

## 原 著

## 簡単な検査による抗酸菌の同定法

東村道雄・水野松司・村田 浩

国立療養所中部病院

受付 昭和56年12月28日

A SIMPLE IDENTIFICATION SYSTEM OF CLINICALLY  
IMPORTANT MYCOBACTERIA

Michio TSUKAMURA\*, Shoji MIZUNO and Hiroshi MURATA

(Received for publication December 28, 1981)

From experiences of our laboratory concerned with the identification of mycobacteria since 20 years, a simple identification system of clinically important mycobacteria was presented for clinical laboratories which are not specialized for this work. The system consists of 10 tests (9 media) shown in Table 1. The results of the tests on various mycobacteria are shown in Tables 2 and 3. From these data, an identification table shown in Table 4 was presented.

## 緒 言

抗酸菌の同定法は2つに分類できる。第1は、あらゆる既知抗酸菌を考慮しての「専門的」同定法であり、第2は、簡単な検査による「省エネルギー型」同定法である。同定法としては前者が望ましいのは当然であるが、多数の既知菌種を同定するには<sup>1,2)</sup>、それだけ多数の検査が必要である。このような検査を同定を専門としない機関が行なうことは到底不可能と言えらる。かと言つて、分離された抗酸菌全部の同定を専門機関が行なうことも不可能である。そこで、実際問題として、日常遭遇する抗酸菌の同定を簡単な方法で、通常の検査室で行ない、同定不能の菌株のみを専門的機関に送付するということが必要である。本報は、このような目的のための同定法を紹介する目的で記した。本来ならば、ここで、抗酸菌同定の歴史の短い展望を述べるのが普通であるが、これを行なうことは多くの誌面を取るし、また、本報は抗酸菌同定に関する実用的な面を取り扱うものであるゆえ、これを省略し、別の機会に総説することとしたい。

ここで我々がいう同定とは、飽くまで、抗酸菌の菌種

を同定することを意味する。この意味で、我が国で抗酸菌の同定法について述べたものに、Tsukamura (1967, 1969)<sup>3,4)</sup> および衛生検査指針 (1972)<sup>5)</sup> があり、また、いわゆる「簡易同定法」として東村 (1971, 1972)<sup>6)-8)</sup> のものがある。その後、以後の進歩を考慮して書かれたものに、東村 (1975)<sup>9)</sup>、抗酸菌分類委員会 (1976)<sup>10)</sup>、[東村 (1977)<sup>11)</sup> の簡便な同定法、内藤など (1979)<sup>12)</sup> の同定法などがある。その他、同定法とは銘打つてないが、東村など (1976, 1981)<sup>13)-15)</sup> の3部作 (3編で同定法となる) がある。この中で、東村 (1977)<sup>11)</sup> および内藤など<sup>12)</sup> の方法は比較的簡単であるが、それでもやや面倒な酵素試験を含む10~20のtestsを使用している。我々は、今回、より簡単な方法で、しかもおおよそ実用に耐えると思われる同定法を考案したので、ここに報告する。

## 実験材料および方法

被検株として表2および表3に示した合計429株の当研究室保存の抗酸菌を使用した。これらは文献9に記した標準検査法により同定したものである。

本報の同定法で検査した項目は次のとおりである。

\* From the National Chubu Hospital, Obu, Aichi 474 Japan.

Table 1. Tests and Media

Test	Medium
Growth after 3 days	Ogawa egg medium (incubated in the dark) <sup>a</sup>
Colony pigmentation in the dark	The same medium as above is used
Photochromogenicity	Ogawa egg medium (incubated under exposure light) <sup>a</sup>
Resistance to NH <sub>2</sub> OH·HCl (0.5 mg/ml) (Resistance to HA) <sup>16,17)</sup>	Ogawa egg medium containing NH <sub>2</sub> OH·HCl (0.5 mg/ml) <sup>a</sup>
Resistance to p-nitrobenzoic acid (0.5 mg/ml) (Resistance to PNB) <sup>18)</sup>	Ogawa egg medium containing p-nitrobenzoic acid (0.5 mg/ml) <sup>a</sup>
Resistance to ethambutol (5 µg/ml) (Resistance to EB) <sup>19)</sup>	Ogawa egg medium containing ethambutol (5 µg/ml) <sup>a</sup>
Degradation of p-aminosalicylate (PAS) <sup>20)</sup>	Ogawa egg medium containing 0.2% sodium p-aminosalicylate <sup>a</sup>
Tolerance to 0.2% picric acid (Tolerance to PA) <sup>22,23)</sup>	A modified Sauton agar medium containing 0.2% picric acid (pH 7.0) <sup>b</sup>
Nitrate reduction (after 24 hours) <sup>24)</sup>	Refer to c
Tween hydrolysis (after 7 days and 14 days) <sup>25)</sup>	Refer to d

**Inoculation source.** A bacterial suspension, 10 mg wet weight per ml, was prepared from a 3 to 5 day-old culture (rapidly growing mycobacteria) or from a 14 to 21 day-old culture (slowly growing mycobacteria), which grew on an Ogawa egg medium slant. One loopful sample (0.01 ml) of the suspension was inoculated onto each medium of the above, and the media were stoppered by a gum cap with a 3mm cut-line in its bottom and incubated at 37°C in the dark, except for one tube of the Ogawa egg medium containing no agent, which was incubated at 37°C under exposure to light (a 40 watt-incandescence light, 30 cm). Good aeration is essential for photosynthesis of carotenoids by photochromogenic mycobacteria<sup>21)</sup>.

