MYCOBACTERIA AND FISH

Saburo SATO

Research Institute for Tuberculosis and Leprosy, Tohoku University

Since Bataillon et al, first recorded tuberculosis-like disease of a carp in 1897, isolating a strain of mycobacteria, *M. piscium* from the fish tissue, several works on the subject have been presented by Aronson (1926, sea-water fish, *M. marinum*), Baker & Hagan (1942 Mexican platy fish, *M. platypoecilus*), Besse (1949, siamese fighting-fish-*M. anabanti*), and Ross (1959—salmon and trout—*M. salmonifilum*—4 strains). (These mycobacteria are designated as *M. pis*, *M. mar*, *M. pl*, *M. ana*, *M. sal* for short in the following description.)

The author has isolated 21 strains of mycobacteria from 129 fish of 11 species of the tropical fish out of 260 fish of 23 species, (Tables 1-a and 1-b). Besides these he has obtained 3 more strains of mycobacteria culturally from a goldfish and two crucians which were previously inoculated with leprosy bacilli (strains "Shio" and "C 106") One more strain, "Cc 116" was the one originated from a crucian inoculated with killed leprosy bacilli. On the other hand, attempts to detect mycobacteria in the viscera of various fresh-, brackish- and sea-water fishes, (53 goldfish, 24 crucian, 16 carp, 15 loach, 5 dace, 13 macropodus chinensis, 47 rainbow trout, 21 sea-water fishes including a salmon and 4 sea-perch-totaling 170), tinctorially and culturally, ended almost entirely negative. Histological examinations performed in more than 50 fish gave no results.

Although diseased fish sometimes were sluggish and dull in appearance, scarcely and ulceration or tumor was found in the skin. In autopsy, there were seen greyish white, pin-headed or rice grain sized, soft nodules in the viscera, in particular, liver, kidney and spleen in rapidly advanced cases. Abundant acid-fast rods were detected intra- and extra-cellularly of monocytes in the granuloma which resembled considerably to a rat leproma or avian tuberculous granuloma in histology. In slowly advanced cases, however, many miliar nodules resembling to a transverse section of a hyalinized vessel in their appearances, were found in the viscera. (Fig. 2 and 3)

The author has studied on the mycobacteria of the fish origin bacteriologically and immunologically together with some other biological properties. In particular, pathogenicity to goldfish or other experimental animals has been studied comparing with lesions seen in spontaneously diseased tropical fish. The results were summarized as follows:

1) Bacteriology: The 24 strains can be classified into 4 groups according to their cultural properties, in particular, to ability of pigment production conforming to Runyon's classification of atypical mycobacteria. Thus; i) Photochromogens (P-group for short); orange colored pigmentation develops in less than 24 hours after exposing the culture to electric light—60 candle power at distance of 30-40 cm for 20 minutes. 5 strains, "Lt," "Pl," "Sf2," "Sp," "Sw". ii) Scotochromogens (S); bright orange color is formed even in the dark. 9 strains, Bm2, Gp, C106, Cc116, Pg3, Pg4, Pg6 Sf3, Tp2. iii) Nonphotochromogens (N); greyish white colonies. 7 strains, Bm1, Bg, Bt, Pg1, Pg5, Sf4, Shio. iv) Delayed photochromogens (provisional designation, P'-group). 3 strains, Pg2, Sf1, Tp1. Optimal temperature for growth are found ranging from 25°C to 30°C. All of the strains grow well on egg media and on heart infusion agar slant. Strongly acid-fast rod resembling tubercle bacillus. "Bt" is slender in size. "Pl," "Sf2" "Sp" "Sw" are generally thicker and longer in size than tubercle bacillus, especially in the fish tissue, whereas they are shorter on culture media, showing somewhat pleomorphic tendency. Formation of pellicle in liquid media is mostly difficult to be seen in the strains of "S" and "N"-groups. No typical cord formation could be seen except for in Lt, Bm2, Bg, Bt. (Fig. 6) Viability of the bacilli stored in physiological saline at room temperature; majority of the strains retained their flourishing activity for more than 9 months in a saline. Neutral red reaction are mostly positive. Pg1 and Sf1 were strongest while strains of P-group generally gave weak reaction. Strains "C106" and "Cc116" were negative for the test.

Table 1-b Number of tropical fish from which no acid-fast bacilli were isolated in spite of positive bacillary finding in smeared or sectioned specimen

		Number of fish positive for bacilli		
		smeared	section	culture
Helostoma temminckii C. and V.	Kissing gourami	1/2*	0/2*	0/2*
Chanda buroensis (Bleeker)	Glass fish	1/2	0/2	0/2
Pristella riddlei (Meek)	Pristella	1/7	1/7	0/7
Apistogramma ramirezi Myers & Harry	Ram	1/1	0/1	0/1
Danui malabaricus (Jerdon)	Giant danio	1/3	0/3	0/3

No acid-fast bacilli were detected both, tinctorially and culturally in the following 6 sorts of tropical fishes (3 of *Hemigrammus ocellifer*, 4 of *Hyphessobrycon innesi*, 7 of *Pterophyllum eimekei*, one *Hemichromis bimaculatus*, 5 of *Barbus tetrazona* and 5 of *Brachydanio rerio*.

* A denominator signifies total number of fish examined and a numerator number of cases positive for bacilli.

Table 1-a Name of tropical fish from which acid-fast bacilli were isolated

Name of fish examined		Number of fish	Number of fish positive for bacillus			Number of strains isolated and their designation	
Scientific name	Popular name		smear	section	culture		
Fam. poeciliidae	Lebistes reticulatur (Peters)	Guppy	19	0/19*	0/4*	1/13*	1 (Gp)
	Molliensia latipinna Le Sueur	Sailfin or Mollie	9	9/9	6/6	6/6	4 (sfl-sf4)
	Molliensia sphenops var	Black Mollie	3	1/3	0/3	2/3	2 (Bm1-Bm2)
	Xiphophorus helleri Heeker	Swordtail	10	3/10	3/10	2/5	1 (sw)
	Xiphophorus maculatus (Guenther)	Platy fish	2	2/2	2/2	2/2	1 (pl)
Fam. anabactidae	Betta splendens Regan	Siamese fighting fish	6	2/6	1/2	1/3	1 (Bt)
	Ttichogaster leerii (Bleeker)	Pearl gourami	134	115/134	15/15	55/72	6 (Pg1-Pg6)
	Trichogaster trichopterus (Pallas)	Blue gourami	10	2/10	0/10	1/10	1 (Bg)
Fam. characidae	Hyphessobrycon callistus callistus Boulinger	Serpa tetra	5	3/5	3/3	2/3	1 (sp)
	Hyphessobrycon pulchripinnis AHL	Lemon tetra	2	1/2	1/2	1/2	1 (Lt)
	Tilapia Mossambica Peters (Fam. cichlidae)	Tilapia	15	0/15	0/15	1/15	2 (Tp1-Tp2)

* A denominator signifies total number of fish and a numerator number of cases positive for bacilli.

