

原 著

Mycobacterium nonchromogenicum, *Mycobacterium terrae*
および *Mycobacterium triviale* の計数分類

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 59 年 10 月 24 日

NUMERICAL CLASSIFICATION OF *MYCOBACTERIUM NONCHROMOGENICUM*,
MYCOBACTERIUM TERRAE AND *MYCOBACTERIUM TRIVIALE*

Michio TSUKAMURA*

(Received for publication October 24, 1984)

Numerical classification of strains received as *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium terrae* and *Mycobacterium triviale* (Table 1) was carried out, using 81 characters (Table 4) and matching coefficients. The dendrogram prepared by single linkage-clustering showed two "centroid clusters" (Fig. 1 and 2); one consisting of *M. nonchromogenicum* strains, including type strain NCTC 10424, and another of *M. terrae* and *M. triviale* strains, including type strains ATCC 15755 and ATCC 23292. The range of these clusters were determined by the method previously described (Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol., 95: 207-212, 1976) (Table 2), and strains placed outside the centroid clusters were tested whether they enter either or both of these ranges. By this method, 9 strains were identified as *M. nonchromogenicum* and 8 strains as *M. terrae-M. triviale* (Table 3). Thus, in total, 33 strains were classified to *M. nonchromogenicum* and 43 strains to *M. terrae-M. triviale*. These results well agreed with the results obtained by a M value matrix (Fig. 3). In conclusion, the majority of the strains tested were classified as either *M. nonchromogenicum* or *M. terrae-M. triviale*. The strains received as *M. terrae* or *M. triviale* formed one cluster and regarded as one taxonomic unit.

The characters of the *M. nonchromogenicum* and *M. terrae-M. triviale* thus classified are shown in Table 4. Among these characters, four characters shown in Table 5 were considered as highly useful for differentiating between *M. nonchromogenicum* and *M. terrae-M. triviale*. All *M. nonchromogenicum* strains showed positive reaction in three or more of these four characters, while all *M. terrae-M. triviale* strains, except for only one strain, showed negative reaction in three or more of these four (Table 6). *M. nonchromogenicum* strains are clearly differentiated from *M. terrae-M. triviale* strains by a combination of these four characters.

Keywords : *Mycobacterium nonchromogenicum*,
Mycobacterium terrae, *Mycobacterium triviale*,
Numerical classification

キーワード : *Mycobacterium nonchromo-*
genicum, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium*
triviale, 計数分類

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

緒 言

Mycobacterium nonchromogenicum Tsukamura 1965¹⁾, *Mycobacterium terrae* Wayne 1966²⁾および *Mycobacterium triviale* Kubica 1970³⁾は、一連の共通性状をもつ遅発育性の nonphoto-chromogenic な抗酸菌として知られている^{4)~7)}。この3者は、従来、非病原性と考えられていたが、最近に至り、これらによる感染症の報告が相次いで現われた⁸⁾⁹⁾。しかしながら、米国における *M. terrae* または *M. triviale* 感染症の報告の菌種は、直ちに、これを信じるわけにはいかない⁸⁾¹⁰⁾。なぜなら、*M. nonchromogenicum* との区別が全く行なわれていないからである。更に、日本における感染症の起炎株は *M. nonchromogenicum* ばかりであったという事実があるからである⁸⁾¹⁰⁾。このように、*M. nonchromogenicum*, *M. terrae* および *M. triviale* の区別が、特に欧米で明確に実施されなかった事実に鑑み、本報では、この3者の分類の問題を改めて取り扱うこととした。

研究 方法

菌株：使用した菌株は90株で、いずれも *M. nonchromogenicum*, *M. terrae* または *M. triviale* として受領した株である。これらは表1に示されている。*M. nonchromogenicum* の中で、患者名のついていない株は、我々の研究室で土壌から分離したものである。患者分離株も全部我々のところで同定した。*M. terrae* 株は、ATCC no. のもの以外は、すべてDr. L. Wayne, Veterans Administration Medical Center, Long Beach, California, U. S. A. から、*M. triviale* 株も ATCC no. の株以外は、すべてDr. G. P. Kubica, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, U. S. A. から受領した。ATCC 株は American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U. S. A. から受領した。*M. nonchromogenicum* の土壌分離株は1960~1965年に分離された。*M. terrae* 株は1966年に、*M. triviale* 株も1966年に受領した。これらの株は、 20°C に保存され、年1回継代された。そのため、前2者は元々S型であったのに、大部分がR型に変異してしまった。*M. triviale* は元々R型であった。従って、本報の集落形態に関する成績は、必ずしも分離当初の特徴を反映していない。

検査性状：90株の各株について、表4に示す81性状について検査した。これらの性状の検査方法については前報した¹¹⁾。

計数分類：検査の結果を1 (+) または0 (-) としてcode化し、matching coefficient (M value) を次式で計算した。

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

ここに、 n_s は2株間で同一のcode記号(11または00)を示した性状数、 n_d は2株で異なるcode記号(10)を示した性状である。菌株のclusteringはsingle linkage-methodによった¹²⁾。計数分類の結果は、single linkageによって作ったdendrogramおよびM value matrix (菌株×菌株のmatrix) として表わした。

