

原 著

抗酸菌の日常検査における鑑別法の検討

正 井 秀 雄

関東中央病院臨床検査科

受付 昭和52年3月2日

STUDIES ON THE ROUTINE IDENTIFICATION
PROCEDURE FOR MYCOBACTERIA

Hideo MASAI*

(Received for publication March 2, 1977)

The test in the clinical laboratory should be done simply and reliably and the final results of the test would desirably be brought out as early as possible. Considering those requirements, the following seven features were selected to be tested for the identification of clinical isolates of Mycobacteria: 1) colour tone of the colonies, 2) roughness of the colonies, 3) photoactive pigment production, 4) niacin production, 5) nitrate reduction, 6) heat stable phosphatase activity and 7) Tween hydrolysis. To fulfil the above described requirements, test paper methods were employed in cases of niacin test and nitrate reduction test, and the commercial reagent kit for blood chemistry was employed in case of the heat stable phosphatase test.

Since these tests except the roughness of colonies were carried out by reading the colour change, the results of these tests were read simply and reliably. In addition, every test could be done within a few hours except the Tween hydrolysis, and the species name of the tested strain could be brought out on the day of examination in many occasions. Dividing the above described test combinations into two steps, the author succeeded to identify various strains of Mycobacteria of typical characteristics, such as *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. intracellulare* (*M. avium-intracellulare* complex), *M. scrofulaceum* and *M. fortuitum* by performing five or six tests out of the above seven tests.

The test system herein described would contribute to the routine identification method of Mycobacteria in clinical laboratories.

結 言

近年、非定型抗酸菌分離例が次第に増加しており、抗酸菌の鑑別が重要になつてきている。抗酸菌の鑑別および同定を行なうには、抗酸菌の生物学的性状、生化学的性状、抗結核剤耐性等の総合的な検査を必要とするが、抗酸菌鑑別の検査法の報告は非常に多く^{11)~14)19)~25)}、検査を実施するものにとつて選択に迷うほどである。

抗酸菌鑑別法の比較検討はもちろん必要であるが、検査方法が簡便であり、検査結果の判定が容易で、信頼性と再現性が高く、更に実施時間の短いことが臨床検査には要求されよう。

著者は試験紙法および市販の検査試薬キットの導入等、7項目の検査による抗酸菌の鑑別法を検討し、日常検査に用いるものと考えられたので報告する。

* From the Kanto Chuo Hospital, 6-25-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158 Japan.

実験方法および成績

関東中央病院臨床検査科で分離した抗酸菌のうち、結核菌以外の抗酸菌67株を含むすでに菌種同定がなされている180株を1%小川培地に継代し、その4週培養を被検菌とし、次の7項目の検査を行なった。いずれも保存標準株、または保存株について確認された所見と比較して陽性、陰性のレベルを検し、それを判定の基準²⁾⁶⁾⁸⁾とした。

1) 集落の色調：小川培地上の抗酸菌の菌苔の色調を、人型結核菌4週間培養後の集落の色調を淡黄色として、濃黄色、橙黄色と判定されたものを橙色、また黄色調の認められない集落を灰白色と判定した。

抗酸菌の集落の色調として橙色、淡黄色および灰白色の3つの群に区別し、表1にみられるように、抗酸菌180株のうち、淡黄色を示したものが118株(65.6%)で最も多く、ついで灰白色の42株(23.3%)、最も少ないのは橙色の20株(11.1%)であった。抗酸菌180株を菌別に分けてみると、淡黄色は結核菌と *M. kansasii* であり、灰白色は *M. intracellulare* (以下 *M. avium-intracellulare* complex とする) および *M. fortuitum* にみられ、橙色は全株とも *M. scrofulaceum* であった。

2) 菌のS型、R型：抗酸菌を滅菌生理食塩水の中へ菌塊を入れてくずし、容易に混濁液が得られたものをS型とし、そうでないものをR型とした。成績は表に示すごとく、S型の性状を示したものは180株中67株(37.2%)、R型の性状を示したものは113株(62.8%)であった。抗酸菌別にみるとS型は *M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare* complex および *M. fortuitum* であり、R型は結核菌のみであった。