2) Drug resistance: Majority of the strains can grow well on egg-media containing PAS 2m/ml except for 2 strains of *M. sal.* As shown in Table 2, many of the strains showed strong resistance to INH, 1314Th, chloromycetin and streptomycin except for 2 strains of P'-group, Pg2 and Sf1.

3) Enzyme activity: Majority of the strains exhibited strong catalase activity. As shown in Table 3, formamidase test is negative in all of them except for "Bg" and 4 strains of *M. sal.* Not a few strains had nicotinamidase activity. Urease reaction were strongly positive in many strains excluding two, "Bg," and "Shio". Niacin test; it was highly emphasized that the 4 of the photochromogens together with *M. Pl* and *M. mar.* showed positive for the test. Besides this, "Bg" and 4 strains of *M. Sal.* were also positive, though weak and inconstant, for the test (Table 3).

4) Immunological properties: Sera of goldfish infected with "Sp" and "Pi" strains were capable of agglutinating both of them reciprocally (Table 4-a and 4-b). Cross immunity among the strains were clearly demonstrable by routine agglutination test using rabbit antisera and by Ochterlony's gel-diffusion method (Fig. 4-a and 4-b). Tuberculin allergy did not arise in guinea-pigs inoculated with "Sp", "Sw", "Sf1" Pg3 and Bm2 even after 6 weeks.

5) Inoculation experiments: Almost no noteworthy lesions were produced in rabbits, guinea-pigs, mice and chickens. Virulence of the strains apparently seemed to be weak against warm blooded animals. On the other hand, goldfish (7-10 cm in body length) inoculated

with the mycobacteria of the fish origin (0.1mg/0.1ml) caused generalized infection identical to that of spontaneously diseased tropical fish. It was revealed that intramuscular inoculation was favorable for evaluation of the infection than intraperitoneal injection inasmuch as the effect of mechanical violences on fish by injection were avoidable. Although the study is not yet thoroughly performed, generally speaking, pathogenicity of strains of P-group seems to be strongest and constant, followed by Bm2, Bt, Cc116, Pg1, Pg5 and C106 etc. Toxity of Bg, Pg2, Pg3, Sf3 seemed to be rather weak or almost avirulent. However, the virulence of every strain seemed to be influenced considerably by breeding condition. If the condition was kept favorably, the fish would remain alive for 1/2—1 year

Table 2 Drug resistance of Mycobacteria isolated from tropical fishes.
Concentration: γ /ml

Drugs		INH	1314	CM	SM
Strains					
P	Lt	<10	<20	<20	<50
	Pl	<10	<20	<50	<20
	Sf2	<10	<5	<50	<20
	Sp	<10	<10	<20	<10
	SW	<10	<10	<20	<10
	PL*	<10	<10	<50	<20
	Pis*	<10	<10	<50	<50
	Mar*	<20	<10	<50	<50
S	Bm2	<10	>50	>100	<20
	Gp	<10	<20	<100	<20
	Pg3	<5	<10	<50	<20
	Sf3	<5	<10	<50	<100
	Tp2	<50	<20	<50	>100
N	Bg	>50	>50	>100	>100
	Bt	>50	>100		
	Pg1	>50	>100	>100	>100
	Pg5	<1	<100	<20	
	Shio	>50	>100	<50	>100
	M32*	<20	<50	<20	<100
	Sal. Sc*	<10	<100	<20	<100
P	Pg2	<10	<5	<5	<1
	Sf1	<5	<5	<10	<1

* Pl...*M. Platypoecilus*; pis...*M. piscium*; mar...*M. marinum*; M32 and sal SC...Mycobacteria isolated from a tropical fish and a salmon respectively, by Ross.
P...Photochromogen; S...Scotochromogen; N...Nonphotochromogen.

<10...Inhibited growth in 10 γ /ml-concentration.

>100...luxuriant growth in 100 γ /ml-concentration.

Table 3 Amidase activity of mycobacteria of fish organs with reference to the Niacin test.

Enzymes for examination		Formamidase	Nicotinamidase	Urease	Niacin test
Strains					
P	Lt, M. Pis.	—	—	++~+++	—
	Pl, St2, Sp, Sw	—	+	+++	++~+++
	M.PL.	—	+	++	++~+++
	M. Mar.	—	++	+++	±
S	Bm2, Gp, Pg3, Sf3	—	—	++	—
	CC-116	—	—	+	—
N	Shio.	—	—	—	—
	Bg	+	—	—	+~—*
	M. Sal. CC	+	+	++	+~—*
	M. Sal. SC	+	—	++	+~—*
	M. Sal. CAR & OR	++~+++	+	+++	+~—*
P'	Sf1	—	+	+	—

+~—*; Reactions were in weak and results were inconstant.

Symbols signify the same thing as those shown in Table.

Table 4-a Agglutination test between sera of gold-fish infected with the strain "Sp" or "Pl" and bacilli suspension of "Sp"

Bacilli infected	Number of fish sera	Elapsed days after infection	Dilution of sera				
			20	40	80	160	320
Sp	1	141	++	+	+	+	±
	2	183	++	+++	++	++	++
	3	190	++	++	++	+	±
	4	211	+++	+++	++	+	+
	5	255	++	++	+	+	+
Pl	2	97	++	++	++	+	+
	3	118	++	++	++	+	+
	4	132	+++	++	++	++	+
	5	162	+++	++	+	±	±
Control Group	1		++	+	±	—	—
	2		++	+	+	±	—
	3		—	—	—	—	—
	4		+	±	—	—	—

and over. In histology, the lesions developed in the fish tissue were characterized with formation of miliar nodules or granulomas identical to the lesions found in the diseased tropical fish above mentioned.

