

総 説

Nocardia の細菌学 (分類と同定)

東 村 道 雄

国立療養所中部病院内科

受付 昭和62年11月28日

REVIEW : BACTERIOLOGY OF *NOCARDIA* — CLASSIFICATION AND IDENTIFICATION

Michio TSUKAMURA *

(Received for publication November 28, 1987)

The nocardiae which may cause disease in humans are *Nocardia asteroides*, *N. nova*, *N. farcinica*, *N. brasiliensis* and *N. otitidis-caviarum*. Of these, *N. asteroides*, *N. nova* and *N. farcinica* had previously been regarded as belonging to only one species, *N. asteroides* (Gordon and Mihm, 1957). In 1969, Tsukamura divided the *N. asteroides* species into two species, *N. asteroides sensu stricto* and *N. farcinica*, reviving the name *N. farcinica* Trevisan 1889. The *N. asteroides* in the new sense could furthermore be divided into two species, *N. asteroides* in a newer sense and *N. nova* sp. nov. (Table 1). The genus *Nocardia* is differentiated from genera *Mycobacterium* and *Rhodococcus* by the characteristics shown in Table 2. The identification of *Nocardia* species is carried out according to the schedule shown in Table 3.

Key words : *Nocardia*, Classification, Identification, Bacteriology

キーワードズ : ノカルディア, 分類, 同定, 細菌学

緒 言

Nocardia は、比較的稀ではあるが、ヒトに感染症を起こす菌として知られている。この属は、*Mycobacterium* (抗酸菌) と近縁関係にあり、弱い抗酸性を示す好気性菌として知られる¹⁾²⁾。そのためか、抗酸菌同様、肺に感染することが多い (これについては、続報で総説する)。*Nocardia* 感染症の報告は、わが国でも時折みかけるが、そのほとんど全部が *Nocardia asteroides* によるとされている。しかし、起炎菌を *N. asteroides* とした根拠をみるとはなはだ寒心に堪えない状況である。多くの報告が、ただ、菌の配列が「星状型」である程度の所見に基づいており、生化学的性状の検査すら行われ

ていない。比較的稀な感染症であるにもかかわらず、菌株の保存も行われていないものが多く、これらの報告を、直ちに *Nocardia* 感染症と認めるわけにはゆかない。菌株の保存が行われているのは、比較的信頼しうる施設であるが、菌株を調べてみると、そのような施設においてすら、3分の1は *Nocardia* ではなかった。誤られた菌は、*Rhodococcus* または *Mycobacterium fortuitum* であった。このような状況にかんがみ、この総説を書くこととした。

Nocardia の分類

Nocardia 属の菌種として最初に記載された菌は、*Nocardia farcinica* Trevisan 1889³⁾ である。しかし、

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

1世紀も前の発表であり、従って、その記述も乏しいために、次に記載された *Nocardia asteroides* Blanchard 1896⁴⁾ の陰にかくれて、研究者の注意を引かなくなってしまう。その後、*Nocardia brasiliensis* Pinoy 1913⁵⁾ と *Nocardia otitidis-caviarum* Snijders 1924⁶⁾ が報告された。最後の菌は、長い間、誤って“*N. caviae*”と呼ばれていたが、1980年に国際微生物会議命名委員会によって発行された“Approved lists of bacterial names”⁷⁾ で正式に *N. otitidis-caviarum* と呼ぶことに決まった。同時に、通常、各属で最初に記載された菌種に対して与えられる“type species”の名称は、*N. asteroides* と決定された。以上のごとく、*N. farcinica* は、あいまいな名前として、type species からはずされたが、その名前は残された。以上の4菌種のほかに、数多くの菌種が Bergey's Manual 第8版 1974⁸⁾ および第9版 1986⁹⁾ に記載されているが、ヒトに感染する菌種は、上記の4菌種に限られている。なお、“madura foot”の語源になった“*N. madurae*”は、*Nocardia* 属から外された。

