

## 委員会報告

## 臨床材料に見出される抗酸菌とその鑑別, 同定法

## — 抗酸菌分類委員会試案 —

日本結核病学会抗酸菌分類委員会

委員長 堀 三津夫 (阪大教授)

委員 (ABC順, 敬称略)

青木国雄(愛知県がんセンター研), 岩崎龍郎(結核予防会結研), 占部 薫(放射能影響研), 岡捨己(東北大抗研), 岡田 博(名大), 今野 淳(東北大抗研), 斎藤 肇(広大), 佐藤直行(国立予研), 庄司 宏(兵医大), 染谷四郎(国立公衆衛生院), 高橋義夫(北大結研), 武谷健二(九大), 東村道雄(国療中部病), 堀三津夫(阪大微研), 室橋豊穂(国立予研), 山本正彦(名市大), 米田正彦(阪大微研)

受付 昭和 51 年 3 月 22 日

## はじめに

昭和40年6月に組織された日本結核病学会抗酸菌分類委員会は, 臨床細菌学的な立場から臨床材料に証明される抗酸菌の分類, 鑑別ならびに同定試案を報告し(日本結核病学会抗酸菌分類委員会: 結核・呼吸器抄録, 23: 225, 1972), もつて同委員会に課せられた任務を一応終了した。

ところで, この試案に関して, 特に実地医家より, より簡便な抗酸菌の鑑別, 同定法が強く要望され, ここに同委員会はその後得られた新しい若干の知見をも加えてこの試案の改訂を試みることにした。

## 1. 臨床材料に証明される抗酸菌とその一般性状

これは一括して表1に示した。

表にかかげられた菌種名はそれらのすべてが決定的なものではなく, 将来その国際的なとりきめができあがればそれによらねばならないことはいうまでもないが, 現時点では一応合法的と思われるものをとりあげた。

## 2. 抗酸菌の鑑別, 同定の試験の実施法

抗酸菌の鑑別, 同定上有用と考えられる以下の試験法は原法あるいは標準法の要約であり, これらを実施するにあつての一般的な留意事項は次のようである。

(1) 供試菌は特にことわりのない限り1%小川培地(以下小川培地)培養を用いることにし, 培養温度に留意し, 通常 Slow growers では2~3週, Rapid growers では3~7日のものを用いる。

(2) 供試菌量は特定の場合を除いて必ずしも厳密を

要しないので, 所定の大きさの白金耳で菌を採取する程度で十分である。菌液の調製にはどのような方法を用いてもよいが, 菌に強い障害を与えるような操作はさけるべきである。一法として白金耳で所定量の菌塊を試験管にとり, ガラス棒でいねいに摩砕しながら蒸留水または生塩水を1滴ずつ滴下しながら調製する。必要な場合には蒸留水または生塩水を用いて菌を遠沈洗浄する。これらの操作は無菌的に行なうことが望ましく, 特に反応に長時間を要する試験の場合には無菌的操作を厳守すべきである。

(3) 試薬類はできるだけ純品を用いることが望ましい。

## 1. 小川培地上の性状

小川培地上の性状は, 原則として, 分離後あまり継代されていない菌の性状が記載されており, 継代を重ねた菌ではその性状がかなり変わつてくることがあるので留意を要する。また集落のS型, R型は必ずしも典型的なもののみではなく, その間に移行型があり, また時には記載とは逆の型を示すものもあるので注意を要する。

なお *M. xenopi* は Runyon III 群菌に分類されているが, 黄色集落の菌株が多く, 白色集落のものはむしろ少ない。

## 2. 鑑別に用いる培地

(1) パラニトロ安息香酸 (PNB) 培地 (*M. Tsukamura*-*S. Tsukamura*: Tubercle, 45: 64, 1964)

