

原 著

## 抗酸菌の臨床細菌学的同定に関する一考察

内藤 祐子・久世 文幸・前川 暢夫

京都大学結核胸部疾患研究所内科学第1

受付 昭和54年5月2日

A STUDY ON THE IDENTIFICATION OF CLINICALLY  
SIGNIFICANT MYCOBACTERIA

Yuko NAITO\*, Fumiyuki KUZE and Nobuo MAEKAWA

(Received for publication May 2, 1979)

In view of an increasing demand for simple methods of identification of various mycobacteria for clinical use, our seven years' experiences were summarized and the results were evaluated to find out a better method.

A total of 263 strains of mycobacteria, which were either isolated in our Institute or referred to our laboratory from several other institutes, have been submitted to differential identification. The key differential features which we have adopted were (1) acid-fastness, (2) cell forms on smear, (3) speed of growth, (4) characteristics of colony (rough or smooth), (5) pigmentation at dark, (6) photoreactive pigmentation, (7) growth on Sabouraud's agar and nutrient agar, (8) PAS degradation, (9) Tween 80 hydrolysis (5 days), (10) nitrate reduction, (11) semiquantitative catalase, (12) arylsulfatase, (13) amidases (urease and pyrazinamidase) and (14) niacin. The mycobacterial strains could be differentiated into six species and four groups, namely, *Mycobacterium tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, other scotochromogens, *M. intracellulare-avium* complex, other nonphotochromogens, *M. fortuitum*, *M. chelonae* and other rapid growers. Further differentiation into species among each group was assessed to be not accurate enough due to our relatively simple identification system, however the system seemed to be valid as far as our present clinical situation concerns.

The validity of our identification system was again evaluated in this study using forty seven documented strains, nearly all of which were kindly provided by the U.S.-Japan Cooperative Medical Science Program-NIAID in 1975 (Trudeau Mycobacterial Culture Collection=TMC strains). Eleven key differential features were adopted in this reevaluation, and the seventh, twelfth and thirteenth keys were excluded because of either relative complexity of the technique or paucity of differential features in view of our present clinical situations.

Our second simplified system revealed to be still valid for the differentiating various mycobacteria into six species and four groups.

Shortcomings of our differentiation system seem to be in case of identification of *M. xenopi* and *M. szulgai* which will be probably differentiated into "other scotochromogens" and also in case of niacin negative *M. tuberculosis* as well as *M. africanum*, though the former two species are almost negligible in their frequency in our clinical isolates.

\* The First Department of Medicine, Chest Disease Research Institute, Kyoto University, Sakyo-ku, Kyoto 606 Japan.





Dubos Tween Albumin 培養菌液 0.2 ml 滴下し、培地上面に菌の発育を認めるとき、カタラーゼ試薬 (30%過酸化水素水と 10% Tween 80 水溶液の等量混合物) 1.0 ml を重層し 5 分後に生ずる泡柱の高さを mm で示した。

(xii) アリールスルファターゼ試験

「結核菌の臨床細菌学」(結核予防会)記載<sup>9)</sup>の方法によつた。ただし判定は 3 日後、2 週後に行なつた。

(xiii) アミダーゼ試験

Wayne<sup>9)</sup>の方法による簡易法で urease と pyrazinamidase を実施した。前者は 3 日、後者は 7 日判定である。

(xiv) ナイアシン試験

アニン法を主として使用し、ナイアシンテストペーパー「北研」を一部併用した。

## II. 実験成績

### 1) 臨床分離株の成績

喀痰分離株 189 株 (1970年4月より1975年4月までの分離) の同定成績を表 1 に示した。同定項目に記載した諸検査の結果により、*Mycobacterium tuberculosis*, *M. scrofulaceum*, other Scotochromogens, *M. intracellulare-avium* complex, other Nonphotochromogens, *M. fortuitum*, *M. chelonae* の各菌種ならびに菌種群に推定分類を行なつた。*M. kansasii* と *M. marinum* ならびに other rapid grower の分別も設けたが、上記 189 株中にはこれに該当するものはなかつた。表中下段の計 54 株は既同定株 (TMC 株) で、数種の生化学的検査における対照のため同様操作を実施したものである。表 2 は、それ以降 1977 年 12 月までの成績を追加したものである。*M. kansasii* と *M. marinum* 各 1 株ずつが分離されており、いずれも疾患に関連

があつた。同一施設もしくは同一地域からの分離ではないが、症例の頻度からは *M. intracellulare(-avium complex)* 症がほとんどを占めている。他に single isolate であるが *Nocardia* と思われる菌株が 3 株あり、他に極めて dysgonic で継代、増菌できなかつた 1 株があつた。

