

原 著

SLOWLY GROWING SCOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIA
 における生物学的生化学的特徴とその鑑別点

一 山 智・宮地卓也・東村道雄

国立療養所中部病院内科

受付 昭和62年2月5日

BIOLOGICAL AND BIOCHEMICAL CHARACTERISTICS OF SLOWLY
 GROWING SCOTOCHROMOGENIC MYCOBACTERIA AND
 DIFFERENTIATION AMONG THEIR SPECIES

Satoshi ICHIYAMA *, Takuya MIYACHI and Michio TSUKAMURA

(Received for publication February 5, 1987)

Biological and biochemical characteristics of slowly growing, scotochromogenic mycobacteria were compared with each other. Sixty three strains of *M. gordonae*, 49 strains of *M. scrofulaceum*, 15 strains of *M. szulgai*, and 13 strains of *M. xenopi* were examined for a total of 118 characters.

M. gordonae was characterized by the following ;

1) presence of long rods ($> 7 \mu$), 2) susceptibility to ethambutol (5 $\mu\text{g/ml}$), 3) positive Tween 80 hydrolysis after 14 days, 4) negative nitrate reduction to nitrite after 24 hr, 5) negative nicotinamidase and pyrazinamidase activities, and 6) ability to use n-propanol, n-butanol and iso-butanol as sole carbon sources in the presence of ammoniacal nitrogen.

M. scrofulaceum was characterized by the following ;

1) absence of long rods, 2) resistance to ethambutol (5 $\mu\text{g/ml}$), 3) negative Tween 80 hydrolysis after 14 days, 4) negative nitrate reduction to nitrite after 24 hr, and 5) positive nicotinamidase and pyrazinamidase activities.

M. szulgai was characterized by the following ;

1) presence of long rods, 2) susceptibility to ethambutol (5 $\mu\text{g/ml}$), 3) negative Tween 80 hydrolysis after 14 days, 4) positive nitrate reduction to nitrite after 24 hr, and 5) inability to use glucose as the sole carbon source in the presence of ammoniacal nitrogen.

M. xenopi was characterized by the following ;

1) presence of long rods and filaments, 2) resistance to ethambutol (5 $\mu\text{g/ml}$), 3) susceptibility to NH_2OH (500 $\mu\text{g/ml}$) and isoniazid (10 $\mu\text{g/ml}$), 4) negative Tween 80 hydrolysis after 14 days, 5) positive nitrate reduction to nitrite after 24 hr, but negative reaction in the fresh isolates, 6) positive nicotinamidase and pyrazinamidase activities, and 7) inability to use glucose, acetate and pyruvate as sole carbon sources in the presence of ammoniacal nitrogen.

* From the National Chubu Hospital, Departments of Internal Medicine, Obu, Aichi 474 Japan.

All of these characters of four species were considered to be useful for differentiation among them.

Key words : *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, Biological and biochemical characteristics

キーワード : *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, 生物学的化学的特徴

緒 言

我が国における非定型抗酸菌症は1980年代に入りその発生率の増加に伴って、感染菌種の多様化を呈してきた^{1)~3)}。また *M. nonchromogenicum*, *M. gordonae* のように環境中に常在し一般に非病原性と考えられている菌による感染症も報告され^{1)~3)7)8)}、その存在が注目されるようになった。このような感染菌種の多様化に対し、菌の正確な同定を行うことがよりいっそう重要なことと考えられる。

ところで、*M. gordonae* 感染症に関する報告をみると、米国ではこの菌の同定を単に、Tween 80 水解 (+)、硝酸還元 (-)、Catalase 半定量 (+) によって行っている。しかしながら、*M. scrofulaceum* も硝酸還元 (-)、Catalase 半定量 (+) であり、結局両者の区別点は Tween 80 水解のみとなる。単一性状で菌種を区別し、同定を行うことは十分な方法とは言えない。正確な同定を行うためには複数の鑑別点が必要である。

また、これまでにも我々の研究室に他施設から *M. xenopi* による肺感染症として、その菌の同定の確認の依頼が数件あったが、その結果はいずれも *M. xenopi* ではなかった。

このように、これらの菌による感染症に遭遇した場合、菌の同定に難渋することが少なくない。

本報では、Runyon (1959)⁴⁾ の Group II Scotochromogens に属する *M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi* の生物学的生化学的特徴を調べ、これらの菌の同定に関する鑑別点を明らかにした。