第二次大戦後、最もよく *Nocardia* の分類学的研究を行ったのは Gordon & Mihm^{10)~13)} で、彼らは、*N. asteroides*, *N. brasiliensis* および *N. caviae* (*N. otitidis-caviarum*) の3者を独立の菌種として認め、*N. farcinica* は *N. asteroides* と同一とした¹⁰⁾。年代的には、*N. farcinica* の発表の方が *N. asteroides* の発表より早いですが、すでに *N. asteroides* の名が広く通用している状況を考え、この両者の名として *N. asteroides* の方が適当であるとした¹⁰⁾¹²⁾。そして、*Nocardia* の type species を *N. asteroides* とするよう提唱した¹²⁾。1980年の“Approved lists of bacterial names”⁷⁾ は、この Gordon & Mihm¹²⁾ の提唱を取り入れたものと思われる。こうして、*N. farcinica* の名前は、事実上、消滅していた。

1969年に、Tsukamura¹⁴⁾ は、100性状を用いて、*Nocardia* として受領した112株について計数分類を行った。その結果、2つの成果が得られた。第1は、*N. asteroides* 株を2群に分け得たことであった。第1群は30株からなり、この中に、以前 *N. farcinica* とされていた ATCC 3318 株が含まれていたため、*N. farcinica* と呼ぶことにした。他の群は、21株からなり、これを新しく *N. asteroides* と呼ぶことにした。そして、neotype として ATCC 23824 株を設定した。第2の新知見は、一群の *Nocardia* 株が1つの分類単位を作ることを見出したことで、この中で最も古い名前である *Nocardia rubra* の名を、この群に与えた。これに属したのは、次の菌種であった。*N. rubra*, *N. convoluta*, *N. minima*, *N. lutea*, *N. rubropertincta*, *N. erythropolis*, *N. globerula*, *N. polychromo-*

genes であった。これらの群は、後に *Rhodococcus*¹⁵⁾¹⁶⁾ の名が与えられて、独立した属となった。すなわち、*Rhodococcus* 属の誕生は、この研究に由来している。以上の中で、*N. rubra* から *N. lutea* までの4者は、後に *R. lentifragmentus* となり¹⁷⁾、*N. rubropertincta* は *R. rubropertinctus*¹⁵⁾¹⁶⁾ となり、以下の2者は、それぞれ *R. erythropolis*¹⁸⁾、*R. globerulus*¹⁹⁾ となった。

Tsukamura¹⁴⁾ による *N. asteroides* の2菌種への分割は、その後、多くの研究者により確認された。Bradley²⁰⁾、Mordarski et al.²¹⁾ は、DNA reassociation により、この2つが別菌種であることを確かめ、Goodfellow²²⁾、Kurup & Schmitt²³⁾、Schaal & Reuthersberg²⁴⁾ および Tsukamura²⁵⁾ は計数分類により、これを追認した。また、McClung⁸⁾ によって書かれた Bergey's Manual 第8版にも、この旨が記されている。

国際微生物会議には、その後、*Nocardia* 委員会が置かれ、英国の M. Goodfellow が委員長となって、“Approved lists of bacterial names”⁷⁾ が作られたが、*N. asteroides* の type strain には、Tsukamura¹⁴⁾ の提唱を無視して、新たに ATCC 19247 を選定した。*N. farcinica* の名は listsに残ったが、記載は Trevisan 1889 のままとされてしまった。その他、Tsukamura¹⁶⁾ により、手続きを踏んで提唱された *R. aurantiacus* と *R. sputi* は削除され、*R. lentifragmentus* は *R. ruber* として Goodfellow and Alderson の名に置きかえられ、*R. rubropertinctus* も Goodfellow & Alderson に置きかえられた。このような変更は、委員の1人である筆者に何らの通知もなく行われたので、筆者は、これに抗議して委員を辞任した。1986年の Bergey's Manual の *Nocardia* の稿は、Goodfellow & Lechevalier⁹⁾ によって書かれ、*N. farcinica* は“Goodfellow tests”によって *N. asteroides* から区別できるとされ、*N. asteroides* の2菌種への分割は、あたかも Goodfellow によってなされたかのごとく記されている。

