Cycloserine 感受性試験により *Mycobacterium fortuitum* を他抗酸菌から区別する方法

東 村 純 雄

名古屋大学医学部細菌学教室

東 村 道 雄 ・ 水 野 松 司

国立療養所中部病院

[受付: 11 月 17 日, 1966 年]

Mycobacterium fortuitum は人体に感染することのある rapid-growing mycobacteria の一つとして最近重要視されつつある。この菌は比較的特異な一連の反応によつて、他抗酸菌から区別可能とされている。すなわち、(1) Arylsulfatase 3 日試験 (Wayne¹⁾; Kubica & Vestal²⁾); (2) Amidase pattern (Bönicke³⁾); (3) PAS 分解 (東村^{4,5)}); Tarshis⁶⁾); (4) Salicylate 分解 (東村⁵⁾); (5) $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ 0.5 mg/ml 培地発育 (東村⁷⁾) の 5 性状は、*M. fortuitum* に殆んど特異的な反応として報告されている。

われわれは新しい抗結核剤の種々の抗酸菌にたいする感受性を検する間に、*M. fortuitum* が cycloserine (CS) にたいして高度の自然耐性を示すことを見出し、これを同定の一法として利用しようと考えたので報告する。

実験方法

被検株は 269 株で、その内訳は表に示した。CS 耐性検査の接種源としては、slow-growing mycobacteria は Löwenstein-Jensen 培地 4 週培地養菌を、rapid-growing mycobacteria は同培地 2 週培養菌を用いた。

CS 耐性度の検査に使用した培地は、Löwenstein-Jensen 培地⁸⁾で、CS は滅菌前に所定の濃度に添加し、8 ml づつ 170×18 mm の試験管に分注した後、90°C 60 分滅菌して斜面に仕上げた。CS は、塩野義製薬株式会社から試験用に提供された密封末末を使用した。CS 濃度は、0, 125, 250, 500 γ /ml の 4 種を一組とした。この培地に、被検株を白金耳 (外径 3.5 mm, 内径 2.0 mm) で 1 白金耳づつ塗抹接種した。接種後、試験管にゴム栓を施し、37°C に培養した。発育は、rapid-growing mycobacteria

(表の上段) では 2 週後に、slow-growing mycobacteria (表の下段) では 4 週後に判定した。CS 濃度 0 γ /ml の対照地には、菌は全面に融合発育したので、CS 含有培地における少数コロニーの発育または (±) の如き痕跡的発育は発育なし (感性) と判定した。CS の濃度段階が前述の場合、発育 (+) と発育 (-) の境界は明瞭で判定に迷う例はなかった。

実験成績および考察

成績は表 1 の如くで、被検 269 株の中で、CS 125 γ /ml 以上に発育したのは、*M. fortuitum* と *M. smegmatis* の 2 菌種 だけであつた。CS 125 γ /ml 培地には、*M. fortuitum* の 98.5 % の株と *M. smegmatis* の 87.5 % の株が発育したが、他の菌種はすべて発育しなかつた。従つて、CS 125 γ /ml 培地に発育する菌は、*M. fortuitum* か *M. smegmatis* のいずれかと考えて略誤りないと思われる。特に、CS 500 γ /ml 培地に発育したのは、*M. fortuitum* のみで、*M. fortuitum* の 79.0 % はこの培地に発育したのに、他の菌種はこの濃度には全く発育しなかつた。従つて、CS 500 γ /ml 培地に発育する菌は、*M. fortuitum* と考えてよいと思われる。ただし被検 *M. fortuitum* でも、約 20 % はこの培地に発育しなかつたので、CS 500 γ /ml 培地に発育しなくても、*M. fortuitum* の可能性を否定できない。従つて、CS 500 γ /ml 培地発育陽性の場合に意味があると考えられる。

M. fortuitum の同定に有用な 5 性状として、(1) arylsulfatase 3 日試験^{1,2)}、(2) amidase pattern (acetamidase, urease, nicotinamidase, pyrazin amidase 及び allantoinase 陽性——ただし nicotinamidase 及び pyrazinamidase は欠如することがある——benzamidase,

Table 1 Cycloserine Tolerance of Various Mycobacteria

Species	Number of Strains Showing Positive Growth			
	Cycloserine* Concentration in Löwenstein-Jensen Medium (γ /ml)			
	0	125	250	500
<i>M. fortuitum</i>	66	65	58	52
<i>M. smegmatis</i>	24	21	2	0
<i>M. phlei</i>	20	0	0	0
<i>M. parafortuitum</i>	6	0	0	0
<i>M. aurum</i>	14	0	0	0
<i>M. thermoresistibile</i>	10	0	0	0
Scotochromogens (Group II)	22	0	0	0
Nonphotochromogens (Group III)	48	0	0	0
<i>M. avium</i>	14	0	0	0
<i>M. terrae</i> **	20	0	0	0
<i>M. kansasii</i>	10	0	0	0
<i>M. bovis</i>	5	0	0	0
<i>M. tuberculosis</i>	10	0	0	0

All media were inoculated with one loopful (a 2.0 mm. inside diameter and 3.5 mm. outside diameter loop) of a stock culture of test organisms.