On the other hand, the author performed inoculation experiments to the goldfish with leprosy, and tubercle bacilli and 4 strains of atypical mycobacteria together with 7 strains of saprophytic

Table 4-b Agglutination test between sera of gold-fish infected with the strain "Sp" or "PI" and bacilli suspension of "PI"

Bacilli infected	Number of fish sera	Elapsed days after infection	Dilution of sera				
			20	40	80	160	320
PI	1	49	+	+	+	+	—
	2	97	+	+	+	±	±
	3	118	+++	+++	+++	+	+
	4	132	+	+	+	+	±
	5	162	++	++	+	+	±
Sp	2	183	+	+	±	±	—
	3	190	+++	+++	+++	+	+
	4	211	+++	+++	+++	++	+
	5	255	+++	+++	+++	++	+
Control Group	1		++	+	±	±	—
	2		±	—	—	—	—
	3		+	—	—	—	—
	4		±	—	—	—	—

mycobacteria, examining the results obtained bacteriologically, immunologically and histopathologically in comparison with the results obtained by inoculation test with the mycobacteria of the fish origin.

Although leprosy bacilli, murine leprosy bacilli, tubercle bacilli, a strain of saprophytic mycobacteria were found tinctorially over 1—2 years (742, 757, 397 and 441 days respectively), and that the latter four kept their viability, at least 12, 4 and 6 months long after the inoculation in the fish tissue respectively, producing slight lesions in the fish body. It was clear that these mycobacteria were not pathogen, though not indifferent, to the fish. Contrary to these findings, of the 4 strains of atypical mycobacteria, 3 were found to be virulent to goldfish as almost similarly as mycobacteria of the fish origin. The 3 were P6 (Scotochromogen), P7(Non photochromogen) and P8 (Photochromogen). Every strain injected into the muscle at the site between the back-fin and side-line. It was revealed that the agents inoculated caused generalized infection after 3—4 weeks, forming miliar tubercles in the kidney, spleen or liver etc.

Although the study is going on and further and elaborate scrutinization should be required, the facts that there exist many similarities in bacteriological, immunological and other biological properties between atypical mycobacteria group and mycobacteria group of the fish origin are full of suggestion in solving the relationship between the two groups, and between each of the two and saprophytic mycobacteria groups. Furthermore, it is emphasised that there are much more strains of mycobacteria associated with the cause of tuberculosis-like disease of the fish besides *M. marinum* and *M. platyepocilus*, both of which alone are accepted as mycobacteria concerned in the Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. (7th edition, 1958).

写真説明

- Fig. 1 Photomicrograph showing a formation of miliar nodules in the spleen of a goldfish inoculated intramucularly with a scotochromogenic strain P6 of atypical mycobacteria and, killed 161 days after. Bacilli and masses of pigment were seen. Ziehl-Neelsen, 20×20.
- Fig. 2 Photomicrograph showing a murine leproma-like granuloma seen in the liver of a tropical fish, *mollinsea latipinna* Le Sueur. Ziehl-Neelsen, 20×10.
- Fig. 3 Photomicrograph showing a formation of miliar nodules, resembling to a transverse section of a thrombosed vessels, in the kidney of a tropical fish *xiphophorus helleri* Hecker. Big bacilli masses are seen. Ziehl-Neelsen, 20×20.
- Fig. 4 Ultra-thin section of the kidney of a carp inoculated intramuscularly, with mycobacteria, "Sp" strain, isolated from a tropical fish and killed after 227 days. Showing a transverse section of three bacilli (Myc) enclosed by capsule-like memberane with uniformly dense body (U-equivalent to "opaque droplet"). Capsule spaces (CS) are clearly shown.
- Fig. 5 Ultra-thin, longitudinal section of a strain "Sp" of mycobacteria of the fish origin, cell wall, endoplasmic memberane, nuclear site, mitochondrial equivalent (M) were seen. A cell in dividing process is clearly shown (arrow). MpB.....Metaphosphated bodp.
- Fig. 6 Showing a cord-formation of a strain Lt of mycobacteria of the fish origin, cultivated in Lockemann's media added serum for 4 weeks. Ziehl-Neelsen, 20×20.
- Fig. 7 Absorption spectra of pigments obtained from two strains of mycobacteria ("SP" and "Pg3") and a carrot.
- Fig. 8 A homologous precipitation reaction between antiserum of strain "P1" isolated from a fish (in a middle well) and antigens of 6 strains of mycobacteria (in outer wells, No. 1—No. 6). The antigens were prepared from a filtrate of 4-5 weeks old culture on Lockemann's media (a luxuriant pellicle formation) by concentration to 1/10 volume on the water-bath at 62°C. Symbols; 1-5.....antigens of 5 strains, Sp, Sw, Sf1, Sf2, and P1 in the order designated, all of which of the fish origin. 6.....antigen of tubercle bacilli (Strain "Aoyama B")
- Fig. 9 A almost homologous precipitation reaction between antiserum of strain "P1" isolated from fish (in a middle well) and antigens of 6 strains of mycobacteria (in 6 outer wells, No. 1-6). The antigens was prepared in quite the same ways as described in Fig. 8. Symbols; 1 and 2.....antigens prepared from strains "Sf1" and "Bm2" respectively, both isolated from fish. 3...an antigen of a strain P8 of atypical mycobacteria. 4...an antigen of *M. salmonifilum* SC 5 and 6...Antigens of two strains, B913 and B916, of *M. balnei*.
- Fig. 10 Photomicrograph showing formation of numerous miliar nodules containing bacilli in the heart (ventricle and auricle) of a goldfish inoculated intramuscularly with strain "Sp", mycobacteria of the fish origin, and killed 178 days after. Ziehl-Neelsen, 20×4.
- Fig. 11 Photomicrograph showing a nodule found in the liver of a goldfish inoculated intramuscularly with strain "P1", a sort of mycobacteria of the fish origin, and killed 131 days after. A nodule resembling to a transverse section of a hyalinized vessel contains bacilli masses. Ziehl-Neelsen, 20×40.

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

Fig. 6

Fig. 7. Absorption spectra of pigments obtained from two strains of mycobacteria ("Sp" and "Pg3") and a carrot.