ところで、*N. farcinica* の記載は、今から100年も前のことなので、命名に若干の問題点があった。今日、*N. farcinica* の原株として、パリの Institut Pasteur に保存されている「“378”株」は、実は *Nocardia* ではなく *Mycobacterium* (後に *M. farcinogenes* と命名された) であることが分かった。一方、American Type Culture Collection (ATCC) に保存されている ATCC 3318 株は、“378”株を ATCC が受領したはずであるのに、こちらは、まぎれもなく *Nocardia* である。このような疑問点を解消するため、Tsukamura²⁶⁾ は、*N. farcinica* の名を reject して、*N. paratuberculosis*²⁷⁾ とすることを提唱したが、*Nocardia* 委員会

Table 1. Classification of *Nocardia asteroides*

Gordon and Mihm 1957 ¹⁰⁻¹²⁾	Tsukamura 1969 ¹⁴⁾	Tsukamura 1982 ²⁷⁾
<i>N. asteroides</i>	<i>N. asteroides</i> (in new sense) <i>N. farcinica</i>	<i>N. asteroides</i> (in a newer sense) <i>N. farcinica</i> <i>N. nova</i>

N. nova was separated from the *N. asteroides* in new sense (Tsukamura, 1969).

The *N. asteroides* strains defined by Gordon and Mihm 1957 included all three species

N. asteroides sensu stricto, *N. farcinica* and *N. nova*.

Table 2. Differentiation between Genera *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia*

	<i>Mycobacterium</i>	<i>Rhodococcus</i>	<i>Nocardia</i>
Fragmenting mycelium	(-)	(±)	(+)
Acid-fastness	(+)	(±)	(±)
Sucrose as C source	(-)	(+)	(-)
Arylsulfatase	(+)	(-)	(-)
β-Galactosidase	variable	(-)	(+)
Resistance to 5-fluorouracil (20 μg/ml) in Ogawa egg medium	variable	(-)	(+)
Resistance to mitomycin C (5 μg/ml) in Ogawa egg medium	variable	(-)	(+)
Mycolic acids			
Total number of C atoms	60-88	30-66	44-60
Number of double bonds	less than 3	2-6	less than 2

(委員長 Goodfellow) により否決された。従って, *N. farcinica* が現在も, この菌の正式名となっている。

この後, Tsukamura²⁷⁾ は, 1969年に新たに定義された *N. asteroides*¹⁴⁾ を, さらに2つの菌種に分割した。そして, type strain ATCC 19247株を含む群をさらに新しい意味での *N. asteroides* とし, 他の群を *Nocardia nova* と命名した。結局, 以前の *N. asteroides* は, 新しい意味での *N. asteroides*, *N. farcinica*, *N. nova* の3菌種に分割された (Table 1)。

従って, 現在, 感染症を起こす可能性がある *Nocardia* としては, 次の5つの菌種があげられる。*N. asteroides* (in new sense), *N. farcinica*, *N. nova*, *N. brasiliensis*, および *N. otitidis-caviarum* (synonym: *N. caviae*)。

Nocardia の同定

Nocardia の同定には, まず, 類縁菌である *Mycobacterium* および *Rhodococcus* からの区別が必要で

ある。*Nocardia* とこれら2属との鑑別点を Table 2 に示す。これらは, 文献 27~34 から作製した。しかし, 臨床細菌学の現場では, 次のような形態観察で十分であると思われる。

