

原 著

<sup>35</sup>S-Sulfate 摂取後の薄層クロマトグラフィーによる  
*Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* Complex  
における2亜群の区別

東 村 道 雄・水 野 松 司

国立療養所中部病院

受付 昭和55年6月28日

SUBGROUPING OF STRAINS OF *MYCOBACTERIUM AVIUM*-*MYCOBACTERIUM*  
*INTRACELLULARE* COMPLEX BY THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY OF  
ACETONE-SOLUBLE FRACTION AFTER INCUBATION WITH <sup>35</sup>S-SULFATE

Michio TSUKAMURA\* and Shoji MIZUNO

(Received for publication June 28, 1980)

Strains of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex could be divided into two subgroups, one showing no detectable spots and another showing two radioactive spots at the R<sub>f</sub> values 0.10—0.14 and 0.32—0.36, by thin-layer chromatography (TLC) of a fraction extracted with acetone after incubation with <sup>35</sup>S-sulfate.

The strains tested were cultivated on Ogawa egg medium, harvested after incubation at 37°C for 10 days, and washed twice with a 0.9% NaCl solution. One hundred mg (wet weight) of cells were weighed and added aseptically to the following reaction mixture: 3.0 ml of M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 0.1% sodium acetate and 5μCi/ml, <sup>35</sup>S-sulfate. The reaction mixture was incubated at 37°C for 24 hours, and the cells were centrifuged. The cells were washed twice with 2.0 ml of distilled water and extracted twice with 10% trichloroacetic acid (TCA) solution. The cells were then extracted twice with 2.0 ml of petroleum ether, and the petroleum ether extracts were discarded. The cells were extracted twice with 2.0 ml of acetone, each time for 5 minutes. The acetone extracts were combined and dried by allowing to stand at 37°C. The dried material was dissolved in 0.1 ml of acetone, and its 0.02 ml sample was placed onto a Silica Gel H layer (20 by 20 cm; 0.25 mm thick) with a micropipette. The sample was subjected to TLC using a solvent: n-propanol-n-butanol-water-ammonia (57: 20: 20: 3, in volume) (ascending system). The chromatogram was then scanned for the radioactivity by an automatic TLC scanner (Nihon-Musen Co., Tokyo) (Scanning speed, 300 mm/hour; chart speed, 150 mm/hour; range, 1,000 counts per minute (cpm); slit, 30×6 mm; time constant, 30 seconds). The <sup>35</sup>S-sulfate was a product of the Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England (Sodium sulfate (<sup>35</sup>S) injection, 0.63 mCi/ml).

The results are shown in Table I and Fig. 1. The radioactive spot that has appeared at the R<sub>f</sub> value 0.95 is originally petroleum ether-soluble<sup>3)</sup>. The TLC of the concentrate of the petroleum ether extracts showed only one spot at this R<sub>f</sub> value and the peak was as high as more than 1,000 cpm.

The strains were divided into two subgroups by the absence or presence of some acetone-soluble radioactive compounds. The first subgroup did not show any radioactive spot and the strains showing

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

serotypes 1, 2, 7 and 14 belonged to this group. The second subgroup consisted of the strains which showed the serotypes 9, 16, 18, and 20. Strains which had a *M. scrofulaceum* serotype 43 (Gause) also entered this group. The former showed no detectable, radioactive spots and the latter showed two radioactive spots at the Rf values 0.10—0.14 and 0.32—0.36.

### 緒 言

束村・水野<sup>1)~3)</sup>は、前に <sup>35</sup>S-methionine と抗酸菌 (*Mycobacterium*) を incubate した後、trichloroacetic acid (TCA) 処理後、ethyl ether-ethanol 混液で抽出した放射性化合物を薄層クロマトグラフィー (thin-layer chromatography, 以下、TLC) にかけて展開し、その放射性 spots の分布を記録した。そして、こうして得られた放射性 spots の分布 pattern によつて大部分の抗酸菌菌種を同定しうることを報告した。しかし、次の菌種では、同一菌種でも複数の pattern の存在が認められた。*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. gordonae*, *M. szulgai* および *M. flavescens*. この中で、前4者の間

