

原 著

日本人女性に皮膚潰瘍を作った *Mycobacterium ulcerans* 類似菌

束 村 道 雄

国立療養所中部病院内科

金 田 研 司

東京医科歯科大学医学部解剖学教室

今 枝 保

Department of Microbiology, University of Medicine
and Dentistry, Newark, New Jersey, U. S. A.

御子柴 甫

信州大学医学部皮膚科教室

受付 平成元年1月13日

A TAXONOMIC STUDY ON A MYCOBACTERIUM WHICH CAUSED SKIN ULCER IN
A JAPANESE GIRL AND RESEMBLED *MYCOBACTERIUM ULCERANS*Michio TSUKAMURA *, Kenji KANEDA, Tamotsu IMAEDA
and Hajime MIKOSHIBA

(Received for publication January 13, 1989)

A taxonomic study has been made on a mycobacterial strain isolated from skin ulcer lesion of a 19 year-old Japanese girl who has lived only in Japan. By numerical classification, in which 108 characters were used, 6 isolates of this strain formed one cluster together with *Mycobacterium ulcerans* strains. However, the isolates were distinguished from the *M. ulcerans* strains, forming a subcluster (Fig. 1). The isolates were differentiated by the characters shown in Table 2 from authentic *M. ulcerans* strains. The mycolic acids of the strain ATCC 33788 isolated from Japanese girl were distinguished from those of the type strain ATCC 19423 of *M. ulcerans* (Fig. 2). The number of carbon atoms of alpha-mycolate of the former centered at 80, whereas those of the strain ATCC 19423 at 76. The number of carbon atoms of the alpha-unit was 24 in both strains and the number of double bonds was 2 in both strains. The strain ATCC 33788 showed a 100% similarity with the strain ATCC 19423 in DNA hybridization. In view of the above results, we have concluded that the strain belongs to a new subspecies of *M. ulcerans* (*M. ulcerans* subsp. *shinshuense*). Until now, *M. ulcerans* infection has occurred only in three area of

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

the world, Africa, Oceania, and South and Middle America. Our case is the first case of *M. ulcerans* infection discovered in an area other than the above. However, the strain was not the same as the *M. ulcerans* described previously but differed from it in mycolic acids and some biological and biochemical characteristics.

Key words : Skin ulcer, *Mycobacterium ulcerans*-like organism

キーワード : 皮膚潰瘍, *Mycobacterium ulcerans* 類似菌

緒 言

1982年に、御子柴ほか¹⁾は、19歳の日本女性の皮膚潰瘍から、*Mycobacterium ulcerans*に類似する抗酸菌を分離したことを報告した。*M. ulcerans*の感染症は、太平洋、アフリカ、中南米の熱帯地域にしかみられないとされていたので、この分離は極めて異例のことと思われた²⁾³⁾。そこで、この分離菌の性状は、Tsukamura and Mikoshiba⁴⁾によって詳しく研究され、*M. ulcerans*と近縁ではあるが、明らかに、それとは区別できる新しい型の抗酸菌であることが分かった。われわれは、その後、この抗酸菌の分類学的位置を明らかにするために、計数分類学、mycolic acids および DNA homology analysis の立場から研究を行った。

研究 方法

菌株 : 被検株は、御子柴が、外国に行ったことのない19歳の日本人女性の皮膚潰瘍から分離し、東村に送付した6株である。ただし、これらは、同一患者に由来するので、英語で言えば、one strainに属する6 isolatesである。最初の報告は、1982年であるが¹⁾⁴⁾、実際の分離年は、1980年である。1980年に、御子柴から東村の許へ送られ、-20°Cに凍結して保存された。これらのisolatesには、44601-44606の菌株番号が付され、1株は、東村により American Type Culture Collection (ATCC) に送付され、ATCC 33728 (=44601) として保存されている。これらの菌株と比較するために、皮膚感染菌として知られる次の3菌種の株を使用した。*Mycobacterium marinum*, *M. haemophilum*, *M. ulcerans*, これらの菌株の由来は、Table 1 に示した。

