

Mycobacterium と *Nocardia* の区別の試み

東 村 道 雄

国立療養所中部病院 (院長 勝 沼 六 郎博士)

受付 昭和 42 年 7 月 13 日

ATTEMPTS OF DIFFERENTIATION BETWEEN
MYCOBACTERIUM AND *NOCARDIA**

Michio TSUKAMURA

(Received for publication July 13, 1967)

Nocardia is characterized by its fragmenting impermanent mycelium and weak acid-fastness and *Mycobacterium* is by its absent or rudimentary mycelium and acid-fastness. However, there occur not rarely strains of these genera which fail to exhibit the characteristics of the genus, and there occur confusions. It is desirable to supplement several biochemical characteristics to the usual morphological characteristics.

We tested five species of nocardia, which were supplied by Dr. I. Uesaka, Kyoto University, according to the schedule of our laboratory for the tests of mycobacteria and compared the characters of nocardia with those of mycobacteria. The results showed that nocardia simulate very much rapidly growing mycobacteria, but a few points for differentiation between these genera could be suggested: two-week-arylsulfatase and utilization of trimethylene diamine as simultaneous sources for nitrogen and carbon. Nitrate reduction also seems to be used as a supplementary one.

Methods

Two-week-arylsulfatase. The medium used was composed of the following: (A): Dubos TB broth base Difco (without Tween), 6.5 g; tripotassium phenolphthalein disulfate, 1.3 g; distilled water, 800 ml; (B) Glucose, 7.5 g; NaCl, 0.85 g; distilled water, 100 ml; (C) Bovine serum, 100 ml. The medium A was sterilized by autoclaving at 115°C for 30 minutes, medium B by heating at 100°C for 15 minutes and medium C by heating at 56°C for 30 minutes. The above three were added aseptically and poured into tubes in 5 ml quantities. The medium was inoculated with the test organism and incubated at 37°C for 14 days. The presence of phenolphthalein was tested by addition of 1 ml of 10% sodium carbonate.

Utilization of trimethylene diamine (TMD) as simultaneous sources of nitrogen and carbon for growth. The basic medium was as follows: KH_2PO_4 , 0.5 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5 g; purified agar, 20.0 g; and distilled water, 1,000 ml. The basic medium was added with 0.1 M TMD (7.4 g/l) or without TMD and the pH was adjusted to 7.0 by addition of 10% KOH. The medium was sterilized by autoclaving at 115°C for 30 minutes and slanted after cooling. The medium was inoculated with one loopful of the test organism and the growth on the TMD medium was read after incubation at 37°C for 14 days in comparison with the growth on control medium.

Nitrate reduction. Fifty mg (wet weight) of the organism were suspended in 5 ml 0.067 M phosphate buffer (pH 7.1) containing 0.1% sodium nitrate, and incubated at 37°C for 16

* From the National Sanatorium, Chubu Chest Hospital, Obu-cho, Chita-gun, Aichi-ken, Japan.

hours. Formation of nitrite was tested by adding two drops of 2% p-dimethylaminobenzaldehyde in 10% HCl+1 ml 10% HCl.

Results

The results are shown in Table 1. Among twelve strains (five species) of nocardia tested, only two showed the positive reaction in the two-week-arylsulfatase, while almost all strains of rapidly growing mycobacteria, in exception of a part of *M. aurum* strains, showed the positive reaction in this. Only one of the twelve nocardial strains showed the positive reaction in the utilization of TMD, while almost all strains of mycobacteria, with exception of *M. chitae*, a rarely occurring species recently proposed by Tsukamura, showed the positive reaction in this. Nitrate reduction was not so distinctive as the above two tests, but it may be useful as a supplement test to the above.

Nocardia は *Mycobacterium* と分類学的にも近縁で、類似の性状を示す菌として知られている。Bergey's Manual¹⁾によれば、genus *Mycobacterium* は菌糸を欠くか痕跡的で、抗酸性であるとされ、一方 genus *Nocardia* は部分的抗酸性または非抗酸性で発育初期に菌糸を示すが、後 rod form または coccoid form になるとされている。*Nocardia* は喀痰中では抗酸性を呈することがあり、*Mycobacterium* との区別が付きにくいことがあるとされているが、分離された菌株では *Mycobacterium* ほど著明な抗酸性を呈することはなく、この点での区別は必ずしも困難ではない。