後に成績の項に示すように、本報の計数分類では、dendrogramで明確なclusteringの形成はみられなかった(被検株全部を明らかな2群または3群に分つことはできなかった)。しかし、94%レベルで、2つのclustersが認められたので、これを“centroid clusters”と名付けて、Liston et al¹³⁾の方法で、これらのcentroid clustersのhypothetical median organism-pattern (HMO) を作った。このHMOに対するcentroid cluster内の各株のM valueを測定することにより、centroid clusterの範囲を $(M \pm 2s)$ と定義することができた¹⁴⁾。ここに、Mは、cluster中の各株のHMOに対するM valueの平均値、sは、その標準偏差である。この $(M \pm 2s)$ %の範囲には、centroid cluster内の株の95%が含まれる¹⁴⁾。任意の株の2つのcentroid clustersのHMOsに対するM valuesを測定し、cluster AのHMOに対する測定値がAの範囲に入り、cluster BのHMOに対する測定値がBの範囲外にあれば、被検株は、centroid cluster Aに属するものと同定できる¹⁴⁾。この方法で、centroid clustersに入らなかった株の同定を試みた。

研究 成績

計数分類の結果を、dendrogram (Fig. 1および2) およびM value matrix (Fig. 3) として示した。

まずdendrogramをみるのに、94%M valueレベルで2つのclustersが認められる。第1のclusterはFig. 1の09013から09070に至る24株で、すべて*M. nonchromogenicum*として受領したもので、この中にはType strainの09003 (ATCC 19530=NCTC 10424) も含まれている。第2のclusterはFig. 2の37006から38017に至る35株で、これらの株は*M. terrae* または *M. triviale* として受領したものである。このclusterには、*M. terrae* のType strain ATCC 15755および *M. triviale* のType strain ATCC 23292も含まれている。

このcentroid clusterを形成した*M. nonchromogenicum* 24株からHMOを作り、HMOに対する24株の平均M valueを求めると $93.7 \pm 2.5\%$ となる (Table 2)。これから $(M \pm 2s)$ %の範囲を求めると $98.7 \sim 88.7\%$ となる。一方、他のcentroid clusterを形成した*M. terrae*-*M. triviale* 35株の上記HMOに対する平均M valueは $82.2 \pm 2.5\%$ 、菌株の95%を含む範囲は $87.2 \sim 77.2\%$ であり、*M. nonchromogenicum* 24株の分布の範囲と*M. terrae*-*M. triviale* 35株の分布の

Table 1. Mycobacterial Strains Used

Laboratory no.	Received as :	Source ^a
09018	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09021	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09022	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09029	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09264	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25145	4
09301	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> Patient Mori	1
09303	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> Patient Takahashi	1
09013	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> E1711 (= ATCC 19531)	1
09032	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09016	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09017	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09113	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> E2509 (= ATCC 19690 ^b)	1
09263	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25144	4
09027	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09261	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25142	4
09266	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25218	4
09025	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09268	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25264	4
09015	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09031	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09231	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09114	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> E2510 (+ ATCC 19691 ^b)	1
09228	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> NCTC 10479 (=09033)	5
09294	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 19531 (=09013)	4
09267	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25219	4
09260	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 19530 ^T (=09003)	4
09003	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> E317 ^T (= ATCC 19530=NCTC 10424)	1
09020	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09024	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09262	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25143	4
09270	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25266	4
09030	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09033	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
09112	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> E2508 (= ATCC 19689 ^b)	1
09265	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25216	4
09269	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> ATCC 25265	4
09230	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> Patient Sawai	1
09300	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> Patient Takinami	1
09032	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> Patient Yamada	1
09293	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i> Patient Yamazaki	1
38023	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25149	4
38025	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25217	4
38015	<i>Mycobacterium terrae</i> W523	2
09026	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1

Table 1 . continued

Laboratory no.	Received as :	Source ^a
37006	<i>Mycobacterium triviale</i> T39-4	3
37007	<i>Mycobacterium triviale</i> T40-4	3
37001	<i>Mycobacterium triviale</i> alb 2386 (= ATCC 23290)	3
37003	<i>Mycobacterium triviale</i> C1614	3
37004	<i>Mycobacterium triviale</i> C5181 (= ATCC 19386)	3
37005	<i>Mycobacterium triviale</i> T20-5	3
37008	<i>Mycobacterium triviale</i> T75-4	3
37010	<i>Mycobacterium triviale</i> T81-4	3
37012	<i>Mycobacterium triviale</i> T248-1	3
37013	<i>Mycobacterium triviale</i> T254-3 (= ATCC 19387)	3
37018	<i>Mycobacterium triviale</i> T452-4	3
37015	<i>Mycobacterium triviale</i> T319-3	3
37016	<i>Mycobacterium triviale</i> T340-3	3
37019	<i>Mycobacterium triviale</i> WX2191	3
37009	<i>Mycobacterium triviale</i> T80-4	3
37014	<i>Mycobacterium triviale</i> T255-3 (= ATCC 23292 ^T)	3
37024	<i>Mycobacterium triviale</i> ATCC 19387	4
38002	<i>Mycobacterium terrae</i> W168A	2
38003	<i>Mycobacterium terrae</i> W171	2
38011	<i>Mycobacterium terrae</i> W972	2
38012	<i>Mycobacterium terrae</i> W973	2
38022	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25147	4
38021	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25146	4
38028	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25269	4
38024	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25213	4
38007	<i>Mycobacterium terrae</i> W900	2
37002	<i>Mycobacterium triviale</i> DT67-4	3
37020	<i>Mycobacterium triviale</i> WX2199 (= ATCC 23291)	3
37023	<i>Mycobacterium triviale</i> ATCC 19386	4
38010	<i>Mycobacterium terrae</i> W971	2
38027	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25268	4
38005	<i>Mycobacterium terrae</i> W598	2
38006	<i>Mycobacterium terrae</i> W897	2
38016	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755 ^T (1966)	4
38017	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 15755 ^T (1969)	4
09019	<i>Mycobacterium nonchromogenicum</i>	1
38001	<i>Mycobacterium terrae</i> W167	2
38008	<i>Mycobacterium terrae</i> W923	2
38013	<i>Mycobacterium terrae</i> W45 (= ATCC 15755 ^T)	2
37011	<i>Mycobacterium triviale</i> T240-4	3
37021	<i>Mycobacterium triviale</i> WX2336	3
38004	<i>Mycobacterium terrae</i> W527	2
38009	<i>Mycobacterium terrae</i> W947	2
38014	<i>Mycobacterium terrae</i> W511	2
38026	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25267	4
38020	<i>Mycobacterium terrae</i> ATCC 25113	4