計数分類 : 各菌株について、108性状を検査した。この中の103性状は、Tsukamura⁵⁾が前に示した104性状から“Gram染色”を除いた103性状である。今回は、この103に、次の5性状を追加した。(1) 28°C 7日後の発育、(2) 28°C 14日後の発育、(3) 28°C 28日後の発育、(4) succinamideのN源としての利用、(5) L-serineのN源としての利用。28°Cでの発育は、被検株を約0.1 mg (湿菌量)「1%小川培地」に接種した場合の発

育の有無を示した。*M. haemophilum*に関する検査は、Dawson and Jennis⁶⁾の報告に基づいて、1% Ferric ammonium citrateを添加した小川培地で行った。計数分類は、matching coefficientを計算し、single linkage法⁷⁾で“clustering”を行った。

Mycolic acids : Mycolic acidsの抽出およびC原子数の測定は、mass spectrometry gas chromatographyにより行った⁸⁾。

DNA Hybridization : DNA hybridizationは、dot blot法で行い、近縁とみられた菌種の比較は光学的に行った。DNAの標識は、photo-biotineによった。DNA hybridizationの方法および guanine + cytosine (G+C) mol%の測定の方法は既報した⁹⁾¹⁰⁾。

研究結果および考察

計数分類

計数分類の結果を Fig. 1 に示す。Matching coefficient 88%のレベルで、3つの clusters がみられる。第1の cluster は、08004 および 08005 の2株を除いた24株の *M. marinum* から成る。第2は、5株の *M. haemophilum* の cluster であり、第3の cluster は、5株の *M. ulcerans* と6株 (6 isolates) の信州大学分離株から成る。この結果をみると、信大株 (日本女性株) は *M. ulcerans* と同定すべきであると思われる。しかし、他の“authentic”な *M. ulcerans* 株が互いに似ているのに対し、信大株は、これらと若干違っていることが、図の結果から分かる。事実、信大株と“authentic” *M. ulcerans* 株の性状を比較してみると、Table 2 に示すような差異がみられる。

(1) 信大株は発育が速く、28°C 14日後に、小川培地によく発育するが、*M. ulcerans* は、ほとんど発育しない。

(2) 信大株は、薄い褐色ないし黄色のR型集落を形成するが、*M. ulcerans* は無色である。

(3) 信大株は、Rifampicin 25 µg/ml に耐性であるが、*M. ulcerans* は感受性である。

(4) 信大株は、6株中5株が Isoniazid 10 µg/ml 感受性であるが、*M. ulcerans* は耐性である。

Table 1. Strains Used

Serial no.	Laboratory no.	Species name as received	Source
1	08001	<i>M. marinum</i>	S. Sato ^{a)} , 1964; A. J. Ross
2	08002	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; B 916, <i>M. balnei</i>
3	08003	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; B 913, <i>M. balnei</i>
4	08004	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; <i>M. platypoecilus</i>
5	08005	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; L-17, <i>M. ranae</i>
6	08006	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; <i>M. piscium</i>
7	08007	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; Lt, tropical fish
8	08008	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; Sf-2, fish
9	08009	<i>M. marinum</i>	S. Sato, 1964; Sw, fish
10	08010	<i>M. marinum</i>	ATCC 927 ^T ; ATCC ^{b)} , 1967
11	08011	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke ^{c)} , 1968; SN 1251
12	08012	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke, 1968; SN 1253
13	08013	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke, 1968; SN 1254
14	08014	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke, 1968; SN 1256
15	08015	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke, 1968; SN 1301
16	08016	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke, 1968; SN 1302
17	08017	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke, 1968; SN 1304
18	08018	<i>M. marinum</i>	R. Bönicke, 1968; SN 1305
19	08019	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura ^{d)} , 1973; human skin
20	08020	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura, 1973; human skin
21	08021	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura, 1975; human skin
22	08023	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura, 1976; MIS 14
23	08024	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura, 1976; MIS 225
24	08026	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura, 1977; human skin
25	08027	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura, 1984; human skin
26	08028	<i>M. marinum</i>	M. Tsukamura, 1984; human skin
27	27501	<i>M. haemophilum</i>	D. J. Dawson ^{e)} , 1980; RM
28	27502	<i>M. haemophilum</i>	D. J. Dawson, 1980; O B J
29	27503	<i>M. haemophilum</i>	D. J. Dawson, 1980; P O W
30	27504	<i>M. haemophilum</i>	D. J. Dawson, 1980; haemophilum
31	27505	<i>M. haemophilum</i>	D. Sompolinsky ^{f)} , 1970; ATCC 29548 ^T
32	28501	<i>M. ulcerans</i>	D. J. Dawson, 1980; 14795/78 Setter
33	28502	<i>M. ulcerans</i>	D. J. Dawson, 1980; Brooks
34	28503	<i>M. ulcerans</i>	D. J. Dawson, 1980; Cockrell
35	28504	<i>M. ulcerans</i>	ATCC 19423 ^T ; ATCC, 1981
36	28505	<i>M. ulcerans</i>	ATCC 19423 ^T ; H. Boisvert ^{g)} , 1981
37	44601	Present isolate	H. Mikoshiba ^{h)} , 1980; ATCC 33728
38	44602	Present isolate	H. Mikoshiba, 1980
39	44603	Present isolate	H. Mikoshiba, 1980
40	44604	Present isolate	H. Mikoshiba, 1980
41	44605	Present isolate	H. Mikoshiba, 1980
42	44606	Present isolate	H. Mikoshiba, 1980