以下、各同定検査項目ごとの成績と問題点を述べる。

#### (i) 抗酸性染色

分離菌が *Mycobacterium* に含まれるか否かの必須検査であるが、他に *Nocardia* などの部分抗酸性をもつ菌種の発見の端緒になること、スライドガラス上への塗抹操作によつて肉眼的な集落の性状の判定 (R 型, S 型, R-S 型) を補うる、という 2 点が利用できると考えられる。

*M. tuberculosis* をはじめとして R 型の菌はスライド上への塗抹を薄く平等に行なうことが困難なのに反して、S 型の菌はコロニー自体が極めて柔らかく潤滑しておりスライド上への平等な薄層塗抹が極めて容易である。継代培地発育菌を使用した抗酸性の再確認では対比染色は多く省略したが、最初の分離培地上の発育菌の確認では雑菌の混入の確認にも有利であると考えられた。

#### (ii) 塗抹菌の形態学的観察 (cell form)

表 1 に含まれる菌株では、極めて短小な球菌状 (cocci) を呈するもの (図 1) とそれ以外のもの (適当な語がなく bacillary と記載) とを分けた。この分類は検者の主観にかなり左右されるが、図 1 に示したとき典型的なものは *M. intracellulare-avium* complex と群別推定した菌株に多くみられ約 75% を占めているが、臨床材料より分離直後の塗抹ではやや多い印象があつた。

表 2 には *M. kansasii* が 1 株含まれているが、この株は分離判定時集落の一部が鮮黄色 (lemon yellow) に着色していたことと、図 2 に示すごとく長く太く、明瞭な

Table 2. *Mycobacteria* Isolated from Sputum (April, 1970~Dec., 1977)

Mycobacterial species & group		No. of strains	Disease-associated strains
<i>(M. tuberculosis)</i>		(39)	(39)
Photochromogenic mycobacteria	<i>M. kansasii</i>	1	1
	<i>M. marinum</i>	1	1
Scotochromogenic mycobacteria	<i>M. scrofulaceum</i>	19	0
	Other scotochromogens	13	0
Nonphotochromogenic mycobacteria	<i>M. intracellulare-avium</i> complex	160	27
	Other nonphotochromogens	12	0
Rapid growers	<i>M. fortuitum</i>	10	0
	<i>M. chelonae</i>	4	0
	Other rapid growers	0	0
( <i>Nocardia</i> )		(3)	(3)
Not identified		1	0

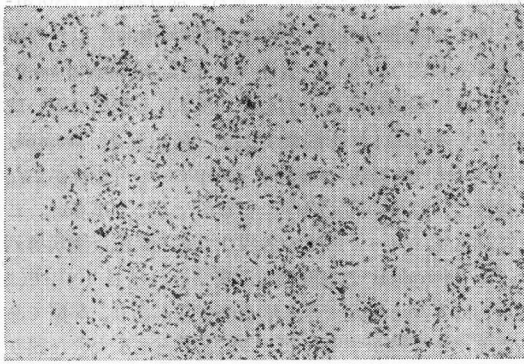


Fig. 1. Morphology on smear of *M. intracellulare* (TMC 1469) (Ziehl-Neelsen's stain, 10×100).

顆粒が観察され、粗な束状排列を示す特徴的な塗抹所見により *M. kansasii* の疑いがまずもたれたものである。保存株の観察でも *M. kansasii* 多数株にこの所見がみられた。

#### (iii) 発育日数

発育日数の判定にあたっては2段階の確認を採用した。1週以内でかなり旺盛な発育を示すものを迅速発育菌の可能性が極めて大きいと判断し、更に再検の上3日以内の旺盛な発育を示したとき初めて迅速発育菌と推定した。手技としては、継代にあたって軽く白金耳を被検菌に当て、菌塊をできるだけ継代培地上に持ち込まないように努力した。R型の菌株では、この手技で時に接種が培地面に不平等になることがあり、まれに判定に困難があつた。確認のため、あらかじめガラス玉コルペンで菌液 (ca. 0.1 mg/ml) を作成し、その1白金耳を接種する方法も試みたが、実際には前者で3日以内の判定を厳密にすればさほど問題は無いと考えられた。1週程度で発育の旺盛な菌株は *M. intracellulare-avium* complex をはじめ多数あり、other nonphotochromogen と判定した菌株の多くが1週以内で発育が旺盛であつたのが注目される。