3) 光発色性：小川培地4週間培養の菌苔を、窓近く

の自然光に15分間さらしたのち、37°Cに培養し翌日ないし翌々日菌苔を観察した。色調の橙黄色の増強を示した株を陽性とし、変化しないものを陰性とした。抗酸菌180株中陽性は5株(2.8%)であり、175株は陰性であった。菌別では光発色性陽性を示したものは全株とも *M. kansasii* であった。結核菌, *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare* complex および *M. fortuitum* は陰性を示した。

4) ナイアシン産生能¹⁾²⁾：小川培地上の菌苔に高温滅菌蒸留水を約1.5ml注ぎ、培地表面をおおうように試験管を傾斜させ、15分間放置してナイアシンの溶出をはかつた。次いでその抽出液約0.5mlを別の小試験管に移し、ナイアシン試験紙を入れて15分後に、試験管底部の液の色調が黄色に変色したものを陽性、透明のままを陰性とした。また“北研”ナイアシン試験紙法³⁾では濾紙上部が赤色帯を示したものを陽性とした。

成績は表1に示した。抗酸菌180株中ナイアシン陽性は113株(62.8%)で、陰性は67株(37.2%)であった。抗酸菌別にみるとナイアシン陽性は全株とも結核菌であり、*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare* complex および *M. fortuitum* はいずれもナイアシン陰性を示した。

5) 硝酸塩還元能⁴⁾：小試験管のM/100 NaNO₃溶液2mlに抗酸菌を1白金耳量入れ、振盪後37°Cの温浴に2時間保ち、それに試験紙BMテストN⁵⁾⁶⁾を投入し、30秒後に下部の濾紙の着色の有無によつて陽性、陰性を判定した。紅紫色から桃色のものを陽性とし、着色の認められないものを陰性とした。

成績は抗酸菌180株中陽性は125株(69.5%)であり、陰性は55株(30.5%)であった。これを抗酸菌別にみると硝酸塩還元能陽性のものは結核菌, *M. kansasii*

Table 1. Results of the Tests on Various Strains of Mycobacteria Isolated from Clinical Specimens

Species	Colour tone (colony)			Rough or Smooth (colony)		Photochromogenicity		Niacin		Nitrate reduction		Heat-stable phosphatase		Tween hydrolysis	
	L	O	W	R	S	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
<i>M. tuberculosis</i>	113			113		113		113		113		113		113	
<i>M. kansasii</i>	5			5		5		5		5		5		5	
<i>M. scrofulaceum</i>		20		20		20		20		20		20		20	
<i>M. intracellulare</i> (<i>M. avium-intracellulare</i> complex)		35		35		35		35		35		35		35	
<i>M. fortuitum</i>		7		7		7		7		7		7		7	
Total	118	20	42	113	67	5	175	113	67	125	55	12	168	5	175

L: Light yellow O: Orange, evident yellow W: White, gray

Table 2. Key Features for Differentiation of Mycobacteria

Species	Test	Colour tone (colony)	Rough or Smooth (colony)	Photochromogenicity	Niacin	Nitrate reduction	Heat-stable phosphatase	Tween hydrolysis
<i>M. tuberculosis</i>		L	R	-	+	+	-	-
<i>M. kansasii</i>		L, O*	S	+	-	+	+	+
<i>M. scrofulaceum</i>		O	S	-	-	-	-	-
<i>M. intracellulare</i> (<i>M. avium-intracellulare</i> complex)		L	S	-	-	-	-	-
<i>M. fortuitum</i>		L	S	-	-	+	+	-

L: Light yellow O: Orange, evident yellow

* Photochromogenicity was confirmed.