**Reading of results.** After incubation for 3 days, the growth on the Ogawa egg medium containing no agent, which was incubated in the dark, was observed. If abundant membranous growth occurred after 3 days, the results of all tests were read after incubation for 7 days. If no growth or only scanty growth occurred after 3 days, the results of all tests were read after incubation for 14 days. If no abundant growth was observed even after 14 days, the time of reading the results was extended until the end of incubation for 21 or 28 days.

The reading of the growth on PNB medium (Ogawa egg medium containing p-nitrobenzoic acid, 0.5 mg/ml), which is used for screening of mycobacteria other than *M. tuberculosis* and *M. bovis*, was read after incubation at 37°C for 21 days. The reading of the growth on this medium is exceptional. Not only presence of abundant membranous growth but also presence of thin membranous growth was read as positive.

**Remark.** Direct inoculation of a stock culture onto the test media may be done by a loop.

**a. Preparation of Ogawa egg medium.** Ogawa egg medium was used as a basic medium. Its composition as follows: Basal solution (1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> and 1% sodium glutamate), 100 ml; whole eggs, 200 ml; glycerol, 6 ml; 2% aqueous solution of malachite green, 6 ml (the pH, 6.8). The medium was poured in 7 ml quantities into tubes, 165 by 16.5 mm, and made as slopes by sterilization at 90°C for 60 minutes. When some agents were added to Ogawa egg medium, they were added before sterilization. p-Nitrobenzoic acid was first dissolved in propylene glycol at a concentration of 25 mg/ml, and its two volumes was added to 100 volumes of the Ogawa egg medium before sterilization. Other agents were dissolved in distilled water and added to the medium, to give a final concentration described in table, before sterilization.

**b. Preparation of a modified Sauton agar medium containing 0.2% picric acid (PA agar).** A modified Sauton agar medium was used as a base of picric acid-Sauton agar medium. Its composition is as follows: Glycerol, 30 ml; sodium glutamate, 4.0 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.5 g; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.5 g; ferric ammonium citrate, 0.05 g; citric acid, 2.0 g; purified agar, 20.0 g; distilled water, 970 ml. The pH of the medium was adjusted to 7.0 by adding a 10% KOH solution and sterilized by autoclaving at 120°C for 20 minutes. To prepare the PA agar medium, 200 ml of the above medium was melted by heating in a water bath. To this, 0.4 g of picric acid was added. The pH of the medium was adjusted to 7.0 by adding a 10% KOH solution, mixing well the medium. The medium was poured in 7 ml quantities into tubes, 165 by 16.5 mm, and sterilized by heating at 100°C for 10 minutes. The medium was made as slopes after cooling.

**c. Nitrate reduction test.** The composition of the test medium is as follows: M/15 phosphate buffer solution, pH 7.1, 100 ml; Tween 80, 0.5 ml; NaNO<sub>3</sub>, 0.2 g. The medium was poured in one ml quantity into tubes and sterilized by autoclaving at 120°C for 20 minutes. To this medium, a 0.3 ml sample of a bacterial suspension (10 mg wet weight/ml) or three loopfuls (3 to 5 mg wet weight) of bacteria were inoculated. The medium was shaken vigorously and incubated at 37°C for 24 hours. To this medium, two drops of the Ehrlich's aldehyde reagent (a 10% HCl solution containing 2% p-dimethylaminobenzaldehyde) and 0.5 ml of a 10% HCl solution were added, and the color of the medium was observed after one minute. A medium without inoculation should be used as a control. Yellow coloring of the medium shows the formation of nitrite from nitrate. According to our results, there is no Mycobacterium which can consume nitrite within a 24 hour-incubation period. Therefore, it is not necessary to confirm the presence of nitrate remained by adding zinc powder. This method of testing the nitrate reduction was described by Tsukamura<sup>24)</sup> in 1951, and thereafter slightly modified<sup>25)</sup>.