#### (iv) 集落の性状

前述したごとく、塗抹操作における難易さも参考にしたが、継代培地発育菌の肉眼的観察を主眼とした。表1の189株中 *M. tuberculosis* と判定したものが34株に及んだが、これらの大部分は近傍施設より集落の性状のみでS型であろうとして送付されたものであつた。R型、S型の判定には主観的なものが多く混入したことが考えられる。これらは分離培地で直接判定されたものが多く、継代培地上での観察 (自家製ガラスキャップ付1%小川培地) ではかなり容易にR型と判定された。しかし肉眼的には、ことに dysgonic の傾向がある菌株で R-S 型と判定せざるをえないものも少数例存在した。

実体顕微鏡の使用も試みたが、簡易同定には肉眼的判断で充分であつた。

#### (v) 集落の着色

表1では無色、淡黄色、黄色、橙色、レンガ色の項目

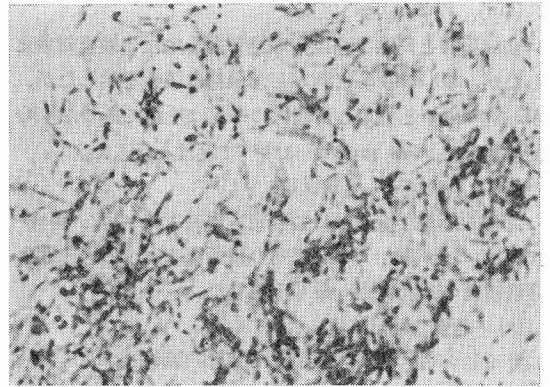


Fig. 2. Morphology on smear of *M. kansasii* isolated at the author's institute (Ziehl-Neelsen's stain, 10×100).

に分類した。無色と淡黄色の区別にはかなり主観が入り、この区別は実際的には無用であると考えられた。*M. intracellulare-avium* complex をはじめ *M. tuberculosis* においてもごく淡い黄色を示すものは観察される。表1において黄色、橙色、レンガ色のものを有色とするのが妥当であると考えられた。なお表中 *M. intracellulare-avium* complex と分類した菌株の中で、菌株の送付時かなり長期間室内に放置した菌株で、数株が黄色に着色しているのが観察された。継代して同定操作中にはかかる着色は明確ではなく、光発色も通常の手技では陰性で、ナイアシンテストも陰性を示し、上記菌種群に属するものと判断した。

#### (vi) 光発色性試験

表1に含まれる菌株は本試験はすべて陰性であつたが、研究室保存株の検討より、本試験は培養2週以前のもので実施することが望ましいこと、4週以後の陳旧化した集落では半数以上のものが陰性を示した。集落の散在するものが望ましいと思われるが、陳旧培養菌を厳密に避けければ、旺盛な発育菌による判定もそれほど困難ではない。最近、*M. kansasii* 2株を分離培地より同定する機会を得たが、1菌株では判定操作中に当初無色の集落が、発育の観察回数を重ねるとともに明らかに鮮黄色に発色してくるのを検者が気付いており、他の1株では菌株の運搬途中で集落の着色が明瞭になり、直ちに前述の塗抹による菌形態の観察 (図2参照) が *M. kansasii* 発見の端緒となつた。暗発色性菌とはやや異なつた鮮やかなレモン黄色に注目することも参考にならう。

#### (vii) サブロー培地、普通寒天培地上の発育

発育日数1週以内の全菌株と他の一部のものについて、上記2培地上での発育の有無について検討したが、3日以内に1%小川培地上で発育を認めた迅速発育菌のすべてに、両培地上で1週以内に旺盛な発育が認められた。ただし、slow grower の中でも少数株ではかなりの発育を認めている。

## (viii) PAS 培地の黒変

前記項目と同様1週以内の発育菌を主たる検査対象としたが、*M. chelonae* と判定した菌株は陽性を示したが、*M. fortuitum* と判定した菌株の一部は陰性であった。今回検討した slow grower はすべて陰性を示した。

## (ix) Tween 80 水解試験

比較的簡易な検査項目で判定も容易であった。Runyon の II 群菌と III 群菌内の諸菌種における病原菌と非病原菌の分別判定に最も重視した。

## (x) 硝酸塩還元試験

ナイアシン試験陽性の菌株はすべて陽性を示し、*M. intracellulare-avium complex* ならびに *M. scrofulaceum* と判定したものはすべて陰性で、迅速発育菌は陽性と陰性の菌株に分かれた。本試験の問題点は、弱い発色の場合の判定である。薄く桃色がかつたものは陰性と判定した。