Fig. 8

Fig. 9

Fig. 10

Fig. 11

抗 酸 菌 と 魚 類

(東北大 抗研) 佐 藤 三 郎

1897年 Bataillon et al¹⁾ が結核様乃至癩様疾患を持つ鯉から *M. piscium* を分離し、魚類にも抗酸菌症のあることを明らかにした。Parisot²⁾ によると当時これが結核菌の魚体内での変異を示すかどうかをめぐる多くの実験と議論が行われた。Bertarelli et al (1910)³⁾ は多くの海水魚を調べて自然の状態ではこれらに抗酸菌症はほとんどあるまいと述べたが、その後 Alexander⁴⁾ や Sutherland⁵⁾ は鱈の1種に狼瘡様疾患を見たとし、1926年 Aronson⁶⁾ は水族館飼育の海水魚に時折結核様疾患を見たという Winsor の言からこれを調査して、*M. marinum* を分離し、その細菌、病理、免疫学的研究を公にした。水族館飼育の熱帯魚にこの種疾患を見ることは稀でなく 1942年 Baker and Hagan⁷⁾ は platy fish から *M. platipocilus* (*M. PL*) を分離、1949年には Besse⁸⁾ が paradise fish を含む多数の熱帯魚から抗酸菌を分離して *M. anabanti* と呼んだ。後年 Vogel⁹⁾ は本疾患の分布は10目、34科、84属 120種の淡水、海水産の魚にわたると称した。鮭類についても Earp et al¹⁰⁾ Wood et al¹¹⁾ の発見に続き最近 Ross¹²⁾ による *M. Salmonifilum* (鮭菌と略す) の分離が報ぜられた。以上魚の結核様疾患については Aronson¹³⁾ や Parisot²⁾ の総説にくわしい。

一方、癩と魚との関連については古く Hutchison¹⁴⁾ や Creighton¹⁵⁾ による Fish-theory があり癩発病と腐魚嗜喰との関係が宣伝されたがもとより根拠のない議論である。ただ、近年、Bergel¹⁶⁾ は魚はGの所謂 pro-oxidant の食物で癩感染に促進的に働らくと述べた。

以下私はまず病原、非病原の諸種抗酸菌の金魚、鮪への接種試験の成績を述べ、ついで熱帯魚その他からえた多数の抗酸菌株の生物学的性状と金魚への接種試験の成績を記し、さらにこれらと人の非定型抗酸菌との関連についても言及しよう。

1) 金魚、鮪などに対する癩菌その他病原 非病原性抗酸菌の接種試験

成績の一部は既に公表した。¹⁷⁾¹⁸⁾

癩菌：菌液（20-100倍結節乳剤の1000回2分遠心後の上清）0.1ml を4-8gの金魚の、0.5ml を35-70gの金魚の各腹腔内に接種した場合、菌は2年余にわたってほとんど毎常内臓殊に肝、脾、腸間膜、卵巣などに証明で

き、しかも細胞内に小塊をなし、集まって肉芽腫を形成し増殖したかのような所見を呈することが屢々だった。しかしその周辺に組織反応の著しいものがなく、対照の煮沸菌接種群にもほぼ似た所見が見られた。鼠癩菌（ほぼ癩菌の場合と同じ操作で菌液を作ったが菌量はずっと多い）ではさらにいっそう増殖を思わせる所見に接する。しかも接種後1年までは少なくとも菌の生存が確認された。しかし共に累代接種には成功しなかった。筋肉内に接種した場合はなお観察中であるが、接種局処における菌の増殖は癩菌、鼠癩菌共確実ではなく内臓に菌が侵入することも少ないようである。熱帯魚 *Trichogaster leeri* または *Tilapia mossambica* による実験は供試魚自体が既に抗酸菌症を有しており、判定不能であった。なお Chaussinand et al¹⁹⁾ は *Eupomotis gibosus* の腹腔内で20カ月も鼠癩菌が生存するとし、高山²⁰⁾ の鮪での実験では259日であった。

結核菌：青山B株 0.1mg/0.1ml を5g前後の金魚の腹腔内に接種したが、菌は400日以上も内臓中にも証明でき小塊を作っていたが、復原培養では4カ月まで陽性だったに過ぎない。

自然界抗酸菌：水系5、土系1、動物系1（モルⅢ株）の7株について 0.1mg/0.1ml を腹腔または皮下に接種したが、菌株により金魚に対する毒力を多少異にするが、それよりも接種法による差が大きく、腹腔内に接種されたモルⅢ株の如きは400日後も内臓中に残存し、復原培養も9カ月まで可能であった。土系の1株も腎に多数の菌を持つ小結節を作った。しかし皮下に接種された多くの水系の菌はおおむね、速やかに消失するものようであった。中村²¹⁾ は雑系抗酸菌を鯉の腹腔内に10mgの大量注射し7週後にかなりの病変を認めている。以上の接種実験例のすべてについて剖検時、肝、脾、腎、鰾、卵巣、心などから、培養試験を行ったが、癩菌を接種した金魚（塩谷株）鮪（C106株）から各1株、および癩死菌を接種した鮪より1株（Cc 116株）の抗酸菌を分離し得た以外、全例陰性に終わった。しかも上記3株の菌は金魚、鮪計170尾の内臓計約800個についての培養成績である。

非定型抗酸菌：P1, P6, P7, P8の4株を各0.1mg/0.1ml ずつ7~8cm長の金魚の筋肉内に接種した。P1株とP8株は Photochromogens, P6株は Scotochromo-

gens, P7 株は Non-photochromogens に属する。6 カ月にわたる観察によると P1 株は病原性少なく局処に菌をもつ肉芽腫を作るが、内臓では微細結節を作ってもその中の菌は速やかに消滅した。しかるにほかの株はかなりの病原性を示し、接種部に慢性の肉芽腫を作り、腎、肝、脾、心などにも間質に菌を容れた細胞が現われ、殊に腎、脾、筋肉に微細な結核結節の形成さえ見られた。(Fig. 1)

2) 金魚その他養殖、天然の淡水魚、海水魚についての抗酸菌症の探索

検査の方法は体表および内臓の外観を調べた後、各臓器の塗抹標本を作って抗酸菌の有無を検し、肝、腎、脾については毎常、その他の臓器については時折、小川法により培養25°C (時には37°C にも) に2カ月間放置した。それによると金魚53 (宮城, 山形, 大和郡山産), 鮒24 (内10尾は養殖), 鯉16 (養殖), 鱸15, ウグイ 5, 朝鮮鮒13, 虹鱒47, 鮭及び川鱒各1, その他イシダイ 6, スズキ 4 を含む21尾の海水魚では1例の朝鮮鮒 *Macropodus chinensis* (Bloch) で肝に数コの抗酸性桿菌? を認めた (切片, 培養は陰性) 以外, 全例すべて塗抹, 切片, 培養各試験が陰性に終わった。