**d. Tween hydrolysis test.** The composition of the test medium is as follows: M/15 phosphate buffer solution, pH 7.1, 100 ml; Tween 80, 0.5 ml; 0.1% aqueous solution of neutral red, 2.0 ml. The medium was poured in 4 ml quantities into tubes and sterilized by autoclaving at 120°C for 20 minutes. Each medium was inoculated with one loopful of bacteria and incubated at 37°C. The color of the medium was observed after incubation for 7 days and for 14 days. A medium without inoculation should be incubated as control. Development of deep red color shows a positive reaction. The incubation period originally described by Wayne et al<sup>25)</sup> was 5 days and 10 days, but these were modified by us as after 7 and 14 days, as the observation on the same day of the week was considered as convenient.

- (1) 1% 小川培地での3日後の発育。
- (2) 1% 小川培地上の集落の色素。
- (3) 光発色性 (1% 小川培地, 光培養)。
- (4)  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  0.5 mg/ml を含有する1% 小川培地での発育<sup>16)17)</sup>。
- (5) p-nitrobenzoic acid (PNB) 0.5 mg/ml を含有する1% 小川培地での発育<sup>18)</sup>。
- (6) Ethambutol (EB) 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  を含有する1% 小川培地での発育<sup>19)</sup>。
- (7) sodium p-aminosalicylate (PAS) 2 mg/ml を含有する1% 小川培地に発育した集落の黒変<sup>20)21)</sup>。
- (8) picric acid を0.2%の割合に含有する麦法 Sauton 寒天培地上の発育<sup>22)23)</sup>。
- (9) 硝酸還元 (24時間後)<sup>24)</sup>。
- (10) Tween 水解 (7日および14日後判定)<sup>25)</sup>。

上記の検査に使用する培地は9本で one set とする (第1と第2の項目は同一培地で行なう)。これらの培地は、極東製薬工業株式会社 (東京) によつて、著者の指示した方法により作製された (表1)。

培養温度は37°Cのみとした。上記9培地の中で、第3の光発色性試験に使用する1本を除いて、他の8本はすべて37°Cのフラン器に暗所培養した。光発色性試験に使用する培地は、菌を接種した後、40 wattsの白熱燈をつけたフラン器内で、電燈から約30 cm 離して培養した。試験管の栓には、中央に約3 mmの切れ目のあるダブルゴム栓を使用した。光発色には充分な酸素の供給が必要であるゆえ<sup>26)</sup>、この型のゴム栓が適当である。(注。光培養が困難な場合は、次善の策として、いつたん通常の暗培養で培養し、7日後または14日後の判定を行なつた後、ゴム栓をゆるめ、半日日光に曝した後、再び2日間培養する。また、室温が25°C以上あれば室内に放置してもよい)。

接種源としては、迅速発育菌は1% 小川培地の3~5日培養菌を、遅発育菌は14~21日培養菌を用いた。集落を白金耳で取り試験管底にこすりつけ、これに生理食塩水を加えて目測で約10 mg/ml (湿菌量) の菌液を作つた。菌液から各培地に1白金耳 (0.01 ml) ずつを接種した。ただし、硝酸還元試験の培地には菌液0.3 ml または直接菌を3白金耳接種した (注。菌液を一つ一つ作るのは面倒であるから、培地に発育した菌に白金耳を軽く触れて、試験培地に丁寧に塗抹接種する方法で差し支えない。この際、培地面に菌塊が残るような heavy inoculation を行なつてはならない。硝酸還元試験培地には、3白金耳接種する)。

接種した培地は、37°Cに培養し、まず3日後に1% 小川培地 (対照) の発育を観察する。3日後に培地全面の菌膜発育があれば、迅速発育菌と判定し、すべての tests の結果を7日後に判定した。3日後に発育がないか、痕

跡的であれば、遅発育菌と判定し、すべての tests の結果を14日後に判定した。14日後に至つても対照培地の発育が充分でないときは、21日または28日後に判定した。

PNB 培地<sup>18)</sup>の発育の判定は元々4週判定とされていたものであり、かつ結核菌以外の抗酸菌を screening するためのものであるから、他と切り離して37°C 3週培養後に判定する。しかし、被検株が結核菌以外であることが確実であれば省略してもよい。PNB 培地の判定は、他の培地の判定基準より多少甘くなつてゐる。すなわち、PNB 培地での発育が対照培地より少なくとも、膜様発育 (薄膜状発育) であれば陽性とした。この培地を加えたのは、niacin test で screening した場合に、niacin (-) の *M. tuberculosis*<sup>27)~29)</sup> が混入したとき、これを見出だすのに役立つからである。

硝酸還元試験だけは、37°C 24時間培養後に培地に2滴の Ehrlich 氏 aldehyde 試薬 (p-dimethylaminobenzaldehyde を2%の割合に含有する10% HCl 液) と0.5 ml の10% HCl 液を加え、1分後に判定する。黄色色調が生じれば陽性である。この方法は、1951年に東村<sup>24)</sup>が発表した方法を多少 modify したもので<sup>9)</sup>、他で一般に使用される方法とは異なつてゐる。