## (xi) カタラーゼ試験 (半定量法)

*M. tuberculosis* の全菌株と *M. intracellulare-avium complex* の大部分の株が 45 mm 以下であったが、他の菌株は 45 mm 以上のものも多かつた。本検査は液体培地使用の必要があり、操作はかなり複雑であるが判定自体は極めて容易である。

## (xii) アリルスルファターゼ試験

本反応と次項のアミダーゼ反応は一部の菌株について実施した。3日反応では、*M. fortuitum* と *M. chelonae* と判定した菌株のすべてが陽性を示した。slow grower はほとんどのものが陰性であったが、other nonphotochromogens の中に一部陽性のものが認められた。

## (xiii) アミダーゼ反応 (Urease, Pyrazinamidase)

一部の菌株に実施したが、*M. tuberculosis* では両反応とも陽性の傾向があり、*M. intracellulare-avium complex* では Urease は陰性、Pyrazinamidase は陽性の傾向があった。other nonphotochromogens においても実施菌株数は少ないがその傾向にあった。

## (xiv) ナイアシン試験

アニン法を主体として判定した。ナイアシンテストペーパー「北研」も一部併用したが、従来のベンチジン法、アニン法の方が判定しやすい印象を受けた。

## 2) 臨床分離株同定についての私どもの鑑別主眼点

今回の臨床分離株同定にあつての私どもの考え方の概要は図3に示した。私どもは実地臨床上の特殊性を考え、できるだけ速やかに主治医へ報告できる可能性を考慮して、同定鑑別操作を概念的に2段階に分けて考えた。最初に私どもが受け取る材料は、多くは臨床材料より3%小川培地に分離された発育菌である。私どもが今回採用した同定項目の (i) 抗酸性染色、(ii) 塗抹菌の形態学的観察、(iv) 集落の性状、(v) 集落の着色の観察は、ほとんどの分離菌において直ちに実施しうるものであつて、これらの検査は第1段階と考えている。項目 (i) では

*Mycobacterium* の確認が可能である。部分抗酸性 (*Nocardia* 等)、非抗酸性を示す菌は、*Mycobacterium* 以外の菌種を考えねばならない。項目 (ii) では *Mycobacterium* の中で、太い長桿状菌を示すもの (図2) と極めて短い球菌状のもの (図1) を観察すれば、前者は *M. kansasii*、後者は *M. intracellulare-avium complex* の可能性がかなり濃厚で、以後の同定操作に参考になることが多い。これに加えて、コード形成の名残りである緊密な束状排列は *M. tuberculosis* の可能性を示唆する。項目 (iv) では明らかに S 型と断定できる場合に意味があり、S 型であることがまず確かであれば AM と考えても大きな誤りはないと考えられる。項目 (v) で明らかかな着色があればこれも AM と判定できる。したがつて、第1段階の操作でかなりの AM を確認でき、「S 型であるか、明瞭な着色を認めるもの」は AM として主治医に preliminary report を送付することができる。

第2段階の操作は、できるだけ早期に数本の1%小川培地へ分離菌を継代することによって開始される。継代培地2本はできるだけ前述の要領で接種菌量を可及的に少なくし、1本は一部 (もしくは全体) を光より遮断し光発色性試験に備え、他の1本は発育日数の観察に用いる。3日以内に旺盛な発育を認めたものは迅速発育菌に属し、この中で明らかかな着色を認めるものを other nonpathogenic rapid growers として除外し、残りのものは硝酸塩還元試験を主眼として *M. fortuitum* と *M. chelonae* に大別し、光発色性試験、PAS 培地の黒変、Tween 80 水解試験、カタラーゼ半定量法も実施しておくとともに同時にナイアシン試験で確認する。旺盛な発育に3日以上要する菌株については、以後1週ごとに発育日数を確認し、発育がみられれば直ちに (v) 集落の着色 (暗所)、(vi) 光発色性試験を同時に実施する (これと平行して (xiv) ナイアシン試験も実施する)。これだけの操作で、光発色性菌と暗発色性菌、更に非光発色性菌の3種に大別できる。この段階で多くの *M. tuberculosis* がナイアシン試験を通過するので、ナイアシン陽性で R 型の菌株は *M. tuberculosis* として同定操作を実質上打ち切れる。

光発色性を示す菌株は、本邦では *M. kansasii* か *M. marinum* と考えられるので、(x) 硝酸塩還元試験、(ix) Tween 水解試験、できれば (xi) カタラーゼ半定量法を実施し、前2者が陽性、後者が >45 mm であれば *M. kansasii* と考え、硝酸塩還元試験が陰性であり、更にカタラーゼ試験が <45 mm であれば *M. marinum* と考えられるであろう。また、臨床の実際においては分離材料の由来が重要な決定点となる (皮膚病変由来のものは *M. marinum*)。

