

非定型抗酸菌の性状(Ⅱ)

— 平板培地上における集落観察の試み (i) —

京都大学結核胸部疾患研究所 内科学第一

久世 文幸, 武田 貞夫, 前川 暢夫

(原稿受付 昭和49年10月21日)

序 論

ヒト型結核菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) およびウシ型結核菌 (*Mycobacterium bovis*) 以外の抗酸菌によっても肺結核ときわめてよく似た病像を示す肺疾患が惹起されることは現在周知の事実である。この所謂非定型抗酸菌症については最近多くの研究成果が発表されつつある。ことに細菌学的な知見の増加はめざましいものがあり、多くの新菌種が決定され、臨床的にも菌種ごとにその病像の検討が行われんとする傾向にある。(例 *M. kansasii* 症, *M. intracellulare* 症等)

しかしながら本症に関する臨床的な解析はなお不十分であり、今後多くの症例をきめこまかく検討していかなければならない。胸部レ線像の検討、病理組織学的な検討、さらに疫学的な研究等今後多くの知見が得られるであろうが、本症の診断という観点からみると抗酸菌の「菌種」の正確な同定が何よりも重要なことである。

抗酸菌の同定に関しては、他の菌種と同じく形態学的観察、生化学的検査、実験動物に対する病原性等を総合して行われる必要があるが、各々その必要度に応じて、きわめて厳格な細菌学的同定から実際の臨床検査の一部として一般検査室でも実施出来る簡単な同定検査迄、多くの段階を採らざるを得ないであろう。実際本邦の現状から特に求められているのは、比較的誤りの少ない、一般臨床家にも容易になじみ得る

簡易同定検査であろう。昭和47年4月日本結核病学会抗酸菌分類委員会から出された、抗酸菌分類委員会試案¹⁾、東村の簡易同定検査法²⁾、さらに Kubica の方法³⁾ 等もこの線にそった提唱であろう。

これらの検査法は主として生化学的検査に重点を置いている様に見受けられるが、Kubica も述べている如く、抗酸菌の集落形態の綿密な観察は時に生化学的検査の誤りを訂正し得る可能性もある様で、現在迄比較的報告は少ないが、Fregnan と Smith⁴⁻⁶⁾、Kubica 等^{7,8)}、又 Runyon 等^{9,10)} によって平板培地を用いた抗酸菌集落の形態学的観察がなされ、その有用性が報告されている。これらの報告によると菌種によっては同定が可能の様であり、又、短期間に同定がなされ得るという利点もある様である。この比較的簡単な手技を利用することにより、臨床細菌学の立場から抗酸菌の簡易同定の一助ともなし得ると考え以下の観察を行った。

材料および方法

1) 培 地

一般細菌検査用のプラスチック製の無菌ペトリ皿 (90×15 mm) に後述の寒天培地を 20 ml ずつ注入し使用に供した。今回の観察では、キルヒナー (Kirchner) 寒天培地^{*}、デュボス

* キルヒナー寒天培地：キルヒナー液体基礎培地 900 ml, 細菌用寒天末 15 g を加熱溶解後高圧滅菌を行い、50°C まで冷まし牛血清を10%になるように加える。

(Dubos) 寒天培地[†], corn meal glycerol 寒天培地^{*} の3種類を使用した。

2) 使用菌株

1%小川培地で継代保存している抗酸菌101株を使用に供した。内訳は次の如くである。

M. tuberculosis:

H37Rv, H37Ra, 青山B, 患者分離株10株

M. kansasii:

P8, P18, ATCC 12478 および米国患者分離株3株

M. scrofulaceum:

P6, ATCC 19981 および患者分離株3株

M. intracellulare-avium group:

P39, P40, P41, P42, P44, P45, P47, P48, P49, P50, P53, P54, ATCC 15985, 100616, 121326, ATCC 15769 および米国患者分離株2株を含む患者分離株52株 (患者名又はNo. で記載)

M. fortuitum:

ATCC 6841 および米国患者分離株2株

M. chelonae:

ATCC 19977, Yamamoto S, Sato

以上の他, M. gordonae と思われる喀痰よりの分離株3株と, 同じく喀痰より分離された Nocardia 3株を使用に供した。

以上の菌株のうち, Package strains (P株), ATCC 株, 100616, 121326, Yamamoto S 及び Sato の諸株は, 大阪大学微生物病研究所より分与されたものであり, 他の菌株は, われわれの研究室で同定を行ったものである。同定検査には, コロニー性状, コロニー着色, 1%小川培地上の発育日数, 光発色性試験, カタラーゼ半定量法, Tween 80 水解反応 (5日法), 硝酸塩還元酵素反応, アリルスルファターゼ反応, アミダーゼ反応, PAS 含有培地上の黒変, ナイアシンテスト等を用いた。