表1 臨床材料から分離

菌種	小川培地上の性状										
	増殖				集落			ナイアシン試験	硝酸還元	ジアミン(16時間)酸化	耐熱カタラーゼ
	温度(°C)			速度 可視集落出現までの期間	S型またはR型	着色					
	28	37	45			暗所	照射後				
<i>M. tuberculosis</i>	-	+	-	2~3週	R	-	-				
<i>M. bovis</i>	-	+	-	3~5週	S(R) <sup>4)</sup>	-	-	-	-	-	-
<i>M. kansasii</i>	+	+	-	2~3週	RS <sup>4)</sup>	-	黄	-	+	-	+
<i>M. marinum</i>	+	(±) <sup>2)</sup>	-	2~3週	S	-	黄	-	-	+	(±)
<i>M. simiae</i>	+	+	-	2~3週	S	-	黄	+	-	-	+
<i>M. marianum</i> ( <i>scrofulaceum</i> )	+	+	-	2~3週	S	橙	橙	-	-	-	+
<i>M. szulgai</i>	+	+	-	2~3週	S	橙	橙	-	+	-	+
( <i>M. gordonae</i> ) <sup>1)</sup>	+	+	-	2~3週	S	橙	橙	-	-	-	+
<i>M. avium</i>	+	+	+	2~3週	S	-	-	-	-	-	+
<i>M. intracellulare</i>	+	+	(±) <sup>3)</sup>	2~3週	S	-	-	-	-	-	+
<i>M. xenopi</i>	-	+	+	3~4週	S	(黄-)	(黄-)	-	-	-	+
<i>M. ulcerans</i>	+	-	-	4~7週	S	-	-	+	-	-	+
( <i>M. gastri</i> )	+	+	-	2~3週	S	-	-	-	-	-	-
( <i>M. nonchromogenicum</i> )	+	+	-	2~3週	S or R	-	-	-	+	-	+
( <i>M. terrae</i> )	+	+	-	2~3週	S or R	-	-	-	+	-	+
<i>M. leprae</i>	-	-	-								
<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	<3日	S(R)	-	-	-	+	+	+
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	+	+	-	<3日	S(R)	-	-	(±)	-	+	+
subsp. <i>abscessus</i>	+	+	-	<3日	S(R)	-	-	-	-	+	+
( <i>M. parafortuitum</i> complex) ( <i>M. parafortuitum</i> )	+	+	-	<3日	S	淡黄	淡黄~黄	-	+	+	+
( <i>M. aurum</i> )	+	+	-	<3日	S	橙	橙	-	(±)	+	+
( <i>M. neoaurum</i> )	+	+	-	<3日	S	橙	橙	-	(±)	+	+
( <i>M. thermoresistibile</i> )	+	+	+	<7日	R	淡黄	淡黄	-	+	-	+
( <i>M. flavescens</i> )	+	+	-	<7日	R(S) <sup>4)</sup>	黄	黄	-	+	-	+
( <i>M. phlei</i> )	+	+	+	<3日	R	黄	黄	-	+	+	+
( <i>M. smegmatis</i> )	+	+	+	<3日	R	-	-	-	+	+	+
( <i>M. chitae</i> )	+	+	-	<3日	S or R	-	-	-	+	-	+
( <i>M. vaccae</i> )	+	+	-	<3日	S	淡黄	黄	-	(±)	-	+

注: 1) ( ) 内の抗酸菌は、ヒトには非病原性であるが臨床材料から分離されることもありうる。

2) 分離当初は 37°C で増殖しにくい、継代を重ねると増殖可能となる。

3) (+), (-) は 10~30% の菌株が示す性状。

4) 集落の S(R) は時に R 型, R(S) は時に S 型, また RS は R 型 S 型の中間の性状を示すもの。

5) アリールスルファターゼは遅育菌では 2 週間法, 速育菌では 3 日間法の性状。

される抗酸菌の一般性状

耐熱 フ オ ス フ ア	タ ー ゼ	ツ イ ー ン ( 80 5 日 水 解)	ア リ ー ル ス ル フ	ア ミ ダ ー ゼ			増 殖					PAS 培 地 黒 変	備 考	
				ウ レ ア ー ゼ	ニ ミ ダ ー ゼ ア	ピ ラ ジ ン ゼ ア	ア ナ ラ ン ト イ	5 $\mu$ g EB 培 地	グ ル タ ミ ン	酸 ソ ダ タ ミ ン	ブ ド ウ 糖 寒 天 培 地			2 mg ピ ク リ ン
-	-	-	+	+	+	-				-	-	( $\mp$ )	-	
-	-	-	+	-	-	-				-	-	( $\mp$ )	-	グリセリン加培地で難増殖性を示すことあり
+	+	+	+	+	-	-				-	( $\pm$ )	+	-	
+	+	+	+	( $\mp$ )	( $\mp$ )	+				-	( $\pm$ )	+	-	体表部病巣から分離
-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	-	
-	-	+	( $\pm$ )	( $\mp$ )	( $\mp$ )	-	+	+	-	+	+	+	-	
-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	Tap water scotochromogen
-	+	+	( $\pm$ )	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	
-	-	( $\pm$ ) <sup>3)</sup>	-	( $\pm$ )	( $\pm$ )	-	+	+	-	+	+	+	-	
-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	( $\pm$ )	+	+	-	
-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	熱帯地方在住者の体表部病巣から分離
+	+	+	+	+	-	-	-	+	or -	-	+	+	-	
+	+	+	-	( $\mp$ )	( $\mp$ )	-	-	-	-	-	+	+	-	
-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	
+	or -	+	+	( $\mp$ )	( $\mp$ )	+				+	+	+	( $\pm$ )	
( $\mp$ )	-	+	+	+	( $\pm$ )	-				-	+	+	+	
-	( $\mp$ )	+	+	+	+	-				+	+	+	+	
-	+	-	+	+	+	-				+	( $\pm$ )	( $\pm$ )	-	
-	+	-	+	+	+	( $\mp$ )				+	( $\pm$ )	( $\pm$ )	-	
-	+	-	+	+	+	-				+	( $\pm$ )	( $\pm$ )	-	
-	+	-	+	+	+	-				+	+	+	-	
-	+	-	+	+	+	-				+	+	+	-	
-	+	-	+	+	+	-				+	+	+	-	
-	+	-	+	+	+	-				+	+	+	-	
+	or -	+	+	+	+	-				+	+	+	-	
-	+	-	+	+	+	+				+	+	+	-	