および *M. fortuitum* で、陰性を示したものは *M. scrofulaceum* および *M. avium-intracellulare* complex であつた。

6) 耐熱性ホスファターゼ⁷⁾: 小試験管内の生理食塩水 0.5 ml に抗酸菌を1白金耳量入れ、70°C の温浴で30分間加熱したのち、Kind-King 法⁹⁾によるホスファターゼ基質液 2 ml を加え、37°C の温浴で60分間保ち、発色液を 2 ml 追加した。赤褐色から赤色のものを陽性、黄色のままに止まるものを陰性とした。

成績は180株中耐熱性ホスファターゼ陽性のものは12株(6.7%)、陰性を示したものは168株(93.3%)であつた。抗酸菌別に分けると、陽性は *M. kansasii* および *M. fortuitum* であり、陰性のものは結核菌、*M. scrofulaceum* および *M. avium-intracellulare* complex であつた。

7) Tween 80 水解能⁹⁾: M/15 pH 7.0 の磷酸緩衝液 100 ml に Tween 80 の 0.5 ml および 0.1% 中性紅水溶液 2 ml を混合し、試験管に 4 ml ずつ分注、高圧滅菌した。この基質液に抗酸菌1白金耳量入れ、37°C におき、5日後に観察、色調がコハク色から赤～淡紅色に変化したものを陽性、コハク色のままを陰性とした。

成績は抗酸菌180株のうち、Tween 80 水解能陽性のものは5株(2.8%)であり、陰性は175株(97.2%)であつた。抗酸菌別にみると *M. kansasii* のみが Tween 80 水解能陽性を示し、結核菌、*M. scrofulaceum*、*M. avium-intracellulare* complex および *M. fortuitum* は陰性であつた。以上、7項目の性状検査と抗酸菌種名をまとめると表2のごとくである。

考 察

近年、結核菌と同様な病変を起こす非定型抗酸菌が注目され、Runyon¹⁰⁾ は光発色性、集落の色調および発育

速度によつてこれを4群に分類した。以来、抗酸菌鑑別の検査法、あるいは抗酸菌種名の報告はおびただしいものがあり、病院検査科において結核菌、あるいは非定型抗酸菌を鑑別する機会は今後増加するものと思われ、これら抗酸菌を鑑別することの重要性は増すであろう。

臨床検査科はこれらの菌種が分離され、最初に鑑別を行なう責任を負う機関である。したがつて臨床細菌検査室で行なわれる検査法は理論的に基礎細菌学的批判に耐え、しかも再現性高く、技術的個人差の少ないものであることが必要である。また特定の菌種を、他の多くの菌種から短時日中に一定の精度で、鑑別できる方法であることがのぞましい。限られた時間内にこれらの要求をみたす実験を行なうことができるのは、臨床的な情報を利用しうることによる。病院検査室では、臨床的に病巣を形成している、ないしは病原性を示している菌の可能性が高い菌株について検討することが多い。

抗酸菌においては、3度以上くり返して分離されたもの、または1度に多数の集落をえたものに限定し、病原性のある既知の菌種と同定しうるかどうかを検討し、その後、同定しえない菌株は専門家の判断にゆだねるべきであろう。今回の検討はこの時間と精度の制約の中で、病院検査室での検査の可能性と限界について考察しようとしたものである。

抗酸菌鑑別の諸報告のうち、主なものをいくつかあげてみると、結核菌検査指針¹¹⁾ では13の検査法を用いて、11の抗酸菌種を同定しており、また米国の NTRDA¹²⁾ は27項目によつて10菌種の抗酸菌を、Kubica¹³⁾ らは19項目の検査法によつて、20菌種の抗酸菌を鑑別し、抗酸菌分類委員会¹⁴⁾ では19の検査項目を用いて、17菌種の抗酸菌をそれぞれ掲げて抗酸菌鑑別法を述べている。臨床細菌検査室において、これらに掲げられている検査法を日常実施することはやや困難であり、検査項目およ

び検査法を必要最小限とするよう意図した。

わが国において検出される病原性抗酸菌種として山本¹⁵⁾は結核菌, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, *M. avium-intracellulare* complex, *M. chelonae* および *M. fortuitum* の7菌種であると述べている。なお *M. bovis*, *M. avium*, *M. xenopi* および *M. ulcerans* はここ10年来報告をみないか、あるいは菌を分離したことがないとしている。