3) 観察方法

上記菌株の1%小川培地に発育したものをを用い, ガラス玉コルベンで均等な菌液を作成, 約 10^{-4} mg/ml のものを 0.5 ml ずつ培地全面に接種した。各ペトリ皿は乾燥を防ぐ目的でプラス

ティックバッグに入れ密封し, 37°C で培養し, 接種後原則として4日, 7日, 9日および12日後に取り出し (迅速発育菌では, 1日, 2日および3日後), ペトリ皿を反転, 直下からの透過光を用い弱拡大 (10×10倍) で鏡検, 集落の形態を観察するとともに写真撮影を行った。(Nikon L型, EFMで, フィルムはFuji 35mm Neopan SS ASA 100を使用。)

観察結果

1) 全般的にみた集落の形成状況

所謂迅速発育菌 (Rapid grower) では接種後24時間以内に, 又, Slow grower では4日以内に, 10×10倍ですでに小集落の形成を観察し得た。この時期にみられた形態は, 伸長した桿状の菌体が束状に集まった一見不完全な紐状ないし糸屑様のもの (写真1-A) からきわめて初期の不正円形の集落らしき構造 (写真1-B) まで, 各々の菌株の発育の遅速によって種々の発育相がみられた。この時期には集落はいまだ緊密ではなく, それを形成している束状の菌体集合が明らかに見分けられた。

接種後 Rapid grower では2日, Slow grower では7日前後で, 集落はそれぞれ固有の形態を取りはじめ, 一方では所謂コード形成と名付けられている毛髪束状の形態 (写真1-C) に, 又, 一方では円形のドーム様の集落形態 (写真1-D) 等に分化していくのが観察された。接種後1週間目より2週間目にいたる間に, 各抗酸菌種, 又, 菌種によっては菌株によって, 更に使用した培地によって多種多様の集落形態が観察出来た。以下菌種別に記載する。

2) 菌種別の集落形態

Rapid grower で24時間以内 Slow grower で4日以内の集落形態は菌種間又は菌株間に著

[†] デュボス寒天培地: BACTO TB broth base dehydrated (Tween 含有) Difco 2.4 g と glycerol 10 ml に蒸溜水 170 ml を加え, 高圧滅菌後牛血清アルブミン液 20 ml を加える。

^{*} corn meal glycerol 寒天培地: corn meal agar (Difco) 17 g, glycerol 30 ml に 1,000 ml の蒸溜水を加える。

明な差違を示さなかったので、以下はそれ以後の観察時期における集落形態を記載した。

(i) *M. tuberculosis*

キルヒナー寒天培地(以下 KA と略す)には良好な発育を示すが、corn meal glycerol 寒天培地(以下 CMA と略す)には殆ど発育しない。菌株によっては CMA 上でも桿状の菌体が束状に集合したきわめて微細な集落を認めることがあるが、これ以上の発育は同培地上では認められなかった。

KA 上の集落は特徴的で、きわめて緊密な紐状の発育を示し、全体的な印象は毛髪の束状という形容が当筈だった。(写真1-C, I型と仮称する)写真1-Cは H37Rv 株の13日目の集落の一部である。この形態は今回検討した患者株の全てに認められた。

デュボス寒天培地(以下 DA と略す)上における *M. tuberculosis* の集落形態は、KA 上に

おける形態に比較するとその特殊性に乏しい。写真2-Aおよび2-Cは H37Rv 株および患者分離株の7日目の集落であるが、円形で平滑なドーム様集落で、後述するごとく、*M. intracellulare* の DA 上の集落形態と一見同じ様であった。ただ培養日数がたつにつれ集落周辺が平滑さを欠き、不正円形の割合が増して来るのが認められた。(写真2-Bおよび2-D)

(ii) *M. kansasii*

M. tuberculosis と同じく、KA および DA には良好な発育を示すが、CMA 上の発育は不良で、検討した6株中1株のみに後述する IV_a 型の集落形成を認めたにすぎなかった。

KA 上の集落形態は KA 上における *M. tuberculosis* の形態と酷似し相互に鑑別することが不可能であった。(写真3-A)