小川培地に *p*-nitrobenzoic acid (PNB) を 0.5 mg/ml の割合に加えたもの。

PNB 250 mg を propylene glycol 10 ml に溶かし (25 mg/ml となる), その1容量を小川培地50容量に加え, 中試験管 (18×170 mm) に 8 ml ずつ分注し, 斜面に固める。冷暗所で少なくとも3カ月の保存にたえる。

小川培地培養菌に白金耳を軽くふれて対照培地 (小川培地) および PNB 培地に丹念に塗抹し, 37°C に 3 (~4) 週間培養する。

PNB 培地には発育が全くみられないか, あるいは僅少の分離集落の発育しか示さないものを発育陰性, 対照培地と同程度または少し発育が悪くても全面発育の場合を発育陽性とする。

PNB 培地上には *M. tuberculosis* および *M. bovis* は全く発育しないのに対して, 他の抗酸菌ではごく少数の例外 (*M. kansasii*, *M. marinum* および *M. xenopi* の一部の菌株) を除いてよく発育する。

(2) ヒドロキシルアミン (HA) 培地 (M. Tsukamura: J. Bacteriol., 90 : 556, 1965)

小川培地に  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  を 62.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の割合に加えたもの。

$\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  625  $\mu\text{g}/\text{ml}$  水溶液を作り, その1容量を小川培地9容量に加え, 中試験管 8 ml ずつ分注し, 斜面に固める。冷暗所で少なくとも3カ月の保存にたえる。

菌の接種ならびに判定の仕方は (1) と同様である。

HA 培地には結核菌の大多数が発育しないのに対して, 他の抗酸菌ではよく発育する。したがって PNB 培地に発育せず HA 培地に発育する菌には *M. kansasii*, *M. marinum* ならびに *M. tuberculosis* の一部の菌株が入るので, この場合には光発色性試験によつて前2者を後者より鑑別することが必要である。

(3) エタンプトール (EB) 培地 (東村道雄: 結核, 45 : 237, 昭45)

小川培地に EB を 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の割合に加え, 中試験管に 8 ml 分注して斜面に固める。

菌を接種して 37°C, 2 (~3) 週後に発育の有無を判定するが, 菌接種ならびに判定の仕方は (1) と同様である。

EB に対して *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* および *M. scrofulaceum* は耐性であるが, *M. nonchromogenicum*, *M. terrae*, *M. gastri* および *M. gordonae* は感性である。

(4) パラアミノサリチル酸ソーダ (PAS) 培地 (M. Tsukamura: Jap. J. Tuberc., 9 : 70, 1961)

小川培地に PAS を 2 mg/ml の割合に加え, 中試験管に 8 ml 分注して斜面に固める。

小川培地培養菌の1白金耳を塗抹し, 37°C, 1週間後において, 発育菌が培地を異変するものを PAS 分解陽性とする。

*M. chelonae* の他に, *M. fortuitum* の大部分も陽性である。

(5) ピクリン酸培地 (M. Tsukamura: Amer. Rev. Resp. Dis., 92 : 491, 1965)

変法 Sauton 寒天培地

グルタミン酸ソーダ	4.0 g	} 加温溶解後, 10% KOH で pH 7.0 に修正。精製寒天 30 g を加えて加温溶解後 (必要ならば pH 7.0 に再修正), 中試験管に 8 ml ずつ分注。115°C, 30 分高圧蒸留水 滅菌後, 斜面に固める。
クエン酸ソーダ	2.0 g	
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g	
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g	
ピクリン酸	2.0 g	
グリセリン	30 ml	
蒸留水	970 ml	

被検菌の接種の方法は (1) と同様である。

37°C, 2週後に発育陽性のものは Rapid growers である。ただし *M. chelonae* subsp. *chelonae* のみは例外で発育陰性である。

(6) グルタミン酸ソーダ・ブドウ糖加寒天培地 (M. Tsukamura・S. Tsukamura: Amer. Rev. Resp. Dis., 96 : 512, 1967)

基礎培地

グルタミン酸ソーダ	4.0 g	} 加温溶解後, ブドウ糖を 1.0 g 添加。10% KOH で pH 7.0 に修正後, 滅菌中試験管に 8 ml ずつ分注。100°C, 15 分ずつ2回間欠蒸留水 滅菌後, 斜面に固める。
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0.5 g	
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 g	
精製寒天(栄研)	20.0 g	
蒸留水	1,000 ml	

被検菌の接種ならびに判定の方法は (1) と同様である。

*M. scrofulaceum*, *M. gordonae* および *M. intracellulare* はブドウ糖加培地に発育する。*M. avium*, *M. xenopi* および大部分の *M. nonchromogenicum* はブドウ糖加培地, 基礎培地ともに発育しない。本法は特に *M. avium* を *M. intracellulare* から鑑別する上に参考となる。ただし, *M. intracellulare* の少数株はブドウ糖加培地にも発育しないことがあり, また *M. avium* の中にも発育する少数の菌株があるので留意を要する。

### 3. 生化学的性状の試験法

(1) 光発色性試験 (一般に用いられる方法)

[試験材料]

暗所で1~2週間培養して発育がもつとも盛んであると思われる小川培地培養菌で, 陳旧培養は適さない。また, 集落の散在するものが望ましい。

[試験法]

