

抗酸染色による *Nocardia* と *Mycobacteria* の鑑別

室 橋 豊 穂・吉 田 幸 之 助

国立予防衛生研究所結核部 (部長 室橋豊穂)

受付 昭和 41 年 7 月 23 日

DIFFERENTIATION OF *NOCARDIA* AND *MYCOBACTERIA*
BY THE ACIDFAST STAINING OF SMEARS*

Toyoho MUROHASHI and Konosuke YOSHIDA

(Received for publication July 23, 1966)

Differentiation of *Nocardia* from *Mycobacteria* is generally not difficult according to the cultural properties. Sometimes, however, it is not easy to differentiate them, especially in the microscopic examination of sputum specimens, owing to the acidfast stain of the fragments of some of the *Nocardia*.

As reported previously, analytical studies carried out on the decolorization procedures of the acidfast staining led us to the finding that within 20 minutes rinsing in a decolorizer composed of 0.1~0.5% HNO_3 or HCl in 70% (v/v) Ethanol resulted in the complete loss of the stain of saprophytic *Mycobacteria*. In the present studies, two kinds of acid-ethanol, namely, 0.1% HNO_3 -70% Ethanol and 4% HNO_3 -Ethanol, were used for the decolorization.

The results revealed that the former was very effective in decolorizing *Nocardia* almost completely by less than 30 seconds' rinsing, by which time *Mycobacteria* retained nearly 50% of stain. On the contrary, by the use of the latter, the commonly used decolorizer, such a marked difference was not observed between *Nocardia* and *Mycobacteria*.

Based on the results obtained, a very simple method was devised to differentiate *Nocardia* from *Mycobacteria* by the acidfast stain of smears employing 0.1% HNO_3 -70% Ethanol as a decolorizer for 10 to 30 seconds.

Nocardia を *Mycobacteria* から鑑別することは、培養性状によれば必ずしも困難ではない。とくに培地に食いつくように増殖する集落形態や、集落の強烈な色調や、さらに分裂様式の違いなどの点で、鑑別はむしろ容易であるとさえいえる。しかし *Nocardia* のあるものは、桿菌状をなす菌体片が Ziehl-Neelsen 染色で弱いし部分的抗酸性を呈するために、喀痰材料の塗抹標本検査において、結核菌との鑑別に迷うことがあるといわれる^{1)~3)}。その抗酸性の程度については、しかし明確な記載はみられない。

すでに報告したように⁴⁾⁵⁾、抗酸染色法における脱色

条件を検討して、*Mycobacteria* のうち抗酸雑菌が最も抗酸性の弱いことを明らかにしたが、*Nocardia* の抗酸性はこれよりもいつそう弱いことが推察される。この点を明らかにするために、一定時間の作用で抗酸雑菌のみを完全に脱色せしめるような組成の脱色液⁴⁾を用い、所要脱色時間を指標として、*Nocardia* の抗酸性の程度を抗酸雑菌のそれと比較することにした。その結果、塗抹標本の染色状態の違いによつて *Nocardia* を *Mycobacteria* から容易に区別しうる条件が見出されたので、その成績を報告する。

* From Department of Tuberculosis, National Institute of Health, Kamiosaki-chojamaru, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan.

Table 1. Decreasing Trend of the Acidfastness (%) of *Nocardia* and Saprophytic *Mycobacteria* by the Use of 4% HNO_3 -Ethanol as the Decolorizer

Strain	Decolorization time (Seconds)				
	10	30	60	180	300
<i>N. carallina</i>	92.3 (1861)	69.5 (1931)	3.1 (1772)	0.1 (1876)	—
<i>N. convoluta</i>	91.4 (1987)	55.8 (1795)	13.8 (1994)	1.2 (1998)	—
<i>N. erythropolis</i>	85.2 (1987)	70.2 (2269)	8.5 (1911)	0.7 (1949)	—
<i>N. lutea</i>	85.8 (2053)	19.0 (2167)	0.7 (1898)	0	—
<i>N. caviae</i>	84.0 (2150)	15.3 (2057)	0.4 (1980)	0	—
<i>N. pellegrini</i>	81.0 (2357)	65.5 (1722)	9.8 (2024)	0.6 (1916)	—
<i>N. gardneri</i>	85.2 (2137)	18.1 (2079)	0.7 (2040)	0	—
<i>M. phlei</i>	94.9 (2316)	87.1 (2195)	39.7 (2502)	21.8 (2015)	11.2 (2129)
<i>M. smegmatis</i> (SY 1)	84.2 (1986)	60.9 (2163)	30.4 (2114)	11.2 (2135)	7.0 (2120)

Note: () Number of rods counted.