Tween 水解試験は、Wayne et al.<sup>25)</sup>の原法では、5日後および10日後判定となつてゐるが、我々の方式では、7日後と14日後の判定とした。これは、5日後および10日後判定よりも、一定の曜日判定の方が便利と考えたからである。

## 実験結果

実験結果を表2および表3に示す。この結果から表4の同定表を作製した。表4には、本報の同定法には組み入れられていない niacin test<sup>30)</sup>および集落形態も参考に示した。niacin test の結果は文献13から、集落形態は文献13~15から引用した。表4では、Group IV の非病原性抗酸菌は、その他として一括されている。これらは、臨床材料にはまれにしか現れないし、臨床的意義も少ないからである。

更に、上記の同定法が、臨床材料から新たに分離される新鮮分離株に適用できるかどうかをみるために、最近6ヵ月以内に分離された抗酸菌83株を計数同定法で標準株と比較して同定し、この成績と本報の簡便同定法での同定結果と比較した。同定に当たつては、被検株に連番番号を附して菌株がどの菌種であつたか分からないようにした。その結果、簡便同定法の結果が標準法の結果と100%の一致率を示した (表5)。

## 考 察

### 同定法の定義

一般に抗酸菌同定法と称しても、その定義は一定して

Table 2. Characters of Slowly Growing Mycobacteria

Species	Number of strains showing positive reaction											
	Number of strains	Growth after 3 days	Tolerance to PA	Colony pigmentation in dark	Photochromogenicity	Nitrate reduction (24 hours)	Resistance to EB	Tween hydrolysis (7 days)	Tween hydrolysis (14 days)	Resistance to HA	Degradation of PAS	Resistance to PNB
<i>M. tuberculosis</i>	20	0	0	0	0	20	0	0	0	0	0	0
<i>M. bovis</i>	10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
<i>M. microti</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>M. kansasii</i>	40	0	0	0	37	40	7	40	40	0	0	30
<i>M. marinum</i>	20	0	0	0	19	0	15	7	7	13	0	14
<i>M. simiae</i>	5	0	5	0	5	0	5	0	0	5	0	5
<i>M. asiaticum</i>	5	0	0	0	5	0	5	0	0	5	0	5
<i>M. scrofulaceum</i>	20	0	0	20	0	0	16	0	0	16	0	20
<i>M. gordonae</i>	20	0	0	20	0	0	0	18	18	0	0	20
<i>M. szulgai</i>	5	0	0	5	0	5	0	0	5	0	0	5
<i>M. xenopi</i>	5	0	0	5	0	0	5	0	0	0	0	4
<i>M. avium</i>	20	0	0	0	0	0	16	0	0	16	0	20
<i>M. intracellulare</i>	79	0	0	0	0	0	75	0	2	69	0	79
<i>M. malmoense</i>	10	0	0	0	0	0	6	0	10	7	0	10
<i>M. nonchromogenicum</i>	20	0	0	0	0	0	0	20	20	20	0	18
<i>M. terrae</i>	10	0	0	0	0	4	1	10	10	10	0	10
<i>M. triviale</i>	10	0	0	0	0	3	2	10	10	10	0	10
<i>M. shimoidi</i>	5	0	0	0	0	0	0	0	5	0	0	5
<i>M. gastri</i>	5	0	0	0	0	0	0	5	5	0	0	5

The results were read after incubation at 37°C for 14 days, except for *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. microti*, and *M. xenopi*, the results of which were read after incubation for 3 or 4 weeks. The growth on the PNB medium was read in all test strains after incubation at 37°C for 3 weeks.

Table 3. Characters of Rapidly Growing Mycobacteria

Species	Number of strains showing positive reaction											
	Number of strains	Growth after 3 days	Tolerance to PA	Colony pigmentation in dark	Photochromogenicity	Nitrate reduction (24 hours)	Resistance to EB	Tween hydrolysis (7 days)	Resistance to HA	Degradation of PAS	Resistance to PNB	
<i>M. flavescens</i>	5	5	5	5	0	5	0	5	0	0	0	5
<i>M. thermoresistibile</i>	5	5	5	5	0	5	0	2	0	0	0	5
<i>M. phlei</i>	5	5	5	5	0	5	0	5	0	0	0	5
<i>M. vaccae</i>	5	5	5	5	0	0	0	5	0	0	0	5
<i>M. parafortuitum</i>	5	5	5	3	2	1	0	0	0	0	0	5
<i>M. aurum</i>	5	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	5
<i>M. obuense</i>	5	5	5	5	0	0	5	5	0	5	5	5
<i>M. rhodesiae</i>	5	5	0	5	0	0	0	5	0	0	0	5
<i>M. neoaurum</i>	5	5	5	5	0	1	5	5	0	0	0	5
<i>M. aichiense</i>	5	5	5	5	0	0	0	5	0	0	0	5
<i>M. chubuense</i>	5	5	5	5	0	3	0	5	0	0	0	5
<i>M. tokaiense</i>	3	3	3	3	0	0	3	3	0	0	0	3
<i>M. davalii</i>	3	3	3	3	0	3	0	0	0	0	0	3
<i>M. gilvum</i>	3	3	3	3	0	3	0	0	0	0	0	3
<i>M. smegmatis</i>	5	5	5	0	0	2	5	2	0	0	0	5
<i>M. fortuitum</i>	20	20	20	0	0	18	20	0	20	17	20	20
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	10	10	0	0	0	0	10	0	10	10	10	10
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	10	10	10	0	0	0	10	0	10	10	10	10
<i>M. chitae</i>	5	5	5	0	0	5	0	0	5	0	0	5
<i>M. agri</i>	5	5	5	0	0	0	0	0	0	0	0	5

