

原 著

Mycobacterium nonchromogenicum と *Mycobacterium terrae* の区別

東 村 道 雄・水 野 松 司・村 田 浩

国立療養所中部病院

受付 昭和 55 年 4 月 1 日

DIFFERENTIATION BETWEEN *MYCOBACTERIUM NONCHROMOGENICUM*
AND *MYCOBACTERIUM TERRAE*

Michio TSUKAMURA*, Shoji MIZUNO and Hiroshi MURATA

(Received for publication April 1, 1980)

Mycobacterium nonchromogenicum Tsukamura (1965)¹⁾, *M. terrae* Wayne (1966)²⁾, *M. novum* Tsukamura (1966)³⁾, and *M. triviale* Kubica *et al.* (1970)⁴⁾ are slowly growing, nonphotochromogenic mycobacteria belonging to Runyon's Group III and are isolated from sputum specimens. These are closely related to each other^{5),6)}. *M. novum* is considered as a synonym of *M. terrae*⁷⁾. It was reported that *M. nonchromogenicum* and *M. terrae* are differentiable from each other by nicotinamidase and pyrazinamidase activities and some other properties⁸⁾⁻¹¹⁾, but it is also certain that these are very closely related⁶⁾. The purpose of the present study is to search useful characters which are able to differentiate between these two organisms. The results of the present study have shown that the following characters are useful: nicotinamidase, pyrazinamidase, nitrate reduction, heat-stable acid phosphatase, growth at 42°C, and thin-layer chromatography after uptake of ³⁵S-methionine.

M. nonchromogenicum usually grows at 42°C, shows positive heat-stable acid phosphatase activity, and shows a radioactive spot at Rf value 0.94 to 0.98 in thin-layer chromatography. In contrast to the above, *M. terrae* does not grow at 42°C, does not show heat-stable acid phosphatase activity, and does not show any spot at the Rf value 0.94 to 0.98 in thin-layer chromatography. Usefulness of the heat-stable acid phosphatase activity for differentiating these two organisms was shown by Saito *et al.*¹⁶⁾ This was confirmed by the present study. The other two useful characters, the growth at 42°C and the presence or absence of the radioactive spot at the Rf value 0.94 to 0.98, were added in the present study. The substance which shows the spot at the Rf value 0.94 to 0.98 is extracted from bacterial cells by diethyl ether-ethanol (1:1) mixture, and it is soluble in petroleum ether. It is considered to be a sulfolipid. This substance is found in *M. nonchromogenicum*, but it is not found in *M. terrae*.

- 1) Tsukamura, M.: Med. & Biol. (Tokyo), 71: 110, 1965.
- 2) Wayne, L.G.: Am. Rev. Respir. Dis., 93: 919, 1966.
- 3) Tsukamura, M.: Med. & Biol. (Tokyo), 73: 244, 1966; Japan. J. Microbiol., 11: 163, 1967.
- 4) Kubica, G.P. *et al.*: Int. J. Syst. Bacteriol., 20: 161, 1970.

緒 言

Mycobacterium nonchromogenicum Tsukamura(1965)¹⁾,*Mycobacterium terrae* Wayne (1966)²⁾, *Mycobacterium novum* Tsukamura(1966)³⁾ および *Mycobacterium triviale* Kubica *et al.* (1970)⁴⁾ は、いずれも Group III nonpho-

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

Table 1. Biological and Biochemical Characters Useful for Differentiating Species *Mycobacterium nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. novum*, and *M. triviale*