われわれの手許にある *Nocardia* 株について観察すると、*Nocardia* では視野の菌全部が著明な抗酸性を呈することはなく、弱抗酸性かまたは菌糸の一部のみが抗酸性を呈するのみである(菌糸の中で、既に rods に分断した部の一部といったほうが適切かもしれない)。しかし *Mycobacterium* でも発育の速い菌、とくに *M. smegmatis* では、発育の初期に非抗酸性の菌糸状体を示すことがあり、*Nocardia* との形態的差異は発育後期に著明な抗酸性 rods を示す点だけといえる。この点、発育の速い *Mycobacterium* と *Nocardia* の区別は必ずしも容易でないことがある。実際に *N. globerula*, *N. rubra*, *N. polychromogenes* のある株は、Gordon & Mihm²⁾³⁾によつて *M. rhodochrous* と分類され、同一菌株が、ある研究者によつては *Nocardia* に、ある研究者によつては *Mycobacterium* と分類されるという事態が起こっている。したがつて *Mycobacterium* と *Nocardia* の性状を系統的に調べて、両者の比較を行ない、区別点をもつとはつきりさせることが必要と思われる。

Nocardia はすべて発育が速いので、實際上問題となるのは、発育の速い抗酸菌 (*Mycobacterium*) ということになる。発育の遅い抗酸菌 (*Mycobacterium*) は、発育が遅いうえに、はじめから強い抗酸性を示すので *Nocardia* との区別は容易である。

われわれはさきに抗酸菌の分類に有用な性状として

100項目をあげて、これを実際に分類に使用しているが⁴⁾、この検査法をそのまま *Nocardia* に応用して両者の比較を行なつたところ、arylsulfatase と trimethylene diamine の NC 源利用とが、両者の区別に有用な反応と考えられた。

実験材料および方法

Nocardia の標準株として使用したのは、1965年4月に京都大学結核研究所上坂一郎博士から受領した12株で、これらの菌株名は表1に掲げてある。*Mycobacterium* は一応発育の速いもののみを検討の対照とした。使用菌株はいずれも本研究室保存株で、表1に示すごとく、計215株である。

検査項目は既報した⁴⁾。次の3性状は、*Nocardia* と *Mycobacterium* との区別に有用と思われたので、ここに詳細を記す。

Arylsulfatase 2週反応。

培地は次の組成からなる。培地(A): Dubos TB broth base Difco (Tween なし), 6.5 g; tripotassium phenolphthalein disulfate, 1.3 g; Aq. dest., 800 ml。培地(B): Glucose, 7.5 g; NaCl, 0.85 g; Aq. dest., 100 ml。培地(C): bovine serum (栄研), 100 ml。培地(A)は115°C 30分滅菌、培地(B)は100°C 15分滅菌、培地(C)は56°C 30分加熱して非働化する。以上の3培地を、滅菌後に合して一つとし、無菌的に中試験管(170×17 mm)に5 ml ずつ分注する。各培地に被検株を1白金耳ずつ接種して、ゴム栓をほどし、37°C 14日間培養した後、10% Na₂CO₃を0.5 ml ずつ加えて発色させる。arylsulfatase が存すれば、phenolphthalein が生じているので、アルカリにより培地全体が紅色に染まる。

Trimethylene diamine (TMD) の同時 NC 源としての利用。

TMD を単一N源およびC源として発育するかどうかの検査で次の基礎培地を用いる。基礎培地: KH₂PO₄,

Table 1. Differentiation between *Mycobacterium* and *Nocardia*

Strain or species	Number of strains tested	2-Week arylsul-fatase	Nitrate reduction	TMD §
<i>N. globerula</i> , NRRL No. B 1306* (U-75)		—	—	—
<i>N. rubra</i> , CBS* (U-1)		—	+	—
<i>N. polychromogenes</i> , CBS* (U-6)		—	+	+
<i>N. asteroides</i> , Drake (U-72)		—	—	—
<i>N. asteroides</i> , NRRL (U-73)		—	+	—
<i>N. asteroides</i> , Emmons, NIH(9935) (U-93)		+	—	—
<i>N. asteroides</i> , Emmons, NIH(9976) (U-94)		—	—	—
<i>N. asteroides</i> , Gordon (3661) (U-123)		—	—	—
<i>N. asteroides</i> , Gordon (R#409) (U-124)		+	+	—
<i>N. asteroides</i> , Gordon (R#420(1)) (U-128)		—	—	—
<i>N. brasiliensis</i> , McMillan, O-410 (U-145)		—	—	—
<i>N. brasiliensis</i> , McMillan, O-415 (U-146)		—	+	—
<i>N. phlei</i>	20	20	20	20
<i>M. chitae</i>	4	4	4	0
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>runyonii</i> **	7	7	(3)	6
<i>M. fortuitum</i> subsp. <i>fortuitum</i>	116	116	112	116
<i>M. aurum</i>	35	26	11	35
<i>M. parafortuitum</i>	9	9	9	9
<i>M. smegmatis</i>	24	24	24	24