a) S. Sato, Tohoku University, Sendai, Japan; b) American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, U. S. A.; c) R. Bönicke, Forschungs-institut Borstel, Borstel, Germany; d) M. Tsukamura, National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan; e) D. J. Dawson, State Laboratory of Microbiology and Pathology, Brisbane, Australia; f) D. Sompolinsky, Asaf Harofe Hospital, Zerfin, Israel; g) H. Boisvert, Institut Pasteur, Paris, France; h) H. Mikoshiba, Shinshu University, Matsumoto, Nagano, Japan.

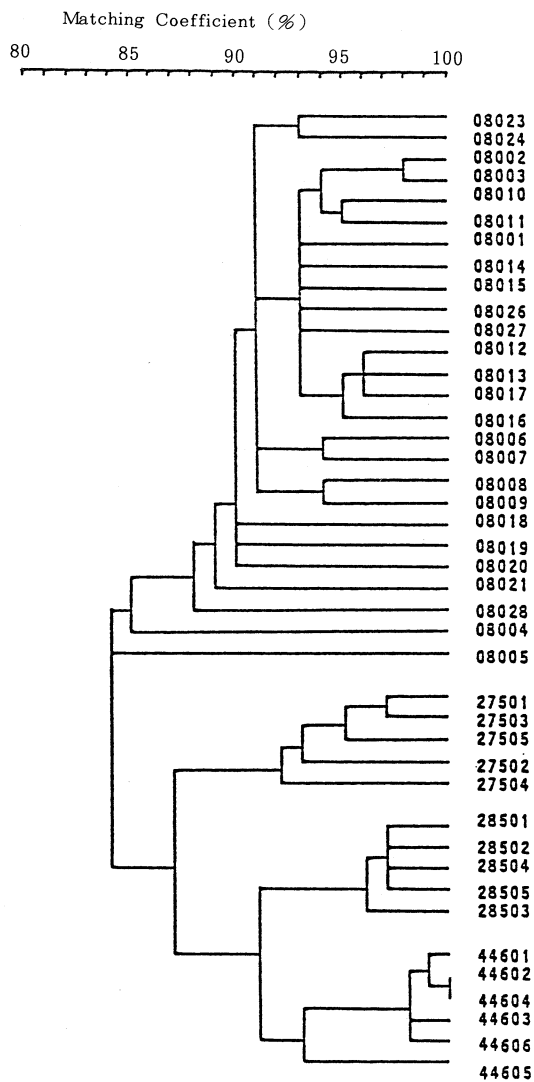


Fig. 1. Dendrogram of strains prepared by the single linkage-method of the clustering.