- a 1. M.Tsukamura, National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan ;
- 2. L.G. Wayne, Veterans Administration Medical Center, Long Beach, California, U.S.A. ;
- 3. G.P. Kubika, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, U.S.A. ;
- 4. American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, U.S.A. ;
- 5. National Collection of Type Cultures (NCTC), London, England.
- b Isolated from guinea pig organs inoculated by soil samples.

範囲とは重複しない (Table 2)。

M. terrae-*M. triviale*のcentroid cluster形成株のHMOに対するM valuesの分布の計算では、*M. nonchromogenicum*株と*M. terrae*-*M. triviale*株のM value分布の間に僅かのoverlapがあるが、前述の*M. nonchromogenicum*のHMOを用いた比較では、両群の区別が可能であるので、この2群は区別可能とみなして差支えない。

次に、上述のcentroid clustersに入らなかった菌株が、*M. nonchromogenicum*に属するか「または*M. terrae*-*M. triviale*に属するかを検定してみた。即ち、これらの菌株の上記2つのHMOsに対するM valueを計算して、

(1) *M. nonchromogenicum*-HMOに対するM valueが*M. nonchromogenicum* centroid clusterの範囲に入り、一方*M. terrae*-*M. triviale*-HMOに対するM valueも*M. terrae*-*M. triviale* centroid clusterの範囲に入るものが3株あった。これらは「中間型」と考えられる (Table 3)。

(2) *M. nonchromogenicum*-HMOに対するM valueが、その範囲に入り、*M. terrae*-*M. triviale*-HMOに対するM valueが、その範囲に入らない株が9株あった。これらは、*M. nonchromogenicum*と同定してよいと思われる (Table 3)。

(3) 前の逆で、*M. terrae*-*M. triviale*と同定されるものが8株あった (Table 3)。

(4) 2つのHMOsに対するM valuesが、ともに範囲外にあり、いずれとも同定しがたい株が11株あった (Table 3)。

以上のごとく、*M. nonchromogenicum*のcentroid clusterを形成した24株に、新たに同定された9株を加えて、*M. nonchromogenicum*と分類しえた株は合計33株となる。また、*M. terrae*-*M. triviale*のcentroid clusterを形成した35株に、新たに同定された8株を加えて、*M. terrae*-*M. triviale*と分類しえた株は合計43株となる。

この結果を、M value matrix (Fig. 3)と比較してみると、両者は大概一致していることが分る。M value matrixでも、被検株でもおおよそ2群に分たれ、2つのclustersが形成されている。上記の計算で中間型または同定不能とされた株は、Fig. 3のclustersにも入らず、2つの方法の分類の結果は、よく一致している。