- 1) 菌を培養した試験管またはシャーレの一部をアルミファイルで巻いて遮光する。
- 2) 試験管ならば栓をゆるめる(色素の合成には  $O_2$  を必要とする)。
- 3) 30~60ワットの電球で約 30 cm の距離から1時間照射。ただし、光照射の条件は必ずしも厳密を要せず、蛍光灯で照射してもよいし、また散光に曝露してもよい。
- 4) 37°C の暗所にもどして1夜培養し、照射部位の集落の色調の変化を非照射部位の集落と対比する。

## 〔判定〕

遮光部の集落の色調に変化がなく白色~象牙色で、光照射部の集落の色調が黄色~レモン黄色に変化していれば光発色性陽性と判定する。

Slow growers では、*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. simiae* ならびに *M. asiaticum* が、また Rapid growers では *M. vaccae* が光発色性陽性である。ただし、*M. simiae* の光発色性の発現には6~24時間の光の照射を必要とする。

なお、*M. marianum* (*scrofulaceum*), *M. gordonae* および *M. szulgai* (II群抗酸菌)は曝光培養によつて色調の増強がみられる。

## (2) ナリアシン試験(今野淳・長山英男・岡捨己)

日本胸部臨床, 20: 867, 昭36)

## 〔試験材料〕

a) 小川培地培養菌: 中等大集落 50 コ以上、あるいは培地の1/3以上をおおう程度の菌量が必要である。

b) A液: 3% Benzidine ethanol 液

B液: 10% Bromcyan 水溶液

A液, B液とも褐色瓶に入れて密栓し、冷暗所に保存すれば、数カ月間は使用できる。なお、B液は空気の流通のよい場所で手早く調製する。

## 〔試験法〕

- 1) 菌培養試験管に沸騰水 1.5 ml を注加し、全集落が浸るように水平に約5分間静置する(ナリアシン抽出)。
- 2) 抽出液の 0.2 ml ずつを2本の小試験管に移す。
- 3) 2本の試験管にA液 0.1 ml ずつを加え、うち1本には更にB液 0.1 ml を加える。

## 〔判定〕

A, B両液を加えた試験管に桃色~赤色の沈殿のみられたものを陽性、対照とほぼ同様の白色沈殿のみを生じたものを陰性とする。

*M. tuberculosis* 以外の抗酸菌ではほとんどすべて陰性であるが、*M. africanum*, *M. simiae*, *M. ulcerans* ならびに一部の BCG および *M. chelonae* の菌株は陽性である。

## 〔注〕

- (1) 本試験は菌液を用いても実施することができ

る。この場合は少なくとも 10 mg (湿菌量)が必要である。

(2) Bromcyan は毒物であるからゴム帽をつけたピペットを用いて取り扱い、絶対に口で吸つてはならない。

また反応終了後の試料を捨てる時には必ずクレンジル石けん液の中に小試験管とともに捨てる。酸性のものを使用する流し場に捨ててはいけぬ。

(3) 耐熱性カタラーゼ試験 (G.P. Kubica-G.L. Pool: Amer. Rev. Resp. Dis., 81: 387, 1960)

## 〔試験材料〕

a) 小川培地培養菌: 数白金耳の菌を M/15 リン酸緩衝液 (PB; pH 7.0) 0.5 ml に分散させたもの。

b) ① 10% Tween 80 水溶液

② 30%  $H_2O_2$

## 〔試験法〕

1) 菌液をいれた小試験管を 68°C の温湯に20分浸した後、室温まで冷却。

2) Tween 80- $H_2O_2$  等量混液 0.5 ml を注加。

## 〔判定〕

発泡の有無を肉眼的に観察する。発泡があれば陽性、20分間観察を続けてもなお発泡のみられないときは陰性。

本試験は *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. gastri* および大多数の *M. marinum* の菌株は陰性であるが、他の菌種ではほとんど陽性である。

## 〔注〕

M/15 PB (pH 7.0)

(A液) M/15  $KH_2PO_4$ :  $KH_2PO_4$  9.7 g を蒸留水に溶かし、1,000 ml とする。

(B液) M/15  $Na_2HPO_4$ :  $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$  11.87 g または  $Na_2HPO_4 \cdot 12H_2O$  23.88 g を蒸留水に溶かして、1,000 ml とする。

A液とB液とを40:60の容量比で混合する。

(4) 硝酸還元試験 (S. Virtanen: Acta Tuberc. Scand. Suppl. 48: 119, 1960)

## 〔試験材料〕

a) 小川培地培養菌

b) ① M/100  $NaNO_3$  溶液:  $NaNO_3$  0.085 g を M/45 PB (pH 7.0) 100 ml に溶解し、高圧滅菌して保存。

② HCl 溶液: 濃 HCl を水で2倍に希釈

③ A液: 0.2% Sulfanilamide 水溶液

④ B液: 0.1% N-(1-Naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride 水溶液

A液, B液は室温保存で2週間は有効であるが、着色すれば捨てる。

## 〔試験法〕

- 1)  $NaNO_3$  溶液 2 ml を小試験管にとり、1白金耳

の菌塊(湿菌量約5mg)を入れる。

2) 37°C, 2時間温浴

3) HCl 溶液 0.1 ml, A液 0.2 ml, 次いでB液 0.2 ml を加えた後, 軽く振る。

[判定]

