

## 総 説

## 抗酸菌の同定法——ある展望

東 村 道 雄

国立療養所中部病院

受付 昭和 57 年 1 月 9 日

## IDENTIFICATION OF MYCOBACTERIA. A Review

Michio TSUKAMURA\*

(Received for publication January 9, 1982)

At present there is no international consensus on the identification system of mycobacteria. We have only nationalistic or personal identification systems. It is expected to compare various methods of differentiation between species, to select more effective methods, thus to compose a good identification system. In the present paper, we showed various methods of differentiation between mycobacterial species and showed also various systems which are used in various countries.

## 緒 言

分類学 (taxonomy) は分類 (classification), 命名 (nomenclature) および同定 (identification) の3者から成り立つ。このなかで、分類と命名については世界の学者の合意 (consensus) が得られているのに対して、同定に関しては国際的な合意はなく、今日あるのは(後で述べるように) nationalistic な同定法または個人的な同定法であると言つてよい。わが国には、米国の同定法すなわち国際的に受け入れられた同定法とする者があるが、私は同意できない。そこで、本報では、抗酸菌の同定法の簡単な歴史と現状を述べて、問題点を紹介したい。

## 同定とは何か

同定とは、提供された被検株が、既知のいかなる菌種に属するかを決定することである。手段は問わない。生物学的・生化学的方法でも、免疫学的方法でも、生物物理学的方法のいずれでもよいし、これらを併用してもよい。同定とは、それに先行する分類と命名が存在し、はじめて成立するものである。

具体的には、被検株の性状を調べて、既知菌種の性状と比較し、既知菌種のあるものと一致すれば、その菌種

名が同定の答となる。しかし、ここに問題がある。抗酸菌も生物の一つであるから、その性状に変異があり、必ずしも既知菌種の性状と被検株の性状が完全に一致するとは限らない。それでは、どの程度の一致でもつて同一菌種と判定したらよいのであろうか。また、抗酸菌の菌種は既知のものが約50種ある<sup>1)</sup>。被検株を、これらすべての菌種と比較して区別するには多数の tests が要るのは自明の理である。しかし、専門的な同定以外に、このような比較を行なうことはあまりに複雑すぎて実用にならない。それでは、実際問題として同定の対象とする菌種をどのように絞つたらよいのか。そして、同定に必要な性状 tests の数は、どのくらい必要なのであろうか。

## 1) 同定の対象とする菌種

同定の専門家にとつては、同定の対象となる菌種は既知菌種全部である。しかし、一般の臨床家にとつては、対象となる菌種は病原菌として知られるものと、これと鑑別を要する特定の非病原性菌だけでよい。こうすると対象は約30に限定される(表1)。

## 2) 同定に必要な性状の質

同定に必要な性状は、ある菌種では100%陽性(または100%に近い陽性)の成績を与え、他の菌種では100%陰性(100%近く陰性)の成績を与える性状である。こ

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

Table 1. Clinically Important Mycobacteria

Group	Complex name	Species name	Pathogenicity
	<i>M. tuberculosis</i> complex	<i>M. tuberculosis</i> <i>M. africanum</i> <i>M. bovis</i>	+ + + + +
I		<i>M. kansasii</i> <i>M. marinum</i> <i>M. simiae</i> <i>M. asiaticum</i>	+ + + -
II		<i>M. scrofulaceum</i> <i>M. xenopi</i> <i>M. szulgai</i> <i>M. gordonae</i>	+ + + -*
III	<i>M. avium</i> complex <sup>a)</sup>	<i>M. avium</i> <i>M. intracellulare</i> <i>M. malmoense</i> <i>M. shimoidei</i> <i>M. ulcerans</i> <i>M. haemophilum</i>	+ + + + + +
	<i>M. nonchromogenicum</i> complex	<i>M. nonchromogenicum</i> <i>M. terrae</i> <i>M. triviale</i> <i>M. gastri</i>	-* -* -* -
IV	<i>M. fortuitum</i> complex	<i>M. fortuitum</i> <i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i> <i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i> <i>M. thermoresistibile</i> <i>M. flavescens</i>	± ± + -* -

a) *Mycobacterium avium* complex is composed of *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* and *M. asiaticum* (Tsukamura (1976)<sup>28)</sup>).

\* These usually occur as non-pathogens, but there are a few papers reporting that they have caused infection in humans.

のような性状は「重要性状」(key character; distinguishing character; differentiating character; important character)と呼ばれる。ある菌種で60%陽性、他の菌種で40%陽性といった性状を使用することは有害無益である。

### 3) 同定に必要な性状の数

AとBの2つの菌種を区別するのに、Aで100%(+)、Bで100%(-)の成績を与える性状があれば、区別には唯一つの性状(test)で十分である。しかし、そのように都合のよい性状は実際にはほとんどないと言ってよい。あるのは、せいぜいAで95%(+)、Bで100%(-)といった性状である。したがって、AとBとの区別を、より確実に行なうためには、更にもう1つか2つの性状を追加しなければならない(理論的には、AとBの区別に3 testsを行なうことが望ましい<sup>29)</sup>)。このように、正確な同定を行なうためには、勢い性状の数は多くならざるをえない。性状の数を減らせば、それだけ正確さが減じる

ことを覚悟しなければならない。したがって、同定法は、複雑ではあるが正確な方法か、簡単ではあるが正確さを欠く方法のどちらかとなるわけで、簡単で正確な方法は理論的に存在しない。

### 4) 同定の方法

同定法は、多数の性状を検査して行なう「計数同定法」<sup>30)</sup>と比較的少数の性状を検査して行なう「古典的同定法」に分けることができる。前者は同定を客観的に行ない、かつ正確な成績が得られるので、より望ましい方法であることは言うまでもない。しかし多大の労力を要するので日常の検査に適用するわけにはゆかない。後者は一般に広く使用される方法であるが、同定表の中にピッタリ適合する菌種が見出だされる場合はよいが、そうでない場合は、検者の経験により裁定が行なわれる。したがって、どうしても主観が入らざるをえない。しかし、日常の同定業務はこの方法で行なわれるのが普通である。

## 同定法発達の歴史

同定法の歴史を遡れば、1882年の Robert Koch<sup>4)</sup> による結核菌の同定にまで言及すべきであろう。しかし、ここでは、もつと身近な、現在我々が使用している方法の開始の頃から始めたい。同定法は、抗酸菌の生化学的な研究と密接に関係している。したがって、抗酸菌生化学の曙の時代から始めたい。

