

総 説

結核菌と他の抗酸菌を区別するための
パラニトロ安息香酸培地 (PNB 培地)

—非定型抗酸菌の Screening—

東 村 道 雄

国立療養所中部病院内科

受付 昭和 59 年 2 月 29 日

P-NITROBENZOIC ACID MEDIUM (PNB MEDIUM) AS AN AID TO DIFFERENTIATE
TUBERCLE BACILLI FROM OTHER MYCOBACTERIA (A REVIEW)

Michio TSUKAMURA*

(Received for publication February 29, 1984)

The PNB medium is an egg medium (Ogawa egg medium or Löwenstein-Jensen medium) containing 0.5 mg of p-nitrobenzoic acid per ml⁹⁾. To prepare it, p-nitrobenzoic acid is dissolved in propylene glycol at a concentration of 25 mg/ml and one volume of this solution is added to 50 volumes of egg medium before sterilization. The medium serves for differentiating tubercle bacilli from other mycobacteria. *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* and *M. microti* do not grow on this medium after incubation at 37°C for 3 weeks, while all other mycobacteria do grow¹⁰⁾¹⁶⁾¹⁸⁾. The medium is useful for differentiating non-tuberculous mycobacteria, including niacin-positive *M. simiae* strains and niacin positive variants of other species, from the *M. tuberculosis* complex and for differentiating the *M. tuberculosis* complex strains, including niacin negative variants, from other mycobacteria (Table 5).

Keywords : p-Nitrobenzoic acid-Ogawa egg medium, PNB medium, Screening for atypical mycobacteria

キーワードズ : パラニトロ安息香酸・小川培地, PNB 培地, 非定型抗酸菌のスクリーニング

結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) を他の抗酸菌から区別する方法として最も広く用いられているのは niacin test である。この方法は今野¹⁾が1956年に発表したもので、結核菌がほぼ特異的に多量の nicotinic acid (niacin) を産生することに基づいている。結核菌と他の抗酸菌との niacin 産生の差は定量的なものであって定性的なものではない²⁾。今野の仕事は、この前に Pope

and Smith³⁾が *M. tuberculosis* は niacin を産生するが、*M. bovis* は産生しないことを観察していたことに基づき、これを他の抗酸菌に適用したものである。当時、結核菌以外の抗酸菌による感染症——今日いう「非定型抗酸菌症」が問題となりつつあったのに鑑み、より簡単な、またはより確実な非定型抗酸菌の screening の方法の発見が要望された。次に述べるサリチル酸培地

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

(SS 培地) およびパラニトロ安息香酸培地 (PNB 培地) は、このような目的で作られたが、必ずしも niacin test に置き換わるには至らなかった。しかしながら、PNB 培地は英国および我国の国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班 (国療共研) 参加施設で広く使用され、その有用性を信じるものも多い。従って、ここに、PNB 培地の使用の歴史およびその有用性について述べて読者の参考に供したい。

サリチル酸培地 (Salicylate-Ogawa Egg Medium) (SS 培地)

「サリチル酸培地」、通称「SS 培地」は“sodium salicylate 培地”の頭文字を取ったもので、sodium salicylate を 0.5 mg/ml の割合に含む 1% 小川培地で、1962年に東村⁴⁾⁵⁾によって発表された。*Mycobacterium tuberculosis* および *M. bovis* の発育を抑制するが、他の抗酸菌の発育は抑制しない一種の選択培地である。1964年に Tomasovic⁶⁾はこの培地の有用性を認める小文を American Review of Respiratory Disease に寄せているが、国療共研で1960年代後半に実用されたほかは、広くは使用されなかった。

国療共研では、1968~1969年に16,795株の抗酸菌を入院患者喀痰から分離し、これを SS 培地に接種して 37°C 3 週培養後に発育陽性の株を中部病院に送り、詳細な検査⁷⁾で全株の同定を行なった。SS 培地陽性株として送付された株が926株で、その中の820株 (89%) が非定型抗酸菌、残りの106株 (11%) が *M. tuberculosis* であった⁸⁾。かなりの *M. tuberculosis* が誤って screening されたのは、対照培地より少ない発育でも、発育があれば送付されたためと思われる。