そこで、上記の7菌種の鑑別、あるいは同定を目的として検査項目を検討し、また検査を実施するにあたり、1) 検査法が簡便であり、2) 検査成績の判定が容易で、3) 信頼性、再現性が高く、4) 操作時間の短縮が図れることも考慮した。

検討の結果、ここで行なつた 1) 集落の色調、2) 菌のS型、R型、3) 光発色性、4) ナイアシン産生能、5) 硝酸塩還元能、6) 耐熱性ホスファターゼ、7) Tween 80 水解能の7項目が必要かつ十分なものと考えられた。集落の色調は抗酸菌分離時に多くの場合判定可能であり、*M. scrofulaceum* 等は容易に取り上げることができる。また菌のS型、R型を併せて行なえば抗酸菌を結核菌とそれ以外の菌とに区別する1つのかぎとなりうる。更に光発色性試験を実施すれば *M. kansasii* および *M. marinum* を他の菌種から区別が可能である。

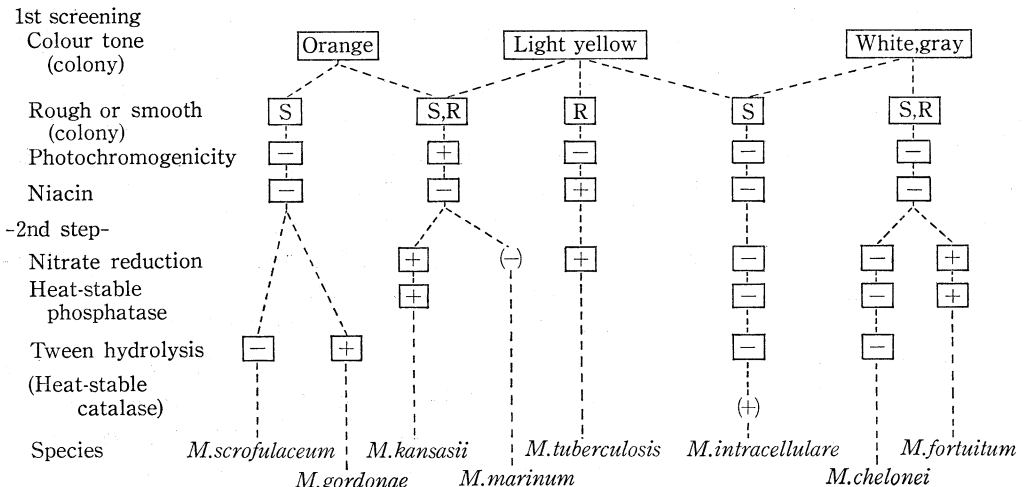
生化学的検査の多くは各抗酸菌種の特徴を示す項目で、ナイアシン試験は結核菌のみが陽性を示し、他の臨床材料由来の抗酸菌は陰性であり、また硝酸塩還元試験では結核菌、*M. kansasii* および *M. fortuitum* が陽性であるところから、結核菌と *M. bovis*, *M. fortuitum* と *M. avium-intracellulare* complex の鑑別が可能である。耐熱性ホスファターゼ試験は *M. kansasii* および *M. fortuitum* が陽性を示すので、結核菌と *M. kansasii* あ

るいは *M. avium-intracellulare* complex と *M. fortuitum* との鑑別に用いることができる。Tween 80 水解能試験は光発色株である *M. kansasii* および *M. marinum* を除いて、病原菌は陰性を示すので、*M. scrofulaceum* と *M. gordonae* との区別、あるいは非発色株の病原菌と非病原菌との鑑別にも応用しうる。ナイアシン産生能、硝酸塩還元能、耐熱性ホスファターゼおよび Tween 80 水解能のいずれの検査においても、各種抗酸菌の陽性、陰性の反応は再現性の高い成績を示した。なお当検査科で約10年間に結核菌423株を検出し、3株のナイアシン陰性株¹⁶⁾を発見した。それらの株はいずれもR型を示し、unknown株としたが、硝酸塩還元、コード形成試験¹⁷⁾とも陽性、また光発色性、Tween 80 水解能試験陰性の成績を得たので結核菌と判断し、予研結核部に同定を依頼した結果、ナイアシン陰性の人型結核菌と同定された。