研究 方法

使用した菌株はすべて国立療養所中部病院保存株のうち、既に同定を終えたもので、各々分離源が異なるものを選んだ。

内訳は *M. gordonae* 63 株、*M. scrofulaceum* 49 株、*M. szulgai* 15 株、*M. xenopi* 13 株であった。これらの菌株について、束村らによる既報⁵⁾⁶⁾の方法に従い、各々118の性状を調べ、その陽性率を各菌種間で比較検討した。

研究 結果

M. gordonae 63 株、*M. scrofulaceum* 49 株、*M. szulgai* 15 株、*M. xenopi* 13 株について、各菌種間の鑑別に有用と考えられた性状の陽性率を Table に示した。

1. 集落及び形態

M. szulgai, *M. xenopi* はすべて R 型集落を呈したのに対し、*M. gordonae*, *M. scrofulaceum* は殆どが S 型集落を呈した。また Ziehl-Neelsen 染色において *M. gordonae*, *M. szulgai* 及び *M. xenopi* の殆どが Long rods ($>7\mu$) が主体で、Cross-barring (Intracellular granules) を伴っていた。一方、*M. scrofulaceum* は Short ~ Intermediate rods が主体であった。

2. 発育温度域

M. xenopi は他の菌種に比べ発育温度は高温域であった。即ち、28℃で発育せず、37~45℃で発育した。他の3菌種はすべて28℃で発育し、45℃では発育しなかった。

3. NH₂OH に対する感受性

M. xenopi はこれに対する感受性は高く、500 µg/ml にすべてが感受性であった。一方、他の3菌種は約半数が耐性であった。

4. 各種抗菌剤に対する感受性

M. scrofulaceum, *M. xenopi* は殆どが、Ethambutol (5 µg/ml) に耐性であったが、*M. gordonae*, *M. szulgai* はすべて感受性であった。また *M. xenopi* は殆どが isoniazid (10 µg/ml) に感受性であった。

5. 酵素反応

M. gordonae のみが Tween 80 水解 (+) であった。*M. xenopi* の 31% が Catalase 半定量 (+) であり、他の3菌種は殆どが陽性であった。*M. szulgai*, *M. xenopi* は殆どが硝酸還元 (+) であり、*M. gordonae*, *M. scrofulaceum* はすべて (-) であった。また *M. szulgai* は殆どが Asid phosphatase (+) であった。

6. C 源の利用能

M. gordonae, *M. scrofulaceum* はその過半数が、NH₃ の存在下に C 源として glucose, acetate, pyru-

Table Differentiation among Four Species of Slowly Growing, Scotochromogenic Mycobacteria

Character	Percentage of strains showing positive reaction			
	<i>M. gordonae</i> (63 strains)	<i>M. scrofulaceum</i> (49 strains)	<i>M. szulgai</i> (15 strains)	<i>M. xenopi</i> ^{a)} (13 strains)
Long rods (> 7 μm in length)	86	0	87	100
Cross barring	86	0	87	100
Rough colonies	17	12	100	100
Growth at 28°C	100	100	100	0
Growth at 45°C	0	10	0	100
Resistance to NH ₂ OH (500 μg/ml)	46	67	33	0
Resistance to ethambutol (5 μg/ml)	0	69	0	100
Resistance to isoniazid (10 μg/ml)	76	84	33	8
Tween80 hydrolysis (14 days)	87	0	0	0
Nitrate reduction (24 hr)	0	0	93	100
Catalase (foam height >45mm)	90	88	93	31
Acid phosphatase	3	41	93	0
Urease	35	61	73	31
Nicotinamidase	10	82	60	100
Pyrazinamidase	10	82	53	100
Glucose as C source (NH ₃ -N)	76	84	0	0
Acetate as C source (NH ₃ -N)	83	69	100	0
Pyruvate as C source (NH ₃ -N)	59	51	67	0
n-Propanol as C source (NH ₃ -N)	70	14	0	0
n-Butanol as C source (NH ₃ -N)	76	12	13	0
iso-Butanol as C source (NH ₃ -N)	70	8	0	0
Nicotinamide as N source	25	84	87	0
Pyrazinamide as N source	48	84	100	0

a) Strains of *M. xenopi* preserved in our laboratory gave a weakly positive reaction, but flesh isolates gave a negative reaction.

vate を利用することができた。しかしながら、*M. szulgai* は glucose を、*M. xenopi* はこれらすべてを C 源として利用できなかった。また *M. gordonae* は殆どが n-propanol, n-butanol, iso-butanol を C 源として利用することができた。