では共通の pattern の存在が認められ、これら4菌種の関連性が示唆された。今回、我々は <sup>35</sup>S-sulfate と抗酸菌特に *M. avium*-*M. intracellulare* complex の菌とを incubate した後、アセトン可溶分を抽出して TLC にかけてたところ、*M. avium*-*M. intracellulare* complex を2群に分かちうることを見出した。

### 実験材料および方法

使用した菌株は表1に示した。*M. avium*-*M. intracellulare* complex に属する菌株の血清型 (Schaefer による) は、前に根本など<sup>4)</sup>によつて検査された結果を示してある。

被検株は、1%小川培地に白金耳で接種し、37°Cに10

Table 1. Subgrouping of Strains of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* Complex by Thin-Layer Chromatography of Acetone-Soluble Fraction after Incubation with <sup>35</sup>S-Sulfate

Subgroup	Strain	Serotype	Other designation
No detectable radioactive spot at Rf values 0.10—0.14 and 0.32—0.36	11001	1 (I)	ATCC 71
	11002	2 (II)	ATCC 3717
	11005	2 (II)	ATCC 4121
	11006	1 (I)	ATCC 11755
	11016	1 (I)	ATCC 15769
	11019	2 (II)	ATCC 17944
	11020	1 (I)	ATCC 15773
	11021	2 (II)	ATCC 17942
	13885	7 (VII)	
	13887	14 (Boone)	
Two radioactive spots at Rf values 0.10—0.14 and 0.32—0.36	13009	16 (Yandle)	
	13011	16 (Yandle)	
	13025	9 (Watson)	
	13038	18 (Altman)	
	13543	18 (Altman)	ATCC 19179
	13884	18 (Altman)	
	13022	20 (Arnold)	
	13948	20 (Arnold)	
	13040	43 (Gause)*	
	13042	43 (Gause)*	
	13043	43 (Gause)*	
12321**	43 (Gause)*	ATCC 15078	

\* Serotype of *Mycobacterium scrofulaceum*.

\*\* Received as *Mycobacterium scrofulaceum*.

日間培養した後、培地斜面に発育した菌を白金耳でかきとり、試験管（遠心用）に移し、ガラス棒で管壁にこすりつけて均一化し、生理食塩水（0.9% NaCl 溶液）3.0 ml で2回洗浄した。洗浄菌を秤量して湿菌量 100 mg となり、それを無菌的に次の反応液に浮遊させた。

反応液：M/15 磷酸緩衝液（pH 7.1）3.0 ml に次の成分を含む：醋酸ソーダ 0.1%， $^{35}\text{S}$ -sulfate 5  $\mu\text{Ci/ml}$ （反応液は菌添加前に 100°C 10分加熱して滅菌した）。

上述の反応液を 37°C 24時間 incubate した後、遠心（500×g 15分）して集菌し、2.0 ml の蒸留水を加えてガラス棒で混和し、再び遠心して集菌した。この菌に、冷蔵庫（5°C）で冷した 10% TCA 液 2.0 ml を加えて、5分間ガラス棒でかきまぜて遠心し、更に1回 10% TCA 液による抽出を繰り返した。TCA 処理後の菌に 2.0 ml の石油エーテルを加えて5分間ずつ2回抽出した。次に、菌に 2.0 ml のアセトンを加えて、ガラス棒でかきまぜながら、5分間ずつ2回抽出した。アセトン液を遠心してとり、2回の抽出分を合わせて、37°C のフラ

ン器に放置して蒸発させた。蒸発後に、試験管に 0.1 ml のアセトンを加え、その約 0.02 ml をマイクロピペットでとって薄層上において、TLC にかけた。TLC は Silica Gel H (Merck, Darmstadt, 西ドイツ) を使用し、20×20 cm、厚さ 0.25 mm の薄層を調製し、次の溶媒を用いて上昇法で展開した：*n*-propanol-*n*-butanol-water-ammonia (57+20+20+3, 容量)。展開後の放射性 spots の位置を、日本無線製、薄層クロマト・スキャンナーによって記録した。記録の条件は次のとおりである。scanning speed 300 mm/hour, chart speed 150 mm/hour, range 1,000 counts per minute (cpm), slit 30×6 mm, time constant 30 seconds.