Nocardia の特徴は, その分断菌糸 (fragmenting mycelium) の存在にある。分断菌糸というのは, 発育の初期には, 菌糸形成が認められ, これが後に, 桿菌状ないし球菌状形態へと分断してゆくものをいう。具体的には, *Nocardia* を小川培地に接種した場合, 28°C で1~2日培養すると僅少の発育がみられる。これを, 白金耳でスライドに塗抹し, Ziehl-Neelsen 染色で染めて鏡検してみると, 10 μm 以上の長さの糸状体が認められる。これが菌糸で, 通常, この糸状体から分枝が出ているのがみられる。この時期, *Nocardia* は非抗酸性で青染しているが, 時に, 菌糸の中に, 抗酸性の顆粒が認められる (これを「部分抗酸性」 Partial acid-fastness という)。さらに培養を続けて, 3~5日後に塗抹染色してみると, 菌糸はほとんど認められず, 弱抗酸性

Table 3. Differentiation between the Species of *Nocardia*

	% of strains showing positive reaction				
	<i>N. asteroides</i>	<i>N. nova</i>	<i>N. brasiliensis</i>	<i>N. otitidis-cavium</i>	<i>N. farcinica</i>
No of strains tested	9	14	7	10	27
Growth at 45°C	0	0	0	50	96
Colony pigmentation in dark	78	100	14	0	30
Reduction of nitrate to nitrite	100	93	0	60	30
Benzamidase	0	0	0	0	70
Allantoinase	33	0	71	100	7
L-Serine as simultaneous N and C sources	0	0	29	100	0
Acetamide as simultaneous N and C sources	0	7	0	0	96
Monoethanolamine as simultaneous N and C sources	11	0	0	100	96
Citrate as C source	89	0	100	0	0
1, 3-Butylene glycol as C source	0	0	0	0	81
D-Galactose as C source	0	0	57	0	0
L-Rhamnose as C source	11	0	0	0	96
Inositol as C source	0	0	71	100	0
Mannitol as C source	0	0	57	90	0

The utilization of carbohydrates were tested in the presence of ammoniacal nitrogen.

(薄紫色)の桿状型または球状型がみられる。このように、発育の初期にだけ菌糸が認められる状態が、分断菌糸である。発育のどの時期にも菌糸が認められるものを、永久菌糸 (permanent mycelium) という。永久菌糸を示すものは、*Nocardia* ではない。*Mycobacterium* は強抗酸性で菌糸を欠く。また、*Rhodococcus* は、決して強抗酸性にはならず、弱抗酸性で菌糸を欠く(根痕的に菌糸を作る菌も稀に存在する)。

形態観察を、より正確に行う方法としては、次の方法をすすめたい³⁵⁾。

培地: KH_2PO_4 , 0.75 g; Na_2HPO_4 , 8.65 g; picric acid, 2.0 g; sodium succinate, 2.0 g; distilled water (pH は自然に 7.8 となるので、そのまま無修正で使用)。中試験管に 4.0 ml ずつ分注し、120°C 20 分間、オートクレーブで滅菌して使用する。小川培地に 28°C 3 日間培養した被検株を 2 白金耳接種し、強く振盪して混和した後、28°C に培養する。1 日、2 日、3 日後

に、管底に生じた発育を白金耳ですくい取ってスライド上に拡げて乾燥し、Ziehl-Neelsen 法で染色し、鏡検する。なお、培養中は綿栓を用いる。

上記の培地は、N 源を含まず、picric acid を含んでいるため、菌の発育は緩徐にしか起こらない。しかも、菌が粘液状物となっているため、そのまま、スライド上に拡げることができる。従って、菌の配列が塗抹によって激しく変わることがない。*Nocardia* では菌糸形成が認められ、後に、これが分断してゆくのを認めることができる。*Mycobacterium* と *Rhodococcus* では、菌糸が認められない。かつ、前者は強抗酸性、後者は弱抗酸性に染まる。

以上の操作で、被検株が *Nocardia* であることを確認できたなら、次は、菌種の同定である。菌種同定には、Table 3 の検査を行うことをすすめたい。この Table 3 の方法は、文献 27 から作製した。