実験材料・方法

1. 菌株。7株の *Nocardia* (*N. carallina*, *N. lutea*, *N. convoluta*, *N. erythropolis*, *N. caviae*, *N. pellegrini*, *N. gardneri*) および, *Mycobacteria* 中抗酸性の最も弱い抗酸雑菌の代表として2株 (*M. phlei*, *M. Smegmatis*) を用いた。

2. 菌液および塗抹標本。以上の菌株を1%小川培地に37°C, 7日間培養したのち, 集落を掻き取り, 試験管壁で磨砕して菌液とした。菌計数のためには, この菌液を濾紙1枚で濾過して単個菌菌液とし, 1視野当り50コ程度の菌を数えるように適宜に希釈し, その1白金耳を塗抹した。また簡易鑑別法設定のためには, 濃厚菌液をそのまま1白金耳塗抹した。

3. 染色法および鏡検。victoriablue 染色液で加温染色したのち, 脱色液中に一定時間挿入し, 水洗後, 10倍希釈 Ziehl 液で複染した。1標本につき50視野鏡検して, 抗酸性(濃紺)および非抗酸性(ピンク)の菌数を数え, 抗酸性%を算出した。

4. 脱色液および脱色時間。通常の抗酸染色に用いられる3% HCl または4% HNO_3 -Ethanol (95% Ethyl-alcohol) と, 既報の0.1% HNO_3 -70%(v/v) Ethanol⁴⁾ とを用いた。脱色時間は, 10秒, 30秒, 1分, 3分および5分である。

実験成績

塗抹標本を victoriablue 液で加温染色後, 4% HNO_3 -

Table 2. Decreasing Trend of the Acidfastness (%) of *Nocardia* and Saprophytic *Mycobacteria* by the Use of 0.1% HNO_3 -70% Ethanol as the Decolorizer

Strain	Decolorizing time (Seconds)				
	10	30	60	180	300
<i>N. carallina</i>	0.8 (2213)	0 (2121)	—	—	—
<i>N. convoluta</i>	0.8 (1915)	0 (1713)	—	—	—
<i>N. erythropolis</i>	0.4 (2019)	0 (1945)	—	—	—
<i>N. lutea</i>	0.2 (1992)	0 (1803)	—	—	—
<i>N. caviae</i>	1.7 (1624)	0.9 (1887)	0 (1596)	—	—
<i>N. pellegrini</i>	0.1 (1952)	0 (1748)	—	—	—
<i>N. gardneri</i>	1.7 (1686)	0.5 (1796)	0 (1724)	—	—
<i>M. phlei</i>	46.7 (2361)	28.4 (2532)	13.6 (2443)	7.8 (2435)	3.5 (2157)
<i>M. smegmatis</i> (SY 1)	40.4 (2547)	24.7 (2246)	14.5 (2117)	4.7 (1836)	1.2 (2168)

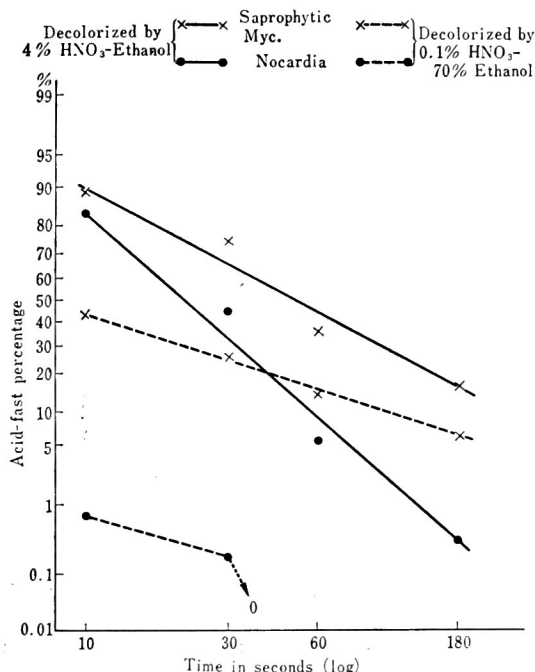
Ethanol に挿入し, 経時的に取り出して, 10倍希釈 Ziehl 液で複染した場合の抗酸性菌体%の推移は Table 1のごとくである。