パラ・ニトロ安息香酸培地 (p-Nitrobenzoic Acid-Ogawa Egg Medium) (PNB 培地)

「パラ・ニトロ安息香酸培地」通称「PNB 培地」は、1964年に Tsukamura and Tsukamura⁹⁾が発表したもので、p-nitrobenzoic acid を 0.5 mg/ml の割合に含有する 1% 小川培地または Löwenstein-Jensen 培地である。作り方は、p-nitrobenzoic acid (中和の必要

なし) を 25 mg/ml の割合に propylene glycol に溶解し、この 2 容を滅菌前の小川培地100容に加えて分注し、90°C 60分滅菌して斜面とする。この PNB 培地と対照の 1% 小川培地に被検菌を 1 白金耳ずつ接種し、37°C 3 週後に発育を判定する。薄膜状以上の発育を発育陽性とする。*M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti* の *M. tuberculosis* series (complex) の菌は、この培地に発育せず、他の抗酸菌は発育する¹⁰⁾。

この培地は、1964年に Tubercle に発表されたが、英国および連合王国で広く使用され、国療共研でも1971年以降、この培地を非定型抗酸菌の screening に用いている。また、この培地は、抗酸菌検査用の再現性の高い検査の一つとして、菌種記載時の必須検査法として国際的に指定されている¹¹⁾。

外国で最初にこの培地を使用したのは、英国の Tuberculosis Reference Laboratory (Mycobacterium Reference Laboratory) の Marks¹²⁾で、1965年に採用している。次いで、Barrie¹³⁾が1967年に非定型抗酸菌の screening に有用なことを報告している。ソビエトの Barauskiene¹⁴⁾も同様の報告を1976年に行なっている。また、Marks¹⁵⁾は「結核菌および他の抗酸菌の検査法」にこれを取り入れている。

Tsukamura¹⁶⁾は1970年に PNB 培地による非定型抗酸菌の screening の追補を発表している。PNB 培地は、この目的にほぼ満足すべき結果を示したが、外国分離の *M. kansasii* の一部と *M. marinum* の一部が発育しなかったために、これを補う意味で、その前に発表した「Hydroxylamine 培地」(NH₂OH 培地)¹⁷⁾を併用することをすすめた。NH₂OH 培地には、125, 250および500μg/ml と 3 種類があるが、ここには125μg/ml のものを用いた。この併用によりほぼ洩れなく非定型抗酸菌を screening 出来るとした(表2)。これに対して、英国の Collins and Yates¹⁸⁾は PNB 培地のみで非定型抗酸菌の screening には十分で、NH₂OH 培地の併用は必要ないと述べている(表3)。

PNB 培地の発育と Niacin test の相関関係を研究

Table 1. Screening for Non-tuberculous Mycobacteria by Sodium Salicylate-Ogawa Egg Medium (SS Medium)^a

Number of acid-fast strains tested	Number of strains that grew on the SS medium	Number of strains identified as non-tuberculous mycobacteria ^b	Number of strains identified as <i>M. tuberculosis</i> ^b
16,795	926(100.0%)	820(88.6%)	106(11.4%)

a Ogawa egg medium containing 0.5mg of sodium salicylate per ml⁵⁾.

b Identified according to the methods of Tsukamura (1967)⁷⁾.

Remark. The data of this table are cited from the report of the Co-operative Study Group of the Japanese National Sanatoria (1970)⁸⁾

したものに、米国の Gangadharam and Droubi¹⁹⁾ の仕事がある。彼らは Niacin test と Löwenstein-Jensen 培地を用いての PNB 耐性の関係を調べた。Niacin (+)

と PNB 感性、Niacin (-) と PNB 耐性が共存すれば 相関関係があることになる。被検株282株中、Niacin (+) で PNB 感性の株が136株、Niacin (-) で PNB 耐性

Table 2. Screening for Non-tuberculous Mycobacteria by p-Nitrobenzoic Acid-Ogawa Egg Medium (PNB Medium)^a and Hydroxylamine-Ogawa Egg Medium (HA Medium)^b