Character	No. of strains showing positive reaction (%)			
	<i>M. nonchromogenicum</i> <i>n</i> = 36	<i>M. terrae</i> <i>n</i> = 15	<i>M. novum</i> <i>n</i> = 27	<i>M. triviale</i> <i>n</i> = 21
Growth at 23°C ^a	36 (100%)	15 (100%)	27 (100%)	21 (100%)
Growth at 37°C ^a	36 (100%)	15 (100%)	27 (100%)	21 (100%)
Growth at 42°C ^a	31 (86%)	4 (27%)	4 (15%)	14 (67%)
Growth at 45°C ^a	3 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
Nicotinamidase ^b	25 (69%)	4 (27%)	5 (19%)	6 (29%)
Pyrazinamidase ^b	29 (81%)	4 (27%)	6 (22%)	6 (29%)
Nitrate reduction (24H) ^c	16 (44%)	1 (7%)	14 (52%)	0 (0%)
β-Galactosidase ^d	30 (83%)	12 (80%)	27 (100%)	7 (33%)
Acid phosphatase ^e	36 (100%)	15 (100%)	16 (62%)	18 (86%)
Heat-stable acid phosphatase ^f	26 (72%)	1 (7%)	1 (4%)	7 (33%)
Growth on 0.1% NaNO ₂ -Sauton agar ^g	33 (92%)	13 (87%)	26 (96%)	19 (90%)
<i>n</i> -Propanol as C source ^h	3 (8%)	1 (7%)	0 (0%)	0 (0%)
Glucose as C source ^h	1 (3%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
<i>n</i> -Butanol as C source ⁱ	4 (11%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)
iso-Butanol as C source ⁱ	3 (8%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

'*n*' is total number of strains tested.

a Growth was observed on Ogawa egg medium after incubation for 3 weeks.

b Tested according to the method of Bönicke (Bull. Un. Int. Tuberc., 32:13, 1962) extending the incubation time to 24 hours and using twice the amide concentration.

c Tsukamura, M. : Identification of mycobacteria, Publ. National Chubu Hospital, Obu, Aichi, 1975.

d Tsukamura, M. : J. Gen. Microbiol., 80:553, 1974.

e Tsukamura, M. *et al.* : Iryo, 28:275, 1974.

f Tested after incubation of bacterial suspension at 70°C for 30 minutes.

g Tsukamura, M. and Tsukamura, S. : Am. Rev. Respir. Dis., 98:505, 1968.

h Tsukamura, M. : Tubercle, 48:311, 1967.

i Tsukamura, M. and Mizuno, S. : Kekkaku, 46:197, 1971.

Table 2. Differentiation between *Mycobacterium nonchromogenicum* and *M. terrae* by Thin-Layer Chromatography after Uptake of ³⁵S-Methionine

Extract	Species	Radioactive spots in thin-layer chromatogram			
		Rf value			
		Spot a 0.00~0.01	Spot b 0.14~0.16	Spot c 0.32~0.35	Spot e 0.94~0.98
Diethyl ether-ethanol-soluble fraction	<i>M. nonchromogenicum</i> ^a	+	+++	++	+++
	<i>M. terrae</i> ^b	+	+++	++	-
Petroleum ether-soluble fraction of the concentrate of the above extract	<i>M. nonchromogenicum</i> ^a	-	-	-	+++
	<i>M. terrae</i> ^b	-	-	-	-

As to the method of thin-layer chromatography, refer to Tsukamura, M. and Mizuno, S. : Int. J. Syst. Bacteriol., 25:271, 1975.

Solvent : *n*-propanol-*n*-butanol-water-ammonia (57:20:20:3, in volume). Unidimensional ascending run. Recorded by an automatic thin-layer chromatogram scanner. Silica Gel H (20 by 20 cm; 0.25 mm thick). Symbols + to +++ show small to large radioactive spots. Symbol - shows that no spot is detectable.

a Strains tested : 09003 (ATCC 19530; NCTC 10424; type); 09013 (ATCC 19531); 09033 (ATCC 19533; NCTC 10479); 09112 (ATCC 19689); 09113 (ATCC 19690).

b Strains tested : 38001 (W-167); 38002 (W-168A); 38013 (W-45; ATCC 15755; type).