供試7株の *Nocardia* の抗酸性は, 脱色液10秒の作用では抗酸雑菌と変わりなく, 30秒では著しく脱色するもの(3株)と, 抗酸雑菌とほぼ同程度の抗酸性を示すもの(4株)とがあつた。しかし60秒になると, *Nocardia* の大多数は10%以下の抗酸性となり, 3分ではほぼ抗酸性菌体を認めえなくなつた。これに対して抗酸雑菌では, 5分後においてもなお10%近くの抗酸性を有するので, この脱色条件だけからも, この両者の抗酸性の程度に違いのあることは明らかに示されている。しかし実際問題として, この程度の染色状態の違いをもつて両者を鑑別することは, その差があまり著しくないので困難と思われる。

次に脱色液として, 0.1% HNO_3 -70% Ethanol を用いた場合の成績を Table 2 に示した。

脱色液に挿入10秒後において, *Nocardia* 7株のすべてが2%以下の抗酸性となつてしまつたのに対して, 抗酸雑菌ではなお40~50%に抗酸性の染まりを残し, 著しい相違を示した。そして30秒ないし1分の作用で, *Nocardia* には最早や全く抗酸性菌体を認めることができなくなるが, 抗酸雑菌では5分後においてもなお数%程度に抗酸菌体を含んでいた。すなわち4% HNO_3 -Ethanol を脱色液とする場合に示された *Nocardia* と *Mycobacteria* の抗酸性の程度の違いが, 0.1% HNO_3 -70% Ethanol によつていつそう明確に, 拡大して示さ

Fig. 1. Decolorizing Trend of the Stained Cells of Nocardia and Saprophytic Mycobacteria by the Acid-ethanol of Different Compositions



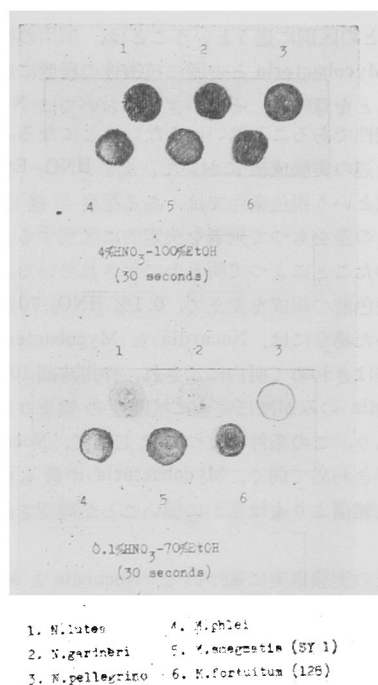
れたことになる。

Table 1, 2 の成績を用いて、脱色液作用時間 ごとの Nocardia (7 株) および抗酸雑菌 (2 株) の平均抗酸性 % を算出し、Fig. 1 を得た。この図から明らかなように、0.1% HNO₃-70% Ethanol を 10 秒、すなわち瞬間的に作用させるのみで、Nocardia はほぼ完全に脱色されてしまうが、これに対して抗酸雑菌はなお 50% 程度に抗酸性を維持するので、染色状態の面からこの両者を容易に区別することが可能となる。

以上の成績に基づき、次のようなきわめて簡易な鑑別法を設定することができた。

固型培地上の集落の場合、集落を掻き取つて適宜の濃度の菌液とし、塗抹、火焰固定後、victoriablue 同時法染色液⁶⁾ で加温染色する。標本が冷却してから水洗し、0.1% HNO₃-70% Ethanol に 10~30 秒間挿入し、ただちに濾紙で吸湿する。抗酸雑菌塗抹部分が青色(抗酸性)を呈するのに対して、Nocardia のそれは黄褐色(非抗酸性)を呈するので、肉眼的に区別できる。(写真)

Ziehl-Neelsen 法の脱色液を 0.1% HCl または 0.1% HNO₃-70% Ethanol にすれば、抗酸雑菌塗抹部分はピンク(抗酸性)に、Nocardia のそれは青(非抗酸性)に染まるので、同様に両者を区別できる。ただしこの場合には、fuchsin と methylenblue の色が混合して紫色となり紛わしいことが起こりうるので、色調の対比が鮮明でしかも染色操作が 1 回ですむ victoriablue 同時染



Decolorization of the Smears of Nocardia and Mycobacteria Employing Acid-ethanol of Different Composition for 30 Seconds Each