Species	Number of strains	PNB medium Growth		HA medium Growth	
		Positive	Negative	Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i>	120	0	120	0	120
<i>M. bovis</i>	23	0	23	0	23
<i>M. kansasii</i>	16	10	6	13	3
<i>M. marinum</i>	18	14	4	18	0
<i>M. scrofulaceum</i>	26	26	0	26	0
<i>M. gordonae</i>	53	53	0	53	0
<i>M. avium</i>	26	26	0	26	0
<i>M. intracellulare</i>	76	76	0	76	0
<i>M. nonchromogenicum</i>	108	108	0	108	0
<i>M. terrae</i>	48	48	0	48	0
<i>M. xenopi</i>	4	3	1	2	2
<i>M. flavescens</i>	7	7	0	7	0
<i>M. fortuitum</i>	100	100	0	100	0
<i>M. chelonae</i>	54	54	0	54	0
<i>M. phlei</i>	20	20	0	11	9
<i>M. smegmatis</i>	26	26	0	25	1
<i>M. parafortuitum</i> complex	51	51	0	38	13

a Ogawa egg medium containing 0.5mg of p-nitrobenzoic acid per ml¹⁹⁾.

b Ogawa egg medium containing 0.125mg of hydroxylamine hydrochloride per ml¹⁷⁾.

Remark. The data of this table are cited from Tsukamura (1970)¹⁶⁾.

Table 3. Screening for Non-tuberculous Mycobacteria by p-Nitrobenzoic Acid-Löwenstein-Jensen Medium (PNB Medium)^a and Hydroxylamine-Löwenstein-Jensen Medium (HA Medium)^b

Species	PNB medium			HA medium		
	No. of strains	Growth Positive	Negative	No. of strains	Growth Positive	Negative
<i>M. tuberculosis</i>	2,346	0	2,346	148	21	127
<i>M. kansasii</i>	81	81	0	7	7	0
<i>M. xenopi</i>	106	106	0	8	7	1
<i>M. avium</i> - <i>M. intracellulare</i>	38	38	0	4	4	0
<i>M. fortuitum</i> complex	65	65	0	3	3	0
Other mycobacteria	83	82	1	9	9	0

a Löwenstein-Jensen medium containing 0.5mg of p-nitrobenzoic acid per ml.

b Löwenstein-Jensen medium containing 0.1mg of hydroxylamine hydrochloride per ml.

Remark. The data of this table are cited from Collins and Yates (1979)¹⁸⁾.

の株が113株であったので、合計249株(88.3%)が相関関係を示した。

PNB 培地は非定型抗酸菌を結核菌から区別する目的で、British Medical Research Council, Singapore Tuberculosis Service, Brompton Hospital, East African British Medical Research Council, Hong Kong Tuberculosis Treatment Service および Cooperative Tuberculosis Chemotherapy Study in Poland^{20)~28)} によって実用に供された。我国では国療共研により1971年度研究から一貫して非定型抗酸菌の screening に使用されて来た(文献は省略する)。

次にPNB 培地の有用性に関するもので未発表成績を記述する。

1. PNB 培地による非定型抗酸菌の Screening

国療共研の1971年度研究で、入院患者の喀痰から分離された抗酸菌は7,660株であった。この株をPNB 培地に接種し、37°C 3 週後に発育した株は479株であった。この479株を中部病院に集めて1971年度報告²⁹⁾ に示した方法で同定した結果、454株(94.8%)が非定型抗酸菌であり、25株(5.2%)が誤って入った *M. tuberculosis* であった(表4)。1975年度研究³⁰⁾ では4,859株の抗酸菌が分離され、その中で364株がPNB 培地に発育した。この中で354株(97.3%)が非定型抗酸菌と同定され(同定法は1975年同定法³¹⁾ による)、10株(2.7%)だけが誤って入った *M. tuberculosis* であった(表4)。