Table 4に、*M. nonchromogenicum*および*M. terrae*-*M. triviale*の性状の比較を示す。

Table 4の性状の中で、*M. nonchromogenicum*と

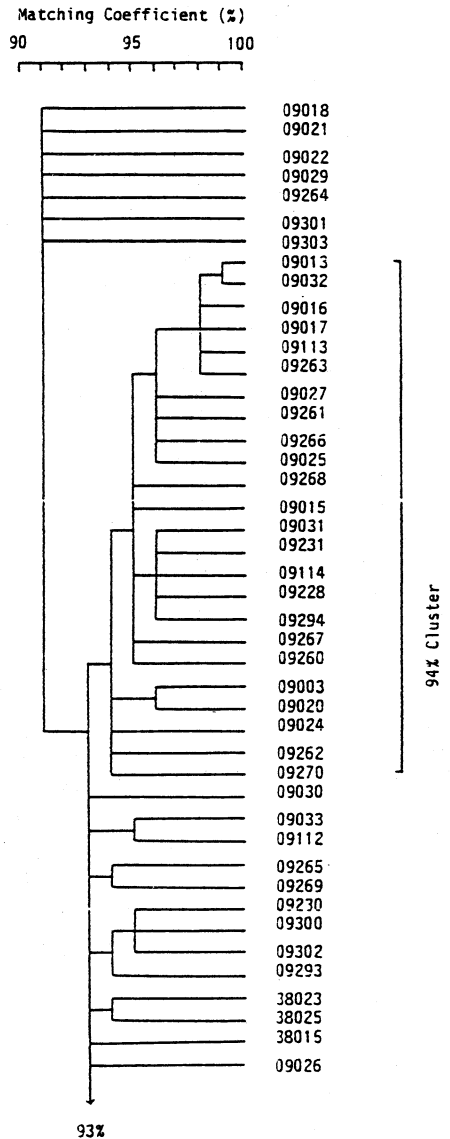


Fig.1. Dendrogram (1). Strains 09013 to 09270 (24 strains) form a centroid cluster of *M. nonchromogenicum* at a 94%-level. Strain 09003 is the type strain of *M. nonchromogenicum*.

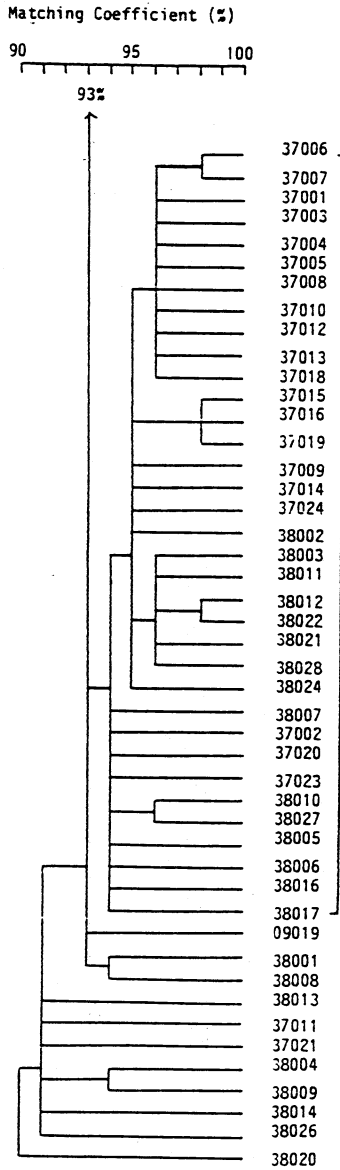


Fig.2. Dendrogram (2).

Strains 37006 to 38017 (35 strains) form a centroid cluster of *M.terrae-M.triviale* complex at a 94%-level. Strain 37014 is the type strain of *M.triviale*, and strains 38016 and 38017 are the type strain of *M.terrae*, which were received from the American Type Culture Collection at different times.

*M.terrae-M.triviale*との間で、最も著しい差を示す性状4つをとると、Table 5に再掲するごとくなる。そして、*M. nonchromogenicum* と同定された33株および *M.terrae-M.triviale* と同定された43株で、この4性状の陽性頻度を数えると Table 6に示す結果が得られた。即ち、*M. nonchromogenicum* では、31株(94%)が、この4性状全部について陽性の成績を示したのに、*M.terrae-M.triviale* で4性状全部に陽性を示した株は1株もなかった。また、*M. nonchromogenicum* は全株が、上記4性状中3性状以上で陽性反応を示したのに対して、*M.terrae-M.triviale* の中で、このような反応を示したものは唯1株(2%)しかなかった。この成績から、Table 5の4性状を検査して、3性状以上に陽性反応を示す株を *M. nonchromogenicum* と同