### 1. 同定法の礎となった戦前の研究

この時代の研究を展望した名著に H. G. Wells & E. R. Long の “The Chemistry of Tuberculosis” (2nd edition) (1932)<sup>5)</sup> がある。この著者の1人 Long<sup>6)7)</sup> は、卵や血清を加えない合成培地を用いて、種々の炭水化物のC源としての利用、種々のアミノ酸やアミドのN源としての利用を研究した。このような研究を行なつたものに Braun et al.<sup>8)</sup>, Kondo<sup>9)10)</sup>, Merrill<sup>11)</sup>, Thomson<sup>12)</sup>, Gordon<sup>13)</sup>, Gordon & Hagan<sup>14)</sup> がある。これらの研究は1920~1938年に行なわれ、対象とされた抗酸菌は今日の *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. avium*, *M. phlei*, *M. smegmatis* であつた(ただし、Merrill 以下<sup>11)~14)</sup> は “saprophytic” mycobacteria のみ)。このなかで特記すべきことは、Kondo (金沢)<sup>10)</sup> が1925年に *M. tuberculosis* は NH<sub>3</sub>-N 源の存在下で glucose をC源としてわずかしが発育しないが、*M. bovis* は glucose をC源としてよく発育すること、また *M. avium* は glucose をC源として発育しないことを観察していることである。この所見は *M. tuberculosis* と *M. bovis* との代謝の差を示した最初の報告であると思われるが、惜しむらくは著者自身があまりこの所見に注目していない。同様な所見は、1931年に Merrill<sup>11)</sup> によつて観察されている。

種々の炭水化物を単一C源として利用する「パターン」が菌種によつて異なることを、初めて明らかにしたのは Gordon & Smith<sup>15)16)</sup> および Gordon & Mihm<sup>17)</sup> である。彼らは *M. phlei*, *M. smegmatis*, *M. fortuitum* による炭水化物利用パターンの差を明らかにした。Gordon など<sup>18)</sup> は、Bergey's Manual 第7版 (1957) で、発育温度域、rhamnose および inositol からの酸形成、動物に対する病原性の差を key characters とする同定法を発表した。

### 2. 生化学的方法による菌種鑑別的发展

第二次世界大戦後まもなく米国で非定型抗酸菌症が注目され、これが世界的に関心を引いてから、非定型抗酸菌(結核菌以外の抗酸菌)と結核菌との鑑別が必要となり、この方面へ関心が集まるとともに抗酸菌の分類法および同定法にも興味を持たれるようになった。

この方面の仕事のきつかけとなつたのは、Pope & Smith<sup>19)</sup> によつて *M. tuberculosis* は合成培地中でニコチン酸 (niacin) を形成するが、*M. bovis* はこれを形成し

ないという事実が見出だされたことであつた。今野<sup>20)</sup> は、これを *M. tuberculosis* と他の抗酸菌とを区別するために応用し注目を集めた。

その後の時代の菌種鑑別法の発展は、前の時代に引き続いてのC源およびN源の利用「パターン」を利用する方法と酵素活性「パターン」を利用する方法に分けられる。このうち、酵素活性検査による方法は次項に譲り、ここではC源およびN源の研究について述べる。

C源およびN源の研究は、1957年に Sneath<sup>21)22)</sup> によつて始められた計数分類学と関係がある。この方法は菌と菌との類似度を比較して客観的な分類を行なう方法であるから、類似度の信頼性を高めるためには多数の性状の検査を必要とする。このために、比較的簡単な方法で多くの性状 tests が可能であるC源およびN源の tests が使用されるようになった。こうして計数分類が行なわれると、その結果得られる同定のための性状としてC源およびN源の検査が登場してきた。抗酸菌の分野で、はじめて計数分類を行なつたのは、メキシコの Bojalil et al.<sup>23)</sup> で、彼らはその成果として *M. gordonae* と *M. flavescens* の2つの新菌種を発見した。彼らの示す同定表にはC源利用 tests が多い。次いで、Tsukamura<sup>24)</sup> は、抗酸菌としては、はじめて計数分類に必要とされる50~60以上の性状(94性状)を用いて計数分類を行なつた。その結果、迅速発育菌と遅発育菌とは、単に発育速度だけでなく、他の種々の性状でも分けられることが分かつた。この結果、両者は亜属(subgenus)に相当するものと考えられた<sup>25)</sup>。迅速発育菌と遅発育菌を区別するのに、発育速度だけを調べると間違いが起こることがあるが、これにピクリン酸耐性<sup>26)</sup>、亜硝酸耐性<sup>27)</sup>などの性質を追加すると確実に両者を分けることができる<sup>28)</sup>。

Tsukamura<sup>24)25)</sup> が使用したのは糖、アルコール、有機酸のC源としての利用「パターン」であるが、その他に、次の7種のN化合物のN源およびC源としての同時利用の「パターン」が迅速発育菌の同定に有用であることを見出だした。L-glutamate, L-serine, glucosamine, acetamide, benzamide, monoethanolamine および trimethylene diamine。

Tsukamura<sup>29)</sup> は無機N化合物のN源としての利用を研究した結果、菌種の発育速度と利用されるN化合物の種類との間に一定の関係があることを見出だした。最も発育が遅い *M. tuberculosis* complex はアンモニウム塩しか利用しないが、他の遅発育性抗酸菌はアンモニウム塩と硝酸塩を利用する。そして迅速発育性抗酸菌は、これら2者のほかに亜硝酸塩もN源として利用する(表2)。

また、Tsukamura<sup>30)</sup> は単一C源として利用される有機酸の種類と発育速度の間に関係があることを見出だした(表3)。以上の表2および表3の結果は抗酸菌の進化を考えるうえで興味がある。*M. tuberculosis* は栄養要

Table 2. Utilization of Inorganic Nitrogen Compounds as Sole Nitrogen Source by Various Mycobacteria<sup>a)</sup>

Species	Nitrogen compounds utilized		
	Ammonium salt	Nitrate	Nitrite
<i>M. tuberculosis</i>	+	-	-
<i>M. bovis</i>	+	-	-
<i>M. kansasii</i>	+	+	-
<i>M. marinum</i>	+	+	-
<i>M. avium</i>	+	+	-
<i>M. intracellulare*</i>	+	+	-
<i>M. scrofulaceum*</i>	+	+	-
<i>M. gordonae*</i>	+	+	-
<i>M. phlei</i>	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+
<i>M. fortuitum</i>	+	+	+

a) Cited from Tsukamura (1966)<sup>29)</sup>.

\* These species were shown as nonphotochromogens, scotochromogens (multiple patient-isolates), and scotochromogens (sporadic patient-isolates), respectively, in the previous paper (Tsukamura (1966)<sup>29)</sup>).