(5) 信大株は Urease 陽性であるが, *M. ulcerans* は陰性である。

(6) 信大株は, glutamate の存在下で, pyruvate を C 源として発育するが, *M. ulcerans* は発育しない。

以上のように, 両者の間には, かなり判然とした生物学的, 生化学的性状の差がみられる。

Mycolic Acids の比較

信大株の 44601 株 (ATCC 33728) と *M. ulcerans* の type strain (ATCC 19423) の mycolic acids を比較してみると, 次のような差がみられた。薄層 chromato-

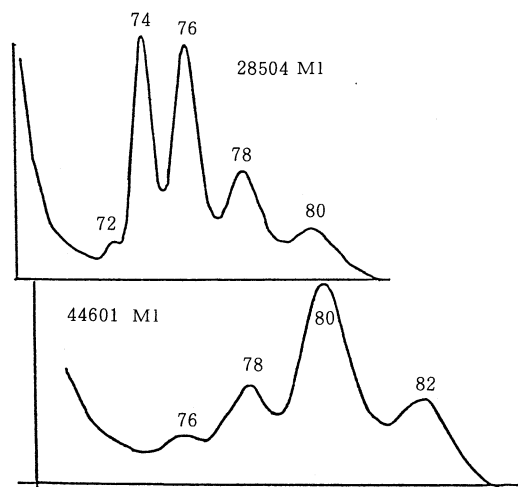


Fig. 2. Comparison of the gas chromatographic patterns of a trimethylsilyl ether derivative of the α -mycolate between the type strain 28504 (ATCC 19423) of *M. ulcerans* (upper) and the isolate 44601 (ATCC 33728) (lower).

The numbers in figure are those of carbon atoms.

graphy では, 両者ともに α -mycolate (M_1), methoxy-mycolate (MeO) および keto-mycolate (M_2) に相当する spots がみられたが, mass spectrometry で調べた α -mycolate (M_1) の C 原子数は, 信大株 ATCC 33728 では, 76, 78, 80 および 82, 平均 80 であったのに対し, *M. ulcerans* ATCC 19423 株では, 72, 74, 76, 78 および 80, 平均 76 で, 両者の間に判然とした差がみられた (Fig. 2)。しかし, 両者の α -unit の C 原子数は 24, double bonds 数は 2 個で, 同じであった。以上のごとく, mycolic acids の分析では, はっきりと両者を区別することができた。

DNA Hybridization

信大株 ATCC 33728 株の G+C mol % は 61.8, *M. ulcerans* ATCC 19423 株のそれは 61.4 で, ほとんど差がなかった。dot blot 法で DNA hybridization を行うと, 信大株は, 前に使用した抗酸菌のいずれとも関連性を示さなかった¹¹⁾。しかし, *M. ulcerans* の type strain とは区別しがたかった。そこで, この両者の hybridization の程度を光学的に測定してみたが, 100% の hybridization であると示された。

以上の 3 つの研究の結果は, それぞれ違いがあり, その分類学的意味づけに若干苦慮しなければならなかった。

まず, mycolic acids の成績をみると, 両者の C 原子数の分布は, 明らかに違っており, 両者を別種のもの

Table 2. Characters Useful for Distinguishing among Four Taxa of Skin Pathogens

Character	Percent of strains showing positive reaction			
	<i>M. marinum</i> (24 strains)	<i>M. haemophilum</i> (5 strains)	<i>M. ulcerans</i> (5 strains)	Present isolates (6 isolates)
Growth after 7 days (28°C) ^{a)}	100	0	0	0
Growth after 14 days (28°C) ^{a)}	100	0	0	100
Rough colonies	96 ^{b)}	0	100	100
Photochromogenicity ^{c)}	75	0	0	0
Colonial pigmentation in dark ^{d)}	21	0	0	100
Growth at 37°C ^{a)}	100	80	100 ^{f)}	0
Resistance to 0.2% sodium para-aminosalicylate ^{a)}	96	80	0	0
Resistance to NH ₂ OH.HCl, 0.25 mg/ml ^{a)}	100	0	100	100
Resistance to ethambutol, 5 µg/ml ^{a)}	42	100	0	0
Resistance to rifampicin, 25 µg/ml ^{a)}	8	80	0	100
Resistance to sodium salicylate, 0.5 mg/ml ^{a)}	92	100	0	0
Resistance to isoniazid, 10 µg/ml ^{a)}	100	80	100	17
Catalase (foam height > 45 mm)	0	0	100	100
α-Esterase	0	100	0	0
β-Esterase	75	100	0	0
Urease	100	0	0	100
Nicotinamidase	25	100	20	0
Allantoinase	63	0	0	0
Arylsulfatase (3 days)	100	0	0	0
Arylsulfatase (14 days)	100	0	0	0
Acetate as carbon source (glutamate-N)	100	40	0	0
Pyruvate as carbon source (glutamate-N)	100	20	0	100
Acetate as carbon source ^{e)}	88	0	0	0
Ethanol as carbon source ^{e)}	83	0	0	0