* According to Gordon, *Mycobacterium rhodochrous*

** According to Bojalil *et al.*, *M. runyonii*

NRRL=Northern Regional Research Laboratories, Peoria, Illinois, U. S. A.

CBS= Centralbureau voor Schimmel-cultures, Baarn, Holland.

The strains of nocardia used in the study were supplied by Dr. I. Uesaka, Kyoto University, in April 1965, who had received the strains from Dr. N.M. McClung, University of Georgia, U. S. A.

The numbers listed in the section of mycobacteria are the number of strains showing the positive reaction.

§ TMD=Utilization of trimethylene diamine as the sole sources of nitrogen and carbon (simultaneous sources of nitrogen and carbon) for growth.

0.5 g; MgSO₄·7H₂O, 0.5 g; 精製寒天 (和光または栄研), 20.0 g; 蒸留水, 1,000 ml。対照として基礎培地自身を使用し, 一方基礎培地に 0.1 M の割合に TMD を加え (TMD 培地, TMD の添加量は, 7.4 g/1,000 ml), 10% KOH で pH 7.0 に修正し, 8 ml ずつ中試験管に分注し, 115°C 30 分滅菌後, 斜面とする。対照および TMD 培地に被検株を 1 白金耳ずつ接種し, 37°C 14 日培養後, 対照と比較して発育の有無を検する。TMD 培地に発育を示すものは, TMD の利用陽性である。本法は判定が明瞭で, 接種は上記の白金耳接種法で十分再現性のある結果が得られる。

硝酸還元。

卵培地に発育した新しい菌をとつて, スピッツグラスの内壁にすりつけ, 湿菌量 50 mg を測る。これをガラス棒で管壁にこすりつけて均一化した後, 0.1% NaNO₃ 含有 0.067 M phosphate buffer (pH 7.1) に浮遊させる。これを 37°C 16 時間培養した後, p-dimethylaminobenzaldehyde 液 (2% の割合に 10% HCl に溶

かしたもの) 2 滴と 10% HCl 1.0 ml を加えて亜硝酸の生成の有無を検した。亜硝酸は上記試薬によつて黄色を呈する。

実験成績

100 項目の性状について, *Mycobacterium* と *Nocardia* の比較を行なつたが, 大部分の性状については両者の間を区別する差異はなかつた。ただ抗酸性のほか, 2 週 arylsulfatase, TMD 利用の 2 者が両者の間で著明な差を示した。硝酸還元も *Mycobacterium* では, *M. aurum* の一部および *M. fortuitum* subsp. *runyonii* (Bojalil *et al.*⁵⁾ によれば, *M. runyonii* の他はすべて陽性であつたが *Nocardia* では陰性のものが多かつたので参考となると思われた。

2 週 arylsulfatase は *Nocardia* では 12 株中 2 株のみ陽性で他は陰性であつたのに対し, *Mycobacterium* では 215 株中 206 株が陽性であつた。*Mycobacterium* でこの反

応に陰性成績を示したのは, *M. aurum* の一部のみであつた。

TMD の利用は *Nocardia* では 1 株だけ陽性であつたのに対し, *Mycobacterium* では 215 株中 210 株が陽性であつた。*Mycobacterium* では *M. chitae* が陰性成績を示した。(表 1)

考 察

Mycobacterium と *Nocardia* を比較すると, 前者は後者より抗酸性が強い¹⁾ (抗酸性は Ziehl-Neelsen 染色で Fuchsin に染まる意)。そのほか前者は後者より, アルカリ, 酸, malachite green に対する抵抗力が強いといわれる⁶⁾。また強烈な pink 色, 赤色の集落を作るものは *Nocardia* に限られ, *Mycobacterium* にはみられない。卵培地に食い込む発育も一般に *Nocardia* にみられ, *Mycobacterium* にはみられない。