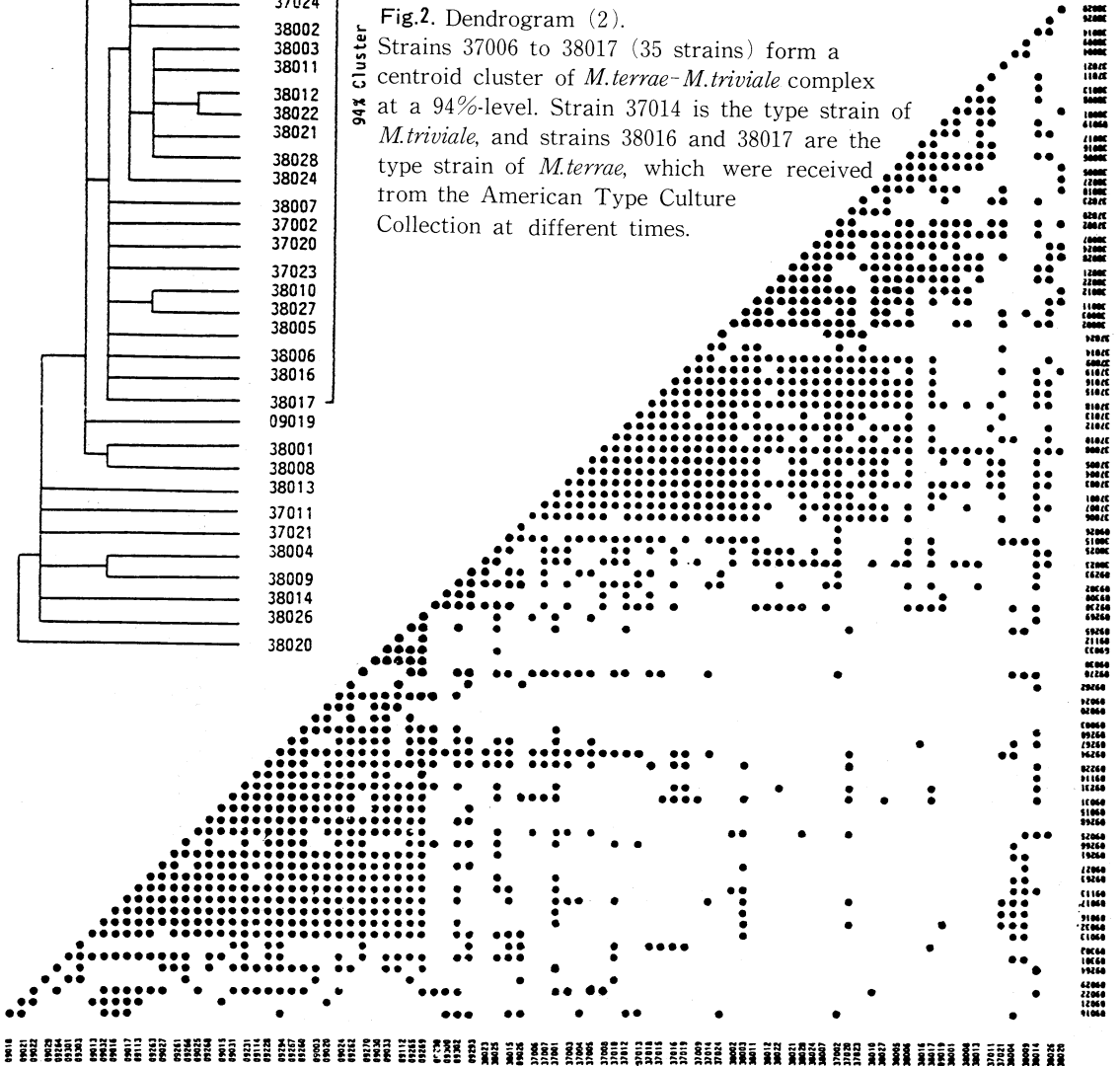


Fig. 3. Schematic representation of the M value matrix, in which the M values higher than 88% are shown as closed circles. The strains are arranged in the same order as shown in Figures 1 and 2.

Table 2. Mean M Values of Strains Forming a Centroid Cluster to Hypothetical Median Organism-Pattern (HMO) of their Own Cluster and to the HMO of another Cluster

Test strains	Mean M value to the HMO of the <i>M. nonchromogenicum</i> strains forming centroid cluster ^a (%)	Mean M value to the HMO of the <i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> strains forming centroid cluster ^b (%)
<i>M. nonchromogenicum</i> strains forming centroid cluster ^a (n=24)	93.7±2.5 (n=24) (98.7~88.7%)	84.1±3.0 (n=24) (90.1~78.1%)
<i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> strains forming centroid cluster ^b (n=35)	82.2±2.5 (n=35) (87.2~77.2%)	93.6±2.6 (n=35) (98.8~88.4%)

a Strains 09013 to 09270 (24 strains) received as *M. nonchromogenicum*, which formed one cluster at a 94%-level (Fig.1).

b Strains 37006 to 38017 received as *M. terrae* and/or *M. triviale*, which formed one cluster at a 94%-level (Fig.2).

The values shown in table are (mean)±(standard deviation). The range of M values of the strains forming the centroid cluster is (M±2s)%, where M is the mean M value and s is the standard deviation. (14). The ranges are shown in parentheses.

Table 3. Classification of Strains Which Were Placed Outside the Centroid Clusters by Comparison of M Values to the HMO of Two Centroid Clusters

Group	5strains classified
Group 1. The M values estimated enter the range of two clusters (intermediate)	09230 ; 09302 ; 38025 (3 strains)
Group 2. The M value to the HMO of the centroid <i>M. nonchromogenicum</i> strains enters the range, and the M value to the HMO of the centroid <i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> strains is outside the range (classified as <i>M. nonchromogenicum</i>)	09264 ; 09301 ; 09030 ; 09033 ; 09112 ; 09265 ; 09269 ; 38004 ; 38009 (9 strains)
Group 3. The M value to the HMO of the centroid <i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> strains enters the range, and the M value to the HMO of the centroid <i>M. nonchromogenicum</i> strains is outside the range (classified as <i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> complex)	38023 ; 38015 ; 09019 ; 38001 ; 38008 ; 37011 ; 38014 ; 38026 (8 strains)
Group 4. The M values to both HMOs do not enter the range of the two centroid clusters (intermediate in a wide sense)	09018 ; 09293 ; 09021 ; 09022 ; 09026 ; 09029 ; 38013 ; 09303 ; 37021 ; 09300 ; 38020 (11 strains)

定し、3性状以上に陰性反応を示す株を *M. terrae*-*M. triviale* と同定する時は、ほぼ完全に同定の目的を達するものと思われる。

Table 4. Comparison of Characters between *Mycobacterium nonchromogenicum* Strains and *Mycobacterium terrae*-*Mycobacterium triviale* Strains