暗発色性を示す菌株は、*M. scrofulaceum* と other scotochromogens で、後者は *M. gordonae* がその大部分を占めると思われる。Tween 80 水解試験で陰性であれば前

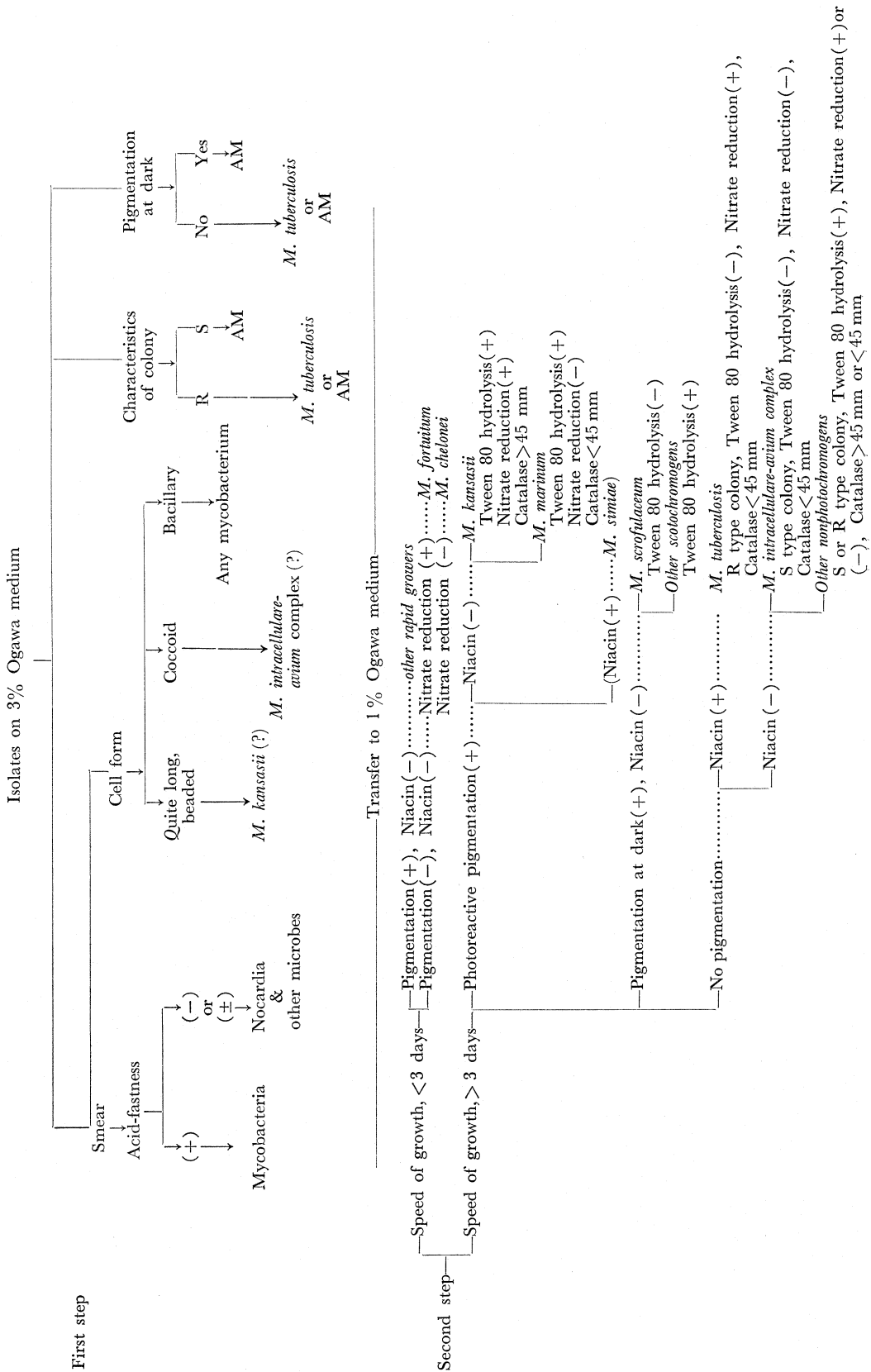


Fig. 3. Key features of simple identification of mycobacteria, AM: Atypical mycobacteria