色法をすすめたい。

考 察

Mycobacteria の特性である抗酸性は、Ziehl-Neelsen 法で代表される染色手技における 3% HCl-Ethanol の短時間(通常約 30 秒)の作用という特定の脱色条件によつて示される。この条件下においては、その程度のいかににかわりなく抗酸性をもつもののほとんどすべてを他の非抗酸性のものから分別できるのであるから、Mycobacteria 検出という目的には好適の脱色条件で、抗酸性をもつものをできるだけ多く検出するための比較的温和な脱色条件といえるであろう。しかし Mycobacteria に属する諸菌株の抗酸性の程度を比較しようとする目的に対しては、この条件は適切とはいいがたく、いつそう苛酷な脱色条件を必要とする。すでに報告したように⁴⁾⁵⁾、0.1%~0.5% HNO₃-70% Ethanol、20 分作用という脱色条件においては、Mycobacteria のいずれの菌株も種々の程度に脱色されて、抗酸性なる性質が絶対的のものでないことを示唆するが、とくに抗酸雑菌のみは、この脱色条件で完全に抗酸性の染まりを失い、他の Mycobacteria から容易に識別されるのである。

Nocardia の抗酸性については、Ziehl-Neelsen 法によつて弱いし部分的抗酸性を示すものがあると成書には記されているのみで、抗酸性の強さの具体的な記載はみられない。しかし臨床検査においてときに Mycobac-

teria との区別に迷うということは、慣用の抗酸染色法では *Mycobacteria* との間に抗酸性の程度に差をつけにくいことを意味し、そのかぎりにおいては *Nocardia* が弱抗酸性であることはいいえないことになる。このことは、上述の実験成績において、4% HNO_3 -Ethanol, 30 秒作用という脱色条件では、ある程度の差は認めえても、この差をもつて両者を決定的に区別することができなかつたことによつて明らかに示されている。これに対して脱色液の組成を変えて、0.1% HNO_3 -70% Ethanol を用いた場合には、*Nocardia* と *Mycobacteria* の染色性の差はきわめて明白に示され、作用時間 10~30 秒で、*Nocardia* のみがほぼ完全に抗酸性の染まりを失なつたのであり、この条件によつてはじめて、*Nocardia* の抗酸性がきわめて弱く、*Mycobacteria* 中最も抗酸性の弱い抗酸雑菌よりもはるかに弱いことが確認されたことになる。

以上の実験事実に基づいて、*Nocardia* と *Mycobacteria* とは、写真に示したように、塗抹標本の染色状態によつて容易に鑑別できるが、喀痰塗抹標本の場合には、次のようにすれば鑑別が可能である。

喀痰塗抹標本を型のごとく抗酸染色して鏡検し、まず抗酸菌のあることを確かめておく。次に Xylene または toluene でセダー油を除き、0.1% HNO_3 -70% Ethanol に 10~20 秒挿入して吸湿、鏡検する。もし前同様に抗酸桿菌が認められれば、それは *Nocardia* ではないと考

えてよい。またさらに 20 分程度挿入してもなお抗酸桿菌が認められれば、その菌は抗酸雑菌ではなくて、非定型抗酸菌か結核菌ということになる⁴⁾。いうまでもなく *Mycobacteria* の同定・鑑別には多くの生物学的性状の検討を必要とするが、その精査に数日ないし数週を要することを考えれば、くわしい成績を得る前におおよその見当をつけることができるという意味で、上述の脱色方法を利用することは、実際的に便利であろうと思う。

総 括

Nocardia の抗酸性は、*Mycobacteria* 中最も抗酸性の弱い抗酸雑菌よりも明らかに弱い。このことは 0.1% HNO_3 -70% Ethanol を脱色に用いることによつて示される。この事実に基づき、抗酸染色性の面で両者を鑑別するきわめて簡便な方法を設定した。

文 献

- 1) R. J. Dubos and J. G. Hirsch : *Bacterial and Mycotic Infection of Man*, 3rd Ed., 584, 1958 ; J. B. Lippincottco., Philadelphia.
- 2) 岩田和夫 : 真菌症 ; 微生物検査必携, 3, 1965.
- 3) B. H. Webster : *Am Rev. Tuberc.*, 73 : 485, 1965.
- 4) 室橋豊穂・吉田幸之助 : 日本細菌学雑誌, 18 : 405, 1963.
- 5) 吉田幸之助 : 日本衛生検査技師会誌, 13 : 61, 1964.
- 6) 衛生検査指針, 1964 ; 微生物検査必携, 1965.