しかるに市販の熱帯魚7科23種計260個体についての調査では次のような興味ある成績を得た。すなわち a) 塗抹陽性, 切片陽性で培養も陽性だった場合, 4科11種計215尾 (内129例は全例培養陽性) b) 内臓の塗抹や切片中に菌を認めながら培養陰性だった場合, 5科5種15尾, c) 塗抹も切片も菌陰性で培養も陰性に終わった場合, 3科17種計30尾, となる (Table 1-a and b)。結局11種の魚から21株の抗酸菌が培養分離されたが, 魚を科別に見ると胎性目高科 *Fam. poeciliidae* 5種から9株, キノボリウオ科 *Fam. anabantidae* 3種から2株, シクリッド科 *Fam. cichlidae* 1種から2株となる。これらの魚は6カ処の水族館より入手したが, その最初の源は香港およびタイ国から輸入された魚と思われる, 大部分が香港の1業者から供給, 国内で繁殖されたものの子孫と考えられた。

3) 熱帯魚の抗酸菌症

重症に潰瘍を見たものはなく外観上特記すべきものなかった。剖検的には高度の場合, 肝, 腎時に脾に粟粒大から半米粒大の灰白色の結節の形成があり, 稀に淡黄褐色の腹水の滲留を見るが, 肉眼的にはさしたる変化を見ないことが多い。各臓器の塗抹標本中には病変に応じて少数または多数の抗酸性桿菌が見られ殊に結節部では大

小の菌塊が純培養を見るように集まっている。組織学的には高度の場合は組織球または単球が集まって大小の肉芽腫を作り, 往々壊疽巣もあるが乾酪化というほどのものは少ない。夥多の菌を密にいた細胞の集塊はあたかも鼠癰腫を見るようで (Fig. 2) その周辺には小許の円形細胞を見るが, ほとんどこれを欠くものが多い。比較的軽症で慢性に経過したと思われる例では心, 肝, 脾, 腎殊に腎に粟粒大の結核結節が形成されるが, それは類円形をなした類上皮細胞の集塊で相融合して類壊疽化して泡沫様となり, 遂には硝子様変性に陥ってエオジンで淡紅染した無構造物と化し, その周辺はヘマトキシリンで青染した細長い細胞の輪でとり巻かれ, 一見内腔が閉塞して硝子様変性に陥った小血管の横断面を見る観がある。(Fig. 3) 細胞内に密につまった菌は細胞の融崩が進むにつれ集まって大小の菌塊を作る。しかし古くなると周囲の輪を残して無構造物と化し菌はほとんど消失し, 時に消耗色素をとどめる。時には多数の黒褐色のメラニン色素塊を菌と共に持つ結節もある。ズダンⅢ染色で特に染まる脂肪粒は認められなかった。超薄切片による電顕像では人の癰腫によく似た所見を呈し, 細胞質内の多数の菌は分裂の種々な過程を示し, 定型的ではないが所謂 opaque droplets や lipid droplets に相当する顆粒も見られ, 菌をとり巻く capsule enclosing membrane や capsule space の明らかなものもあった (Fig. 4)

4) 熱帯魚および金魚, 鮒より分離した抗酸菌の性状

熱帯魚より分離した上記21株の菌と癰菌を接種した金魚, 鮒よりえた既記の3株 (塩谷株, C106株, C C116株) 計24株について菌学的性状の概略を述べ, 要に応じて Ross 氏より送られた *M. piscium* (*M. pis*) *M. marinum* (*M. Mar*) *M. platypoecilus* (*M. Pl*) および *M. salmonifilum* (鮭菌, Cc, Car, OR, SC の4株) と M32 株 (同氏²²⁾ が *Serpa tetra* より分離したもの) やその他の衆知の抗酸菌と比較する。

a) 集落: まずその色調を Runyon²³⁾ が非定型抗酸菌で行った方法に準じ (40~60cm, 60燭光, 15~60分照射) 光発色性によって分類すると, Photochromogens (以下P群) 5株 (Lt, Pl, St₂, SP, SW), Scotochromogens (S群) 9株 (Bm2, C106, Cc116, Gp, Pg3, Pg4, Pg6, Sf3, TP2), Nonphotochromogens (N群) 7株 (Bg, Bm1, Bt, Pg1, Pg4, Sf4, 塩谷) となり, この21株は通常, 厚薄種々の表面や顆粒状をなす湿潤した菌苔を作る。しかるに他の3株 (Pg2, Sf1, Tpl1) は結核菌様の乾燥して半球状に隆起した3~4mm 径の皺襞の

多い集落を作り、融合すれば凹凸あるやや硬くて厚い菌苔となり、小川培地ではその基底を黄褐色に変ぜしめる。集落の色ははじめ淡黄灰白及至淡褐黄色であるが曝光により3～10日で次第に黄褐色の度を増し、少し古くなると橙黄褐色とさえなる。この3株は勿論 Runyon のいう P 群ではないが自然界抗酸菌を室内に長く放置する時、集落の色調に変化をきたす場合のそれとも趣を異にするとわれ、かりに Delayed photochromogens (P'群)と呼んでおく。越智²⁴⁾らは室内7日間の放置で強い色調の変化をきたした非病原性抗酸菌の3株をあげている。それはさておき P 群は露光により微黄褐灰白色の集落が一夜で橙黄色になるが人の非定型菌に比し遙かに着色度が強く又菌苔もずっと厚い。S 群もやや厚い橙黄色の菌苔を作るが Pg4 では薄くて色も淡い。N 群では灰白色やや乾燥した菌苔を作り、Pg1, Pg5, Bg では厚く Bm1, Bt, 塩谷株では薄いことが多い。以上は鶏卵培地上の一般所見で多くの菌株は10～18日後には発育の盛期に達するが、Sf1, Pg2, Tp2 ではやや遅く、C106, Cc116 は最も遅く3～4週を要する。血清、血液寒天、Kirchner 寒天では発育が不良だがグリセリン牛心浸出液寒天では極めて発育がよかった。ゲラチンでも発育はわるく、液化しない。種々の液体培地上での発育は P 群では極めてよく3～4週で厚い皺のある菌膜を作るが、群、N 群では不良または生え難いものも多く、P 群も不良 S でともにかえて底で少し発育する。

b) 菌の染色性と形態：菌株により培養の時期により多少の差があり、P 群は一般に大形で $7\sim 8\mu \times 0.4\sim 0.5\mu$ 以上に達し屢々濃染部と淡染部が交互に4～5コずつ並んでおり、培地上では太い短桿菌となること多くやや多形性を示す。N 群は一般にやや繊細で、P' 群は結核菌に最も近い形態と大きさを示す。定型的な分枝や分芽はなく菌糸を作らない。Sp, Sw 両株の超薄切片像では二重構造の細胞膜、細胞質膜、核様構造など結核菌に類似するが、時に一端が明面の暗黒部になっている時もあった。その他ミトコンドリア様構造や種々の分裂像が見られる (Fig. 5)。抗酸性、抗酒精性は強い。10%の塩酸、硫酸、硝酸の脱色力を見るに1時間では影響されない。しかし3時間の作用では硫酸では影響されないが、塩酸では60%以上、硝酸ではそのほとんどが脱色された。抗煮沸性：pH 7.0 蒸留水を用い後染色なしに判定した。P 群 P' 群の8株は7～10分、S 群も多く10分前後を示したが Gp 株のみ3分であった。N 群も必ずしも弱くなく大抵4～8分にあったが、塩谷株だけが1分を示した。

c) 培養至適温度と温熱に対する抵抗性：i) 培養至適温度は $25^{\circ}\sim 30^{\circ}\text{C}$ とわれ、 $15^{\circ}\sim 18^{\circ}\text{C}$ では発育が