2. 非定型抗酸菌の Screening 法としての Niacin test と PNB 培地の比較

国療中部病院の入院および外来患者から分離された抗酸菌103株について次の実験を行なった。

(1)103株全部について1975年度版同定法³¹⁾ に記した全検査を行なった。この検査は、形態、温度域、栄養要求、酵素反応、薬物感受性などにわたるが、*M. tuberculosis* の同定に重視したのは表5の説明の部に記した14性状であった。*M. tuberculosis* と判定した株は14項目中少なくとも13項目を満足した。一方、非定型抗酸菌(この場合、*M. kansasii* 1株、*M. scrofulaceum* 1株、*M. nonchromogenicum* 1株、*M. fortuitum* 1株、*M. gordonae* 1株、*M. avium-M. intracellulare* 10株)と判定された株は少なくとも8項目以上該当しなかった。同定の結果、103株中88株が *M. tuberculosis*、15株が非定型抗酸菌と判定された。

(2)103株について別個にPNB 培地だけで判定した結果、88株がPNB 培地に発育陰性、15株が陽性と判定され、先の同定結果と100%適中した。

(3)103株について、別個にNiacin test を行なった。Niacin test は Wayne et al. ³²⁾ の方法によった。1株につき2本の小川培地に接種し、1本を4週後に、他の1本を6週後に使用してNiacin test を行なった。その結果、非定型抗酸菌は15株とも陰性となり、正しく判定された。しかし、*M. tuberculosis* は4週培養を使用すると82%だけが陽性となり、6週培養を使用しても96%陽性で、4株(4%)の *M. tuberculosis* がNiacin (-)、即ち誤って非定型抗酸菌と判定される結果となった。

多剤耐性で発育が遅い *M. tuberculosis* が Niacin (-)となることは、Tsukamura³³⁾ が指摘したところであるが、Wayne et al.³²⁾ によると6週培養を使用すると殆んど全部の *M. tuberculosis* が(+)になるという。

Table 4. Screening for Non-tuberculous Mycobacteria by p-Nitrobenzoic Acid-Ogawa Egg Medium (PNB Medium) in the Co-operative Study of the Japanese National Chest Hospitals

	The study year 1971 ²⁹⁾ a	The study year 1975 ³⁰⁾ b
Number of strains of acid-fast organisms tested ^c	7,660	4,859
Number of strains that grew on the PNB medium	479(100.0%) ^d	364(100.0%) ^e
Number of strains identified as non-tuberculous mycobacteria	454(94.8%)	354(97.3%)
Number of strains identified as <i>M. tuberculosis</i>	25(5.2%)	10(2.7%)

a From April 1971 to March 1972.

b From April 1975 to March 1976.

c Acid-fast strains isolated in June, September, December and March in the participating hospitals plus strains isolated in the Chubu Hospital by monthly examinations.

d Identified according to the schedule described in the reference 29.

e Identified according to the methods described in the reference 31.

しかし、いくら慎重に Niacin test を行なっても, Niacin (-) の *M. tuberculosis* が存在することは, Szabo et al.³⁴⁾ および Gruft et al.³⁵⁾ が報告しているとおりであり, 本報の表5に示す結果も, 比較的多剤耐性結核菌を含む率が多い対象(国療入院患者)では約4%の Niacin (-) の株があることを示している。

一方, *M. tuberculosis* 以外で Niacin (+) の菌がかなりあることを忘れてはならない。*M. bovis* の中には稀に Niacin (+) の株があり⁷⁾, *M. marinum* の中には相当数の Niacin (+) の株がある⁷⁾¹⁰⁾。*M. kansasii* の中に稀に Niacin (+) の株があることは, Yue et al.³⁶⁾ および Gimpl et al.³⁷⁾ により報告され, また, *M. avium*-*M. intracellulare* complex 中にも稀に Niacin (+) の株が存在することが, Zvetina and Wichelhausen³⁸⁾, 佐藤など³⁹⁾, Tsukamura et al.⁴⁰⁾ により報告されている。Tsukamura et al.⁴⁰⁾ によれば, Niacin (+) の株の出現率は(2/104)≒約2%であり, Niacin (+) の

株の血清型は13と16であった。また, Bönicke und Ewoldt⁴¹⁾ および東村など⁴²⁾ は, *M. chelonae* subsp. *chelonae* に Niacin (+) の株があったことを報告している。