7. N 源の利用能

M. xenopi は glycerol の存在下に N 源として nicotinamide, pyrazinamide を利用できなかった。一方、*M. scrofulaceum*, *M. szulgai* は殆どがこれらを N 源として利用することができた。

考 察

我々が過去に国療非定型抗酸菌症共同研究班の菌株同定にあたって、最も頭を悩ましたのが Group II Scoto-

chromogens の同定であった。我々が同定の標準とする方法は、Slowly growing mycobacteria においては、Tsukamura⁶⁾ の Manual p. 66 - 71 に示した 76 の性状について計数同定を行うものである。ところが、routine work としての同定では常にこのような手間のかかる方法を実施するわけにはいかない。従って Manual p. 71 の簡易同定法を利用せざるをえない。このような場合、しきりに困難を感じるのが、*M. scrofulaceum* と *M. gordonae* の区別、また、*M. gordonae* と *M. szulgai* の区別である。

例えば、*M. scrofulaceum* と *M. gordonae* の区別の場合、区別点は Tween 80 水解⁹⁾ 及び Ethambutol 耐性¹⁰⁾ の 2 点である。前者は通常これらの 2 性状で (-), (+) の反応を、後者は (+), (-) の反応を示す。しかし (-),

(-) または (+), (+) の反応を示す菌株の場合, いずれに同定すべきか判定に困る。*M. gordonae* と *M. szulgai* の区別においても, 区別点は, 硝酸還元と Tween 80 水解の 2 点であるから同様の問題が起こる。この問題の解決のためには, 更に多くの区別点を用いる必要があり, 本報の研究はこの目的のために行った。

我々は標準の計数同定法で同定した多数の菌株について, 有用な区別点を探した。使用した菌株数は, 我々の過去の研究¹²⁾¹³⁾ の 2 ~ 数倍にのぼった。本報で新たに追加した区別点及び特徴は次のようであった。

1. *M. scrofulaceum* と *M. gordonae* の区別

既報の Tween 80 水解⁹⁾ と Ethambutol (5 µg/ml) 耐性¹⁰⁾ の他に, *M. gordonae* に long rods (> 7 µm) を示すものが多いこと (一方, *M. scrofulaceum* はこれを欠く), また *M. gordonae* に C 源として n-propanol, n-butanol, 及び iso-butanol を利用するものが多かった。

2. *M. gordonae* と *M. szulgai* の区別

この両者の区別点としては, Marks et al.¹¹⁾ により, *M. szulgai* は硝酸還元 (+), Tween 80 水解 (-), C 源として glucose を利用しないこと, 及び R 型集落を形成することが知られている。しかし *M. gordonae* も R 型を形成することが稀ではないので, 重要な区別点は前 3 者である。そこで本報では更に次の事実を加えた。*M. szulgai* は Acid phosphatase (+) であり, *M. gordonae* は (-) であった。*M. szulgai* は Nicotinamidase 及び Pyrazinamidase が (+) のことが多く, また C 源として n-propanol, n-butanol, iso-butanol を利用しなかった。

3. *M. xenopi* の特徴についての新知見

Manual of Clinical Microbiology 第 4 版(1985)¹⁴⁾ によると, *M. xenopi* は S 型集落を形成し, 硝酸還元 (-) と記載されている。ところが本報に示すように, 我々の保存株をみると, 13 株とも R 型集落であった。分離当初は S 型集落であったものが, 継代により R 型に変化した可能性も否定できないが, 日本で分離された 1 株¹⁵⁾ は当初から R 型集落であった (注; 日本での臨床分離株は, 我々の知るかぎり, この 1 例のみである)。従って *M. xenopi* を簡単に S 型と決めることはできないようである。また *M. xenopi* は一般には硝酸還元 (-)¹⁴⁾ と考えられているが, 我々の保存株では, 13 株とも (+) であった。日本で分離された 1 株は, 分離当初は (-) であったが, 継代後直ちに (+) に変化した。この点は同定にあたって十分考慮しなければならないことと思われる。更に, この菌は N 源及び C 源の利用能に特徴が認められた。即ち, C 源として glucose, acetate, pyruvate, n-propanol, n-butanol, 及び iso-butanol すべてを利用せず, また, N 源として, nicotina-

midase, 及び pyrazinamide を利用しなかった。 $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ に対する感受性は 1969 年に Tsukamura¹⁶⁾ によって報告されているが, 本報でも, *M. xenopi* が最も感受性が高く, 500 µg/ml に対し全株が感受性であり, 同定に有用であると考えられた。