使用した  $^{35}\text{S}$ -sulfate は、Sodium sulphate ( $^{35}\text{S}$ ) injection 0.63 mCi/ml, The Radiochemical Centre, Amersham, Buckinghamshire, England である。また使用した有機溶媒は、片山化学製（試薬 1級）であった。

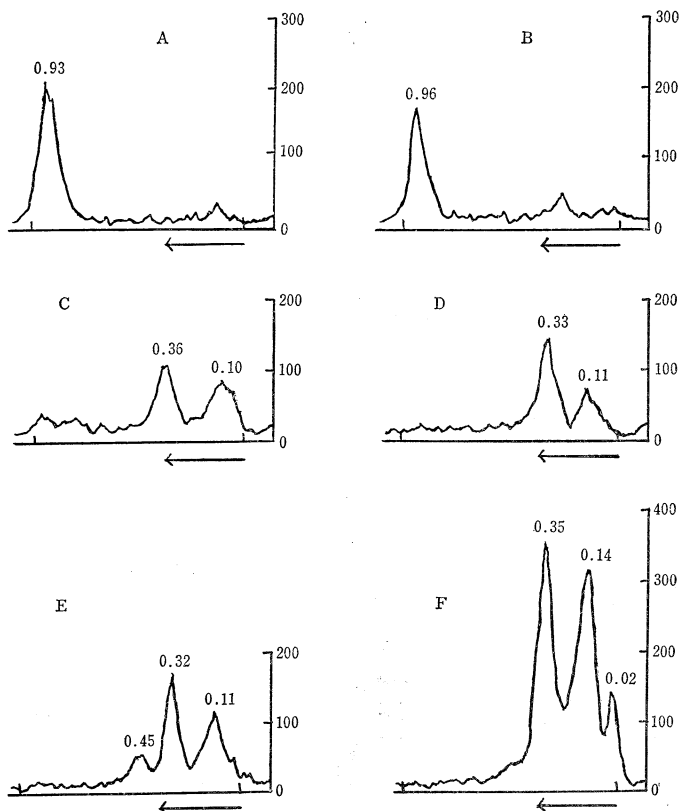


Fig. 1. Thin-layer chromatography of acetone-soluble fraction of *Mycobacterium avium*-*Mycobacterium intracellulare* complex after incubation with  $^{35}\text{S}$ -sulfate.

(A) Strain 13887, serotype 14 (Boone); (B) Strain 13885, serotype 7 (VII); (C) Strain 13011, serotype 16 (Yandle); (D) Strain 13948, serotype 20 (Arnold); (E) Strain 13025, serotype 9 (Watson); (F) Strain 13043, serotype 43 (Gause). The scale at the right vertical axis shows the radioactivity as counts per minute.

## 実験結果

*M. avium-M. intracellulare* complex の菌の中で、血清型 1, 2, 7, 14 (Arium I, Avium II, VII, Boone) を示す菌株10株は、図1のAおよびBに示す pattern を示した。

一方、血清型 9, 16, 18, 20 (Watson, Yandle, Altman, Arnold) を示す菌株8株は、図1のC, D, Eに示す pattern を示した (図1および表1参照)。

被検株の中には、一応 *M. intracellulare* と同定されながら、血清型の検査では *M. scrofulaceum* の血清型 43 (Gause) を示す3株があつたが、この3株は、対照として *M. scrofulaceum* #12321 (血清型 43) と同じ pattern を示した (図1, F)。この pattern は、C, D, E と同じとみなされるが、放射性 spots の放射能値が著しく高い点で異なっている。

## 考 察

本実験では、菌体を TCA 溶液で処理した後、石油エーテルで2回抽出し、更にアセトンで2回抽出して得たアセトン画分を薄層クロマトにかけて放射性 spots の分布を観察した。その結果、*M. avium-M. intracellulare* complex の菌株を2群に分かつことができた。

第1群は *Rf* 値 0.93~0.96 に one spot を示す群で、第2群は *Rf* 値 0.10~0.14 と *Rf* 値 0.32~0.36 に two spots を示す群である。

