. nonchromogenicum* complex の 3 菌種を、他の遅発育性抗酸菌から区別するのに役立つ。前者は、37°C 2 週後に、この培地によく発育するのにたいし、後者は発育しない。

文 献

- 1) 東村道雄: 医学と生物学, 71 : 110, 1965.
- 2) Wayne, L. G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 93 : 919, 1966.
- 3) Kubica, G. P., Silcox, V. A., Kilburn, J. O., Smithwick, R. W., Beam, R. E., Jones, W. D., Jr. and Stottmeier, K. D.: Int. J. Syst. Bact., 20 : 161, 1970.
- 4) Runyon, E. H.: Med. Clin. North Amer., 43 : 273, 1959.
- 5) Kubica, G. P., Silcox, V. A. and Hall, E.: J. Gen. Microbiol., 74 : 159, 1973.
- 6) Meissner, G., Schröder, K. H., Amadio, G. E., Anz, W., Chaparas, S., Engel, H. W. B., Jenkins, P. A., Käppler, W., Kleeberg, H. H., Kubala, E., Kubin, M., Lauterbach, D., Lind, A., Magnusson, M., Mikova, Z., Pattyn, S. R., Scheafer, W. B., Stanford, J. L., Tsukamura, M., Wayne, L. G., Willers, I., and Wolinsky, E.: J. Gen. Microbiol., 83 : 207, 1974.
- 7) Käppler, W.: Z. f. Tuberk. u. Erk. Thoraxorg., 129 : 321, 1968.
- 8) Käppler, W.: Z. f. Erk. Atmungsorg., 135 : 39, 1971.
- 9) Runyon, E. H., Wayne, L. G. and Kubica, G. P.: In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8th ed., edited by R. E. Buchanan, N. E. Gibbons, S. T. Cowan, J. G. Holt, J. Liston, R. G. E. Murray, C. F. Niven, A. W. Rabin, and R. Y. Stanier, The Williams & Wilkins Co., Baltimore, p. 681, 1974.
- 10) Tsukamura, M.: Japan. J. Microbiol., 15 : 229, 1971.
- 11) Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bact., 26 : 409, 1976.
- 12) Stanford, J. L. and Grange, J. M.: Tubercle, 55 : 143, 1974.
- 13) Kubala, E.: Scand. J. Resp. Dis., 80 : 11, 1972.
- 14) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 結核, 51 : 99, 1976.
- 15) 平田世雄・富山哲雄: 結核, 51 : 389, 1976.
- 16) Cianciulli, F. D.: Amer. Rev. Resp. Dis., 109 : 138, 1974.
- 17) Edwards, M. S., Huber, T. W. and Baker, C. J.: Amer. Rev. Resp. Dis., 117 : 161, 1978.
- 18) Dechairo, D. C., Kittredge, D., Meyers, A. and Corrales, J.: Amer. Rev. Resp. Dis., 108 : 1224, 1973.
- 19) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Amer. Rev.

- Resp. Dis., 98 : 505, 1968.
- 20) Abbott, V. D., Kilburn, J. O., Harbison, W. and Kubica, G. P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 97 : 931, 1968.
- 21) Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bact., 25 : 329, 1975.