結 論

Group II scotochromogens (*M. gordonae*, *M. scrofulaceum*, *M. szulgai*, *M. xenopi*) の生物学的生化学的特徴を, 同定の終了した保存株 140 株について各々 118 の性状を調べ, その陽性率を各菌種間で比較した。

M. gordonae は S 型集落を示し, Long rods (+), 28 °C 発育 (+), 45 °C 発育 (-), Ethambutol (5 µg/ml) 耐性 (-), Tween 80 水解 (+), 硝酸還元 (-), Nicotinamidase 反応 (-), Pyrazinamidase 反応 (-) であり, C 源として n-propanol, n-butanol, iso-butanol を利用した。

M. scrofulaceum は S 型集落を示し, Long rods (-), 28 °C 発育 (+), 45 °C 発育 (-), Ethambutol (5 µg/ml) 耐性 (+), Tween 80 水解 (-), 硝酸還元 (-), Nicotinamidase 反応 (+), Pyrazinamidase 反応 (+) であった。

M. szulgai は R 型集落を示し, Long rods (+), 28 °C 発育 (+), 45 °C 発育 (-), Ethambutol (5 µg/ml) 耐性 (-), Tween 80 水解 (-), 硝酸還元 (+), Acid phosphatase 反応 (+) であり, C 源として glucose を利用しなかった。

M. xenopi は R 型集落を示し, Long rods (+), Filaments (+), 28 °C 発育 (-), 45 °C 発育 (+), Ethambutol (5 µg/ml) 耐性 (+), NH_2OH (500 µg/ml) 耐性 (-), isoniazid (10 µg/ml) 耐性 (-), Tween 80 水解 (-), 硝酸還元 (+), ただし初代分離株では (-), Nicotinamidase 反応 (+), Pyrazinamidase 反応 (+) であり, C 源として, glucose, acetate, pyruvate, n-propanol, n-butanol, iso-butanol を利用しなかった。

文 献

- 1) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 日本における非定型抗酸菌症の研究 (国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班 1981 年度報告), *M. kansasii* 症の増加および感染菌種の多様化 (*M. nonchromogenicum* 感染症の出現), 結核, 58: 339, 1983.
- 2) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 日本における非定型抗酸菌症の研究 (国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班 1982 年度報告), 感染菌種多様化の時代に入る, 結核, 59: 329, 1984.
- 3) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 日本におけ

- る非定型抗酸菌症の研究(国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班1983年度報告), *M. kansasii* による肺感染症が増加し, 感染菌種分布は欧米型に近づきつつある。そして感染菌種の多様化は続いている, 結核, 60:299, 1985.
- 4) Runyon, E. H. : Anonymous mycobacteria in pulmonary disease, *Med Clin N Amer*, 43:273, 1959.
 - 5) Tsukamura, M. : A review of the methods of identification and differentiation of mycobacteria, *Reviews of Infectious Diseases* Vol. 3 No. 5 September-October, 1981.
 - 6) Tsukamura, M. : Identification of mycobacteria. p. 1, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan, 1984.
 - 7) 東村道雄 : *M. gordonae* による感染症, *医療*, 37:456, 1983.
 - 8) 東村道雄 : *M. nonchromogenicum* Complex による感染症, *医療*, 38:453, 1984.
 - 9) Wayne, L. G., Doubek, J. R. et al. : Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate, *Amer Rev Respir Dis*, 90:588, 1964.
 - 10) 東村道雄 : Ethambutol 耐性による病原性および非病原性抗酸菌 (Group II 及び Group III) の区別, *結核*, 45:237, 1970.
 - 11) Marks, J., Jenkins, P. A. et al. : *Mycobacterium szulgai*-A new pathogen, *Tubercle*, 53:210, 1972.
 - 12) Tsukamura, M. : Numerical classification of slowly growing mycobacteria, *Int J Systematic Bacteriol*, 26:409, 1976.
 - 13) Tsukamura, M. : Numerical classification of 280 strains of slowly growing mycobacteria, *Microbiol Immunol*, 27:315, 1983.
 - 14) *Manual of Clinical Microbiology* 4th ed., edited by Lennette, E. H., Balows, A. et al., p.216, American Society for Microbiology, Washington, D. C. 1985.
 - 15) Tsukamura, M. et al. : Lung infection due to *Mycobacterium xenopi*. Report of the first case in Japan, *Microbiol Immunol*, 28:123, 1984.
 - 16) Tsukamura, M. : Identification of Group II scotochromogens and Group III nonphotochromogens of mycobacteria, *Tubercle*, 50:51, 1969.