本報では、*Nocardia* の細菌学について解説したので、

続報では、その感染症について述べたい。

文 献

- 1) 束村道雄：抗酸菌の分類学，I，抗酸菌属の定義，結核，55：289-295，1980.
- 2) 束村道雄：抗酸菌の分類，臨床と微生物，13：649-655，1981.
- 3) Trevisan, V. : I generi e le specie delle Batteriacee, Zanaboni & Gabuzzi, Milano, 1889.
- 4) Blanchard, R. : Parasites végétaux à l'exclusion des bactéries. In Bouchard, C. Traité de Pathologie Générale 2 : 811-926, G. Masson, Paris, 1896 (cited from Index Bergeyana, edited by R. E. Buchanan, J. G. Holt and E. F. Lessel, Jr., p.1-1472, 1966, Williams & Wilkins, Baltimore, 1966).
- 5) Pinoy, E. : Actinomycoses et mycétomes, Bulletin de l' Institut Pasteur, 11 : 929-938, 1913.
- 6) Snijders, E. P. : Cavia-scheef-kopperij, een nocardiose, Geneeskundig Tijdschrift voor Nederlandsch-Indie, 64 : 85-87, 1924 (cited from Index Bergeyana, 1966).
- 7) Skerman, V. B. D., McGowan, V., and Sneath, P. H. A. : Approved lists of bacterial names, Int J Syst Bacteriol, 30 : 225-420, 1980.
- 8) McClung, N. M. : Family *Nocardiaceae* Castellani and Chalmers 1919, 1040. In "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology", 8th ed. (eds. R. E. Buchanan, J. G. Holt and N. E. Gibbons), p.726-746, Williams & Wilkins, Baltimore, 1974.
- 9) Goodfellow, M. and Lechevalier, M. P. : Genus *Nocardia* Trevisan 1889, 9. In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, (eds. P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt), volume 2, p.1459-1471, Williams and Wilkins, Baltimore, 1986.
- 10) Gordon, R. E. and Mihm, J. M. : A comparative study of some strains received as nocardiae, J Bacteriol, 73 : 15-27, 1957.
- 11) Gordon, R. E. and Mihm, J. M. : A comparison of *Nocardia asteroides* and *Nocardia brasiliensis*, J Gen Microbiol, 20 : 129-135, 1959.
- 12) Gordon, R. E. and Mihm, J. M. : The type species of the genus *Nocardia*, J Gen Microbiol, 27 : 1-10, 1962.
- 13) Gordon, R. E. and Mihm, J. M. : Identification of *Nocardia caviae* (Erikson) nov. comb. Ann. New York Academy of Sciences, 98 : 628-636, 1962.
- 14) Tsukamura, M. : Numerical taxonomy of the genus *Nocardia*, J Gen Microbiol, 45 : 253-273, 1969.
- 15) Tsukamura, M. : A further numerical taxonomic study of the rhodochrous group Jpn J Microbiol, 18 : 37-44, 1974.
- 16) Tsukamura, M. : Numerical classification of *Rhodococcus* (formerly *Gordona*) organisms recently isolated from sputa of patients: description of *Rhodococcus sputi* Tsukamura sp. nov. Int J Syst Bacteriol, 28 : 169-181, 1978.
- 17) Tsukamura, M., Mizuno, S. and Murata, H. : Numerical taxonomy study of the taxonomic position of *Nocardia rubra* reclassified as *Gordona lentifragmenta* Tsukamura nom. nov. Int J Syst Bacteriol, 25 : 377-382, 1975.
- 18) Goodfellow, M. and Alderson, G. : The actinomycete-genus *Rhodococcus* : a home for the 'rhodochrous' complex, J Gen Microbiol, 100 : 99-122, 1977.
- 19) Goodfellow, M., Weaver, C. R. and Minnikin, D. E. : Numerical classification of some rhodococci, corynebacteria and related organisms, J Gen Microbiol, 128 : 731-745, 1982.
- 20) Bradley, S. G. : Relationships among mycobacteria and nocardiae based upon deoxyribonucleic acid reassociation, J Bacteriol, 113 : 645-651, 1973.
- 21) Mordarski, M. et al. : Interrelation of *Nocardia asteroides* and related taxa as indicated by deoxyribonucleic acid reassociation, Int J Syst Bacteriol, 27 : 66-70, 1977.
- 22) Goodfellow, M. : Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria, J Gen Microbiol, 69 : 33-80, 1971.
- 23) Kurup, P. V. and Schmitt, J. A. : Numerical taxonomy of *Nocardia*, Canad J Microbiol, 19 : 1035-1048, 1973.
- 24) Schaal, K. P. and Reuthersberg, H. : Numerical taxonomy of *Nocardia asteroides*. p.53-62. In Mordarski, M., Kurytowicz, W. and Jeljaszewicz, J. (eds.), *Nocardia* and *Streptomyces*, Gustav Fischer, Stuttgart and