All results were read after incubation at 37°C for 7 days.

Table 4. Identification Table for Mycobacteria

Species	Growth after 3 days	Tolerance to PA	Colony pigmentation in dark	Photochromogenicity	Nitrate reduction (24 hours)	Resistance to EB	Tween hydrolysis (7 days)	Tween hydrolysis (14 days)	Resistance to HA	Degradation of PAS	Resistance to PNB	Niacin production	Colony morphology
<i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	-	+ (-or+)	-	-	-	-	-	-	+	R
<i>M. bovis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<i>M. kansasii</i>	-	-	-	+	+ -or +	+	+	-	-	-	+	-	R
<i>M. marinum</i>	-	-	-	+	-	+or-	-or+	-or+	+or-	-	+	-or+	S
<i>M. simiae</i>	-	+	-	+*	-	+	-	-	+	-	+	+	S
<i>M. asiaticum</i>	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	S
<i>M. scrofulaceum</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	S
<i>M. gordonae</i>	-	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	-	S
<i>M. szulgai</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	R
<i>M. xenopi</i>	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	S
<i>M. avium-M. intracellulare</i>	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	S
<i>M. malmoense</i>	-	-	-	-	-	+or-	-	+	+	-	+	-	S
<i>M. nonchromogenicum-M. terrae</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	S
<i>M. triviale</i>	-	-	-	-	-or+	-	+	+	+	-	+	-	R
<i>M. shimoidei</i>	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	R
<i>M. gastri</i>	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	S
<i>M. fortuitum</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+or-	+	-	RS
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	RS
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	RS
<i>M. obuense</i>	+	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	S
Other Group IV	+	+	+or-	-	+or-	+or-	+or-	-	-	-	+	-	SorR

When growth occurs after 3 days, the results of all tests are read after incubation at 37°C for 7 days, and when growth does not occur after 3 days, the results are read after incubation for 14 days (or 21 days or 28 days). The growth on the PNB medium is read after incubation for 3 weeks. \*Feebly positive. The findings of niacin test and colony morphology of fresh isolates are shown for consideration of identification, although these are not included in this study.

Table 5. Fitness of Identification by Simple System of Fresh Isolates with the Identification by Numerical Method

Species <sup>a</sup>	Number of strains tested	Percentage of strains in which the identification of both methods were the same
<i>M. tuberculosis</i>	10	100
<i>M. kansasii</i>	13	100
<i>M. scrofulaceum</i>	1	100
<i>M. gordonae</i>	2	100
<i>M. avium-M. intracellulare</i>	45	100
<i>M. nonchromogenicum</i>	1	100
<i>M. fortuitum</i>	6	100
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	1	100
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	4	100
Total	83	100

a All these were freshly isolated from sputum specimens of patients within six months and identified by the method of numerical identification<sup>10</sup> using 88 characters (slowly growing mycobacteria) or 106 characters (rapidly growing mycobacteria). These 88 and 106 characters were shown in previous papers<sup>11,12</sup>.

いない。極端な例をあげれば、抗酸菌に niacin test だけを行なつて niacin(+)の菌を *M. tuberculosis* と「同定した」とする人もある。また、約50種の抗酸菌の中から、僅か数種の抗酸菌を取り出して、これを「同定する」簡単な方法を発表する人もある。しかし我々は、このようなものを同定とは考えない。以上のような例は、内科診療所に来る患者で咳と発熱がある患者を感冒と診断すれば、大抵の場合当たつているのと似ている。このような診断も大抵の場合当たるであろう。しかし、科学的な診断とは、一応、種々の疾病の可能性を考えて、これらの鑑別を行なつてはじめて成立するものと思われる。我が国で分離される抗酸菌の菌種はおおよそ一定している<sup>31)</sup>。したがつて、Runyon<sup>32)</sup>の Group III をみれば *M. avium-M. intracellulare*, Group I をみれば *M. kansasii*, Group II をみれば *M. gordonae*, Group IV をみれば *M. fortuitum* とすれば多くは当たつていようであろう。しかし、これでは科学的な同定とはいひ難い。我々は、種々の菌種との鑑別を行なつて後に、被検株に一定の菌種名を与えてはじめて、これを同定と言えと考える。我々が本報に示すのは、このような意味での最も簡単な同定法である。