以上は, 菌種の中に稀に, あるいは相当数(*M. marinum*), Niacin (+) の株を含む例であるが, 菌種全体として Niacin (+) の菌種が *M. tuberculosis* のほかに2つある。それは, *M. africanum*⁴³⁾ と *M. simiae*⁴⁴⁾ である。この両菌種は, まだ今のところ, 日本では分離されていないが, 将来分離される可能性があり, その際, Niacin test を screening に用いては絶対に発見されえない菌種である。

以上のように, Niacin test はすぐれた screening の方法であり, それゆえに広く使用されているものであるが, 決してこれ一つで screening が完全に出来るものではない。一方, PNB 培地にも少数の screening 洩れの危険があるか¹⁶⁾, Collins and Yates¹⁸⁾ のように, こ

Table 5. Comparison of Screening for Non-tuberculous Mycobacteria by p-Nitrobenzoic Acid-Ogawa Egg Medium (PNB Medium) with Screening by Niacin Test

Mycobacteria identified as ^a :	Number of strains	Method of screening					
		PNB medium		Niacin test (4 weeks)		Niacin test (6 weeks)	
		(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)
<i>M. tuberculosis</i>	88	0	88	72	16	84	4
		(0%)	(100%)	(82%)	(18%)	(96%)	(4%)
Non-tuberculous mycobacteria	15	15	0	0	15	0	15
		(100%)	(0%)	(0%)	(100%)	(0%)	(100%)
Total		15	88	72	31	84	19
	103		103		103		103

a All 103 acid-fast strains isolated were the subjects of the identification according to the methods of Tsukamura (1975)³¹⁾. Identification as *M. tuberculosis* was carried out by a combination of the following criteria: (1) Growth at 37°C but no growth at 28°C and 42°C; (2) nonphotochromogenic, rough colonies; (3) slow growth after 10 days or more; (4) compact grouping (cord formation) of bacilli; (5) susceptibility to NH₂OH. HCl, 0.125mg/ml, in Ogawa egg medium; (6) absence of the growth on the Sauton agar medium; (7) Nitrate reduced to nitrite; (8) α- and β-esterases positive; (9) urease, nicotinamidase and pyrazinamidase positive; (10) absence of the utilization of acetate, pyruvate and glucose as the sole source of carbon in the presence of ammoniacal nitrogen; (11) susceptibility to sodium salicylate, 0.5mg/ml, in Ogawa egg medium; (12) susceptibility to p-nitrobenzoic acid, 0.5mg/ml, in Ogawa egg medium; (13) niacin production; (14) resistance to thiophene-2-carboxylic acid hydrozide, 1μg/ml, in Ogawa egg medium. The strains showing all the above 14 characters and/or 13 characters were identified as *M. tuberculosis*. Non-tuberculous mycobacteria lacked 8 or more characters.

The screenings by the PNB medium and by the niacin test were carried out independently of the above identifications.

れだけで十分 screening 可能という人もいる。PNB 培地の特色を挙げれば次のごとく言える。

1) 耐性検査の際に PNB 培地を加えておけば 4 週で検査が完了する (PNB 培地の判定は 3 週が原則であるが 4 週でもよい)。Niacin test でも菌量が少ないと継代しなければならないから手数は同じである。Niacin test で 6 週培養をするよりは判定が速く出来る。

2) PNB 培地に発育しない菌種は, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum* および *M. microti* の *M. tuberculosis* series に属する菌種である (*M. africanum* は Niacin test 同様, PNB 培地によっても区別出来ない)。他の抗酸菌は殆んど例外なく (Niacin (+) の *M. simiae* も含めて) この培地に発育する。

結 論

PNB 培地は非定型抗酸菌の screening 用培地としてすぐれた培地である。日本では, *M. tuberculosis* series に属する菌種で *M. tuberculosis* 以外のものは人間の臨床材料から分離されたことがないから, PNB 培地に発育しない菌は *M. tuberculosis* と考えてよい。PNB 培地は Niacin test と比較して若干の利点も持っている。