陽性であれば直ちに赤色～紫赤色になる。全く着色のないものや, うすい桃色のものを陰性とする。反応陰性の場合には被検液に少量の Zn 末を加え, 液が赤変する(陰性)かどうか確かめた方がよい。

各菌種の本試験の成績は表1参照。

(5) 耐熱性酸性フォスファターゼ試験(H.Saito et al.: Amer. Rev. Resp. Dis., 97:474, 1968)

[試験材料]

a) 小川培地培養(注1参照)

b)  $\alpha$ -Naphthylphosphoric acid および Diazonium *o*-dianisidine をそれぞれ0.2%および0.4%となるように M/5 クエン酸塩緩衝液(pH 5.0)に溶解する。

[試験法]

1) 培養試験管を70°C, 30分加熱後水冷

2) 上記培養菌の1～2白金耳をとり, 濾紙(東洋濾紙 No.50)上にほぼ1cm<sup>2</sup>の広さに拡げる。

3) 上記の試薬溶液を1滴滴下(1/2注射針を使用)

4) 室温(21～25°C)に10分間放置

[判定]

赤色～紫赤色に着色すれば陽性, 発色しないものは陰性。

[注]

(1) 小川培地培養を使用するとマラカイト緑の混入が成績の判定を不明確にすることがあるので, マラカイト緑を加えない1%小川培地を使用することが望ましい。

(2) M/5 クエン酸塩緩衝液(pH 5.0)

(A液) M/5 クエン酸:  $C_3H_4(OH)(COOH)_3 \cdot H_2O$  42.02gを蒸留水に溶かして1,000mlとする。

(B液) M/5 クエン酸ソーダ:  $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$  58.82gを蒸留水に溶かして1,000mlとする。

A液 20.5ml に B液 29.5ml を混和し, 蒸留水を加えて全量を100mlとする。

(3) 試薬 b) の入手が困難な場合には本法にかわるに一般臨床検査で血清の酸性フォスファターゼの測定に汎用されている Kind-King 法によつても同様の成績が得られる(正井秀雄, 斎藤肇, 山岡弘二: 未発表)。

方法: 生塩水 0.5ml に1白金耳量の菌を浮遊させ, これに0.01M フェニールリン酸ソーダ 0.5ml および0.2M クエン酸緩衝液 0.5ml を加えて, 37°C, 1時間保つ。これに0.5ml ずつの0.5N NaOH, 0.5M NaHCO<sub>3</sub>, 0.6%4-アミノアンチピリン, 2.4%赤血塩を加える。赤褐色～濃赤色のものを陽性, 黄色～帯微紅黄色のものを陰性とする。上記の試薬はヤトロンより発売

されている酸性フォスファターゼ測定用試薬 S(ACP-S)の基質緩衝液および呈色試薬を用いればより簡便である。

(6) アリールスルファターゼ試験(G.P.Kubica・A.L.Vestal: Amer. Rev. Resp. Dis., 83:728, 1961; G.P.Kubica・A.L.Rigdon: Amer. Rev. Resp. Dis., 88:737, 1961)

[試験材料]

a) 小川培地培養菌: 生塩水による1mg/mlの菌液を調製したもの。

b) ① Dubos の Tween-albumin 培地(栄研)

② 基質溶液: Tripotassium phenolphthalein disulfate (=Phenolphthalein disulfonic acid potassium salt) の2.6gを50mlの蒸留水に溶かし(0.08M), 濾過滅菌して4°Cに保存。

③ 0.01M 基質液: 基質溶液2.5mlを①の200mlに加えて2ml ずつ小試験管に分注(3日法に用いる)。

④ 0.03M 基質液: 基質溶液7.5mlを①の200mlに加えて2ml ずつ小試験管に分注(2週間法に用いる)。

⑤ 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>: Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1.06gを蒸留水に溶かして100mlとする。

[試験法]

1) 菌液 0.1ml を基質加培地に移植。

2) 3日法: 菌液移植 ②-④ を37°Cで3日培養後, ③の0.1mlを加えて発色させる。

2週間法: 菌液移植 ②-⑤ を37°Cで2週間培養後, 同様にして発色させる。

[判定]

無色(-), 微桃色(±), 淡桃色(+), 桃色(++), 淡赤色(卅), 赤色(卍), 深赤色(卍)

[注]

迅速マイクロアリールスルファターゼ試験(M.S. Tarshis: Acta Tuberc. Scand., 45:221, 1964)

[試験材料]

a) 小川培地培養菌

b) 基質溶液: Tripotassium phenolphthalein disulfate の0.001M水溶液を10ポンド, 20分滅菌。密栓し5°Cに保存すれば6カ月は使用できる。

[試験法]

1) 小試験管に基質液 0.1ml を入れる。

2) 菌液 60～80mg/ml の0.1mlを加え, 37°C, 48時間保つ。

3) 被検液に1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>水溶液の1滴を滴下し, 軽くふつて室温(25°C)に30分放置。

[判定法] 上記したと同様である。

(7) Tween 80 水解試験(L.G.Wayne: Amer. Rev. Resp. Dis., 86:579, 1962)