Growth of rapidly growing mycobacteria (upper) was recorded after 2 weeks incubation at 37°C., and that of slowly growing mycobacteria (lower) after 4 weeks incubation at 37°C.

Presence or absence of growth was very clear-cut.

* Cycloserine "Shionogi" (Shionogi Pharmaceutical Co., Osaka, Japan) was added to medium before sterilization.

** *M. terrae* Tsukamura

isonicotinamidase, salicylamidase, succinamidase 及び malonamidase 陰性)³⁾, (3) PAS 分解⁴⁻⁶⁾, (4) salicylate 分解³⁾及び (5) NH₂OH 耐性 (0.5 mg/ml 耐性)⁷⁾が報告されているが、本報に記した CS 0.5 mg/ml 耐性も重要な性状で、同定に重要な第6の性状とかぞえてよいと思われる。

抗酸菌の CS 耐性変異の発現には、低い上限があり、何代継代しても著しい耐性度の上昇は起らない⁹⁻¹¹⁾。また、実験に CS 投与を長期間うけている患者の人型結核菌についても、CS 100 γ /ml をこえる耐性は見出されない (未発表成績)。従つて、人型結核菌以外の菌につ

いても、in vivo で (CS 投与によつて) 著しい耐性の上昇を起さないと期待される。従つて、CS 使用患者から分離された rapid-growing mycobacteria の同定にも、上記の *M. fortuitum* と *M. smegmatis* の自然耐性の特徴は適用できるものと期待される。

CS 耐性を *M. fortuitum* の同定に使用できることを示したのは、本報が最初であるが、最近 Hawkins & McClean¹²⁾は *M. fortuitum* 5 株と未同定の rapid-growing mycobacteria 19 株中 12 株が CS 0.5 mg/ml 含有 Tween-albumin 培地に発育したと報告している。われわれの成績からすると、Hawkins & McClean が観察した CS 性耐の未同定菌は恐らく *M. fortuitum* であらうと想像される。

結 論

Mycobacterium fortuitum と *M. smegmatis* は、cycloserin (CS) 125 γ /ml 以上を含む Löwenstein-Jensen 培地に発育しうる。他の抗酸菌は、125 γ /ml 培地に発育できない。特に、CS 500 γ /ml 培地に発育しうるのは *M. fortuitum* のみであつた。*M. fortuitum* の被検株 66 株中 52 株 (約 80%) が、500 γ /ml 培地に発育した。この性状は *M. fortuitum* を他抗酸菌から区別するのに使用できると思われる。

文 献

- Wayne, L. G.: Amer. J. Clin. Path. 36: 185, 1961.
- Kubica, G. P. & Rigdon, A. L.: Amer. Rev. Resp. Dis. 83: 737, 1961.
- Bönicke, R.: Bull. Union Internat. Tuberc. 32, 13, 1962.
- Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc. 9, 70, 1961.
- Tsukamura, M.: J. Gen. Microbiol. 41, 309, 1965.
- Tarshis, M. S.: Tubercle 45, 267, 1964.
- Tsukamura, M.: J. Bacteriol. 90, 556, 1965.
- Jensen, K.A.: Bull. Union Internat. Tuberc. 24, 81, 1954.
- Nitti, V. & Tsukamura, M.: Arch. Tisiol. 12, 71, 1957.
- Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc. 9, 43, 1961.
- Tsukamura, M., Toyama, H. & Tsukamura, S.: Japa J. Tuberc. 11, 36, 1963.
- Hawkins, J.E. & McClean, V.R.: Amer. Rev. Resp. Dis. 93, 594, 1966.

Differentiation of *Mycobacterium fortuitum* from Other Mycobacteria by Cycloserine Susceptibility Test

Sumio TSUKAMURA,

Department of Bacteriology, Medical School of Nagoya University, Nagoya

Michio TSUKAMURA and Shoji MIZUNO

National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu, Aichi-Pref.

When the susceptibility to cycloserine of various mycobacteria was tested in the Löwenstein-Jensen medium, it was found that *Mycobacterium fortuitum* was most resistant to this antibiotic and grew at a concentration of cycloserine as high as 0.5 mg/ml. Fifty-two of 66 strains (79 %) of the *M. fortuitum* tested grew at this concentration, but other mycobacteria could not grow at it.

Since mycobacteria do not develop any high degree of resistance even after many transfers on the medium containing this antibiotic, the resistance to 0.5 mg/ml cycloserine seems to be a good tool for differentiation of *M. fortuitum* from other mycobacteria.