Character	% of strains showing positive reaction			
	<i>M. nonchromogenicum</i> centroid strains (n=24)	<i>M. nonchromogenicum</i> strains (n=33)	<i>M. terrae-M. triviale</i> centroid strains (n=35)	<i>M. terrae-M. triviale</i> strains (n=43)
Rough colonies	79	73	91	88
Growth at 42°C	92	82	20	23
Resistance to 0.2% sodium p-aminosalicylate ^a	75	82	100	98
Resistance to NH ₂ OH.HCl, 500 µg/ml ^a	100	100	74	72
Growth on Sauton agar medium	100	100	100	86
Tolerance to 0.1% picric acid ^b	29	30	23	19
Arylsulfatase (3 days)	100	94	63	63
Arylsulfatase (14 days)	100	94	97	74
Tolerance to 0.1% NaNO ₂ ^b	100	100	31	28
Resistance to ethambutol, 5 µg/ml ^a	0	0	6	5
Tolerance to 0.2% NaNO ₂ ^b	88	79	11	9
Growth on 1% Tween-Sauton agar	46	45	69	58
Resistance to rifampicin, 25 µg/ml ^a	96	94	14	19
Tween 80 hydrolysis (7 days)	100	100	89	84
α-Esterase	8	6	31	35
β-Esterase	96	88	80	79
β-Galactosidase	88	85	57	53
Acid phosphatase	100	100	100	95
Nitrate reduction (6 hours)	71	76	51	53
Nitrate reduction (24 hours)	79	79	71	70
Nicotinamidase	50	58	20	19
Pyrazinamidase	75	67	20	19
Glutamate as N and C sources	0	12	0	0
Glucose as C source (glutamate-N)	79	82	17	16
Acetate as C source (glutamate-N)	100	100	77	74
Succinate as C source (glutamate-N)	13	33	0	2
Pyruvate as C source (glutamate-N)	100	100	6	9
Acetate as C source	71	70	80	72
Pyruvate as C source	33	39	11	12
Glucose as C source	13	18	3	2
Fructose as C source	21	18	0	0
n-Butanol as C source	8	12	0	0
Resistance to ofloxacin (DL8280), 2.5 µg/ml ^a	100	100	0	5
Resistance to bleomycin, 5 µg/ml ^a	100	100	9	14
Heat-stable acid phosphatase	71	67	20	16

Unless specially noted, the utilization of carbohydrates as sole carbon sources were tested in the presence of ammoniacal nitrogen. a Tested in Ogawa egg medium. b Tested in a modified Sauton agar medium, in which sodium glutamate (4 g/liter) was substituted for asparagine.

All strains showed positive reaction in the following 9 characters :

1) Growth at 28°C ; 2) growth at 37°C ; 3) resistance to $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$, $125\mu\text{g}/\text{ml}^a$; 4) resistance to $\text{NH}_2\text{OH.HCl}$, $250\mu\text{g}/\text{ml}^a$; 5) resistance to thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, $1\mu\text{g}/\text{ml}^a$; 6) resistance to sodium salicylate, $0.5\text{mg}/\text{ml}^a$; 7) resistance to p-nitrobenzoic acid, $0.5\text{mg}/\text{ml}^a$; 8) Tween 80 hydrolysis (14 days) ; 9) Catalase semiquantitative (foam height > 45mm).

All strains showed negative reaction in the following 37 characters :

1) Colony pigmentation in the dark ; 2) photochromogenicity ; 3) growth after 3 days ; 4) growth at 45°C ; 5) growth at 52°C ; 6) degradation of p-aminosalicylate to catechol ; 7) tolerance to 0.1% sodium salicylate^b ; 8) degradation of salicylate to catechol ; 9) tolerance to 0.2% picric acid^b ; 10) niacin production ; 11) acetamidase ; 12) benzamidase ; 13) urease ; 14) isonicotinamidase ; 15) salicylamidase ; 16) allantoinase ; 17) succinamidase ; 18) serine as simultaneous N and C sources ; 19) glucosamine hydrochloride as simultaneous N and C sources ; 20) acetamide as simultaneous N and C sources ; 21) benzamide as simultaneous N and C sources ; 22) monoethanolamine as simultaneous N and C sources ; 23) trimethylene diamine as simultaneous N and C sources ; 24) citrate as C source ; 25) succinate as C source ; 26) malate as C source ; 27) benzoate as C source ; 28) malonate as C source ; 29) fumarate as C source ; 30) sucrose as C source ; 31) ethanol as C source ; 32) n-propanol as C source ; 33) propylene glycol as C source ; 34) 1, 3-butylene glycol as C source ; 35) 1, 4-butylene glycol as C source ; 36) 2, 3-butylene glycol as C source ; 37) iso-butanol as C source.

Table 5. Characters Highly Useful for Differentiating *Mycobacterium nonchromogenicum* from *Mycobacterium terrae*-*Mycobacterium triviale*

Character	% of strains showing positive reaction			
	<i>M. nonchromogenicum</i> centroid strains (24 strains)	<i>M. nonchromogenicum</i> strains (33 strains)	<i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> centroid strains (35 strains)	<i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> strains (43 strains)
Resistance to ofloxacin (DL8280), $2.5\mu\text{g}/\text{ml}^a$	100	100	0	5
Resistance to bleomycin, $5\mu\text{g}/\text{ml}^a$	100	100	9	14
Pyruvate as C source (glutamate -N)	100	100	6	9
Resistance to rifampicin, $25\mu\text{g}/\text{ml}$	96	94	14	19

a Tested in Ogawa egg medium.