極めて不良、3週間後も陰性のものが少なくない。 37°C での発育はさらに悪いが P' 群で最も不良、P 群でも悪いものが多かった。しかし、Pg3, Pg5 Bg, Gp 等では 25°C と大差がなかった。なお C106, Cc116 の両株は 25°C でも 37°C でもほぼ同じでともに発育が最も遅かった。ii) 温熱に対する抵抗：Sp, Sw, Pg2, Pg3 各株は 40°C 、1時間の作用で死滅に瀕し集落の離解が見られた。 50°C 、1時間ではほとんどの菌株に同様の現象が見られ、 50°C 、4時間の作用では全菌はほとんど死滅、 55°C 、 60°C 各1時間の作用で全菌株は全く死滅する。

d) 食塩水中に保存した場合の菌の生存力約：20 mg の菌を7～8ml の生塩水中に投じ、室温 ($10\sim 30^{\circ}\text{C}$) に置いて1月毎に小川培地に移植した。9ヵ月後、P' 群の Pg2, Sf1 株は死滅に瀕し、S 群中の Pg3, Pg4, Sf3 の三株でも発育が不良であった。結核菌 H37R V, 青山 B 両株は 37°C 、70日の浸漬に耐え、非定型菌 P1, P6, P7, P8 は90日以上も生塩水室温の保存に耐えた。なお Thioglycolate 培地中でも発育は不良だが増殖可能のものが多く、Pg1～Pg6 の6株と P1 株でやや不良であった。

e) 酸、塩基に対する抵抗性：2規定の塩酸、硫酸、硝酸と苛性ソーダ中に4時間菌を置いた後、中和して食塩水を加え遠沈後、小川培地に移植した結果によると、硝酸ではほとんどの菌が死滅し、塩酸でも Lt 株、Pg 2 株は生存したが、Sp, Bg, C106, Cc116, Pg1 各株は死滅した。硫酸、苛性ソーダに対しては抵抗が強く、Cc116 株が硫酸4時間の処理で死滅に瀕したのを見ただけである。

f) 二、三抗結核剤に対する抵抗性：10%血清加 Kirchner 培地に INH, 1314Th, Chloromycetin (CM) Streptomycin (SM) を加えたものに $0.1\text{mg}/0.1\text{ml}$ の菌を加え 25°C においた。成績は Tab. 2 に示す通りで N 群中の Pg5 株が INH 1γ で抑止されたほかは、P, S, N 各群の菌は INH に対し 10γ 以上、1314Th に対し 20γ 以上、CM, SM に対しても $20\sim 50\gamma$ 以上の抵抗性を示すものが多かった。ただし P' 群の Pg2, Sf1 株が SM 1γ で抑止され、ほかの薬剤にも $5\sim 10\gamma$ で発育を抑止されたのは注目される。PAS に対しては東村²⁵⁾²⁶⁾に従い脱炭酸能 (MAP テスト) を調べたところ、N 群の Bg, Pg5 両株は灰黒～茶褐となり、P 群でも3～4週より褐色の色調を帯びた。S 群と P' 群ではほとんど色調の変化を見なかった。発育は P' 群ではかなり抑止されたが、ほかは対照より少し不良の程度だった。しかるに鮭菌 S C O R 両株は著明に抑止されて発育は極めて悪かった。

g) 中性紅試験：Dubos-Middlebrook²⁷⁾ によって行

ったが、陽性を示すものが多く、P' 群では最強、P 群では中等または弱陽性、S 群中の C106, Cc116, Pg6 はほとんど陰性であった。既知の所謂魚結核菌 *M. pis*, *M. mar*, *M. pl* は3株共陽性だったが、Ross の鮭株4株と M32 株は陰性であった。

h) Cord 形成能: 定型的な Cord を形成するものは少なく、金魚に毒性の強いP群でさへその5株中 Lt 1 株のみが Cord 形成を示した。S 群では Bm2, 両株、N 群では Bg と Bt 両株で Cord 形成を見た。P' 群 Sf1 でははなはだ紛らわしかった。*M. pis*, *M. mar.*, *M. pl* は Cord 形成を営み、鮭菌の4株でもこれが見られた。(Fig. 6)

i) Peroxidase 反応 (Cathecol-H₂O₂ 法): おおむね陽性を示したが、S 群の C106 株では陰性、Pg3, Sf3 株では弱陽性、N 群の Pg3 でも弱かった。鮭株でも弱いものが多い。

j) Catalase 試験: Schweizer et al.²⁸⁾ によって行い、Sf1, Sf3 が弱陽性だった以外、いずれも強陽性を示した。

k) メチレン青脱色能: ロッケマン培地に2万倍になるよう色素を加え、菌を接種して4~7日後判定した。ほとんどの菌で陰性だった。

l) Niacin 試験: 今野によった。P' 群とS群の計13株では陰性だったが、P 群5株中 Lt 株を除く4株では明らかな陽性を示し、時には H37RV 株のそれをしのぐ強さであった。Benzidine-BrCN 法での着色が“Sp”株で時に微紫色を帯びることから Niacin 以外の反応物質の共存も考えられる。なおN株中の Pg1, Bg 殊に Bg 株でも弱陽性を示したが、供試標本により陰陽が区々であったが、鮭菌4株でも時により微弱陽性を呈した。なお *M. pis* は陰性、*M. mar* は微弱陽性、*M. pl* は明らかな陽性を示した (Tab. 3)

m) Amidase 試験: 岡²⁹⁾らによった。Formamidase は Bg 1 株を除きおおむね陰性、Nicotinamidase はP群の Lt, *M. pis.*, S群の大部分、N群中の Bg株と鮭菌の Sc 株が陰性だったことが注目された。Urease はN群を除けばおおむね強陽性だったが、S群の Cc116 株が弱陽性、鮭菌は4株とも強陽性だったことを注目したい。(Table. 3)