Table 3. Characteristics of the Documented Species

No.	Acid-fastness	Cell form (C or L)	Characteristics of colony	Pigmentation at dark	Speed of growth	Photoreactive pigmentation	PAS degradation	Semiquantitative catalase	Tween 80 hydrolysis	Nitrate reduction	Niacin (anilin method)	Species & groups by simple method	Documented species (TMC & others)
8	+		R	-	2~3 w	-	-	<45 mm	-	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. tuberculosis</i>
11	+		R	-	1~2 w	-	-	(0)	-	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	TMC 125 (AoyamaB)
12	+		R	-	2~4 w	-	-	(2)	-	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	TMC 102 (H <sub>37</sub> Rv)
33	+		R	-	1~2 w	-	-	(5)	-	+	+	<i>M. tuberculosis</i>	TMC 124 (Kuroono)
	+		R	-	2~4 w	-	-	(3)	-	±	+	<i>M. tuberculosis</i>	TMC K5122 ( <i>M. africanum</i> )
1	+		RS	-	2~3 w	+	-	>45 mm	+	+	-	<i>M. kansasii</i>	<i>M. kansasii</i>
16	+	L <sup>+</sup>	RS	-	1~2 w	+	-	( >140)	+	+	-	<i>M. kansasii</i>	TMC 1204
18	+	L	RS	-	1~2 w	+	-	( 140)	+	±	-	<i>M. kansasii</i>	T3518
23	+	L	RS	-	1~2 w	+	-	( >140)	+	+	-	<i>M. kansasii</i>	T3316
25	+	L	RS	-	1~2 w	+	-	(90)	+	+	-	<i>M. kansasii</i>	(ATCC 12478) No. 3
	+		RS	-	1~2 w	+	-	(100)	+	+	-	<i>M. kansasii</i>	TMC 1203
	+		S	-	2~3 w	-	-	>45 mm	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	<i>M. scrofulaceum</i>
10	+		S	+	1~2 w	-	-	(35)	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	TMC 1315
19	+		S	+	1~2 w	-	-	(90)	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	(ATCC 19981) No. 10
20	+		S	+	1~2 w	-	-	(120)	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	TMC 1306
41	+		S	+	1~2 w	-	-	(115)	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	TMC 1306
45	+		S	+	1~2 w	-	-	(70)	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	TMC 1307
47	+		S	+	1~2 w	-	-	(125)	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	TMC 1302
50	+		S	+	1~2 w	-	-	(105)	-	-	-	<i>M. scrofulaceum</i>	(ATCC 19981) No. 10
Other scotochromogens													
2	+	L	RS	+	2~4 w	-	-	(5)	-	-	-		TMC 1470 <i>M. xenopi</i>
17	+		S	+	1~2 w	-	-	( >140)	+	-	-		TMC 1324 <i>M. gordonae</i>
27	+	C <sup>2+</sup>	S	+	1~2 w	-	-	(110)	+	+	-		TMC 1541 <i>M. flavescens</i>
	+		S(R)	-	<3 d	-	±	>45 mm	±	+	-		<i>M. fortuitum</i>
15	+	C	S	-	<3 d	-	-	(25)	-	+	-	<i>M. fortuitum</i>	TMC 1529
22	+		S	-	<3 d	-	-	(60)	-	+	-	<i>M. fortuitum</i>	(ATCC 6841) No. 49
37	+		S	-	<3 d	-	+	(105)	+	+	-	<i>M. fortuitum</i>	TMC 1547
	+		S(R)	-	<3 d	-	+	>45 mm	±	-	-		<i>M. chelonae</i>
13	+		S	-	<3 d	-	+	(130)	-	-	-	<i>M. chelonae</i>	TMC 1542
21	+		S	-	<3 d	-	+	(100)	-	-	-	<i>M. chelonae</i>	(ATCC 19977) No. 50
32	+	C	S	-	<3 d	-	+	(90)	-	-	-	<i>M. chelonae</i>	TMC 1543
Other rapid growers													
29	+		S	+	<3 d	-	-	(45)	+	+	-		TMC1523 <i>M. phlei</i>
	+		S	-	2~3 w	-	-	<45 mm	-	-	-		<i>M. intracellulare-avium</i> complex
3	+	C	S	-	2~4 w	-	-	(7)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1473
4	+	C	S	-	2~4 w	-	-	(2)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1469
5	+	C	S	-	1~2 w	-	-	(1)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1405
6	+		S	-	1~2 w	-	-	(2)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1419
14	+	C	S	-	2~4 w	-	-	(5)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 721 ( <i>M. avium</i> )
24	+	C	S	-	2~4 w	-	-	(0)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 716 ( <i>M. avium</i> )
26	+	C	S	-	1~2 w	-	-	(3)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1406