Table 6. Frequency of Four Distinguishing Characters in the Strains of *Mycobacterium nonchromogenicum* and of *Mycobacterium terrae*-*Mycobacterium triviale*

Scoring	No. of strains (%)	
	Strains classified as <i>M. nonchromogenicum</i> (33 strains)	Strains classified as <i>M. terrae</i> - <i>M. triviale</i> complex (43 strains)
Positive in all four characters	31 (94%)	0 (0%)
Positive in three characters	2 ^a (6%)	1 ^b (2%)
Positive in two characters	0 (0%)	7 (16%)

Positive in one character	0 (0%)	4 (9%)
Negative in all four characters	0 (0%)	31 (72%)

- a Strain 09270 and 38009 did not show the resistance to rifampicin.
 b Strain 38014 showed three positive characters, except for the utilization of pyruvate as sole C source.

The four distinguishing characters are as follows : 1) Resistance to ofloxacin (DL8280), 2.5 μ g/ml^c; 2) resistance to bleomycin, 5 μ g/ml^c; 3) resistance to rifampicin, 25 μ g/ml^c; and 4) utilization of pyruvate as sole carbon source in the presence of glutamate nitrogen.

- c Tested in Ogawa egg medium.

考 察

M. nonchromogenicum Tsukamura 1965¹⁾, *M. terrae* Wayne 1966²⁾ および *M. triviale* Kubica 1970³⁾ は、この順に報告された発育の遅い非光発色性の抗酸菌であるが、3者は互いに類似し、区別は必ずしも容易ではなかった。1967年に、Tsukamura¹⁵⁾ は *M. nonchromogenicum* と *M. novum* の区別点として、aryl-sulfatase 反応と炭水化物の利用能をあげたが、*M. novum* は後に Meissner et al.⁷⁾ によって *M. terrae* と同一と考えられるに至ったので、この区別点は *M. nonchromogenicum* と *M. terrae* の区別点と考えてよい。続いて、Käppler¹⁶⁾, Tsukamura⁴⁾, Meissner et al.⁷⁾ は *M. nonchromogenicum* が nicotinamidase および pyrazinamidase 陽性であるのに対し、*M. terrae* は陰性であることを報告した。また Tsukamura & Mizuno¹⁷⁾ は ³⁵S-methionine 摂取後の薄層クロマトグラフィで両者の区別が可能であることを報告し、東村ほか¹⁸⁾ は *M. nonchromogenicum* は石油エーテル可溶の sulfolipid を含有するのに対して、*M. terrae* は、これを含有しないと報告した。Van den Berghe & Pattyn¹⁹⁾ も、bacterial lysates の polyacrylamide gel electrophoresis で両者の区別が可能と報告している。また、Saito et al.²⁰⁾ は *M. nonchromogenicum* は耐熱性酸性フォスファターゼが陽性であるのに *M. terrae* は陰性であることを見出し、Tsukamura et al.⁸⁾ は、*M. nonchromogenicum* が bleomycin 耐性であるのに対し、*M. terrae* および *M. triviale* は陰性であることを報告した。

Meissner et al.⁷⁾ は、*M. nonchromogenicum* は硝酸還元反応 (-) であるが、*M. terrae* は (+) であると報告しているが、この所見は、東村ほか¹⁸⁾ によれば全く誤っている。*M. nonchromogenicum* にも *M. terrae* にも、硝酸還元 (+) の株と (-) の株があり、硝酸還元は全く同定の役に立たない。Meissner et al.⁷⁾ の研究では実験菌株数が少なかったために偶然上記の結果が出た可能性が強い。不幸なことに、この結果が、Manual of Clinical Microbiology 1980年版²¹⁾ に、そのまま引用されて、*M. nonchromogenicum* と他の唯一の区別点とさ

れたために、以後、これらの菌種の同定に著しい混乱を招くこととなった。

M. nonchromogenicum, *M. terrae* および *M. triviale* は、はじめ非病原性菌と考えられていたが、最近10年ばかりの間に、これらの菌の感染症が相次いで報告されるようになった(東村総説参照⁹⁾)。これらの報告は、主として、米国および日本で報告されたが、米国での報告は、区別点を硝酸還元だけにおいているため、感染株が果たして報告のとおりであるかどうか全く疑わしい。一方、日本における感染株の同定は、nicotinamidase および pyrazinamidase, 耐熱性酸性フォスファターゼ、ならびに bleomycin 耐性の組合せによって行なわれた。その結果は、肺感染株6株(6名) および足関節感染株1株(1名)のすべてが *M. nonchromogenicum* と同定された。

本報の研究は、*M. nonchromogenicum*, *M. terrae* および *M. triviale* の分類をもう一度やり直し、正確な同定の方法を決める目的で行なった。その結果は、*M. nonchromogenicum* を他の2者から区別することはできたが、*M. terrae* と *M. triviale* は同一clusterに入り、区別することができなかった。かつて Tsukamura⁴⁾ は、*M. triviale* は *M. terrae* の R 型変異株であろうと述べたが、本報の結果も、これを裏付ける結果となった。