5) 光発色性について

既に述べたように魚より分離した抗酸菌24株中、5株はRunyon のいう意味の光発色性をもち皆魚に対し一定の病原性を示したが、そのうちの1株 Lt は定型的 cord 形成をなし、Niacin 試験は陰性、Nicotinamidase 陰性

という点がほかと相異した。前述結核菌様集落を作り、徐々に橙黄色に変色するP'群をも Photo-chromogen に入れてよいかどうかは一考を要する。既知魚結核菌中 *M. pis.* は酵素学的には Lt と一致し、*M. mar.* と *M. pl* は私の Pl, Sf2, Sp, Sw の4株と一致する。この光発色性は私の場合必ずしも不変な性質とばかりはいえないように思われる。それは温血動物を通過せしめた後や薬剤の影響により喪失したと思われる場合があったからで、今後の研究課題で人の非定型抗酸菌の由来を考える上にすこぶ重要な鍵となろう。

いずれにしても光発色性は生菌にのみ見られる現象で煮沸またはフォルマリン処理死菌には見られない。また光量が少なすぎたが Beckmann 光電比色計で検したところでは波長 370~420m μ と 550m μ 部に発色の peak があり、赤外線では発色しない。発色した橙黄色の色素 (S P 株) をS群である Pg 3 株の色素と比較するとともに人参の色素とよく一致し (Fig. 6), CH₃OH と CHCl₃ 等量液で抽出、20% エーテル・石油エーテルでアルミナ、カラムクロマトグラフィで分離した成績によると本色素の主成分は東村や海老名³⁰⁾らのいうように β -carotene で α -carotene も含まれ、そのほか3種の色素を混ずると思われる。Sp, Pg3 両菌株の色素の吸収曲線を実験のそれと比較したのが Fig. 7 である。

6) 魚から分離した抗酸菌の血清学的、免疫学的検討の概略

Tab. 4-a, 4-b に示したようにP群の Pl, Sp 両株を筋肉に接種した金魚の血清について凝集反応を検したところ、接種後 49~225 日では160倍乃至320倍まで陽性の成績を得た。また魚より分離した抗酸菌で免疫した家兎血清について相互の間に凝集反応および Ochterlony の寒天法で Hirano et al.³⁴⁾ に準じて抗原分析を試み興味ある結果を得たが、詳細は別報とするとして、これらの菌が結核菌のみならず非定型菌ともよく反応することを知った (Fig. 8,9)。一方同種の魚からえたのに私の Pl 株と M. PL (Baker 氏等の) とは免疫学的には少し異なる菌株であることが明らかにされた。なお接種後6週まで観察したところでは魚菌の多くは天竺鼠にツ・アレ르기を起こさなかった。

7) 魚より分離した抗酸菌の動物殊に金魚への接種試験

マウス: 0.1mg の静注では認むべき病変を起さず、時に数カ月まで淋巴腺から菌を還元培養し得た。しかし1

～2mgではしばしば急死する。天竺鼠、家兎、家鶏には特に強い病原性があるとは思えなかった。蛙には毒性をもつ株が多い。金魚(鯉、鯛):腹腔内接種では病原性のない自然界抗酸菌でも器械的刺戟の影響も大きいし、病原性がなくても長期にわたって菌が滞留しがちである。筋肉内に0.1mg(7～8g内外の魚)を接種する方法がよいと思われる。なお検討中であるがP群はほぼ一定した病原性を持ち、P'群は案外弱いらしい。しかしS群(Bm2, C106, Cc116等)も強弱種々の毒性を示し、N群(Bt, Pg1, Pg5)中にも毒性を持つものがある。同時に金魚には病原性が少なく熱帯魚には強いという場合も考えられるから、その判定には慎重な今後の検討を要する。病変は既述の熱帯魚の抗酸菌症のそれと全く同じで急激な場合または進行したものでは、腎、肝、脾、心などに鼠竇腫様の肉芽腫炎を、慢性の場合は結核結節(栓塞血管の横断面を見るようである)を発生する。しかし急死を免れた魚は飼育管理さえよければ自然治癒に向い、長く体内に少数の菌を蔵しつつ生存すると思われる。また数種類の抗酸菌の協同作用も考えられなくもない。それは同一個体の熱帯魚から2～4株の菌株が分離されたことが少くなかったことから推想される。(Fig, 10, 11)。

8) 自然界抗酸菌株に *M. balnei* や非定型抗酸菌(狭義)との関係

魚類抗酸菌症の原因菌が自然界抗酸菌株に水系、土系のそれと深く関連することは当然考えられることで、従来非病原性抗酸菌といわれたもののなかにマウス、鮒などに相当な毒性を示し、(Forbes et al.³⁵⁾ 占部³⁶⁾、中村³⁷⁾ 中性紅反応、Cord 形成その他の生物学的性状も部分的にせよ病原性抗酸菌のそれと通ずるものがある(占部³⁸⁾) などその関係は複雑である。近年 Schaffer et al.³⁹⁾ は *M. balnei* と魚結核菌との相似性を水中所在、光発色性などから強調した。私の研究でも人の非定型抗酸菌 P6, P7, P8などは魚にかなりの毒性をもち、筋肉内接種に続いて全身に拡がり、内臓殊に腎、脾に結核結節を作り、しかも生物学的性状が相互に酷似するなど、魚類抗酸菌症の原因菌と深い近縁関係を持つよう思われる。これについての吟味殊に光発色性やナイアシン試験、抗原分析などの詳細については他の機会にゆずりたい。

む す び

私は熱帯魚から21株、癩菌を接種した金魚、鮒から3株計24株の抗酸菌を分離し、その生物学的性状の概略を述べ、あわせて魚類の抗酸菌症について略述、既知の病

原、非病原の諸種抗酸菌との比較にも触れた。分離菌株が多く、その詳細は今後の研究にまたねばならない。本菌群の仔細な検討は人や動物の抗酸菌症、殊に人の非定型抗酸菌症と自然界抗酸菌との関連の解明に重要な示唆を与えるものとする。なお Bergey の分類は魚結核菌に関する点についてはあらためらるべきである。

「本研究に多大の御援助と御示教を賜った東北大学農学部狩谷貞二助教授に深謝し、材料採取に便宜を与えられた松島水族館の竹内健氏と東京上野動物園水族館の久田迪夫氏に感謝する。」

