

原 著

*Mycobacterium fortuitum* Complex を他の迅速発育性抗酸菌  
から区別する方法としての  
MacConkey 寒天培地と NH<sub>2</sub>OH 培地の比較

東 村 道 雄・村 田 浩

国立療養所中部病院

受付 昭和 55 年 9 月 22 日

COMPARISON OF MACCONKEY'S AGAR MEDIUM AND HYDROXYLAMINE  
MEDIUM FOR DIFFERENTIATION OF *MYCOBACTERIUM FORTUITUM*  
COMPLEX FROM OTHER RAPIDLY GROWING MYCOBACTERIA

Michio TSUKAMURA\* and Hiroshi MURATA

(Received for publication September 22, 1980)

MacConkey's agar medium and hydroxylamine egg medium were compared for differentiating strains of the *Mycobacterium fortuitum* complex from other rapidly growing mycobacteria.

Only 40% of the strains of *M. fortuitum* and one half of the strains of *M. chelonae* subsp. *abscessus* could grow on the MacConkey's agar plates or slants, although the procedure described in the Manual of Clinical Microbiology (1974) has been used faithfully. In addition, about one half of the strains of *M. smegmatis* grew on this medium.

In contrast, all strains of the *M. fortuitum* complex grew on the hydroxylamine medium (0.5 mg/ml NH<sub>2</sub>OH·HCl). However, one half of the strains of *M. smegmatis* and all strains of *M. chitae* grew on this medium. On the hydroxylamine medium (0.75 mg/ml), 80% of the strains of *M. fortuitum*, 92% of the strains of *M. chelonae* subsp. *abscessus* could grow, while about 50% of the strains of *M. chelonae* subsp. *chelonae* failed to grow on it. All other strains did not grow on this medium.

The hydroxylamine medium (0.5 mg/ml and 0.75 mg/ml) appeared to be more suitable for differentiating the strains of the *M. fortuitum* complex from other rapidly growing mycobacteria than did the MacConkey's agar. As stated previously by the present authors (7), it is required to use a combination set of three or more tests to make a complete differentiation.

## 緒 言

*Mycobacterium fortuitum* を他の抗酸菌から区別する方法としては、arylsulfatase 3 日試験<sup>1)2)</sup>、MacConkey 寒天培地<sup>3)</sup>、NH<sub>2</sub>OH 培地 (NH<sub>2</sub>OH·HCl を 0.5 mg/ml 含有する 1% 小川培地)<sup>4)</sup>、PAS および salicylate 黒変試験<sup>5)</sup> が報告されている。この他、cycloserine 培地も有

用であるといわれる<sup>6)</sup>。しかし、どの方法にも例外があるので、screening を完全に行なうには、3 つ以上の方法を組み合わせて使用することが望ましい<sup>7)</sup>。

以上の方法が発表された当時の *M. fortuitum* は、その後の分類学の進歩によつて、*M. fortuitum* と *M. chelonae* に分けられ、*M. chelonae* は更に 2 つの subspecies, subsp. *chelonae* と subsp. *abscessus* に分けられた<sup>8)</sup>。こ

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

の間の分類学上の意見の変化の経過については、前に紹介した<sup>9)</sup>。したがって、本報では *M. fortuitum* と *M. chelonae* とを合わせて *M. fortuitum* complex と呼ぶ。

ところで MacConkey 寒天培地については、筆者はその発表当時に試用したことがあるが、あまり有用な方法と思われなかつたので、実際の同定法には組み入れなかつた。この培地は、Manual of Clinical Microbiology<sup>10)</sup> の同定法の表に載っているが、それは同時に採用されている arylsulfatase 3日試験を補う補助的な役をなすも

のと考えていた(ちなみに、Manual<sup>10)</sup> の抗酸菌の項の共著者の1人 Kubica は MacConkey 寒天培地の発表者である)。ところが、最近我が国で、MacConkey 寒天培地のみによつて *M. fortuitum* complex を同定できるとする発表<sup>11)</sup> がみられ、また硝酸還元反応と MacConkey 寒天培地だけによつて *M. fortuitum* を同定した学会報告をみるに及んで、この際、この培地の真価を明らかにする必要があると痛感するに至つた。この培地の評価にあつては、同じく簡単な screening 培地である