文 献

- 1) Konno, K.: New chemical method to differentiate human type tubercle bacilli from other mycobacteria, *Science*, 124: 985, 1956.
- 2) 今野淳: 抗酸菌の生化学的分類, *結核*, 37: 315-324, 1962.
- 3) Pope, H. and Smith, D.T.: Synthesis of B-complex vitamins of tubercle bacilli when grown on synthetic media, *Am Rev Tuberc*, 54: 559-563, 1946.
- 4) 東村道雄: サリチル酸ソーダ感受性による抗酸菌の分類 (*Mycobacterium tuberculosis* の選択), *医学と生物学*, 61: 104-106, 1961.
- 5) Tsukamura, M.: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* from other mycobacteria by sodium salicylate susceptibility, *Am Rev Respir Dis*, 86: 81-83, 1962.
- 6) Tomasovic, A.A.: Sodium salicylate-Ogawa egg medium, *Am Rev Respir Dis*, 89: 592-593, 1964.
- 7) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, *Tubercle*, 48: 311-338, 1967.
- 8) The Co-operative Study Group of the Japanese National Sanatoria on Atypical Mycobacteria: A study on the frequency of 'atypical' mycobacteria in Japanese National Sanatoria, *Tubercle*, 51: 270-280, 1970.
- 9) Tsukamura, M. and Tsukamura, S.: Differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* by p-nitrobenzoic acid susceptibility, *Tubercle*, 45: 64-65, 1964.
- 10) Tsukamura, M.: Numerical classification of slowly growing mycobacteria, *Int J Syst Bacteriol*, 26: 409-420, 1976.
- 11) 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, thio-phen-2-carboxylic acid hydrazide, hydroxylamine, and p-nitrobenzoate, *Int J Syst Bacteriol*, 26: 311-318, 1976.
- 12) Marks, J.: Bacteriological aspects of the national register of drug-resistant tuberculosis in its first two years. *Monthly Bulletin of the Ministry of Health and the Public Health Laboratory Service*, 24: 2-6, 1965.
- 13) Barrie, J.D.: Use of thiosemicarbazone and para-nitrobenzoic acid in screening tests for anonymous mycobacteria, *J Clin Pathol*, 20: 86-88, 1967.
- 14) Barauskiene, L.P.: Simple bacteriological methods for differentiating tuberculous and nontuberculous mycobacteria (in Russian), *Probl Tub*, 1976 (no. 8): 69-75, 1976.
- 15) Marks, J.: A system for the examination of tubercle bacilli and other mycobacteria, *Tubercle*, 57: 207-225, 1976.
- 16) Tsukamura, M.: Screening for atypical mycobacteria, *Tubercle*, 51: 280-284, 1970.
- 17) Tsukamura, M.: Differentiation of mycobacteria by susceptibility to hydroxylamine and 8-azaguanine, *J Bacteriol*, 90: 556-557, 1965.
- 18) Collins, C.H. and Yates, M.D.: Hydroxylamine sensitivity and salt tolerance in screening and identifying mycobacteria, *Tubercle*, 60: 91-94, 1979.
- 19) Gangadharam, P.R. and Droubi, A.J.: Susceptibility of mycobacteria to p-nitrobenzoic acid in relation to their niacin production, *Am Rev Respir Dis*, 108: 143-146, 1973.
- 20) Singapore Tuberculosis Service/Brompton Hospital/British Medical Research Council Investigation: A controlled clinical trial of the role of thiacetazone-containing regimens in the treatment of pulmonary tuberculosis in Sin-