tochromogens に属する抗酸菌であるが、互いに近縁関係にあると考えられている⁵⁾⁶⁾。この中で、*M. novum* は一応 *M. terrae* の同義語と考えられている (*M. terrae* と *M. novum* は、共に1966年に別個に発表されたが同一の菌とされている⁷⁾。残りの3者の中で、*M. nonchromogenicum* と *M. terrae* は特に近縁で、Tsukamura⁵⁾⁶⁾ は同一菌種に属するものと考えているが (若干の性状の差は認められた⁹⁾), K ppler⁸⁾⁹⁾, Kubica *et al.*¹⁰⁾, Runyon *et al.*¹¹⁾, Meissner *et al.*⁷⁾ は、一応、区別しうるものとしている。以上のような、分類学的知見の現状にかんがみ、特に *M. nonchromogenicum* と *M. terrae* について、両者を区別しうる、何らかの性状があるかどうかを検討してみることにした。

実験材料および方法

菌株。使用した菌株は当研究室保存株で、*M. nonchromogenicum* 36株、*M. terrae* 15株、*M. novum* 27株、*M. triviale* 21株である。*M. nonchromogenicum* と *M. novum* は当研究室で分離されたもの、*M. terrae* は Dr. Lawrence G. Wayne, Veterans Administration Hospital, Long Beach, California, U. S. A. より分与されたもの、*M. triviale* は Dr. George P. Kubica, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia, U. S. A. から分与されたものである。

発育温度。小川培地2週培養菌から1mg/ml(湿菌量)の菌液を作り、1白金耳(直径3mm)ずつ、4本の1%小川培地斜面に塗抹接種し、穴あきゴム栓をして次の温度のフラン器に3週培養後、発育を判定した。培養温度は、28℃、37℃、42℃、および45℃の4種。

Nicotinamidase および pyrazinamidase は B nicker¹²⁾の方法で測定した。ただし amides の濃度は2倍とし、amide との培養時間は37℃、24時間とした。

硝酸還元は東村¹³⁾の方法によつて検査した。基質液：M/15 phosphate buffer (pH 7.1) 100 ml + Tween 80 0.5 ml + NaNO₃ 0.2 g。これを試験管に1 ml ずつ分注し、120℃、20分間滅菌して保存する。この液に、被検株を3白金耳(3~5 mg 湿菌量)を加えて、よく混合し、37℃、24時間培養する。Ehrlich 氏 aldehyde 試薬2滴、10% HCl 0.5 ml を加え、黄色になれば陽性とする。Ehrlich 氏 aldehyde 試薬は、*p*-dimethylbenzaldehyde 2 g を 10% HCl 100 ml に溶解したものである。

β -Galactosidase 測定法は既報によつた¹⁴⁾。

Acid phosphatase 測定法は、既報の2法の中、簡易法によつた¹⁵⁾。

耐熱 acid phosphatase 測定は、上記と同様な方法によつたが、はじめに菌液を70℃の湯煎で30分間加熱して使用した。本酵素の測定は、Saito *et al.*¹⁶⁾ により有用性が発表されたが、ここでは、著者の方法にあわせて変

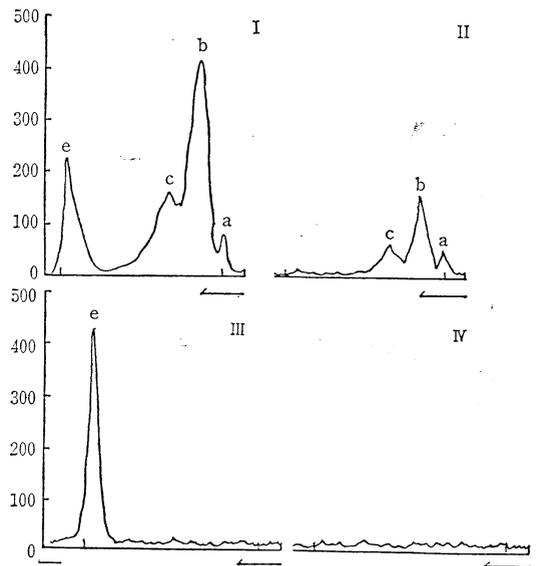


Fig. 1. I and II, Radioactive spots in thin-layer chromatograms of diethyl ether-ethanol-soluble fraction of *M. nonchromogenicum* strain 09033 and *M. terrae* strain 38013, respectively, and III and IV, those of petroleum ether-extract of Silica Gel of spot e of *M. nonchromogenicum* strain 09033 and *M. terrae* strain 38013, respectively.