Table 3. Relationship between Growth Rate and Chemical Structure of Organic Acids Which Are Utilized as Sole Carbon Source in the Presence of Ammoniacal Nitrogen<sup>a)</sup>

Species	Organic acids utilized as the sole source of carbon <sup>b)</sup>			
	2-carbon	3-carbon	4-carbon	6-carbon
<i>M. tuberculosis</i>	-	-	-	-
<i>M. bovis</i>	-	-	-	-
<i>M. kansasii</i> <sup>c)</sup>	+	+	-	-
<i>M. marinum</i>	+	+	-	-
<i>M. avium</i>	+	+	-	-
<i>M. intracellulare</i>	+	+	-	-
<i>M. scrofulaceum</i>	+	+	-	-
<i>M. nonchromogenicum</i>	+	+	-	-
<i>M. gastri</i>	+	+	-	-
<i>M. phlei</i>	+	+	+	-
<i>M. aurum</i>	+	+	+	-
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>abscessus</i>	+	+	+	-
<i>M. chelonae</i> subsp. <i>chelonae</i>	+	+	-	+
<i>M. parafortuitum</i>	+	+	+	+
<i>M. smegmatis</i>	+	+	+	+

a) Cited from Tsukamura (1968)<sup>30)</sup>.

b) 2-carbon organic acid: acetic acid. 3-carbon organic acid: pyruvic acid. 4-carbon organic acids: succinic acid, malic acid, and fumaric acid. 6-carbon organic acid: citric acid.

c) Modified by the author for this review.

求が狭くかつ厳しく、寄生の必要性を示唆している。単一C源として利用される有機酸の種類を調べることは抗酸菌の同定に役に立つ。

### 3. 酵素活性検査による菌種鑑別

酵素活性測定も生化学的手法に含まれるが、以下、項

を改めて述べる。

抗酸菌の鑑別に最も早く酵素反応を利用したのは日本の戸田である (1926) (戸田: 結核菌と BCG (1944)<sup>31)</sup>より引用)。戸田は *M. tuberculosis* および *M. bovis* は大概 urease 陽性であつたが、*M. avium* は陰性であつたと

述べている。酵素反応を用いる菌種鑑別法のなかで、最も重要なのは Virtanen (1960)<sup>32)</sup> の硝酸還元反応, Bönicke(1962)<sup>33)</sup> の amidase tests, Kubica など(1961)<sup>34)</sup> および Wayne (1961)<sup>35)</sup> の arylsulfatase test である。

Virtanen<sup>32)</sup> は, *M. tuberculosis* は硝酸還元(+)であるが *M. bovis* と *M. avium* は (-)であることを示した。Virtanen<sup>32)</sup>をはじめ多くの研究者は, 形成された亜硝酸イオンの証明に Shinn 試薬を用いたが, 東村(1951)<sup>36)</sup> は Ehrlich 試薬を用いた。Tsukamura<sup>38)</sup> は多くの抗酸菌の硝酸還元反応を行なった結果, Runyon (1951)<sup>37)</sup> の Group II および Group III の特徴の一つとして硝酸還元反応 (-)をあげた<sup>38)</sup>。また, この反応は, Group I の *M. kansasii* (陽性)と *M. marinum* (陰性)の区別<sup>39)</sup>, Group IV の *M. fortuitum* (陽性)と *M. chelonae* (陰性)の区別<sup>40)</sup>, *M. szulgai* を他の Group II の菌から区別するためにも用いられる<sup>41)</sup>。一般に, 硝酸還元反応と言えば, Virtanen<sup>32)</sup> の文献が引用されるが, わずか1年遅れで Boisvert<sup>42)</sup> もほぼ同じ所見を報告している。

Amidase は amide を分解して NH<sub>3</sub> を産生する酵素で, Bönicke<sup>33)</sup> 以前にも幾つかの報告があるが, Bönicke によつて10種の amidase 反応が「パターン」として用いられてはじめて同定に威力を発揮したと言つてよい。Bönicke が用いた amidases は次の10種で, 菌種によつて amidases の「パターン」が異なつている: (1)

acetamidase; (2) benzamidase; (3) urease; (4) isonicotinamidase; (5) nicotinamidase; (6) pyrazinamidase; (7) salicylamidase; (8) allantoinase; (9) succinamidase; (10) malonamidase. 表4は Bönicke<sup>33)</sup> の成績を Tsukamura<sup>43)</sup> が補つたものである。

Arylsulfatase (3日反応)は *M. fortuitum* に特異的として発表されたが<sup>34)35)</sup>, その後, *M. fortuitum* と *M. chelonae* が区別されるようになったので, 現在では, *M. fortuitum* と *M. chelonae* に特異性の高い反応と言える。ただし, 新規分離の土壤抗酸菌には上記以外で3日反応陽性のものがまればない。

Tsukamura<sup>44)</sup> は1961年に土壤抗酸菌の2種が *p*-aminosalicylate および salicylate を分解して catechol を形成することを発見した。この catechol から更に黒色物質が形成される。この反応の至適 pH は7.1で, 反応はモノオード錯酸, azide, 重金属イオンによつて阻害された。この反応は, 後に早石など<sup>45)</sup> によつて salicylate hydroxylase と名づけられた酵素によるものと思われる。Tsukamura<sup>46)47)</sup> は1965年に, この反応が *M. fortuitum* に特異的であると報告したが, その後の分類学の進歩により, 現在では *M. fortuitum* および *M. chelonae* に特異的と考えられる<sup>48)</sup>。なお, 土壤から分離される迅速発育性 scotochromogenic *Mycobacterium* である *M. obuense* もこの作用を示す<sup>49)</sup>。1961年に Tsukamura<sup>44)</sup> が salicylate→catechol の実験に使用した菌は *M. fortuitum* と *M. obuense* であつたと分かつた。

Table 4. Amidase Pattern of Various Mycobacterial Species<sup>a)</sup>

Species	Amidase pattern <sup>b)</sup>									
<i>M. tuberculosis</i>	3	5	6							
<i>M. bovis</i>	3									
<i>M. kansasii</i>	3	5								
<i>M. avium</i>		5	6							
<i>M. intracellulare</i>		5	6							
<i>M. scrofulaceum</i>	3	5	6	or	0					
<i>M. gordonae</i>	3			or	0					
<i>M. nonchromogenicum</i>		5	6							
<i>M. terrae</i>				0						
<i>M. gastri</i>		3	5							
<i>M. fortuitum</i>	1	3	5	6	8	or	1	3	8	
<i>M. phlei</i>		3	5	6						
<i>M. thermoresistibile</i>		3	5	6						
<i>M. flavescens</i>		3	5	6						
<i>M. parafortuitum</i>	1	3	5	6						
<i>M. smegmatis</i>	1	2	3	4	5	6		9		

a) Prepared by the present author citing from Bönicke (1962)<sup>33)</sup> and from Tsukamura (1975)<sup>43)</sup>.

b) 1. Acetamidase; 2. benzamidase; 3. urease; 4. isonicotinamidase; 5. nicotinamidase; 6. pyrazinamidase; 7. salicylamidase; 8. allantoinase; 9. succinamidase; 10. malonamidase.