a) Tested in Ogawa egg medium. b) When received all *M. marinum* strains except 08002, 08003 and 08006 formed smooth colonies. c) The photochromogenicity was tested at 37°C, incubating one tube in the dark and another under exposure to Light. d) Tested at 28°C. e) Unless noted, the utilization of carbohydrates was tested in the presence of ammoniacal nitrogen. f) Thin membranous growth after 6 weeks.

としてよいことになる。一方、DNA hybridizationの結果では、両者は全く同一菌種とみなさなければならぬことになる。計数分類の結果をみると、*M. ulcerans* 株と信大株は明らかに区別できるものであるが、両者を合した“cluster”は、他の *M. marinum* 株および *M. haemophilum* 株と比肩し得る位置にある。したがって、信大株を *M. ulcerans* に属するが、明らかに標準株とは異なる亜種 (subspecies) とみなすのが妥当であると思われる。このように考えると、DNA hybridizationにより区別できないのは当然であるし、一方、mycolic acids および生物学的性状、生化学的性状で区別できてよい。このような例は、前に *Mycobacterium fortuitum* subspecies *acetamidolyticum* で経験された¹¹⁾。このような結果は、DNA hybridiza-

tion を基準にして考えると、mycolic acids 分析の結果は、必ずしも菌種と一致しないことを示している。mycolic acids の特異性は、菌種の独立性を示す必須条件ではあるが、mycolic acids が異なっていれば、必ず別菌種であるとはいえないことを示唆している。同一菌種でも、異なった mycolic acids 組成を示しうるものが考えられる。

現在、菌種の定義に関して、すべての研究者の合意は得られていない。計数分類で独立した“cluster”を示す菌があれば、それを菌種とみなすのは、計数分類学の立場である¹²⁾。一方、mycolic acids 研究者にとっては、異なった mycolic acids を示す菌は、異なった菌種と考える立場が主張されている¹³⁾。DNA hybridization の立場からすれば、一致率 70% 以上の菌をもって

Table 3. Comparison of the Characteristics of Strains 08004 and 08005 with Those of Other *Mycobacterium marinum* Strains

Character	% of Strains Showing Positive Reaction		
	<i>M. marinum</i> (24 strains)	08004	08005
Photochromogenicity	75	+	-
Resistance to 0.2% sodium p-aminosalicylate in Ogawa egg medium	100	-	+
Arylsulfatase (3 days)	100	-	-
Arylsulfatase (14 days)	100	-	-
Niacin	21	+	-
α -Esterase	0	-	+
Glutamate as N and C sources	67	-	-
Glucose as C source (ammoniacal N)	83	-	-
Ethanol as C source (ammoniacal N)	83	-	-
Glucose as C source (glutamate-N)	100	-	-
Acetate as C source (glutamate-N)	100	-	-
Pyruvate as C source (glutamate-N)	100	-	-

Strain 08004 was received as '*M. platypocilus*' from S. Sato in 1964.

Strain 08005 was received as '*M. ranae*' L-17 from S. Sato in 1964.

同一菌種とみなすのが、大方の見解のようである¹⁴⁾。いずれの立場に立っても差支えないのであるが、現在では、DNA hybridization が重視される趨勢にあるようである。したがって、われわれも、そのような立場に立てば、信大株を *M. ulcerans* の新亜種とするのが妥当であると思われる。以後、信大株を、*Mycobacterium ulcerans* subspecies *shinshuense* と呼ぶことにする。Type strain は、すでに American Type Culture Collection に寄託した ATCC 33728 株である。

08004 株と 08005 株の分類について

Fig. 1 の計数分類の結果に示したように、従来、*M. marinum* とされていた 08004 株と 08005 株は、他の *M. marinum* とはかなり違っている。この 2 株は、東北大学抗酸菌病研究所の佐藤三郎教授が所持されていた株で、今野淳博士（後、教授）から 1964 年に分与された。東村¹⁵⁾ は、1966 年の発表で、これを *M. marinum* としたのであるが、上述のように、他の *M. marinum* とは、少し違った性状を示す。Table 3 に、その相違点を示す。しかし、計数分類に示すように (Fig. 1)、他の菌種と比較すると *M. marinum* に最も近い。