35	+	C	S	-	1~2 w	-	-	-	(5)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1411
36	+		S	-	1~2 w	-	-	-	(3)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1403
38	+	C	S	-	>4 w	-	-	-	(9)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1469
39	+	C	S	-	2~4 w	-	-	-	(12)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1406
40	+	C	S	-	2~4 w	-	-	-	(12)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1411
42	+		S	-	1~2 w	-	-	-	(12)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1419
43	+	C	S	-	2~4 w	-	-	-	(5)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 716 ( <i>M. avium</i> )
44	+	C	S	-	2~4 w	-	-	-	(25)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1406
46	+	C	S	-	1~2 w	-	-	-	(10)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1406
48	+	C	S	-	2~4 w	-	-	-	(20)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1469
49	+	C	S	-	2~4 w	-	-	-	(5)	-	-	-	<i>M. intracellulare</i>	TMC 1467
	+													Other nonphotochromogens
30	+		R	-	1~2 w	-	-	-	(35)	+	-	-		TMC 1453 ( <i>M. triviale</i> )
31	+		S	-	1~2 w	-	-	-	(45)	-	+	-		TMC 1450 ( <i>M. terrae</i> )
34	+		S	-	2~4 w	-	-	-	(5)	+	-	-		TMC 1456 ( <i>M. gastri</i> )

+, L: quite long, banded and beaded  
#, C: very short (coccioid)

者を、陽性であれば後者 (other scotochromogens) に分別できる。

非光発色性菌も同様にして、硝酸塩還元試験, Tween 80 水解試験が両者とも陰性, カタラーゼ試験 <45 mm で S 型であればまず *M. intracellulare-avium* complex と考えられ、Tween 水解試験, 硝酸塩還元試験のいずれかまたは両者が陽性、もしくはカタラーゼ試験も >45 mm のときは集落の R 型も参考にして、other nonphotochromogens として鑑別できると考えられる。

以上が臨床分離菌の簡易同定操作における私どもの基準の概要であり、主として試案<sup>1)</sup>と Kubica<sup>6)</sup>の報告を参照したものである。

### 3) 既同定株の成績

以上の臨床分離株を用いた私どもの簡易同定の有用性と限界を確認するための一手段として既同定の AM 株計47株を用いて、アリルスルファターゼ試験, アミダーゼ試験等を除いた (i) 抗酸性染色, (ii) 塗抹菌の形態学的観察, (iii) 集落の性状, (iv) 集落の着色, (v) 発育日数, (vi) 光発色性試験, (vii) PAS 培地の黒変, (viii) カタラーゼ試験 (半定量法), (ix) Tween 80 水解試験 (5 日法), (x) 硝酸塩還元試験, (xi) ナイアシン試験 (アニン法) の計11検査項目による簡易同定を試みた。

成績は表3に示した。表3に示すごとく、*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. intracellulare-avium* complex, *M. fortuitum*, *M. chelonae* においてはまず鑑別可能であつたが、(1) *M. tuberculosis*-complex に含まれる *M. africanum* が菌種確定できなかつたこと、(2) *M. xenopi*, *M. gordonae*, *M. flavescens* が other scotochromogens として一括されたこと、(3) *M. phlei* が other rapid growers として菌種の確定がされないこと、(4) *M. triviale*, *M. terrae*-nonchromogenicum complex, *M. gastri* が一括して other nonphotochromogens とされたことが問題点であ

つた。

## III. 考 案

以上、臨床医の立場で、諸家の報告を参照しつつ数年間に私どもが実施した抗酸菌の臨床細菌学的な簡易同定の結果を総括した。

(i) 抗酸性染色, (ii) 塗抹菌の形態学的観察, (iii) 集落の性状, (iv) 集落の着色, (v) 発育日数, (vi) 光発色性試験, (vii) PAS 培地の黒変, (viii) カタラーゼ試験 (半定量法), (ix) Tween 80 水解試験, (x) 硝酸塩還元試験, (xi) ナイアシン試験の計11項目の検査に加え、分離材料の出所を知れば、抗酸菌を *M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, other scotochromogens, *M. intracellulare-avium* complex, other nonphotochromogens, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, other rapid growers の10種の菌種または菌種群にあまり誤りなく大別することが可能であると思われた。