Wayne et al. (1964)<sup>50)</sup> は Tween 水解の有無によつて、Group II と Group III の病原性菌と非病原性菌を分けられることを発見した。病原性菌は水解 (-) であり、非病原性菌は水解 (+) である。この反応は実用的価値が最も高いものの一つである。

抗酸菌は元来すべて catalase 反応陽性であるから、半定量的方法しか利用価値がない。Kubica et al. (1966)<sup>51)</sup> は catalase の半定量的測定法を発表した。catalase 反応の結果は、半定量法であるだけに決定的な意義があるとは言い難いが、反応陽性の場合には参考となる。例えば、*M. avium* complex のなかで *M. avium* と *M. intracellulare* は (-) であるが *M. scrofulaceum* は (+) である。ただし、かなりの例外がある。

そのほか、有用な酵素反応としては acetylnaphthylamine esterases<sup>52)</sup>, acid phosphatase<sup>53)</sup>, 耐熱性 acid phosphatase<sup>54)</sup>, diamine-oxydase<sup>55)</sup> などがある。

#### 4. 生物学的性状による菌種鑑別

抗酸菌の発育速度に差があること、発育温度域に差があること、集落形態に R 型と S 型があることなどは、古くから知られている<sup>18)</sup>。発育速度および発育温度域を検査するには、分離集落を生じる程度の薄い菌液を接種して判定するのが正確であることは言うまでもない (Bergey's Manual 第 8 版 (1974)<sup>56)</sup> では発育速度の検査にこの方法を推奨している)。これは耐性検査 (耐性検査とは薬剤含有培地での発育速度を検査することである) で "actual count 法"<sup>57)58)</sup> がより正確な方法であるのと全く同じ理由による。しかし、日常の同定法で、"actual count 法" で発育速度や発育温度の検査を行なうことはあまりにも面倒である。同定には通常 1 白金耳接種を用いても用が足りると思われる。ただし、その際、判定日数を多少修正する必要がある (抗酸菌の場合、3 日で豊富な膜状発育があれば迅速発育菌と判定する——Bergey's Manual は "actual count 法" で 7 日判定となつている)。

集落形態については、菌株保存中に屢々 R → S の変異が起こることに注意する必要がある。例えば、*M. smegmatis* は R 型と記されていることがあるが、Tsukamura<sup>59)</sup> によれば *M. smegmatis* の新鮮分離株はことごとく S 型であつたという。

光発色性は Runyon (1959)<sup>37)</sup> の群別以後、必須の検査項目となつている。Tsukamura (1962)<sup>60)</sup> によれば *M. kansasii* によつて光合成される色素は主として  $\beta$ -carotene で、光合成に際しては酸素を必要とするという。Wayne & Doubek (1964)<sup>61)</sup> も酸素の必要性について述べている。更に、東村・東村 (1966)<sup>62)</sup> は光合成には酸素の供給とともに glucose, glycerol または pyruvate を必要とすると述べている。

菌の形状も菌種の区別に役立つ<sup>56)63)64)</sup>。*M. kansasii* や

*M. gordonae* は長い桿菌で菌体内顆粒を示すのが特徴である。

#### 5. 種々の化合物に対する感受性テストによる菌種鑑別

##### 1) Pentaheterocyclic carboxylic acid hydrazides

Bönicke (1958)<sup>65)66)</sup> は *M. tuberculosis* は pentaheterocyclic carboxylic acid hydrazides に耐性であるが、*M. bovis* は感性であることを見出した。これは *M. tuberculosis* と *M. bovis* とを鑑別する実用的な方法で、thiophene-2-carboxylic acid hydrazide (TCH) 耐性は niacin test および硝酸還元と並んで広く使用されている。

##### 2) *p*-Nitrobenzoic acid (PNB)

Tsukamura & Tsukamura (1964)<sup>67)</sup> は *M. tuberculosis* と *M. bovis* は卵培地 (小川培地または Löwenstein-Jensen medium) で PNB (0.5mg/ml) に感性であるが、他の抗酸菌は耐性であることを見出した。この方法は英国および国療非定型抗酸菌症共同研究班で使用されている。例外として、少数の *M. kansasii* と *M. marinum* の株が PNB 培地に発育しない。これらを拾い上げるために、Tsukamura (1970)<sup>68)</sup> は  $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$  (62.5 $\mu\text{g}$ /ml) 培地を併用することを推奨している。しかし、日本分離の *M. kansasii* および *M. marinum* では PNB 培地に発育しない株はない (筆者の未発表成績)。

##### 3) Hydroxylamine ( $\text{NH}_2\text{OH}\cdot\text{HCl}$ ) (HA)

Tsukamura (1965)<sup>69)</sup> は HA 耐性 test が抗酸菌鑑別に役立つことを報告した。*M. tuberculosis* と *M. bovis* が最も感受性が高く (62.5 $\mu\text{g}$ /ml 感性)、次いで *M. kansasii*, *M. xenopi* および *M. gastri* が比較的感受性が高く (250 $\mu\text{g}$ /ml 感性)、他の遅発育性菌は 250 $\mu\text{g}$ /ml に耐性である<sup>28)69)</sup>。迅速発育菌では *M. fortuitum* と *M. chelonae* のみが 500 $\mu\text{g}$ /ml 耐性で、他は感性である<sup>2)48)69)70)</sup>。なお、Wayne et al. (International Working Group of Mycobacterial Taxonomy = IWGMT)<sup>71)</sup> は *M. tuberculosis* と他の抗酸菌を区別するときの niacin test の欠点を補うために HA 耐性 test (250 $\mu\text{g}$ /ml) を行なうことをすすめている。

##### 4) Sodium salicylate (SA)

Tsukamura (1962)<sup>72)</sup> は *M. tuberculosis* と *M. bovis* とは SA (0.5mg/ml) に感性であるが、他の抗酸菌はこれに耐性であることを見出し、結核菌 (*M. tuberculosis* および *M. bovis*) と他の抗酸菌の鑑別に使用できるとした。

##### 5) 抗結核剤特に ethambutol (EB) と cycloserine (CS)

後述するように、抗結核剤に対する耐性パターンは同定法の system に組み入れられることが多い。しかし、個々の薬剤について際立つた意味づけがなされているものがある。

東村 (1970)<sup>73)</sup> は種々の抗酸菌の EB 感受性を test し

た結果、Group II と Group III の抗酸菌では Tween 水解と関連性があることを見出した。すなわち、*M. avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum*, *M. xenopi* は EB 5 $\mu$ g/ml に耐性であるが、*M. nonchromogenicum* complex, *M. gastri* および *M. gordonae* は感性であつた。

CS も *M. fortuitum* complex を他の迅速発育抗酸菌から区別するのに役立つ。迅速発育抗酸菌のなかで *M. fortuitum* complex だけが、卵培地中で CS 500 $\mu$ g/ml に耐性である<sup>74)75)</sup>。