## 〔試験材料〕

- a) 小川培地培養菌  
b) 培液

M/15 PB (pH 7.0) 4 ml ずつ試験管に分注し、  
100 ml } 121°C, 15分滅菌。遮光し  
Tween 80 0.5 ml } て4°Cに保存すれば2週間  
0.1% 中性紅水溶液 2.0 ml } は使用可能。

## 〔試験法〕

上記培液に1白金耳の被検菌を分散させ、37°C, 5, 10, 20日後に観察する。通常5日の観察で十分である。

## 〔判定〕

コハク色の培液が桃色～赤色に変われば陽性。

*M. kansasii*, *M. marinum*, *M. gordonae*, *M. gastri*, *M. nonchromogenicum* は5日以内に陽性, *M. tuberculosis*, *M. scrofulaceum*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. xenopi* ではほとんどすべて2週後も陰性, *M. szulgai* は2週後微弱陽性。

- (8) アミダーゼ試験 (R. Bönicke: Zbl. Bakt. I Abt. Orig., 179: 209, 1960)

## 〔試験材料〕

a) 小川培地培養菌: 生塩水による濃厚菌液を作製, 遠沈 (3,000 rpm, 15分) によつて生塩水で2回洗菌 (洗淨液に NH<sub>3</sub> の証明されないことを Nessler 試薬でチェック), 沈渣を M/15 PB (pH 7.2) に分散させて約 10 mg/ml の菌液を調製。

b) A液: アルカリ性フェノール試薬

特級 phenol 25 g に蒸留水 10 ml を加えて水冷し, 振盪しながら冷却した 5 N NaOH 54 ml を少量ずつ加えた後, 蒸留水を加えて 100 ml とする。用に臨み調製する。

B液: 次亜塩素酸ソーダ溶液

市販の次亜塩素酸溶液 (アンチホルミン, 有効塩素濃度約10%) を蒸留水で約7倍に希釈して使用する。

C液: 0.003 M 硫酸マンガン水溶液

MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O 66.9 mg を 100 ml の蒸留水に溶解。

c) 0.00164 M 基質水溶液: 蒸留水 100 ml に溶かす10種のアミドの量は以下のようである。

- |                    |          |
|--------------------|----------|
| 1. Acetamide       | 9.68 mg  |
| 2. Benzamide       | 19.85 mg |
| 3. Urea            | 9.84 mg  |
| 4. Isonicotinamide | 20 mg    |
| 5. Nicotinamide    | 20 mg    |
| 6. Pyrazinamide    | 20.2 mg  |
| 7. Salicylamide    | 22.5 mg  |
| 8. Allantoin       | 25.9 mg  |
| 9. Succinamide     | 19 mg    |
| 10. Malonamide     | 16.7 mg  |

## 〔試験法〕

1) 試験管に菌液 1 ml, 基質液 1 ml をとり, 37°C に16時間保つ。菌液対照 (菌液 1 ml + 蒸留水 1 ml) ならびに基質液対照 (基質液 1 ml + PB 1 ml) も用意する。

2) 上記反応液ならびに対照液に C 液 0.1 ml, A 液 1 ml, B 液 0.5 ml を順次加えて振盪混和。

3) 2) 液の試験管を沸騰水中に15分浸し, 冷水で2分間冷却した後, 室温に約20分放置して発色させる。

## 〔判定〕

液の着色 (青緑色～青色) の程度を標準 NH<sub>3</sub> 溶液を用いた場合の着色と比較して, 次のように判定する。

< 2 μg/ml (+)

< 5 μg/ml +

< 10 μg/ml ++

> 10 μg/ml +++

通常, 判定は標準液の発色と対比せず, 単に肉眼的に行なつてよい。

## 〔注〕

(1) 次亜塩素酸溶液は反応を厳密に実施する必要のあるときは, 市販品を適宜希釈した液 2 ml に蒸留水 10 ml を加え, 更に5%ヨードカリ溶液 2 ml, 水酢酸 1 ml を添加して, 可溶性澱粉を指示剤として 0.1 N チオ硫酸ソーダ溶液で滴定し, 7.5～8.0 ml のチオ硫酸ソーダ溶液を所要する溶液を調製する。

(2) 基質液の調製は, 基質を滅菌容器に入れ, 滅菌蒸留水に溶解したもので試験にさしつかえない。

(3) 簡便なウレアーゼ・テスト (戸田忠雄, 萩原義郷, 武谷健二: 医学と生物学, 55: 184, 1960)

高圧滅菌した M/100 PB (pH 6.8) に尿素を 3%, 0.1% フェノール赤を1%の割に可及的無菌的に加えたものの約 4 ml を滅菌試験管に分注し, これに約1白金耳量の菌を移植する。37°C, 3日後に媒液が微紅色～濃紫赤色に着色すれば陽性, 赤変しないもの (対照色) は陰性と判定する。

- (9) ジアミン酸化試験 (R. Bönicke·H. Nolte: Zbl. Bakt. I Abt. Orig., 202: 479, 1966)