The reaction mixture used for obtaining I and II consisted of 4 ml of a M/15 phosphate buffer solution (pH 7.1) containing 25 mg (wet weight)/ml bacteria, 5 μ Ci/ml ³⁵S-L-methionine, and 10 μ g/ml sodium acetate. The reaction mixture was incubated at 37℃ for 24 hours. The bacteria were harvested by centrifugation, and washed three times in 2 ml of distilled water, and then fractionated as follows. The bacteria were extracted twice with 2 ml of a 10% trichloroacetic acid (TCA) solution for 10 minutes, and extracted twice with 3 ml of a mixture of diethyl ether-ethanol (1:1) at 37℃ for 10 minutes. The diethyl ether-ethanol extracts were combined and concentrated until a 0.1 ml volume by allowing to stand at 37℃. The concentrate was subjected to thin-layer chromatography using Silica Gel H (20 \times 20 cm; 0.25 mm thick) and *n*-propanol + *n*-butanol + water + ammonia (57 + 20 + 20 + 3 in volume). The chromatogram was recorded for their radioactivity using automatic thin-layer chromatogram scanner, Nihon-Musen Co., Tokyo (slit, 30 \times 3 mm; time constant, 1,000 counts per minute/10 seconds; running speed, 300 mm/hour; recording speed, 150 mm/hour). The figures I and II show the results of this scanning. After this scanning, spot e was cut off and extracted with 5 ml of petroleum ether. The extract was evaporated under reduced pressure until 0.1 ml and subjected to thin-layer chromatography in similar manner. The figures III and IV show the results of the second scanning.

改した。

Sauton 寒天培地における 0.1% NaNO₂ 耐性は¹⁷⁾, 0.1% NaNO₂ 含有 Sauton 寒天培地に、被検株を1白金耳接種し、37℃、3週後に判定した (通常2週判定であるが¹³⁾, ここでは3週判定とした)。

Glucose および *n*-propanol¹⁸⁾, および *n*-butanol および *iso*-butanol¹⁹⁾ の C 源としての利用 (NH₃-N 源) は既報の方法により検査した。

³⁵S-methionine とりこみ後の薄層クロマトグラフィー

は既報の方法を用いた²⁰⁾。

実験結果および考察

成績は、表1、表2および図1に示した。

4菌種の間で、かなりの差があると思われた性状は、42°Cでの発育の有無、nicotinamidase, pyrazinamidase, 硝酸還元, 耐熱性 acid phosphatase および ³⁵S-methionine 摂取後の薄層クロマトの6性状で、*M. nonchromogenicum* と *M. terrae* を区別するうえで、最も有用と思われたのは、耐熱性 acid phosphatase と薄層クロマトの2つであつた。耐熱性 acid phosphatase が、この両者を分かつのに有用であることは、Saito *et al.*¹⁶⁾ が報告しているが、本報でも、その結果が支持された。

また薄層クロマトで、Rf 値0.94~0.98の位置の放射性 spot が、*M. nonchromogenicum* では存在し、*M. terrae* では存在しない。この Rf 値の薄層部を石油エーテルで抽出し、再び同じ方法で薄層クロマトを行なうと、spot は前者では存在し、後者にはあらわれない。また菌体の diethyl ether-ethanol (1:1) 混液抽出物を濃縮し、石油エーテルで抽出した後、同じ溶媒で薄層クロマトを行なうと、*M. nonchromogenicum* では、Rf 0.94~0.98 に単一の放射性 spot がみられ、*M. terrae* では、これが見られない(表2、図1)。この物質は、石油エーテル可溶で、³⁵S を含むところから、一種の sulfolipid であろうと思われる。この物質の有無が、上記2菌種の差であろうと思われる。