Rifampicin(RFP) は rifamycin SV の誘導体である。*M. kansasii* と *M. gastri* はともに RFP 25 $\mu$ g/ml に感性である。しかし、rifamycin SV に対しては *M. kansasii* のみが感性である<sup>76)</sup>。*M. szulgai* も RFP 25 $\mu$ g/ml に感性であるのが一つの特徴である<sup>41)</sup>。

Tween 水解と EB 耐性の tests を併用することは、Group II および Group III の抗酸菌を同定するうえで有用である。*M. szulgai* は、はじめ特異な脂質パターンを示す菌として筆者の所に送られてきたが、Tween 水解だけでは *M. scrofulaceum* と区別し難かつた。しかし、この菌が EB 感性である点で区別できた。その他、硝酸還元反応陽性も重要な区別として分かり、Marks, Jenkins & Tsukamura (1972)<sup>41)</sup> の名によつて新菌種として報告された事情がある。

#### 6) 色素

Picric acid(PA) (0.1%) 耐性の有無 (Sauton 寒天培地) が遅発育菌 (感性) と迅速発育菌 (耐性) の区別に役立つことは Tsukamura (1965)<sup>26)</sup> によつて報告された。Tsukamura (1976, 1980)<sup>28)77)</sup> は後に PA 濃度を0.2%に改めた。迅速発育抗酸菌中 *M. chelonae* subsp. *chelonae* のみが感性であるので、この菌の同定に役立つ<sup>48)77)</sup>。

Jones & Kubica (1965)<sup>78)</sup> も種々の色素に対する感受性 (malachite green, methyl violet, pyronin Y, eosin Y, biebrick scarlet) が抗酸菌の鑑別に役立つと報告している。

7) MacConkey 寒天培地, NaCl 耐性, Iron Uptake  
Jones & Kubica (1964)<sup>79)</sup> は *M. fortuitum* のみが MacConkey 寒天培地に発育したと述べている。しかし、筆者の追試によれば *M. fortuitum* でもこれに発育しないものが多い<sup>70)</sup>。

遅発育抗酸菌と迅速発育抗酸菌を分かつ方法として、先に PA 寒天培地<sup>26)77)</sup> および NaNO<sub>2</sub> 寒天培地<sup>27)</sup> をあげたが、これと同じ意味をもつものとして、Kestle et al.<sup>80)</sup> の 5% NaCl 耐性(卵培地)および Tison et al.<sup>81)</sup> の iron uptake がある。遅発育菌は両者ともに陰性で、迅速発育菌は陽性である。

### 抗酸菌の同定法

前章では抗酸菌の菌種鑑別法について述べた。上述の

方法はあくまで菌種の鑑別法であつて菌種同定法ではない。菌種の同法には、これらの方法を組み合わせる必要がある。しかし、先に触れたように、現在、国際的に合意された同定法というものは存在しない。在るのは nationalistic な同定法または個人的な同定法だけである。

同定法としてはまずメキシコの Bojalil et al. (1962)<sup>23)</sup> および Cerbón & Trujillo (1963)<sup>82)</sup> のものを挙げねばならない。前者は C 源 tests と生物学的性状を組み合わせたもの、後者は C 源 tests とその前年に出た Bönicke (1962)<sup>33)</sup> の amidase tests を組み合わせたものである。発表当時としては最高水準のものであつたが、現在では歴史的なものと言えよう。

ドイツの同定法としては Bönicke (1962)<sup>33)</sup> の amidase tests がある。これは元々同定法として発表された。今日からみると amidase tests だけで同定を行なうわけにはゆかないが、当時としては画期的なものであつた。amidase tests は今日でも多くの研究者の同定法に組み入れられている。東ドイツの Käppler (1968, 1971)<sup>83)-85)</sup> の同定法は C 源 tests, 生物学的性状のほかは esterases, phosphatase, amidases の酵素反応を組み合わせたものである。また、Iwainsky & Käppler (1974)<sup>86)</sup> は代謝の面からみた菌種の区別法についてモノグラフで詳述している。これには同定に用いる種々の手法が集められている。

米国の学者の意見は、Bergey's Manual (1974)<sup>56)</sup> および Manual of Clinical Microbiology (1980)<sup>87)</sup> に集約されていると言つてよからう。これらは、前者は Runyon, Wayne & Kubica, 後者は Runyon, Karlson, Kubica & Wayne の個人的著述であるが、米国内で他に有力な同定法の system を発表した人はいないから、米国を代表する意見と言つてよい。この同定法では発育温度域、酵素反応のほかは、色素に対する感受性 tests ならびに MacConkey 寒天培地のように米国の業績を多く取り入れているのが特徴である。このほかに Kestle et al. (1967)<sup>80)</sup>, Kubica et al. (1975)<sup>88)</sup> のものがあるが内容は類似している。

ベルギーの Pattyn & Portaels (1972)<sup>89)</sup> の同定法は、集落形態を詳細に観察し、この所見を重視しているのが特徴である。ただし、集落形態を微に入り細に入り分類してあるので追試が困難である。

英国の Marks (1973, 1975, 1976)<sup>90)-92)</sup> のものは簡便同定法に当たるもので、発育温度域と抗結核剤感受性 tests が主体となつている。screening には PNB 培地を取り入れられている。Marks の system は簡単であるにもかかわらず、著者の彼との共同研究の経験によれば、はなはだ正確な同定が可能である点、驚嘆に値する。

日本では Tsukamura (1966, 1967)<sup>24)25)</sup> の同定法がある。これも発表当時は最新のものであつたが、その後の抗酸菌分類学の進歩によつて今日では陳腐の感を免れえ

ない。新しいものでは矢張り Tsukamura(1975)<sup>43)</sup> のものがある。これは現在でも著者の研究室で使用している方法で、これ以後、追加した性状は42°C発育と菌形状所見のみである。著者の方法は、発育温度域、種々の化合物に対する感受性 tests, C源 tests, 酵素反応のほか、独特なものとしてN化合物のN源C源としての同時利用の tests が入っている。このNC源利用パターンは迅速発育性菌の同定に非常に有効である。要するに、簡単な手法で可及的多くの tests を行なうよう心掛けたのが特徴である。最新のものには、遅発育性抗酸菌 (Tsukamura(1976)<sup>28)</sup>), 迅速発育抗酸菌 (Tsukamura(1981)<sup>93)</sup>; Tsukamura et al.(1981)<sup>94)</sup> の3部作がある。後者には104性状が用いられている。

一応、日本の研究者の意見を集約したものに日本結核病学会抗酸菌分類委員会(1976)<sup>95)</sup> の同定法がある。これは日本の研究者の業績を十分考慮して作られたもので、米国における Bergey's Manual<sup>56)</sup> および Manual of Clinical Microbiology<sup>87)</sup> の同定法に匹敵するものである。今日もなお十分通用する方法と思われる。