## 〔試験材料〕

a) 小川培地培養菌: 生塩水による濃厚菌液を作製, 遠沈 (3,000 rpm, 15分) によつて生塩水で2回洗菌 (洗淨液に NH<sub>3</sub> の証明されないことを Nessler 試薬でチェック), 沈渣を M/15 PB (pH 7.0) に分散させて約 5 mg/ml の菌液を調製。

b) 0.005 M Putrescine 溶液: Putrescine (Diaminobutane) dihydrochloride の 860 μg/ml 水溶液。

c) Nessler 試薬: 市販品でよい。

## 〔試験法〕

1) 小試験管に基質液 0.2 ml, 菌液 1.8 ml を加え, 37°C, 24時間保つ。

- 2) 1) の基質・菌混和液を遠沈, 除菌する。  
3) 上清に Nessler 液 0.1 ml を加えて着色を観察する。

[判定]

反応液が黄色～褐黄色に着色すれば陽性とする。

#### 4. その他

- (1) 紫外線照射による抗酸性喪失試験 (T. Murohishi et al.: Amer. Rev. Resp. Dis., 94: 114, 1966)

小川培地培養菌の生塩水による 30~50 mg/ml の濃厚菌液を調製する。この菌液をスライドグラスに円形 (直径 10~15 mm) に塗抹して自然に乾燥させる。塗抹面の半分をアルミホイルおよび黒い紙でおおい、Mazuda ® GL-15 の殺菌燈で 10 cm の距離より 3 時間照射した後、火炎固定して次のように染色する。

染色液: 95% エタノール 100 ml に 1.5 g の酢酸カリウムを溶解し、次いでビクトリアブルー (5~7 g) およびビスマルクブラウン (0.6~0.7 g) を溶解する。この溶液を 1 昼夜室温に放置して不溶解物を沈殿させて得られた上清を 10 倍に希釈して染色液とする。

塗抹標本に染色液を重層し、湯気が出る程度に加温した後、標本が冷却するまで静置し、染色液を捨て、0.1% 硝酸-70% エタノールで 20 分脱色し、水洗することなく濾紙で吸湿する。

染色標本を肉眼的に観察する。この条件では *M. avium* は抗酸性を保持しているので標本は青く染まるが *M. intracellulare*, *M. xenopi*, *M. nonchromogenicum* などの場合は菌が抗酸性を失い、褐色に染まる。

[注]

(1) 塗抹標本の作製にさいしては、同一スライドグラスの上に被検菌をはさんで既知抗酸菌 (例えば *M. avium* と *M. intracellulare*) を塗抹し、対照とするのがよい。

(2) 紫外線照射は上記の殺菌燈によらなくてもよいが、他の装置を用いる場合には照射距離、時間など、予備実験を行なつて実験条件を決めておく。

- (2) 兎に対する毒力試験 (占部薫他: 結核, 42: 511, 昭42)

小川培地上 2~3 週間培養菌より生塩水による 10 mg/ml の均等菌浮遊液を調製し、体重 2~3 kg の兎の耳縁静脈内に 1 ml 接種する。

被検菌が *M. avium* の場合は接種動物は 3 週以内にす

べて斃死、この間、黄疸の出現 (耳朧, 眼球結膜の黄染), 体重減少は顕著で、菌接種 2~3 週後においても血中ならびに内臓から多数の抗酸菌を証明しうる。他方 *M. intracellulare* の場合は菌接種後 3 週以内には動物はまず死亡せず、この間、黄疸はみられず、多くの動物では体重が増加し、菌接種後 2~3 週では血中から証明される抗酸菌はきわめて少なく、また内臓中の抗酸菌も *M. avium* の場合に比べてはるかに少ない。

[注]

(1) 本試験にさいしては既知の *M. avium* および *M. intracellulare* を対照にとり、被検菌の毒力を比較することが望ましい。また、他の試験法 (アリアルスルファターゼ, グルタミン酸ソーダ・ブドウ糖加寒地培地上の発育, 紫外線照射による抗酸性の喪失など) によつて被検菌が *M. avium* か *M. intracellulare* のいずれに属するものらしいかというところまであらかじめ調べておくことが肝要である。

(2) 本試験は菌接種動物の黄疸出現, 体重の増減, 生死を観察すれば、まず十分であり、血中、内臓中の菌の還元培養は必ずしも必要ではない。

#### 5. 抗酸菌の鑑別実施法

一般臨床検査室でも十分行ないうると思われる、結核菌と他の抗酸菌との鑑別のスクリーニング法 (表 2) ならびに同定方式 (図) の 1 試案を示した。わが国における現在のこの方面の研究の一つの案として参考になれば幸いである。