以上のごとく、*M. nonchromogenicum* と *M. terrae* とは、上記の性状で区別されるとはいえ、他の性状で区別したいことは、今までの研究結果から明らかなどおりで⁵⁾⁶⁾、この両者が極めて近縁であることも、また事実である。従来、この両者を区別できる性状として、nicotinamidase および pyrazinamidase の有無が、Käppler⁸⁾⁹⁾ により指摘され、また Tsukamura⁵⁾ も大体の傾向としてこれを認め、一般にも、そう信じられているが⁷⁾¹¹⁾、本報にも示すごとく、この酵素活性の有無は決定的なものとはいえない。

本報の成績によつて、新たに追加された両者を区別しうる性状は、42°Cでの発育の有無である。*M. nonchromogenicum* の大部分の株は、この温度で発育するが、*M. terrae* の大部分の株は発育しない。しかし、この性状も、表1に示すように、決定的な差ではない。

M. terrae と *M. novum* とは、同一と考えられているが⁷⁾、本報でも、この両者の区別はつけがたかつた。ただ硝酸還元能が強い傾向が、*M. novum* で認められたが、勿論、決定的な差ではない。やはり、この両者は、同一菌種とみなすべきであろう。

M. triviale も、他の3者と類似の性状を示すことは、表1から明らかである。しかし、この菌は *M. terrae* と

類似点が多い。

以上の類似性にかんがみ、臨床検査室で、この3者(*M. nonchromogenicum*, *M. terrae* および *M. triviale*) を区別することは困難であり、また、その必要性も少ないところから、3者を合して、“*M. nonchromogenicum* complex” とするのが妥当であろうと思われる。

結 論

M. nonchromogenicum と *M. terrae* とを区別する性状として、nicotinamidase および pyrazinamidase の有無があげられているが、その他に、42°Cでの発育の有無も役に立つことが分かつた。しかし上記3者より、より有用なのは、最近 Saito *et al.* (斎藤肇ほか) によつて報告された耐熱性 acid phosphatase の有無である。また *M. nonchromogenicum* には、³⁵S-methionine とりこみ後の薄層クロマトで、*M. terrae* にはない放射性 spot が見出される。

文 献

- 1) 東村道雄：医学と生物学，71：110，1965.
- 2) Wayne, L.G.: Am. Rev. Respir. Dis., 93：919, 1966.
- 3) 東村道雄：医学と生物学，73：244, 1966.
- 4) Kubica, G.P. et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., 20：161, 1970.
- 5) Tsukamura, M.: Japan. J. Microbiol., 15：229, 1971.
- 6) Tsukamura, M.: Int. J. Syst. Bacteriol., 26：409, 1976.
- 7) Meissner, G. et al.: J. Gen. Microbiol., 83：207, 1974.
- 8) Käppler, W.: Zeitschr. Tuberk. Erk. Thoraxorg., 129：321, 1968.
- 9) Käppler, W.: Zeitschr. Erk. Atmungsorg., 135：39, 1971.
- 10) Kubica, G.P. et al.: J. Gen. Microbiol., 74：159, 1973.
- 11) Runyon, E.H. et al.: In “Bergey’s Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition,” edited by R.E. Buchanan, N.E. Gibbons, S.T. Cowan, J.G. Holt, J. Liston, R.G.E. Murray, C.F. Niven, A.W. Ravin, and R.Y. Stanier, p. 681, 1974, The Williams & Wilkins, Baltimore.
- 12) Bönicke, R.: Bull. Un. Int. Tuberc., 32：13, 1962.
- 13) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, published by the National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan, 1975.
- 14) Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol., 80：553, 1974.
- 15) 東村道雄他：医療，28：275, 1974.
- 16) Saito, H. et al.: Am. Rev. Respir. Dis., 114：407, 1976.
- 17) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Am. Rev. Respir. Dis., 98：505, 1968.
- 18) Tsukamura, M.: Tubercle, 48：311, 1967.
- 19) 東村道雄・水野松司：結核，46：197, 1971.
- 20) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: Int. J. Syst. Bacteriol., 25：271, 1975.