日本の簡便同定法としては、Tsukamura(1971)<sup>96)</sup>、衛生検査指針(1972)<sup>97)</sup>、東村(1977)<sup>98)</sup>、内藤ほか(1979)<sup>99)</sup> その他のものがある。衛生検査指針<sup>97)</sup>の方法は、このまま使用すると誤りを犯す可能性が多い<sup>100)</sup>。東村の1971年のものも今日ではやや古くなっている。1977年のものが筆者の現在の意見を代表している。

以上、各国の同定法を簡単に展望したが、このほかに同定法としてはまとめられていないがIWGMTの一連の研究がある (Wayne et al.(1971)<sup>101)</sup>; Kubica et al.(1972)<sup>102)</sup>; Meissner et al.(1974)<sup>103)</sup>; Saito et al.(1977)<sup>104)</sup>; Wayne et al.(1978)<sup>105)</sup>)。これらの成績は、そのまま同定法として使用できるものである。IWGMTは、このほかに、再現性の高い11の tests を発表し、新菌種記載の際の必須検査法としている (Wayne et al.(1974)<sup>106)</sup>; Wayne et al.(1976)<sup>71)</sup>)。

抗酸菌の鑑別法に関する文献は本報で取り上げたもの以外にも多数ある。しかし、筆者の個人的見解で取捨した。また追試的な研究はすべて省略した。このほか、同定法としては脂質分析による方法および免疫学的方法についても述べるべきであろう。しかし、現在、これらの方法は分類学の研究には重要な役割を果たしているが、実際の同定には役立っていない。唯一つ、Marksおよびその協同研究者<sup>107)~111)</sup>の方法のみが同定の実用に供されている。脂質分析は将来、抗酸菌同定の重要な手段となる可能性があると思われる。同定法に関するこれからの問題は、菌種鑑別のための種々の方法を比較して取捨選択してゆくことであろう。*M. fortuitum* complex の screening に関する筆者ら<sup>70)</sup>の仕事は、その小さい第一歩である。

## 文 献

- 1) 東村道雄: 抗酸菌の分類学. II. 抗酸菌の菌種一群別の試案, 結核, 55: 341, 1980.
- 2) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: A practical system for identification of *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium kansasii*, and *Mycobacterium fortuitum*. Scand J Respir Dis, 48: 58, 1967.
- 3) Tsukamura, M.: An approach to numerical identification of bacterial species, J Gen Microbiol, 95: 207, 1976.
- 4) Koch, R.: Die Ätiologie der Tuberkulose. Berliner Klin Wochenschr, 15: 221, 1882.
- 5) Wells, H. G. and Long, E. R.: The Chemistry of Tuberculosis, 2nd edition, The Williams & Wilkins, Baltimore, p. 1-481, 1932.
- 6) Long, E. R.: A study in fundamentals of the nutrition of the tubercle bacillus: the utilization of some amino acids and ammonium salts, Amer Rev Tuberc, 3: 86, 1920.
- 7) Long, E. R.: The nutrition of acid-fast bacteria, Amer Rev Tuberc, 5: 857, 1922.
- 8) Braun, H. et al.: Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien. I., Biochem Zeitschr, 145: 381, 1924.
- 9) Kondo, S.: Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien. III. Mitteilung. Die Nahrungsbedürfnisse des Hühnertuberkelbazillus; sein Wachstum beim Aufbau aus einfachen chemischen Verbindungen, Biochem Zeitschr, 153: 302, 1924.
- 10) Kondo, S.: Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien. IV. Mitteilung. Der Verwendungsstoffwechsel der Tuberkelbazillen des Typus humanus und Typus bovinus, Biochem Zeitschr, 155: 148, 1925.
- 11) Merrill, M. H.: Studies on carbon metabolism of organisms of the genus *Mycobacterium*. II. Utilization of organic compounds in a synthetic medium, J Bacteriol, 21: 361, 1931.
- 12) Thomson, H. M.: Studies of saprophytic acid-fast bacteria, Amer Rev Tuberc, 26: 162, 1932.
- 13) Gordon, R. E.: The classification of acid-fast bacteria, J Bacteriol, 34: 617, 1937.
- 14) Gordon, R. E. and Hagan, W. A.: The classification of acid-fast bacteria. II., J Bacteriol, 36: 39, 1938.
- 15) Gordon, R. E. and Smith, M. M.: Rapidly growing, acid fast bacteria. I. Species' description of *Mycobacterium phlei* Lehmann and Neumann and *Mycobacterium smegmatis* (Trevisan) Lehmann and Neumann, J Bacteriol, 66: 41, 1953.
- 16) Gordon, R. E. and Smith, M. M.: Rapidly growing, acid fast bacteria. II. Species' description of *Mycobacterium fortuitum* Cruz, J Bacteriol, 69: 502, 1955.
- 17) Gordon, R. E. and Mihm, J. M.: A comparison of four species of mycobacteria, J Gen Micro-