Table 1. Comparison between Hydroxylamine Medium and MacConkey's Agar Medium for Screening for *Mycobacterium fortuitum* Complex

Species	Number of strains showing growth					
	Total No. of strains tested	NH <sub>2</sub> OH·HCl medium (μg/ml)			MacConkey's agar	
		500	750	1000	Slants	Plates
<i>M. agri</i>	10	0	0	0	0	0
<i>M. thermoresistibile</i>	10	0	0	0	0	0
<i>M. neoaurum</i>	5	1	0	0	0	0
<i>M. aurum</i>	5	0	0	0	0	0
<i>M. phlei</i>	10	0	0	0	0	0
<i>M. parafortuitum</i>	5	0	0	0	0	0
<i>M. duvalii</i>	4	0	0	0	0	0
<i>M. vaccae</i>	10	0	0	0	0	0
<i>M. flavescens</i>	10	0	0	0	0	0
<i>M. chubuense</i>	5	0	0	0	0	0
<i>M. aichiense</i>	5	0	0	0	0	0
<i>M. obuense</i>	5	0	0	0	0	0
<i>M. chitae</i>	5	5	0	0	0	0
<i>M. smegmatis</i>	20	10	0	0	11	11
<i>M. fortuitum</i>	50	50	40	7	20*	17
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	20	20	10	0	0	0
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	12	12	11	2	6	6

\* After 2 weeks, 27 strains showed growth.

The MacConkey's agar was prepared from Difco Bacto MacConkey Agar (dehydrated), Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A. The dehydrated agar (50 g) was suspended in distilled water (1,000 ml) and heated to dissolve the medium. Two types of the medium were prepared; the MacConkey's agar slants and plates. To prepare the former, the medium was poured at 7 ml quantities into tubes, 165 by 16.5 mm, and sterilized at 120°C for 15 minutes. After sterilization, the medium was made as slopes and used for experiments after allowing to stand at room temperature for one day. The latter medium was prepared according to the description of the Manual of Clinical Microbiology (10).

The basal medium of the hydroxylamine medium was the Ogawa egg medium. Its composition is as follows: Basal solution (1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1% sodium glutamate), 100 ml; whole eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2% aqueous solution of malachite green, 6 ml. The medium was poured at 7 ml quantities into tubes, 165 by 16.5 mm, and made as slopes by sterilization at 90°C for 60 minutes. Hydroxylamine hydrochloride (NH<sub>2</sub>OH·HCl, Katayama Chemical Industries, Osaka, Japan) was dissolved in distilled water at concentrations of 25, 37.5 and 50 mg/ml. Two milliliters of these solutions, respectively, were added to 100 ml of the Ogawa egg medium before sterilization. Thus, the final concentrations of hydroxylamine were 0.5 mg/ml, 0.75 mg/ml, and 1.0 mg/ml, respectively. An Ogawa egg medium containing no agent was used as control.

The media other than the MacConkey's agar plates were inoculated with one loopful (a 3 mm-loopful) of bacterial suspension (1 mg (moist weight)/ml), which was prepared from a 5 day-old culture growing on Ogawa egg medium. The MacConkey's agar plates were inoculated with one loopful (the same as above) of a 7 day-old culture of the Dubos broth (12). After inoculation, the tubes were stoppered with a gum cap with pin hole, and incubated at 37°C for 5 days. Presence of membranous growth, similar to the growth on control medium, on the hydroxylamine medium was read as positive, and any growth on the MacConkey's agar was read as positive.

NH<sub>2</sub>OH 培地を比較のために使用した。

## 方 法

菌株は、国療中部病院研究部保存の菌株で、191株の迅速発育抗酸菌を使用した。これらの菌株は104性状をしらべて計数同定法によつて同定した。

MacConkey 寒天培地の対照とするために、NH<sub>2</sub>OH 培地を用いたが、同時に NH<sub>2</sub>OH·HCl の濃度を従来の 500μg/ml の他に、750μg/ml および 1,000μg/ml のものも検討してみた。