表 2 *M. tuberculosis* と他の抗酸菌とのスクリーニング法

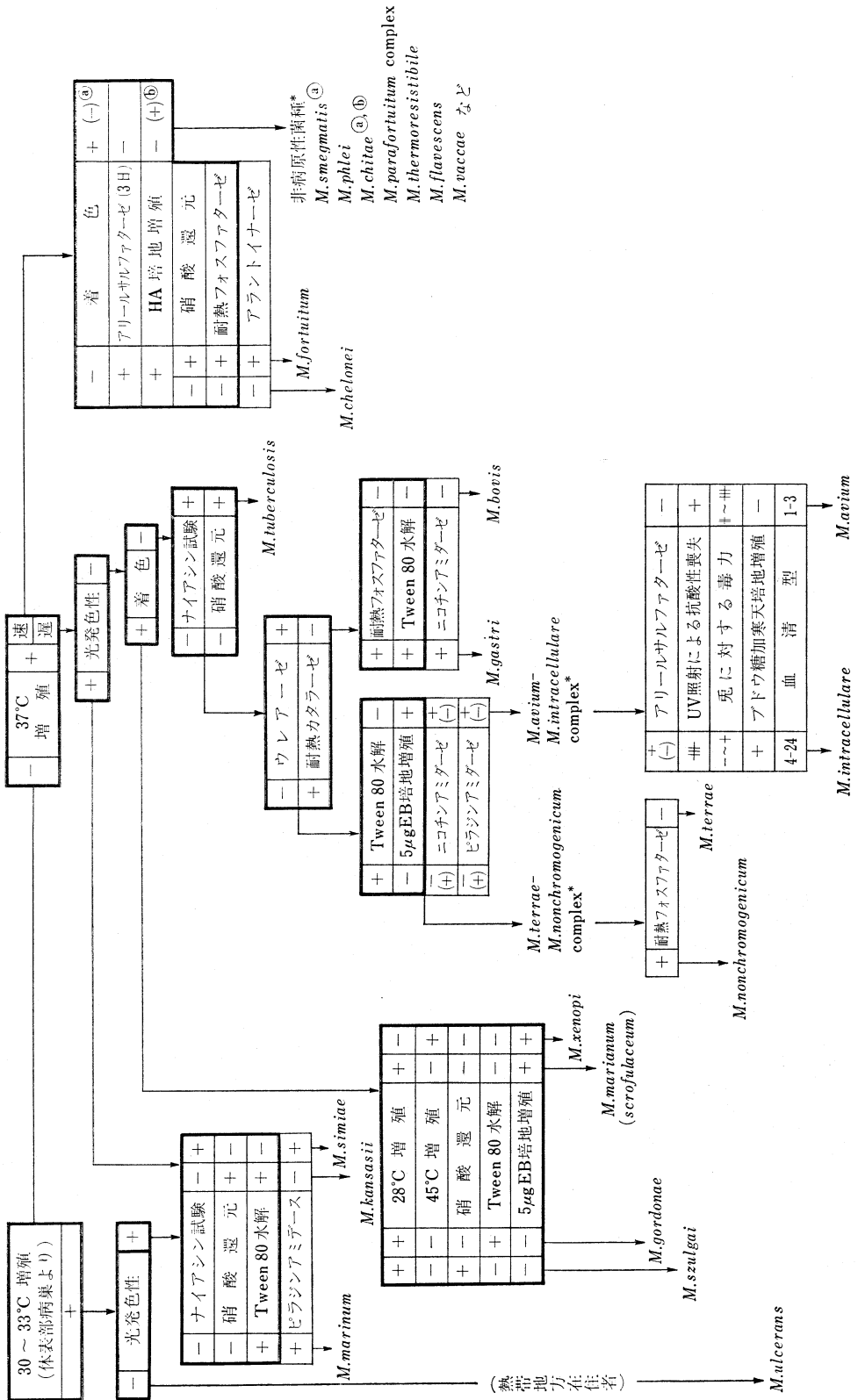
増殖		光発色性	ナイアシン・テスト	推定菌群
PNB 培地	HA 培地			
-*	-	-	+	<i>M. tuberculosis</i> 群
-	+	-	+	
+	+	+	-	<i>M. kansasii</i> , <i>M. marinum</i>
-	+	+	-**	
-	+	-	-	<i>M. xenopi</i> の少数の菌株
+	+	-	-	その他の抗酸菌群
+	-	-	-	

\* それぞれの菌群の主要パターン

\*\* *M. marinum* はナイアシン+のことがある。



図 抗酸菌の同定方式



注: 1) 大群内の検査は必ず行なう。更に細群内の検査も行なえば診断は一層確かとなる。  
 2) 一般臨床検査室では、\*の菌群決定まで十分である。

## 付 記

昭和40年に組織された抗酸菌分類委員会は昭和47年その任務を一応終了して廃止された。

したがって現在の時点で本文を抗酸菌分類委員会試案として掲載することには疑問と抵抗を感ずるものであるが、昭和47年試案が公表された当時からすでにとくに実地医家より、更に簡便な抗酸菌の鑑別、同定法の発表が強く要望されていたので、分類委員会の委員であつた斎藤肇博士にお願いして、同博士を中心として数名の旧委員の方々に分類委員会試案の再検討をしていただいた。その結果できあがつたのが本文であり、斎藤博士の執筆になるものである。

委員会試案(旧)から本案ができあがるまで約4年の年月をけみしているので、本案にはその間に得られた新しい知見、ならびに将来をおもんばかつて、抗酸菌分類国際研究班(理事長: L.G.Wayne 博士, アメリカ)で新菌種としてとりあげるか否かが現在検討されている数株の菌種の性状がつけ加えられている。

このようないきさつから本文は当然斎藤博士他数名の方々の連名で公表されるべきものであるが、斎藤博士のたつての希望によつて抗酸菌分類委員会試案(旧)の改訂案として発表することになつたのを了とされたい。

大阪大学微生物病研究所

堀 三津夫