- biol, 21 : 736, 1959.
- 18) Gordon, R. et al.: Genus I. *Mycobacterium* Lehmann and Neumann, 1896. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 7th edition", R. S. Breed, E. G. D. Murray, and N. R. Smith (ed), The Williams & Wilkins, Baltimore, p. 694-707, 1957.
  - 19) Pope, H. and Smith, D. T.: Synthesis of B-complex vitamins of tubercle bacilli when grown on synthetic media, Amer Rev Tuberc, 54 : 559, 1946.
  - 20) Konno, K.: New chemical method to differentiate human tubercle bacilli from other mycobacteria, Science, 124 : 985, 1956.
  - 21) Sneath, P. H. A.: Some thoughts on bacterial classification, J Gen Microbiol, 17 : 184, 1957.
  - 22) Sneath, P. H. A.: The application of computers to taxonomy, J Gen Microbiol, 17 : 201, 1957.
  - 23) Bojalil, L. F. et al.: Adansonian classification of mycobacteria, J Gen Microbiol, 28 : 333, 1962.
  - 24) Tsukamura, M.: Adansonian classification of mycobacteria, J Gen Microbiol 45 : 253, 1966.
  - 25) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, Tubercle, 48 : 311, 1967.
  - 26) Tsukamura, M.: Differentiation of mycobacteria by picric acid tolerance, Amer Rev Respir Dis, 92 : 491, 1965.
  - 27) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Differentiation of mycobacteria by susceptibility to nitrite and propylene glycol, Amer Rev Respir Dis, 98 : 505, 1968.
  - 28) Tsukamura, M.: Numerical classification of slowly growing mycobacteria, Int J Syst Bacteriol, 26 : 409, 1976.
  - 29) Tsukamura, M.: Differentiation of mycobacteria by utilization of nitrogen compounds for growth, Japan J Tuberc, 13 : 27, 1966.
  - 30) Tsukamura, M.: Relationship between the growth rate of mycobacteria and their ability to utilize organic acids as the sole source of carbon, Japan J Microbiol, 12 : 534, 1968.
  - 31) 戸田忠雄: 結核菌と BCG (抗酸菌学), 南山堂, 東京, p. 1~369, 1944.
  - 32) Virtanen, S.: A study of nitrate reduction by mycobacteria. The use of the nitrate reduction test in the identification of mycobacteria, Acta Tuberc Scand Suppl, 48 : 1-119, 1960.
  - 33) Bönicke, R.: L'identification des mycobactéries à l'aide de méthodes biochimiques, Bull Union Int contre Tuberc, 32 : 13, 1962.
  - 34) Kubica, G. P. and Rigdon, A. L.: The arylsulfatase activity of acid-fast bacilli. III. Preliminary investigation of rapidly growing acid-fast bacilli, Amer Rev Respir Dis, 83 : 737, 1961.
  - 35) Wayne, L. G.: Recognition of *Mycobacterium fortuitum* by means of a three-day phenolphthalein sulfatase test, Amer J Clin Pathol, 36 : 185, 1961.
  - 36) 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.
  - 37) Runyon, E. H.: Anonymous mycobacteria in pulmonary disease, Med Clin North Amer, 43 : 273, 1959.
  - 38) Tsukamura, M.: Identification of Group II scotochromogens and Group III nonphotochromogens of mycobacteria, Tubercle, 50 : 51, 1969.
  - 39) Kazda, J. and Hampl, H.: Ueber den Nachweis einiger Reduktasen zur Differenzierung der Mykobakterien, Zentralbl f Bakteriol Parasitenk Infek und Hyg, I Orig., 197 : 362, 1965.
  - 40) Takeya, K. et al.: Relationship between *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium runyonii*, Amer Rev Respir Dis, 96 : 532, 1967.
  - 41) Marks, J. et al.: *Mycobacterium szulgai*-a new pathogen, Tubercle, 53 : 210, 1972.
  - 42) Boisvert, H.: L'identification des mycobactéries par l'épreuve de réduction des nitrates, Ann Inst Pasteur, 100 : 352, 1961.
  - 43) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, The National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan, p. 1-75.
  - 44) Tsukamura, M.: Formation of a red color product from PAS by certain mycobacteria, Japan J Tuberc, 9 : 70, 1961.
  - 45) Katagiri, M. et al.: Salicylate hydroxylase, a monooxygenase requiring flavin adenine dinucleotide, J Biol Chem, 240 : 3413, 1965.
  - 46) Tsukamura, M.: Salicylate degradation test for differentiation of *Mycobacterium fortuitum* from other mycobacteria, J Gen Microbiol, 41 : 317, 1965.
  - 47) Tsukamura, M.: Conversion of salicylate to catechol by *Mycobacterium fortuitum*, J Gen Microbiol, 41 : 317, 1965.
  - 48) Tsukamura, M.: Differentiation between *Mycobacterium abscessus* and *Mycobacterium borstelense*, Amer Rev Respir Dis, 101 : 426, 1970.
  - 49) Tsukamura, M. and Mizuno, S.: *Mycobacterium obuense*, a rapidly growing scotochromogenic *Mycobacterium* capable of forming a black product from p-aminosalicylate and salicylate, J Gen Microbiol, 68 : 129, 1971.
  - 50) Wayne, L. G. et al.: Classification and identification of mycobacteria. I. Tests employing Tween 80 as substrate, Amer Rev Respir Dis, 90 : 588, 1964.
  - 51) Kubica, G. P. et al.: Differential identification of mycobacteria. Tests on catalase activity, Amer Rev Respir Dis, 94 : 400, 1966.
  - 52) Käppler, W.: Acetyl-Naphthylamin-Esterasen-Aktivität von Mykobakterien, Beitr Klin Tuberk, 130 : 1, 1965.
  - 53) Käppler, W.: Zur Differenzierung von Mycobakterien mit dem Phosphatase-Test, Beitr Klin Tuberk, 130 : 223, 1965.
  - 54) Saito, H. et al.: A new heat-stable acid phosphatase test for mycobacteria, Amer Rev Respir Dis, 114 : 407, 1976.
  - 55) Bönicke, R. and Nolte, H.: Diamin-Oxydasen