MacConkey 寒天培地は Difco 製を使用し、Manual of Clinical Microbiology<sup>10)</sup> の記載通りの方法を使用した。また Manual の記載は平板培地であるが、これとともに試験管使用による斜面培地も検討してみた。NH<sub>2</sub>OH 培地は、1% 小川培地に NH<sub>2</sub>OH·HCl (片山化学、大阪) を 500μg/ml、750μg/ml および 1,000μg/ml に滅菌前に添加し、7ml ずつ中試験管に分注、90°C 60分加熱滅菌して斜面培地とした。方法の詳細は、表1の中に記した。発育の判定は、37°C 5日間培養の後に行なつた。MacConkey 寒天培地では1集落だけでも発育があれば陽性とし、NH<sub>2</sub>OH 培地は膜状発育を陽性とした。

## 実験結果

表1に結果を示す。

NH<sub>2</sub>OH 培地 (500μg/ml) では、*M. fortuitum* complex (*M. fortuitum*+*M. chelonae*) の全株が発育した。しかし *M. fortuitum* complex 以外でも *M. chitae* の全株、*M. smegmatis* の半数、*M. neoaurum* の1株が発育した。

NH<sub>2</sub>OH 培地 (750μg/ml) では、*M. fortuitum* の80%、*M. chelonae* subsp. *abscessus* の約90%、*M. chelonae* subsp. *chelonae* の半数が発育した。一方 *M. fortuitum* complex 以外の菌では、この培地に発育するものはなかつた。

NH<sub>2</sub>OH 培地 (1,000μg/ml) では、*M. fortuitum* complex の一部のみが発育した。

MacConkey 寒天培地は、平板 (原法) でも斜面培地変法でもほぼ類似の結果を示したが、*M. fortuitum* の40%以下、*M. chelonae* subsp. *abscessus* の半数が発育するにすぎなかつた。*M. chelonae* subsp. *chelonae* は発育しなかつた。*M. fortuitum* complex 以外の菌種では、*M. smegmatis* の半数が発育した。

## 考 察

以上の実験成績で得られた結果は、MacConkey 寒天培地には、*M. fortuitum* の約40%、*M. chelonae* subsp. *abscessus* の約50%しか発育しえないことを示した。この結果は、MacConkey 寒天培地が *M. fortuitum* com-

plex の screening 培地としては、はなはだ不適当なことを示している。Manual of Clinical Microbiology<sup>10)</sup> によれば、*M. chelonae* subsp. *abscessus* はこれに発育し、*M. chelonae* subsp. *chelonae* はこれに発育しないことになっているが、もともと subsp. *abscessus* の半数しか発育しないのでは、*M. chelonae* の2つの subspecies の区別法としての価値は低い。*M. fortuitum* complex 以外でも、*M. smegmatis* の約半数が発育する。

以上の成績にかんがみ、この培地だけで *M. fortuitum* complex を同定しようという考え<sup>11)</sup>には賛成できない。*M. fortuitum* complex の菌株は、この培地に発育しないものの方が多いからである。また *M. smegmatis* もこの培地に発育する可能性がある。一步ゆずつて、*M. smegmatis* は臨床材料にまれにしか現れない菌であるゆえ、これを除外するとしても、多数の *M. fortuitum* complex の菌が、この培地に発育不能のために逃がれてしまうのは重大な欠点といわねばならない。ちなみに Manual of Clinical Microbiology<sup>10)</sup> では arylsulfatase 3日試験を併用しているの、むしろ *M. fortuitum* complex の screening は、こちらの方法で行なわれるものとみられる。

NH<sub>2</sub>OH 培地 (500μg/ml) では、*M. fortuitum* complex の全菌株が screening される。しかし *M. smegmatis* や *M. chitae* も screening される可能性があるが、この2菌種は臨床材料にはまれにしか出現しないので、screening の目的には、NH<sub>2</sub>OH 培地 (500μg/ml) の方が適している。一方 NH<sub>2</sub>OH 培地 (750μg/ml) を用いると、*M. fortuitum* の80%はこれに発育するし、*M. chelonae* subsp. *abscessus* の90%、*M. chelonae* subsp. *chelonae* の半数もこれに発育する。またこの培地には、*M. fortuitum* complex 以外の迅速発育性抗酸菌は発育しない。したがつて NH<sub>2</sub>OH 培地 (750μg/ml) の機能は、MacConkey 寒天培地よりも、優れていると考えられる。