- gapore, *Tubercle*, 52: 88-116, 1971.
- 21) British Medical Research Council Co-operative Study.: Co-operative controlled trial of a standard regimens of streptomycin, PAS and isoniazid and three alternative regimens of chemotherapy in Britain, *Tubercle*, 54: 99-129, 1973.
 - 22) Tuberculosis Chemotherapy Center, Madras: A controlled comparison of two fully supervised once-weekly regimens in the treatment of newly diagnosed pulmonary tuberculosis, *Tubercle*, 54: 23-45, 1973.
 - 23) Hong Kong Tuberculosis Treatment Service/Brompton Hospital/British Medical Research Council Investigation of Retreatment Regimens: A controlled clinical trial of daily and intermittent regimens of rifampicin plus ethambutol in the retreatment of patients with pulmonary tuberculosis in Hong Kong, *Tubercle*, 55: 1-27, 1974.
 - 24) Cooperative Tuberculosis Chemotherapy Study in Poland: A comparative study of daily followed by twice or once weekly regimens of ethambutol and rifampicin in retreatment of patients with pulmonary tuberculosis, *Tubercle*, 56: 1-26, 1975.
 - 25) East African and British Medical Research Council Co-operative Investigation. Tanzanian Tuberculosis Survey: Tuberculosis in Tanzania: a national sampling survey of drug resistance and other factors, *Tubercle*, 56: 269-294, 1975.
 - 26) East African and British Medical Research Council Tanzanian Tuberculosis Survey-Follow-up: Tuberculosis in Tanzania: a follow-up of a national sampling survey of drug resistance and other factors, *Tubercle*, 58: 55-78, 1977.
 - 27) East African British Medical Research Council Study: Results at 5 years of a controlled comparison of a 6-month and a standard 18-month regimen of chemotherapy for pulmonary tuberculosis, *Am Rev Respir Dis*, 116: 3-8, 1977.
 - 28) East African and British Medical Research Council Kenya Tuberculosis Survey: Tuberculosis in Kenya: a second national sampling survey of drug resistance and other factors, and a comparison with the prevalence data from the first national sampling survey, *Tubercle*, 59: 155-177, 1978.
 - 29) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 国立療養所入院患者における非定型抗酸菌症(1971年—1972年), *結核*, 48: 203-211, 1973.
 - 30) 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班: 非定型抗酸菌および非定型抗酸菌症に関する研究, 国立療養所非定型抗酸菌症共同研究班1975—1976年度報告, *結核*, 53: 65-72, 1978.
 - 31) Tsukamura, M.: Identification of mycobacteria, p. 1-75, the National Chubu Hospital, Obu, Aichi, Japan, 1975.
 - 32) 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 β -galactosidase, *Int J Syst Bacteriol*, 24: 412-419, 1974.
 - 33) Tsukamura, M.: Niacin-negative *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Respir Dis*, 110: 101-103, 1974.
 - 34) Szabó, I., Fodor, T., Szabó, N. and Kelenffy, S.: Incidence of niacin negative *Mycobacterium tuberculosis* strains, *Acta Microbiologica Academimiae Scientiarum Hungaricae*, 23: 299-300, 1976.
 - 35) Gruft, H. and Osterhout, M.: Niacin-negative strain of *Mycobacterium tuberculosis*, *Am Rev Respir Dis*, 118: 157, 1978.
 - 36) Yue, W.Y. and Cohen, S.S.: Pulmonary infection caused by niacin-positive *Mycobacterium kansasii*, *Am Rev Respir Dis*, 94: 447-449, 1966.
 - 37) Gimpl, F., Szabó, I. and Vándor, J.: Eine niacin-positive Variante von *Mycobacterium kansasii*, *Praxis der Pneumologie*, 22: 295-299, 1968.
 - 38) Zvetina, J.R. and Wichelhausen, R.H.: Pulmonary infection caused by niacin-positive *Mycobacterium avium*, *Am Rev Respir Dis*, 113: 885-887, 1976.
 - 39) 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* - *intracellulare* complex について, *結核*, 56: 531-534, 1981.
 - 40) Tsukamura, M. et al.: Relationship between serotype and certain biological and biochemical characteristics of strains of the *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium intracellulare* complex, *Microbiol Immunol*, 26: 871-875, 1982.

- 41) Bönicke, R. und Ewoldt, A.: Quantitative Unterscheidung über das Niacinbildungsvermögen von *Mycobacterium borstelense* var. *niacinogenes*, Beitr z Klin Tuberk, 130: 149-154, 1965.
- 42) Tsukamura, M.: Numerical analysis of rapidly growing, nonphotochromogenic mycobacteria, including *Mycobacterium agri* (Tsukamura 1972) Tsukamura sp, nov, nom rev Int J Syst Bacteriol, 31: 247-258, 1981.
- 43) Castets, M. et al.: Les bacilles tuberculeux le type Africain (note préliminaire), Rev Tuberc Pneumol, 32: 179-184, 1968.
- 44) Weiszfeiler, J.G.: Die Biologie und Variabilität des Tuberkelbakteriums und die atypischen Mycobakterien, p. 227-256, Akadémiai Kiadó, Budapest.