- in Mycobakterien. I. Mitteilung: Möglichkeiten der Differenzierung einiger *Mycobacterium*-Arten mit Hilfe des Diamin-Oxydase-Nachweis, Zentralbl f Bakteriol Parsitenk Infk u Hig, I Orig, 202 : 479, 1967.
- 56) Runyon, E. H., Wayne, L. G. and Kubica, G. P.: Family II. *Mycobacteriaceae* Chester 1897, 63. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th edition, R. E. Buchanan, and N. E. Gibbons, (ed), The Williams & Wilkins, Baltimore, p. 681-701, 1974.
  - 57) 東村道雄: Kanamycin の耐性検査, 医学と生物学, 49 : 87, 1958.
  - 58) Tsukamura, M.: "Actual count" method for the resistance test of tubercle bacilli, Japan J Tuberc, 12 : 46, 1964.
  - 59) Tsukamura, M.: Properties of *Mycobacterium smegmatis* freshly isolated from soil, Japan J Microbiol, 20 : 355, 1976.
  - 60) Tsukamura, M.: Carotenoids of photochromogens of "unclassified mycobacteria", J Biochem, 51 : 169, 1962.
  - 61) Wayne, L. G. and Doubke, J. R.: The role of air in the photochromogenic behavior of *Mycobacterium kansasii*, Amer J Clin Pathol, 42 : 431, 1964.
  - 62) 東村純雄・東村道雄: *Mycobacterium kansasii* による  $\beta$ -carotene 光合成, 医学と生物学, 72 : 40, 1966.
  - 63) Arima, J. et al.: Étude, en microscopie optique et électronique, des "échelles" des mycobactéries photochromogènes, Compt Rend Séanc Soc Biol, 166 : 480, 1972.
  - 64) 村田浩他: 抗酸菌の形態と菌種 の関係, 結核, 53 : 459, 1978.
  - 65) Bönicke, R.: Die Differenzierung humaner und boviner Tuberkelbakterien mit Hilfe von Thiophen-2-Carbonsäurehydrazid, Naturwissenschaften, 45 : 392, 1958.
  - 66) Bönicke, R.: Ueber die tuberkulostatische Wirksamkeit pentaheterocyclischer Carbonsäurehydrazide, Zeitschr f Hyg, 145 : 263, 1958.
  - 67) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by p-nitrobenzoic acid susceptibility, Tubercle, 45 : 64, 1964.
  - 68) Tsukamura, M.: Screening for atypical mycobacteria, Tubercle, 51 : 280, 1970.
  - 69) Tsukamura, M.: Differentiation of mycobacteria by susceptibility to hydroxylamine and 8-azaganine, J Bacteriol, 90 : 556, 1965.
  - 70) 東村道雄・村田浩: *Mycobacterium fortuitum* complex を他の迅速発育性抗酸菌から区別する方法としての MacConkey 寒天培地と  $\text{NH}_2\text{OH}$  培地の比較, 結核, 56 : 263, 1981.
  - 71) 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, 26 : 311, 1976.
  - 72) Tsukamura, M.: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from mycobacteria by sodium salicylate susceptibility, Amer Rev Respir Dis, 86 : 81, 1962.
  - 73) 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.
  - 74) Hawkins, J. E. and McClean, V. R.: Comparative studies of cycloserine inhibition of mycobacteria, Amer Rev Respir Dis, 93 : 594, 1966.
  - 75) 東村純雄他: Cycloserine 感受性試験により *Mycobacterium fortuitum* を他抗酸菌から区別する方法, 日本細菌学雑誌, 22 : 18, 1967.
  - 76) Tsukamura, M.: Differentiation between *Mycobacterium kansasii* and *M. gastri*, J Gen Microbiol, 74 : 193, 1973.
  - 77) Tsukamura, M.: Usefulness of picric acid-Sauton agar medium for differentiating slowly growing mycobacteria from rapidly growing mycobacteria, Tubercle, 61 : 33, 1980.
  - 78) Jones, W. D., Jr. and Kubica, G. P.: The differential grouping of slowly growing mycobacteria based on their susceptibility to various dyes, Amer Rev Respir Dis, 91 : 613, 1965.
  - 79) Jones, W. D. and Kubica, G. P.: The use of MacConkey's agar for differential typing of *Mycobacterium fortuitum*, Amer J Med Technol, 30 : 187, 1964.
  - 80) Kestle, D. G. et al.: Differential identification of mycobacteria. II. Subgroups of Groups II and III (Runyon) with different clinical significance, Amer Rev Respir Dis, 95 : 1041, 1967.
  - 81) Tison, F. et al.: Un test simple d'étude des mycobactéries: la transformation du citrate de fer ammoniacal, Ann Inst Pasteur, 106 : 797, 1964.
  - 82) Cerbón, J. and Trujillo, A.: A comparison for the classification of mycobacteria. Utilization of carbon sources and deamidasetests, Amer Rev Respir Dis, 88 : 546, 1963.
  - 83) Käßler, W.: Zur Taxonomie der Gattung *Mycobacterium*. I. Klassifizierung schnell wachsender Mykobakterien, Zeitschr f Tuberk und Erk Thoraxorg, 129 : 311, 1968.
  - 84) Käßler, W.: Zur Taxonomie der Gattung *Mycobacterium*. II. Klassifizierung langsam wachsender Mykobakterien, Zeitschr f Tuberk und Erk Thoraxorg, 129 : 321, 1968.
  - 85) Käßler, W.: Beitrag zur Artbestimmung von Mykobakterien, Zeitschr f Erk Atmungsorg, 135 : 39, 1971.
  - 86) Iwainsky, H. and Käßler, W.: Mykobakterien, Biochemie und biochemische Differenzierung, Johann Ambrosius Barth, Leipzig, p. 1-270, 1974.
  - 87) Runyon, E. H. et al.: Chapter 14. *Mycobacterium*. In "Manual of Clinical Microbiology, 3rd edition," E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr. and J. P. Truant (ed), American Society for

- Microbiology, Washington, [D. C., p.150-179, 1980.
- 88) Kubica, G. P. et al.: Laboratory services for mycobacterial diseases, Amer Rev Respir Dis, 112 : 773, 1975.
  - 89) Pattyn, S. R. and Portaels, F.: Identification and clinical significance of mycobacteria, Zentralbl f Bakteriell Parasitenk Infek u Hyg, I Orig, A, 219 : 114, 1972.
  - 90) Marks, J.: Identification of mycobacteria as a clinical service, Ann Soc Belge Med Trop, 53 : 247, 1973.
  - 91) Marks, J.: A new practical classification of the mycobacteria, J Med Microbiol, 9 : 253, 1975.
  - 92) Marks, J.: A system for the examination of tubercle bacilli and other mycobacteria, Tubercle, 57 : 207, 1976.
  - 93) 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.
  - 94) 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.
  - 95) 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.
  - 96) Tsukamura, M.: A simple identification system for atypical mycobacteria, Japan J Tuberc & Chest Dis, 17 : 8, 1971.
  - 97) 厚生省監修: 衛生検査指針・結核菌検査指針, 日本公衆衛生協会, 東京, p. 31-75, 1972.
  - 98) 東村道雄: 簡便な抗酸菌の同定法, 日本胸部臨床, 36 : 278, 1977.
  - 99) 内藤祐子・久世文幸・前川暢夫: 抗酸菌の臨床細菌学的同定に関する一考察, 結核, 54 : 481, 1979.
  - 100) 東村道雄: 「結核菌検査指針」の「抗酸菌同定法」の問題点, 日本胸部臨床, 35 : 319, 1976.
  - 101) Wayne, L. G. et al.: A co-operative numerical analysis of scotochromogenic slowly growing mycobacteria, J Gen Microbiol, 66 : 255, 1971.
  - 102) Kubica, G. P. et al.: A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria, J Gen Microbiol, 73 : 55, 1972.
  - 103) Meissner, G. et al.: A co-operative numerical analysis of nonscoto- and nonphotochromogenic slowly growing mycobacteria, J Gen Microbiol, 83 : 207, 1974.
  - 104) Saito, H. et al.: Cooperative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria The second report, Int J Syst Bacteriol, 27 : 75, 1977.
  - 105) Wayne, L. G. et al.: A co-operative numerical analysis of *Mycobacterium gastri*, *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium marinum*, J Gen Microbiol, 109 : 319, 1978.
  - 106) Wayne, L. G. et al.: Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: Tests for pigment, urease, resistance to sodium chloride, hydrolysis of Tween 80, and  $\beta$ -galactosidase, Int J Syst Bacteriol, 24 : 412, 1974.
  - 107) Marks, J. and Szulga, T.: Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification; technical procedures; *Mycobacterium fortuitum*, Tubercle, 46 : 400, 1965.
  - 108) Szulga, T. et al.: Thin-layer chromatography mycobacterial lipids as an aid to classification; *Mycobacterium kansasii*; and *Mycobacterium marinum* (*balnei*), Tubercle, 47 : 130, 1962.
  - 109) Marks, J. et al.: Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aid to classification: technical improvements: *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare* (Battey bacilli), Tubercle, 52 : 219, 1971.
  - 110) Jenkins, P. A. et al.: Lipid chromatography and seroagglutination in the classification of rapidly growing mycobacteria, Amer Rev Respir Dis, 103 : 179, 1971.
  - 111) Jenkins, P. A. et al.: Thin-layer chromatography of mycobacterial lipids as an aide to classification: the scotochromogenic mycobacteria including *Mycobacterium scrofulaceum*, *M. xenopi*, *M. aquae*, *M. gordonae*, *M. flavescens*, Tubercle, 53 : 118, 1972.