結 論

御子柴甫によって、外国に行ったことがない 19 歳(当時)の日本女性の皮膚潰瘍から分離された抗酸菌は、*M. ulcerans* に属すると考えられる。*M. ulcerans* は、従来、太平洋州、アフリカ、中南米以外では分離されることがないので、これが日本で分離されたことは、極めて異例のことといえる。しかしながら、この株は、従来知られる *M. ulcerans* とは、その生物学的性状、生化学的性状、mycolic acids 組成において、明らかに異なっていた。しかし、DNA hybridization では、*M. ulcerans* と区別できなかった。したがって、この株は、*M. ulcerans* の新しい亜種を形成するものと考えられた。

文 献

- 1) 御子柴甫, 進藤泰子, 松下颯樹, 望月正子, 東村道雄: *Mycobacterium ulcerans* 類似菌による非定型抗酸菌症の 1 例, 日本皮膚科学会雑誌, 92: 557~565, 1982.
- 2) 東村道雄: *Mycobacterium ulcerans* 及び *My-*

- cobacterium haemophilum* による感染症, 結核, 63 : 433~439, 1988.
- 3) Hayman, J. : *Mycobacterium ulcerans* : an infection from Jurassic time ? Lancet 1984 (iii) : 1015-1016, 1984.
 - 4) Tsukamura, M. and Mikoshiba, H. : A new Mycobacterium which caused skin infection, Microbiol Immunol, 26 : 951-955, 1982.
 - 5) Tsukamura, M. : Numerical analysis of rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium agri* (Tsukamura 1972) Tsukamura sp. nov., nom rev. Int J Syst Bacteriol, 31 : 247-258, 1981.
 - 6) Dawson, D. J. and Jennis, F. : Mycobacteria with a growth requirement for ferric ammonium citrate, identified as *Mycobacterium haemophilum*, J Clin Microbiol, 11 : 190-193, 1980.
 - 7) Sneath, P. H. A. and Sokal, R. R. : Numerical taxonomy. The Principles and practice of numerical classification, p.1-573, 1973, W. H. Freeman and Co., San Francisco.
 - 8) Tomiyasu, I. and Yano, I. : Separation and analysis of novel polyunsaturated mycolic acids from a psychrophilic acid-fast bacterium, *Gordona aurantiaca*, Eur J Biochem, 139 : 173-180, 1984.
 - 9) Athwal, R. S., Deo, S. S. and Imaeda, T. : Deoxyribonucleic acid relatedness among *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium leprae* and selected bacteria by dot blot and spectro-photometric deoxyribonucleic acid hybridization assays, Int J Syst Bacteriol, 34 : 371-375, 1984.
 - 10) Imaeda, T., Kirchheimer, W. F. and Barksdale, L. : DNA isolated from *Mycobacterium leprae* ; genome size, base ratio, and homology with other related bacteria as determined by optical DNA-DNA reassociation, J Bacteriol, 150 : 414-417, 1982.
 - 11) Tsukamura, M., Yano, I. and Imaeda, T. : *Mycobacterium fortuitum* subspecies *acetamidolyticum*, a new subspecies of *Mycobacterium fortuitum*, Microbiol Immunol, 30 : 97-110, 1986.
 - 12) Sneath, P. H. A. : New approaches to bacterial taxonomy : use of computers, Ann Rev Microbiol, 18 : 335-346, 1964.
 - 13) 金田研司, 内藤眞一, 今泉貞雄, 富安郁子, 水野淨子, 矢野郁也 : 超高級 (>C₈₀) α -ミコール酸の GC/MS 分析, 質量分析, 33 : 197~201, 1985.
 - 14) Imaeda, T. : Deoxyribonucleic acid relatedness among selected strains of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium bovis* BCG, *Mycobacterium microti*, and *Mycobacterium africanum*, Int J Syst Bacteriol, 35 : 147-150, 1985.
 - 15) Tsukamura, M. : Adansonian classification of mycobacteri, J Gen Microbiol, 45 : 253-273, 1966.