#### 同定表(表4)の使用法についての説明

##### (1) 染色鏡検の必要性

抗酸菌の同定は、言うまでもなく、被検株が抗酸菌であることを前提としている。したがつて、少なくとも最も簡単な方法で被検菌が抗酸菌であることを確かめる必要がある。すなわち、小川培地に発育した菌を白金耳でスライドグラスに塗抹し、Ziehl-Neelsen 法で染色鏡検し、菌が抗酸性であることおよび菌糸がないことを証明する必要がある。この際、菌の形態を観察することで同定の一助とすることができる<sup>33)</sup>。特に長い菌体(>7 $\mu$ m)の存在と菌体内顆粒(cross-baerring)の存在は一定の菌種(*M. kansasii*, *M. gordonae* など)に特有である。

##### (2) *M. tuberculosis* および *M. bovis* 以外の抗酸菌の screening

臨床材料に見出だされる抗酸菌の約90%は *M. tuberculosis* であるから<sup>31)</sup>、同定の実際は、*M. tuberculosis* と他の抗酸菌とを区別することから始める。この目的には、niacin test<sup>30)</sup>が広く用いられているが、PNB 培地<sup>18)</sup>も国療非定型抗酸菌症共同研究班および英国などで使用されている。niacin test で screening を行なう場合、我が国で頻々行なわれるように4週培養菌を使用すると——初代分離が少数集落であると、これをいつたん小川培地で増菌して niacin test を行なうことになる——10%前後の niacin(-)の *M. tuberculosis* が出てくる<sup>27)</sup>。しかし niacin test では、4週培養菌よりも6週培養菌の方が陽性率が高い<sup>34)</sup>。したがつて、3週培養と6週培養について2回テストすることが望ましい<sup>34)</sup>(注。6週培養までみるのであれば、むしろ PNB 培地の方が結果が速く

出る!)。しかし、6週培養を使用してもまれに niacin(-)の *M. tuberculosis* が出現する<sup>28)29)</sup>。我が国では、6週培養についての niacin test は実施されないことが多いので、非定型抗酸菌として screening された菌の中には数%から10%の *M. tuberculosis* が混じている。これらの混同された *M. tuberculosis* を鑑別するのに PNB 培地が役立つ。

##### (3) *M. marinum* と *M. asiaticum* の区別

*M. marinum* と *M. asiaticum* は、我々の同定法では同じパターンとなつて区別できない(表4)。しかし *M. marinum* は分離時には28°Cに培養しないと分離できないし、その採取原も通常、皮膚病巣である。したがつて、この点を参考にすれば、両者を混同することはまずないと思われる。また *M. asiaticum* は、現在、我が国では、まだ分離の報告がない。

##### (4) 集落形態

集落形態は最も観察しやすい性状であるが、我々の同定法には敢えてこれを組み入れなかつた。その理由は、集落形態は、かなり不安定な性状で継代により比較的容易に変異するからである(通常S型からR型へ変わる)。しかし、分離当初の集落形態は参考となるので、表4の同定表には、過去の研究で得た成績を示しておいた。しかし、集落形態の価値は他の性状の価値より低いと思われる。例えば、*M. kansasii* の集落は通常R型であるが、S型のものもまれとは言えない。他の例をあげれば、抗酸菌分類委員会<sup>10)</sup>の性状表をみると、*M. phlei* および *M. smegmatis* の集落形態はR型と記されている。この2つの菌は、古典的な、歴史的に有名な菌であるが、臨床材料には極めてまれにしか見出だされない。このため、分類委員会の報告の観察は、すべて保存株に基づいており、これら保存株がすべてR型であつたために、上記の記載がなされた。ところが、その後、我々が *M. smegmatis* を土壌から<sup>35)</sup>、*M. phlei* を喀痰から分離してみると<sup>15)</sup>、これら新鮮分離株はすべてS型であつた。これらの菌は、分離当初はS型であつたのが、長期にわたつて継代保存されている間にR型に変異してしまつたものと思われる。したがつて、*M. phlei* と *M. smegmatis* の集落形態がR型であると思ひ込んでいると、とんだ間違いを犯す可能性がある。

##### (5) 例外的なパターンに出会つた場合

我々が観察する性状については、どの性状でも例外がつきまとう。したがつて、同定表(表4)に適合しない場合があることがありうる。この場合、表2と表3の成績を参照して、同定されるべき菌種を推定できることもある。例えば、*M. marinum* は通常 Tween 水解(-)であるが、我が国で分離される菌には意外と水解(+)のものが多い。この場合、同じく光発色性の *M. kansasii* との区別は硝酸還元(-)の性状による。また、HA 耐