従来 *Mycobacterium* と *Nocardia* の区別点は, (1) 前者は菌糸形成を欠くか痕跡的であり, 分枝を形成しな

いのに対し、後者は少なくとも発育初期には菌糸が認められ、分枝もみられる、(2)前者は抗酸性であるが、後者は部分的抗酸性か非抗酸性である、の2点であるとされている⁷⁾。

上坂, McClung⁷⁾によれば、*Nocardia* は培養初期は一般に非抗酸性であるが日数の経過とともに抗酸性が強くなり、古くなると再び抗酸性は減弱ないし消失する。ただしその時期は菌種、菌株、その他の原因により必ずしも一定しないという。一方われわれの経験では、*Mycobacterium* でも培養初期には非抗酸性である。しかし日数を経ると急に全部の菌が抗酸性となり、陳旧になつても大多数が抗酸性にとどまる。したがつて培養の各時期にわたつて経時的に観察すれば両者の区別は比較的容易である。しかしこの両者を抗酸性という唯一の性状によつて、異なる family または genus に分かつことが妥当かどうかという疑問が起る。両者を区別するもう一つの性状、すなわち菌糸形成の有無についても、*Mycobacterium* は菌糸を欠くか痕跡的とされているが、*Mycobacterium* の中には発育初期に菌糸に似た形態を示すものがあつて、菌糸形成の有無のみをもつて両者を区別するのに困難を感じることもある。

したがつてわれわれは、この両者を区別する他の生化学的、生物学的性状がほしいわけで、われわれがこの研究を行なつた目的もここにある。また分類学的な見地から、両者の関係をもつと広く比較検討する必要があると思われる。

われわれが本報に示した鑑別性状、(1)2週 arylsulfatase および(2)TMD 利用、さらに参考性状としての(3)硝酸還元は、100%の確率で clear-cut に両者を区別できるものではない。しかしこの点は、菌糸の有無、抗酸性についても同様である。

われわれはある対象菌群を2群に群別する性状として、少なくとも3種できれば5種の性状をあげることが望ましい。少なくとも数種の性状で分割できるものでなければ、分類学的に意味のある群とはいいがたい。そして群別に用いられる性状は、必ずしも100%の確率で2群を分けるものでなくてもよく——(實際上このような100%確率の性状は存しない)——少数の例外を含んでいて差支えない⁸⁾。

われわれがここにあげる性状をつけ加えることにより、

Mycobacterium と *Nocardia* の区別が将来より明確になるものと信じる。われわれの今回の研究では、*Nocardia* の株数が十分とはいえないので、将来より多数の *Nocardia* 株を用いて、両者の区別を明らかにしていきたいと考えている。

結 論

Mycobacterium と *Nocardia* の区別点として、2週 arylsulfatase と trimethylene diamine (TMD) の NC 源としての利用の2性状があげられる。硝酸還元も参考性状として有用と思われる。発育の速い *Mycobacterium* は2週 arylsulfatase 陽性で、TMD の利用陽性であるが、*Nocardia* は2週 arylsulfatase 陰性、TMD 利用も陰性である。また *Mycobacterium* で発育の速い菌は、一般に硝酸還元陽性であるが、*Nocardia* には硝酸還元陰性のものが多い。

以上の所見から *Mycobacterium* と *Nocardia* を区別する性状として、次の4性状が示唆される。(1)抗酸性、(2)菌糸形成、(3)2週 arylsulfatase、および(4)TMD の NC 源としての利用。

(*Nocardia* の菌株を分与して下さつた京都大学結核研究所上坂一郎教授に謝意を表する。)

文 献

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th ed., edited by Breed, R. S., Murray, E. G. D. & Smith, N. R., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1957, p. 713.
- 2) Gordon, R. E. & Mihm, J. M. : J. Bacteriol., 73 : 15, 1957.
- 3) Gordon, R. E. & Mihm, J. M. : J. Gen. Microbiol., 21 : 736, 1959.
- 4) 東村道雄・東村純雄・水野松司・外山春雄 : 結核, 41 : 395, 昭 41.
- 5) Bojalil, L. F., Cerbón, J. & Trujillo, A. : J. Gen. Microbiol., 28 : 333, 1962.
- 6) Uesaka, I. : Acta Tuberc. Jap., 14 : 1, 1964.
- 7) McClung, N. M. & 上坂一郎 : 京大結研紀要, 9 : 113, 昭 36.
- 8) Tsukamura, M. & Tsukamura, S. : Scand. J. Resp. Dis., 48 : 58, 1967.