- New York, 1978.
- 25) Tsukamura, M. : Extended numerical taxonomy study of *Nocardia*, Int J Syst Bacteriol, 27 : 311-323, 1977.
 - 26) Tsukamura, M. : Rejection of the name *Nocardia farcinica* Trevisan 1889 (Approved Lists 1980). Request for an opinion, Int J Syst Bacteriol, 32 : 235-236, 1982.
 - 27) Tsukamura, M. : Numerical analysis of the taxonomy of rhodococci and nocardiae. Division of *Nocardia asteroides* sensu stricto into two species and descriptions of *Nocardia paratuberculosis* sp. nov. Tsukamura (formerly the Kyoto-I group of Tsukamura), *Nocardia nova* sp. nov. Tsukamura, *Rhodococcus aichiensis* sp. nov. Tsukamura, *Rhodococcus chubuensis* sp. nov. Tsukamura, and *Rhodococcus obuensis* sp. nov. Tsukamura, Microbiol Immunol, 26 : 1101-1119, 1982.
 - 28) Tsukamura, M. : Proposal of a new genus, *Gordona*, for slightly acid-fast organisms occurring in sputa of patients with pulmonary disease and in soil, J Gen Microbiol, 68 : 15-26, 1971.
 - 29) Tsukamura, M. et al. : Comprehensive numerical classification of 369 strains of *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia*, Int J Syst Bacteriol, 29 : 110-129, 1979.
 - 30) Tsukamura, M. Differentiation of the *Mycobacterium*, *rhodochrous*-group from nocardiae by β -galactosidase activity, J Gen Microbiol, 80 : 553-555, 1974.
 - 31) Tsukamura, M. : Test for susceptibility to mitomycin C as aids for differentiating the genus *Rhodococcus* from the genus *Nocardia*, and for differentiating *Mycobacterium fortuitum* and *Mycobacterium chelonae* from other rapidly growing mycobacteria, Microbiol Immunol, 25 : 1197-1199, 1981.
 - 32) Tsukamura, M. : Differentiation between the genera *Mycobacterium*, *Rhodococcus* and *Nocardia* by susceptibility to 5-fluorouracil, J Gen Microbiol 125 : 205-208, 1981.
 - 33) Goodfellow, M. et al. : Chemical and numerical taxonomy of strains received as *Gordona aurantiaca*, J Gen Microbiol, 109 : 57-68, 1978.
 - 34) Tomiyasu, I. and Yano, I. : Separation and analysis of novel polyunsaturated mycolic acids from a psychrophilic, acid-fast bacterium, *Gordona aurantiaca*, Eur J Biochem, 139 : 173-180, 1984.
 - 35) Tsukamura, M. : A simple method for observing the morphology of *Nocardia*, *Rhodococcus* and *Mycobacterium*, Biology of Actinomycetes and Related Organisms, 12 : 55-56, 1977.