検査方法の簡易化を図つたものとしては、ナイアシン試験、硝酸塩還元試験および耐熱性ホスファターゼ試験の3項目があげられる。検査法はナイアシン試験および硝酸塩還元試験では試薬の作製を省き、単に試験紙を投入するだけでよく、また耐熱性ホスファターゼの場合も検査試薬を作成する必要がなく、市販試薬キットを利用しうる。いずれの検査もそのつど試薬作製の煩雑さを省き、また長期保存にも耐えるので、検査法の簡易化が可能であつた。

この7項目の検査法による鑑別を行なつた検査成績は表1にみられるように、どの検査項目とも菌種鑑別に利用度が高いことを示した。また判定についても、菌集落の色調、光発色性、ナイアシン産生能、硝酸塩還元能、耐熱性ホスファターゼおよび Tween 80 水解能とも色調の変化でよむため判定しやすく、また菌のS型、R型

Table 3. Procedures for Differentiation of Mycobacteria



* *M. intracellulare* (*M. avium-intracellulare* complex)

についても混濁の有無をみるので、成績の誤の生じる可能性は少ないと考えられる。

更に時間の短縮の点では7項目の検査のうち、Tween 80 水解能の5日間、光発色性の翌日判定を除いては、いずれも1~2時間で検査が完了するので、菌種によってはその日のうちに判定ができるものも少なくない。

表3にみられるごとく7項目の検査を1次 screening および2次検査に分け、1次 screening では1) 集落の色調、2) 菌のS型、R型、3) 光発色性、4) ナイアソンの4項目を全菌株に実施し、2次検査項目は全菌株には行わず、硝酸塩還元能、耐熱性ホスファターゼおよび Tween 80 水解能の各項目を1次 screening の性状の確認、あるいは細分化のために行なうことができる。検査は7項目であるが、1次と2次に分けることにより、各抗酸菌について実施するのはおおよそ5~6項目である。なお、*M. avium-intracellulare* complex については集落の色調および菌のS型、R型を除いた検査法で陰性の性状を示すので、全項目を列記した。陽性の性状でもつて *M. avium-intracellulare* complex を確認するために、耐熱性カタラーゼ試験¹⁸⁾を表3に()で示した。またこの検査を用いることで、耐熱性カタラーゼ陽性の性状を示す *M. avium-intracellulare* complex と陰性の性状を示す結核菌との鑑別も可能である。

これらの検査によつて *M. chelonae* は硝酸塩還元試験および耐熱性ホスファターゼ試験陰性の点で *M. fortuitum* と鑑別される。*M. terrae-M. nonchromogenicum* complex は *M. avium-intracellulare* complex と類似するが、*M. terrae-M. nonchromogenicum* complex が Tween 80 水解試験陽性である点で鑑別される。また *M. terrae-M. nonchromogenicum* complex と *M. kansasii* の鑑別は *M. kansasii* が、光発色性試験陽性であることにより鑑別される。

5~6項目の検査の結果、同定の条件を満足するものに限りに、各抗酸菌種名をあてるべきである。これら検査成績の判定は厳しくとり、どの項目であつても疑わしい成績が認められたならば、不明の菌として更に検索をすすめるか、あるいは専門機関に依頼すべきである。以上7項目の検査法を実施することによつて、病院の日常検査における抗酸菌の鑑別は、十分可能であると考ええる。

結 論

臨床細菌検査室において抗酸菌を鑑別、同定することを考慮し、次の7項目の検査法を選んだ。1) 集落の色調、2) 菌のS型、R型、3) 光発色性、4) ナイアソニン産生能、5) 硝酸塩還元能、6) 耐熱性ホスファターゼ、7) Tween 80 水解能である。