第1群には血清型 1, 2, 7, 14 を示す菌株10株が入り、第2群には血清型 9, 16, 18, 20 を示す菌株8株が入つた。

*M. scrofulaceum* の血清型 43 を示す nonphotochromogens 3株の pattern も第2群と考えられる (量的に放射性 spots の放射能が高い)。

以上のごとく、アセトン抽出画分の薄層クロマトの pattern によつて、*M. avium-M. intracellulare* complex の菌株を2群に分けることができた。そして、こうして分けられた2群は血清型と関係があると思われた。

最近、Baess<sup>9)</sup> は、DNA hybrids を作る方法で *M. avium-M. intracellulare* complex を2群に分けられると報告している。Baess の第1群には血清型 1, 2, 3, 8 の菌が入つており、第2群には血清型 12, 14, 16 の菌が入っている。私共の得た2群とは、血清型 14 の群別がちがうだけで、おおよそ類似しているようにみえるが、Baess の2群と私共の2群の関係は今のところ深く論じるわけにはゆかない。

本実験で菌をまず TCA 溶液で抽出したのは、<sup>35</sup>S-sulfate から形成された <sup>35</sup>S-methionine および <sup>35</sup>S-cystine を除去するためであつた<sup>9)</sup>。次に、石油エーテルで

菌を2回抽出したのは、*Rf* 値 0.95 の spot が石油エーテル可溶であることがわかつたので<sup>9)</sup>、これを抽出するためであつた。しかし、石油エーテル2回抽出では、この物質を充分抽出しきれず、図1のAおよびBに示した菌株では、この物質が残つていて、これがアセトンで抽出された (この物質はアセトンにも可溶である——未発表成績)。ちなみに *Rf* 値 0.95 の spot を示す物質は、菌体からいつたんエチルエーテル・エタノールで抽出すると石油エーテルで完全に抽出できる。したがつて、第1群と第2群を区別する物質は、*Rf* 値 0.10~0.14 と *Rf* 値 0.32~0.36 の spots を示す物質で、第1群では、この物質がなく、第2群では、この物質が存在することが両群の区別点である。この *Rf* 値 0.10~0.14 と *Rf* 値 0.32~0.36 を示す物質は、アセトン抽出画分にてでくる。

## 結 論

<sup>35</sup>S-sulfate と菌とを incubate した後に、菌を10% TCA 溶液で2回、石油エーテルで2回抽出した後、アセトンで2回抽出した画分を薄層クロマトグラフィーにかけて展開し、薄層上の放射性化合物の位置をスキヤニングすることにより、*M. avium-M. intracellulare* complex を2群に分かつことができた。第1群は *Rf* 値 0.10~0.14 および *Rf* 値 0.32~0.36 の spots がなく、血清型 1, 2, 7, 14 の菌がこれに属する。第2群は、上記の *Rf* 値を示す two spots があり、血清型 9, 16, 18, 20 の菌がこれに属する。血清型 43 (*M. scrofulaceum* の血清型の1つ) を示す菌も、第2群にみられると同じ spots を示すが、第2群の *M. intracellulare* よりも spots の放射能が強い。

## 文 献

- 1) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Differentiation among mycobacterial species by thin-layer chromatography, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 25: 271, 1975.
- 2) 東村道雄・水野松司: <sup>35</sup>S-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, *結核*, 53: 85, 1978.
- 3) 東村道雄・水野松司: <sup>35</sup>S-Methionine 摂取後の薄層クロマトグラフィーによる抗酸菌菌種同定法に関する知見補遺, *結核*, 54: 15, 1979.
- 4) Nemoto, H. et al.: Serotype of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex that caused lung disease in Japan, *Japan. J. Microbiol.*, 19: 69, 1975.
- 5) Baess, I.: Deoxyribonucleic acid relatedness among species of slowly-growing mycobacteria. *Acta Pathol. Microbiol. Scand., Sect B*, 87: 221, 1979.
- 6) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Mode of action of chloramphenicol on *Mycobacterium*, *Japan. J. Tuberc.*, 12: 15, 1963.