文 献

- 1) Bataillon, E., Duvard, et Terre, L.: Un nouveau type de tuberculose. *Compt. rend. Soc. Biol.* **49**, 446 (1897)
- 2) Parisot, T.J.: Tuberculosis of fish. *Bact. Rev.*, **22**, 240 (1958)
- 3) Bertarelli, D. und Bocchia, J.: Neue Untersuchungen über die Tuberkulose der Kaltblüter. *Zentralbl. Bakt.*, **54**, 385 (1910)
- 4) Alexander, D.M.: 文献(2) Parisot, T.J.より引用
- 5) Sutherland, P.L.: A tuberculosis-like disease in a Salt-water fish (Halibut) associated with the presence of an acid-fast tubercle-like bacillus. *J. Pathol. Bacteriol.*, **25**, 31 (1922)
- 6) Aronson, J. D.: Spontaneous tuberculosis in salt water fish. *J. Infect. Dis.*, **39**, 315(1926)
- 7) Baker, J.A. and Hagan, W.A.: Tuberculosis of Mexican Platyfish (*Platyopocillus maculatus*). *J. Infect. Dis.*, **70**, 248 (1942)
- 8) Besse, P.: 文献(2) Parisot, T.J. より引用
- 9) Vogel, H.: Mycobacteria from cold-blooded animals. *Amer. Rev. Tuberc.*, **77**, 823 (1958)
- 10) Earp, B.J., Ellis, C.H., and Ordal, E.J.: Kidney disease in young salmon. 文献(2) Parisot, T.J. より引用
- 11) Wood, J., and Ordal, E.J.: 文献(2) Parisot, T. J. より引用
- 12) Ross, A.J.: Mycobacterium salmonifilum Sp, nov. from salmonoid fishes. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **81**, 241 (1960)
- 13) Aronson, J.D.: Tuberculosis of cold blooded animals. A review. *Leprosy Briefs*, **8**, 21(1957)
- 14) Hutchinson, J.: 文献(16) Bergel より引用
- 15) Creighton: 文献(16) Bergel より引用

- 16) Bergel, M. : Cuadros lepromatiformes en animals provocados por alimentacion prooxidante. *Leprologia*, **1**, 46 (1956)
- 17) Sato, S., Mayama, A. : Inoculation experiment of leprosy in goldfish and crucian. I. Brief comparison of the results obtained by inoculation with lepra bacilli and those obtained with tubercle or saprophytic acid-fast bacilli. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, -c. **10**, 185 (1961)
- 18) Sato, S., Mayama, A. and Fukuda, M. : Inoculation experiment of leprosy in goldfish and crucian. II. Results with murine leprosy bacilli. *Sci. Rep. Tohoku Univ.*, -c. **10**, 234 (1961)
- 19) Chaussinand, R. et Besse, P. : Inoculation du bacille de Hansen et du bacille de Stetansky à la perche arc-en-ciel (*Eupomotis gibbosus*). Note préliminaire. *Rev. Brasil. Leprol.*, **19**, 4 (1951)
- 20) 高山保郎：癩菌の異種動物接種に関する研究 第4報、鮎に対する鼠癩菌接種実験、*広島医学*（原著）4巻1328頁（1956）
- 21) 中村加代子：雑菌性ミコバクテリウムの研究—いわゆる *Atypical acid-fast bacteria* との異同を顧慮して、第3編、マウス以外の実験動物に対する病原性の検討、*結核*, **36**, 263 (1961)
- 22) Ross, A.J. Personal Communication
- 23) Runyon, E.H. : Mycobacteria encountered in clinical laboratories. *Leprosy Briefs*, **9**, 21 (1958) (abst.)
- 24) 越智勇一、佐藤軍二、非病原抗酸菌の研究 I 牛からの分離および形態学について、*細菌誌*, **16**, 1068 (1961)
- 25) 東村道雄：PAS から赤褐色物質を産生する抗酸菌の1群、*医学と生物学*, **60**, 5 (1961)
- 26) 東村道雄：PAS から赤褐色物質を産生する抗酸菌の1群、続報、赤褐色物質の生化学的性状ならびに PAS 2mg/ml 1%小川培地による *M. tuberculosis* と *nonphotochromogen* の区別、*医学と生物学*, **60**, 92 (1961)
- 27) Dubos, R.J. and Middlebrook, R. : Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli. *Amer. Rev. Tuberc.*, **58**, 698 (1948) (Letters)
- 28) Schweizer, O. and Román, E., and Soós, I. : Studies on the catalase enzyme of mycobacteria under certain experimental conditions. *Amer. Rev. Tuberc.*, **77**, 146 (1958)
- 29) 今野淳、長山英男、岡捨己：ナイアシンテストの検討、*日胸*, **20**, 897, 1961
- 30) 岡捨己、今野淳、長山英男、工藤磯：抗酸菌の生化学的分類、*日本胸部臨床*, **20**, 797 (1961)
- 31) 東村道雄：非定型抗酸菌(*Photochromogen*および*Scotochromogen*)の Carotenoid 色素、*医学と生物学*, 61巻, 5頁 (1961)
- 32) 東村道雄：非定型抗酸菌(*Photochromogen*)の Carotenoid 色素(第2報) *医学と生物学*, **61**, 63 (1961)
- 33) 海老名敏明、本宮雅吉、宗形喜久男、佐竹央行：非定型抗酸菌 *Photochromogen* No. 8 及び *Scotochromogen* No. 6 の色素について、*結核*, **37**(特) 49 (1962) (学会)
- 34) Hirano, N., and Sushida, K. : Serological relationship between mycobacteria as determined by agar diffusion precipitation test. *Japanese J. Microbiol.*, **4**, 303 (1960)
- 35) Fores, W.D., Cuttino, J.T., Smith, A.C., Margolis, A.M. C., and Reid, D.W. : A Comparative study of for groups of acid-fast organisms, with special reference to pathogenicity. *A.M. A. Arch. Path.*, **66**, 1 (1958)
- 36) 占部薫：非定型抗酸菌の病原性、*医学のあゆみ*, **34**, 413 (1960)
- 37) 中村加代子：雑菌性ミコバクテリウムの研究—いわゆる *Atypical acid-fast bacteria* との異同を顧慮して、第2編、マウス病原性の詳細、*結核*, **36** 201 (1961)
- 36) 占部薫：いわゆる非定型抗酸菌をめぐる、*胸部疾患*, **3**, 305 (1959)
- 39) Schaffer, W.B. and Davis, C.L. : A bacteriologic and histopathologic study of skin granuloma due to *mycobacterium balnei*. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, **84**, 837 (1961)