性 (+) であれば *M. marinum* としてよい。なぜなら、HA 耐性 (+) の *M. kansasii* は1例もないからである。このように、例外的な性状が1つの場合は、大抵の場合、これに対処できるが、例外的な性状が2つになると全く判定不能となるか、または、誤った同定を行なうことになる。この点、多数の性状の検査を行ない、計数同定法<sup>36)</sup>を適用すれば、誤りを犯すことはない。しかし、本報で示したような少数性状による同定法では少数の誤りは避け難いと思われる。したがって、簡便同定法の同定結果を100%正しいと考えることは禁物で、まして、このような方法で同定された菌株を標準株として使用してはならない。

なお、例外的なパターンがみられた場合、直ちに、これを例外と考える前に次の2点を考慮すべきである。

第1は実験誤差で、不審な成績が得られれば、まず実験誤差を考えて、同じ実験を更に2回追加すべきである。合計3回の実験で2回以上示された成績を採用する。例えば EB 耐性の場合、第1回判定(-)、第2回判定(+)、第3回判定(+ )の成績であれば、(+ )の成績を採用する。

第2は菌株の contamination で、被検株が2種以上の菌種の混合物である可能性を考慮する。この場合、被検株の菌液を希釈して、種々の希釈液を小川培地に接種培養してみると2種の菌の混合があるかどうか分かることが多い。2種の菌が混じていると、単個集落の形態性状(色素を含む)の違いが見られることが多い。同定に使用する菌株は、本来、単個集落分離を行なつてから同定に使用するのが常道である<sup>9)</sup>。

#### (6) Niacin test

Niacin test<sup>30)</sup> は信頼度の高い tests の1つであるが、niacin (-) の *M. tuberculosis* が存在することは既に述べた<sup>27)~29)</sup>。この他に、*M. africanum* と *M. simiae* も niacin (+) である<sup>37)38)</sup> (注。東村など<sup>39)</sup>によれば、*M. africanum* は niacin (+) の *M. bovis* である)。この他に、*M. bovis*<sup>3)</sup>、*M. kansasii*<sup>40)41)</sup>、*M. avium-M. intracellulare*<sup>42)~44)</sup>、*M. marinum*<sup>3)13)</sup>、*M. chelonae* subsp. *chelonae*<sup>45)</sup>、*M. chelonae* subsp. *abscessus* (我々の未発表成績)にも少数ながら niacin (+) の菌株がある。したがって、niacin test による screening の場合に、これらの例外の存在を考えておく必要がある。なお PNB 培地による screening にも少数の例外がある<sup>46)</sup>。

#### 総 括

9本の培地で10種の tests を行なう方法で抗酸菌の同定を行なう方法を報告した。この方法は簡単ではあるが、一応、実用に耐えるものと思われる。

#### 文 献

- 1) 東村道雄: 抗酸菌の分類学. I. 抗酸菌属の定義, 結核, 55: 289, 1980.
- 2) 東村道雄: 抗酸菌の分類学. II. 抗酸菌の菌種——群別の試案, 結核, 55: 341, 1980.
- 3) Tsukamura, M.: Identification of mgcobacteria, Tubercle, 48: 311, 1967.
- 4) Tsukamura, M.: Identification of Group II scotochromogens and Group III nonphotochromogens of mycobacteria, Tubercle, 50: 51, 1969.
- 5) 厚生省監修: 衛生検査指針・結核菌検査指針, p. 31, 1972, 日本公衆衛生協会, 東京.
- 6) Tsukamura, M.: A simple identification system for atypical mycobacteria, Japan J Tuberc & Chest Dis, 17: 8, 1971.
- 7) 東村道雄: 臨床材料から分離される抗酸菌の簡易同定法, 日本胸部臨床, 30: 33, 1971.
- 8) 東村道雄: 抗酸菌の同定法. 衛生検査, 21: 683, 1972.
- 9) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria. p. 1-75. The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan.
- 10) 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: 247, 1976.
- 11) 東村道雄: 簡便な抗酸菌の同定法, 日本胸部臨床, 36: 278, 1977.
- 12) 内藤祐子他: 抗酸菌の臨床細菌学的同定に関する一考察, 結核, 54: 481, 1979.
- 13) Tsukamura, M.: Numerical classification of slowly growing mycobacteria, Int J Syst Bacteriol, 26: 409, 1976.
- 14) Tsukamura, M.: Numerical analysis of rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium agri* (Tsukamura 1972) *Tsukamura* sp. nov., nom. rev, Int J Syst Bacteriol, 31: 247, 1981.
- 15) Tsukamura, M. et al.: Numerical analysis of rapidly growing, scotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium obuense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium rhodesiae* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium aichiense* sp. nov., nom. rev., *Mycobacterium chubuense* sp. nov., nom. rev., and *Mycobacterium tokaiense* sp. nov., nom. rev, Int J Syst Bacteriol, 31: 263, 1981.
- 16) Tsukamura, M.: Differentiation of mycobacteria by susceptibility to hydroxylamine and 8-azaguanine, J Bacteriol, 90: 556, 1965.
- 17) 東村道雄・村田 浩: *Mycobacterium fortuitum* complex を他の迅速発育性抗酸から区別する方法としての MacConkey 寒天培地と NH<sub>2</sub>OH 培地の比較, 結核, 56: 263, 1981.
- 18) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by p-nitrobenzoic acid susceptibility, Tubercle, 45: 64, 1964.
- 19) 東村道雄: Ethambutol 耐性による病原性および非病原性抗酸菌 (Group II および Group III) の区別, 結核, 45: 237, 1970.