一般に臨床で用いる同定、鑑別方式は、簡便で検査項目もできるだけ少ないのが望ましいが、重要な菌種の確定は是非とも必要で、検査項目もある程度多くなるのもやむをえないと考えられる。試案<sup>1)</sup>では、必須検査項目として (1) 25°C, 30~35°C, 37°C, 45°C での発育, (2) 発育速度, (3) 集落の着色, (4) 光発色性試験, (5) ナイアシン試験, (6) 硝酸塩還元試験, (7) Tween 80 水解試験, (8) ウレアーゼ, (9) 耐熱カタラーゼ, (10) 耐熱フォスファターゼ, (11) アリルスルファターゼ (3 日), (12) HA 培地増殖, (13) 5 µg EB 培地増殖を使用しており、Kubica<sup>6)</sup> は、(1) speed of growth, (2) Niacin, (3) Nitrate reduction, (4) Semiquantitative catalase test, (5) Catalase activity after 68°C for 20 minutes, (6) pigment, dark, (7) pigment, photoreactive, (8) Tween 80 hydrolysis (5 days), (9) Tellu-

rite reduction (3 days), (10) NaCl tolerance, (11) Arylsulfatase (3 days), (12) MaConkey agar と12項目をあげている。おそらく10項目程度の組合せは、臨床細菌学的な同定にも必要最小限のものであろう。

AMの中で最近病原菌として考えられつつあるものに、*M. simiae*, *M. szulgai* がある。私どもはこれらの菌種を同定した経験がなく、前述の項目で菌種の推定が可能かどうか明らかでない。*M. simiae* は光発色性があると記載され、かつナイアシン試験が陽性なので、私どもの方法でも推定可能とも思われるが、*M. szulgai* は硝酸塩還元試験しかよりどころがなく、本試験の判定のやや不安定なこともあつて、*M. scrofulaceum* と誤認する可能性があると思われる。また、*M. xenopi* も同様 *M. scrofulaceum* に誤認の可能性があり菌種推定不能であらう。この両菌種のより正確な同定には、2,3種類の温度域での追加検討が必要であらうと考えられた。更に私どもの同定検査項目では、*M. bovis*, *M. tuberculosis-complex* に含まれる *M. africanum* ならびにナイアシン試験陰性の *M. tuberculosis*<sup>10)</sup> の正確な鑑別が困難であらうと思われる。今後、以上の点を考慮して、同定項目の改善を期したいと考えている。

一般細菌の同定と比較すると、検査手技自体はかなり簡便であるにもかかわらず、抗酸菌の同定は特殊な専門施設を除いては充分実施されているとは言い難い印象を受ける。その普及には今後の努力に待つところが多い。しかし、極めてまれな菌種とか定型的な性状を示さない菌株の最終的な同定には、reference laboratory の設置も真剣に考慮する必要があると考えられる。

#### IV. 結 論

最近数年間に私どもの施設で実施した抗酸菌の同定、鑑別の結果を総括し、使用した同定検査項目についての

問題点を考察した。計11種類の同定検査項目、すなわち、(i) 抗酸性染色、(ii) 塗抹菌の形態学的観察、(iii) 集落の性状、(iv) 集落の着色、(v) 発育日数、(vi) 光発色性試験、(vii) PAS 培地の黒変、(viii) カタラーゼ試験(半定量法)、(ix) Tween 80 水解試験(5日法)、(x) 硝酸塩還元試験、(xi) ナイアシン試験を用いることによつて、抗酸菌を、*M. tuberculosis*, *M. kansasii*, *M. marinum*, *M. scrofulaceum*, other scotochromogens, *M. intracellulare-avium* complex, other nonphotochromogens, *M. fortuitum*, *M. chelonae*, other rapid growersの10種の菌種または菌種群にほぼ誤りなく大別することができた。

今後同定の必要が生じる可能性のある *M. simiae*, *M. szulgai*, *M. xenopi*, *M. africanum* をはじめ、ナイアシン試験陰性の *M. tuberculosis* などの同定に関してはなお検討の上、同定項目の追加が必要と考えられた。

#### 文 献

- 1) 日本結核病学会抗酸菌分類委員会：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)、結核、51:274, 1976.
- 2) 東村道雄：日胸、30:33, 1971.
- 3) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc. Chest Dis., 17:8, 1971.
- 4) 東村道雄：日胸、36:278, 1977.
- 5) 正井秀雄：結核、52:423, 1977.
- 6) Kubica, G.P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 107:9, 1973.
- 7) Runyon, E.H.: Tubercle, 55:235, 1974.
- 8) 工藤祐是他：結核菌の臨床細菌学、結核予防会、p. 214~215, 1970.
- 9) Wayne, L.G.: Amer. Rev. Resp. Dis., 109:147, 1974.
- 10) Tsukamura, M.: Amer. Rev. Resp. Dis., 110:101, 1974.