以上の成績を考案して、*M. fortuitum* complex の screening の目的には、MacConkey 寒天培地よりも NH<sub>2</sub>OH 培地 (500μg/ml および 750μg/ml 併用) の方が優れていると考えられる。NH<sub>2</sub>OH 培地 (500μg/ml) では、*M. fortuitum* complex の菌株全部を捕えることができる。しかし *M. smegmatis* および *M. chitae* も同時に捕えてしまう可能性がある。実際問題としては、後者の2菌種は、臨床材料にはまれにしかみられないものであるが、同定を厳密にするためには、他の方法を追加して、後の2者を区別する必要がある。このためには、arylsulfatase 3日試験<sup>12)</sup> および PAS 分解、salicylate 分解試験<sup>5)</sup> を併用するとよい<sup>7)</sup>。arylsulfatase 3日試験も *M. fortuitum* complex の screening には、極めて有用な方法であるが、*M. smegmatis*、*M. parafortuitum*、*M.*

*vaccae*, *M. aichiense* も時に陽性を示すことがあつて完全ではない<sup>13)14)</sup>。PAS および salicylate 分解試験の陽性は、ほぼ *M. fortuitum* complex の菌に限られるが、*M. fortuitum* の約1/3が陰性であるため、これだけで同定するわけにはゆかない。要するに同定のためには、一つの方法だけでなく、3つぐらいの方法を組み合わせ使用することが望ましい<sup>15)</sup>。

### 結 論

MacConkey 寒天培地は、*M. fortuitum* complex の一部の菌を screening できるにすぎなかつた。*M. fortuitum* complex の菌を、他の抗酸菌から区別するためには、NH<sub>2</sub>OH 培地 (500 $\mu$ g/ml および 750 $\mu$ g/ml 併用) の方が優れていると思われた。

(本論文の要旨は1980年4月日本結核病学会総会で報告した。)

### 文 献

- 1) Kubica, G.P. and Rigdon, A.L.: The arylsulfatase activity of acid-fast bacilli. III. Preliminary investigation of rapidly growing acid-fast bacilli, Amer. Rev. Resp. Dis., 83:737, 1961.
- 2) Wayne, L.G.: Recognition of *Mycobacterium fortuitum* by means of a three-day phenolphthalein sulfatase test, Amer. J. Clin. Pathol., 36:185, 1961.
- 3) Jones, W.D. and Kubica, G.P.: The use of MacConkey's agar for differential typing of *Mycobacterium fortuitum*, Amer. J. Med. Technol., 30:187, 1964.
- 4) Tsukamura, M.: Differentiation of mycobacteria by susceptibility to hydroxylamine and 8-azaguanine, J. Bacteriol., 90:556, 1965.
- 5) Tsukamura, M.: Salicylate degradation test for differentiation of *Mycobacterium fortuitum* from other mycobacteria, J. Gen. Microbiol., 41:309, 1965.
- 6) 東村純雄・東村道雄・水野松司: Cycloserine 感受性試験により *Mycobacterium fortuitum* を他抗酸菌から区別する方法, 日本細菌学雑誌, 22: 18, 1967.
- 7) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: A practical system for identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium fortuitum*, Scand. J. Resp. Dis., 48:58, 1967.
- 8) Kubica, G.P. et al.: A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria, J. Gen. Microbiol., 73:55, 1972.
- 9) 東村道雄: Group IV 抗酸菌による感染症, 医療, 31: 1187, 1977.
- 10) Runyon, E.H. et al.: Chapter 16. *Mycobacterium*. In "Manual of Clinical Microbiology, 2nd edition", edited by E.H. Lennette, E.H. Spaulding, and J.P. Truant, p. 148-174, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1974.
- 11) 高橋昭三: 非定型抗酸菌の分離と同定, 実験治療, No. 566: 7, 1980.
- 12) Manual of Clinical Microbiology, 2nd edition, edited by E.H. Lennette, E.H. Spaulding, and J.P. Truant, p. 901, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1974.
- 13) Tsukamura, M.: Differentiation between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium borstelense*, Amer. Rev. Respir. Dis., 101:426, 1970.
- 14) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria. Published by the National Chubu Hospital, Obu, Aichi, p. 1-75, 1975.