そのうちのナイアソニンおよび硝酸塩還元は試験紙法を用い、また耐熱性ホスファターゼは市販の血液化学用測

定キットを応用することで、検査方法の能率化を図つた。成績の判読では菌のS型、R型以外の各項目は色調の差異、あるいは変化を比較するので判定の誤りは生じにくかつた。

時間の短縮の点は Tween 80 水解能および光発色性を除いては、1~2時間で判定できるので菌種の鑑別は即日終了できることも少なくなかつた。

7項目の検査法を1次 screening 4項目と2次検査3項目に分けることにより、全菌株に7項目を実施しなくても、5~6項目を行なうことで定型的な結核菌、*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare* (*M. avium-intracellulare* complex) および *M. fortuitum* を他の菌種から鑑別しえた。

これら7項目の検査を実施することにより、抗酸菌鑑別の日常化は可能となるものと考ええる。ここで鑑別しないものは、専門機関に同定を依頼すべきであろう。

稿を終わるにあたり、本研究についてご指導、ご校閲を賜つた結核研究所高橋昭三先生に心から感謝いたします。また有隣病院江波戸欽弥、島根医科大学斎藤肇、東方学会菊地雄二、当院野坂謙二の諸先生方のご援助、二階堂和彦、野崎俊行両氏のご協力にお礼を申し上げます。

文 献

- 1) Konno, K.: Science, 124 : 985, 1956.
- 2) 正井秀雄・藤野湜: 結核, 49 : 283, 1974.
- 3) 田村奈保美・佐野敬元・小川辰次・斎藤嘉鶴: 結核, 48 : 447, 1973.
- 4) Virtanen, S.: Acta Tuberc. Scand. Suppl., 48 : 1960.
- 5) Schaus, R.: J. A. M. A., 161 : 528, 1956.
- 6) 正井秀雄: 結核, 50 : 241, 1975.
- 7) Saito, H., Hosokawa, H. and Tasaka, H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 97 : 474, 1968.
- 8) Saito, H., Yamaoka, K., Kiyotani, K. and Masai, H.: Amer. Rev. Resp. Dis., 114 : 407, 1976.
- 9) Wayne, L.G., Doubek, J.R. and Russell, R.L.: Amer. Rev. Resp. Dis., 90 : 588, 1964.
- 10) Runyon, E.H.: Med. Clin. N. Amer., 43 : 237, 1959.
- 11) 結核菌検査指針: 日本公衆衛生協会, 1972.
- 12) 工藤祐是: 感染症 3 : 139, 1973.
- 13) Kubica, G. P., Gross, W. M., Hawkins, J. E., Sommers, H. M., Vestal, A. L. and Wayne, L.G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 112 : 773, 1975.
- 14) 抗酸菌分類委員会: 結核文献の抄録速報 23 : 225, 1972.
- 15) 山本正彦: 日本胸部臨床, 31 : 861, 1972.
- 16) 江波戸欽弥・伊藤不二雄・正井秀雄, 7 : 113, 1967.
- 17) Middlebrook, G., Dubos, R. J. and Pierce, G.: J. Exptl. Med., 86 : 175, 1947.
- 18) Kubica, G.P. and Pool, G.L.: Amer. Rev. Resp. Dis., 81 : 387, 1960.
- 19) Kubica, G. P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 107 : 9, 1973.

- 20) Technical Committee Meetings: Bull. Int. Un. Tuberc., 39 : 15, 1967.
- 21) Runyon, E. H.: Tubercle, 55 : 235, 1974.
- 22) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 結核, 48 : 203, 1973.
- 23) 東村道雄: 日胸, 36 : 278, 1977.
- 24) 微生物検査—臨床検査技術全書7, 医学書院, p. 179, 1974.
- 25) W. Robert Bailey · Elvyn G. Scott: Diagnostic Microbiology: Mosby, 193, 1970.