M. nonchromogenicum と他の2者を分つ性状としては、先に述べた nicotinamidase および pyrazinamidase, 耐熱性酸性フォスファターゼ、および bleomycin 耐性の組合せよりも、Table 5 に示した4性状の組合せの方が、よりすぐれていると考えられた。即ち、(1) ofloxacin (DL8280) 耐性、(2) bleomycin 耐性、(3) glutamate-N 原存在下での pyruvate 利用、(4) rifampicin 耐性の4者の組合せである。この中でも、最も効果的なのは、ofloxacin 耐性である。*M. nonchromogenicum* は ofloxacin 2.5 μ g/ml を含む1%小川培地に発育するが、*M. terrae* および *M. triviale* は発育しない。

結 論

計数分類によって、*M. nonchromogenicum* を *M.*

*terrae*および*M. triviale*から区別することができた。しかし、*M. terrae*と*M. triviale*とは区別できなかった。*M. nonchromogenicum*を*M. terrae*および*M. triviale*から区別するのに最も有用な性状は次の4性状であると思われる。(1)DL8280 (ofloxacin) 耐性, (2) bleomycin 耐性, (3) glutamate-N 原存在下での pyruvate 利用, および(4) rifampicin 耐性。この中で、DL8280耐性検査が最も有用である。

文 献

- 1) 東村道雄: 土壌から分離された nonphotochromogen 類似の抗酸菌 (*Mycobacterium nonchromogenicum* の記載), 医学と生物学, 71: 110—113, 1965,
- 2) Wayne, L. G.: Classification and identification of mycobacteria, III, Species within Group III, Am Rev Respir Dis, 93: 919—928, 1966.
- 3) Kubica, G. P., et al.: Differential identification of mycobacteria, VI, *Mycobacterium triviale* Kubica sp nov, Int J Syst Bacteriol, 20: 161—174, 1970.
- 4) Tsukamura, M.: Relationship between *Mycobacterium nonchromogenicum*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium novum* and subgroup "V" (*Mycobacterium triviale*), Japan J Microbiol, 15: 229—236, 1971.
- 5) Tsukamura, M.: Numerical classification of slowly growing mycobacteria, Int J Syst Bacteriol, 26: 409—420, 1976.
- 6) Tsukamura, M.: Numerical classification of 280 strains of slowly growing mycobacteria, Proposal of *Mycobacterium tuberculosis* series, *Mycobacterium avium* series, and *Mycobacterium nonchromogenicum* series, Microbiol Immunol, 27: 315—334, 1983.
- 7) Meissner, G., et al.: A co-operative numerical analysis of nonscoto- and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria, J Gen Microbiol, 83: 207—235, 1974.
- 8) Tsukamura, M., et al.: A study of the taxonomy of the *Mycobacterium nonchromogenicum* complex and report of six cases of lung infection due to *Mycobacterium nonchromogenicum*, Microbiol Immunol, 27: 219—236, 1983.
- 9) 東村道雄: *Mycobacterium nonchromogenicum* による感染症, 医療, 38: 453—456, 1984.
- 10) Tsukamura, M.: Necessity of differentiation of *Mycobacterium nonchromogenicum* from *Mycobacterium terrae* and *Mycobacterium triviale*, Am Rev Respir Dis, 129: 883, 1984.
- 11) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, p. 1—75, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, 1975.
- 12) Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R.: Numerical taxonomy, p. 1—573, W. H. Freeman and Company, San Francisco, 1973.
- 13) Liston, J., Wiebe, W. and Colwell, R. R.: Quantitative approach to the study of bacterial species, J Bacteriol, 85: 1061—1070, 1963.
- 14) Tsukamura, M.: An approach to numerical identification of bacterial species, J Gen Microbiol, 95: 207—212, 1976.
- 15) Tsukamura, M.: Two types of slowly growing, nonphotochromogenic mycobacteria obtained from soil by the mouse passage method, *Mycobacterium terrae* and *Mycobacterium novum*, Japan J Microbiol, 11: 163—172, 1967.
- 16) K ppler, W.: Zur Taxonomie der Gattung *Mycobacterium*, II, Klassifizierung langsam wachsender Mykobakterien, Zeitschr f Tuberk Erk Thoraxorg, 129: 321—328, 1968.
- 17) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Differentiation among mycobacterial species by this-layer chromatography, Int J Syst Bacteriol, 25: 271—280, 1975.
- 18) 東村道雄・水野松司・村田 浩: *Mycobacterium nonchromogenicum* と *Mycobacterium terrae* の区別, 結核, 55: 407—410, 1980.
- 19) Van den Berghe, D. A. and Pattyn, S. R.: Comparison of proteins from *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium nonchromogenicum* and *Mycobacterium terrae* using flat bed electrophoresis, J Gen Microbiol, 111: 283—291, 1979.
- 20) Saito, H., et al.: A new heat-stable acid phosphatase test for mycobacteria, Am Rev Respir Dis, 114: 407—409, 1976.
- 21) Runyon, E. H., et al.: Manual of Clinical Microbiology, 3rd edition, Chapter 14, *Mycobacterium*, edited by E. H. Lennette et al., p. 150—179, American Society for Microbiology, Washington, D. C., 1980.