- 20) Tsukamura, M.: Salicylate degradation test for differentiation of *Mycobacterium fortuitum* from other mycobacteria, J Gen Microbiol, 41: 309, 1965.
- 21) Tsukamura, M.: Differentiation between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium borstelense*, Amer Rev Respir Dis, 101: 426, 1970.
- 22) Tsukamura, M.: Usefulness of picric acid-Sauton agar medium for differentiating slowly growing mycobacteria from rapidly growing mycobacteria, Tubercle, 61: 33, 1980.
- 23) Tsukamura, M.: Differentiation of mycobacteria by picric acid tolerance, Amer Rev Respir Dis, 92: 491, 1965.
- 24) 東村道雄: 細菌の硝酸塩還元作用の検査法 (ならびに亜硝酸イオンの証明法) について, 医学と生物学, 21: 56, 1951.
- 25) Wayne, L.G. et al.: Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate, Amer Rev Respir Dis, 90: 588, 1964.
- 26) Tsukamura, M.: Carotenoids of photochromogens of "unclassified mycobacteria", J Biochem, 51: 169, 1962.
- 27) Tsukamura, M.: Niacin-negative *Mycobacterium tuberculosis*, Amer Rev Respir Dis, 110: 101, 1974.
- 28) Szabo, I. et al.: Incidence of niacin negative *Mycobacterium tuberculosis* strains, Acta Microbiol Acad Scientif Hung, 23: 299, 1976.
- 29) Gruft, H. and Osterhout, M.: Niacin-negative strain of *Mycobacterium tuberculosis*, Amer Rev Respir Dis, 118: 157, 1978.
- 30) Konno, K.: New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria, Science, 124: 985, 1956.
- 31) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 非定型抗酸菌による肺感染症に関する研究(1979年度研究報告), 結核, 56: 391, 1981.
- 32) Runyon, E.H.: Anonymous mycobacteria in pulmonary disease, Medical Clin North Amer, 43: 273, 1959.
- 33) 村田 浩他: 抗酸菌の形態と菌種の関係, 結核, 53: 459, 1978.
- 34) Wayne, L.G. et al.: Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for niacin and catalase and for resistance to isoniazid, thiophene-2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine, and p-nitrobenzoate, Int J Syst Bacteriol, 24: 412, 1974.
- 35) Tsukamura, M.: Properties of *Mycobacterium smegmatis* freshly isolated from soil, Japan J Microbiol, 20: 355, 1976.
- 36) Tsukamura, M.: An approach to numerical identification of bacterial species, J Gen Microbiol, 95: 207, 1976.
- 37) Castets, M. et al.: Les bacilles tuberculeux de type Africain (note préliminaire), Rev Tuberc Pneumol, 32: 179, 1968.
- 38) Karasseva, V. et al.: Occurrence of atypical mycobacteria in *Macacus rhesus*, Acta Microbiol Acad Scientif Hung, 12: 275, 1965.
- 39) 東村道雄他: *Mycobacterium tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis* および *M. microti* の関係についての計数分類学的解析, 結核, 54: 491, 1979.
- 40) Yue, W.Y. and Cohen, S.S.: Pulmonary infection caused by niacin-positive *Mycobacterium kansasii*, Amer Rev Respir Dis, 94: 447, 1966.
- 41) Gimpl, F. et al.: Eine niazinpositive Variante von *Mycobacterium kansasii*, Praxis der Pneumol, 22: 295, 1968.
- 42) Zvetina, J.R. and Wichelhausen, R.H.: Pulmonary infection caused by niacin-positive *Mycobacterium avium*, Amer Rev Respir Dis, 113: 885, 1976.
- 43) 佐藤明正他: 肺病巣から分離したナイアシンテスト陽性の *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex について, 結核, 56: 531, 1981.
- 44) Tsukamura, M. et al.: Relationship between serotype and certain biological characteristics of strains of *Mycobacterium avium-Mycobacterium intracellulare* complex, Microbiol Immunol, 発表予定.
- 45) Bönicke, R. and Ewoldt, A.: Quantitative Untersuchungen über das Niacinbildungsvermögen von *Mycobacterium borstelense* var. *niacinogenes*, Beitr z Klin Tuberk, 130: 149, 1965.
- 46) Tsukamura, M.: Screening of atypical mycobacteria, Tubercle, 51: 280, 1970.