DA 上の *M. kansasii* の集落形態は1株を除いて全て KA 上の形態と同様であった。写真

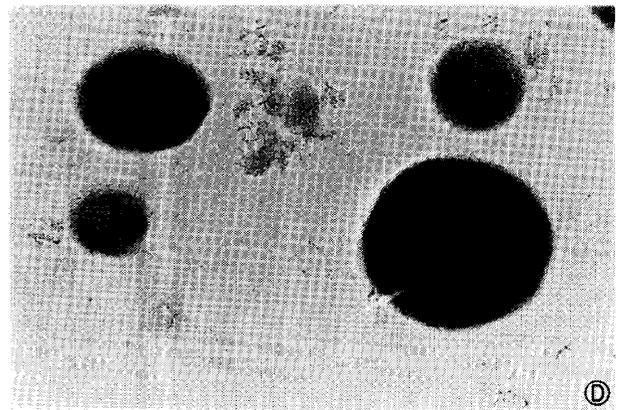
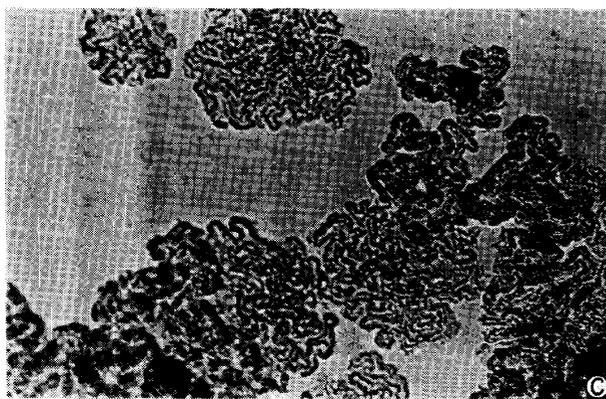
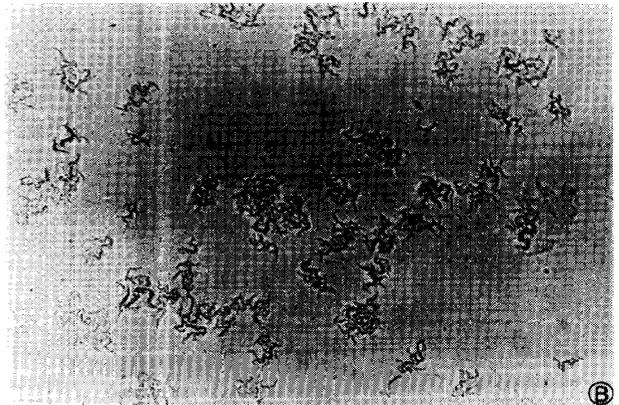
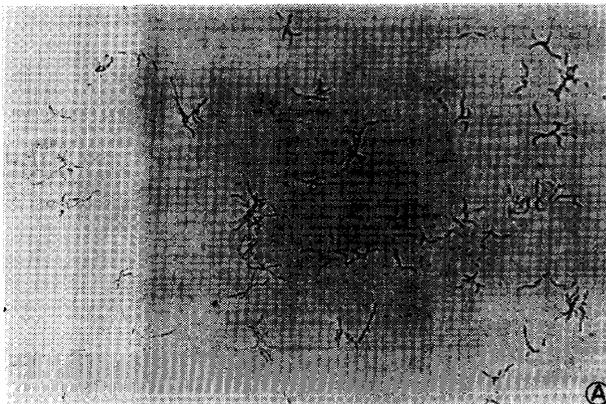


写真1 ④ *M. intracellulare* (ATCC 15985) CMA, 4日目
 ③ *M. intracellulare* (Aiba) CMA, 4日目
 ② *M. tuberculosis* (H37Rv) KA, 13日目〔I型〕
 ① *M. intracellulare* (100616) CMA, 12日目〔III型〕

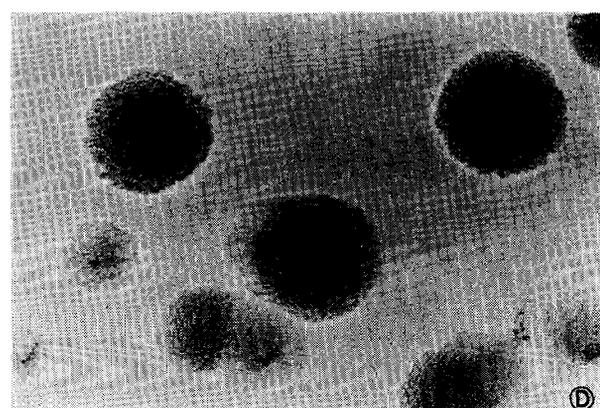
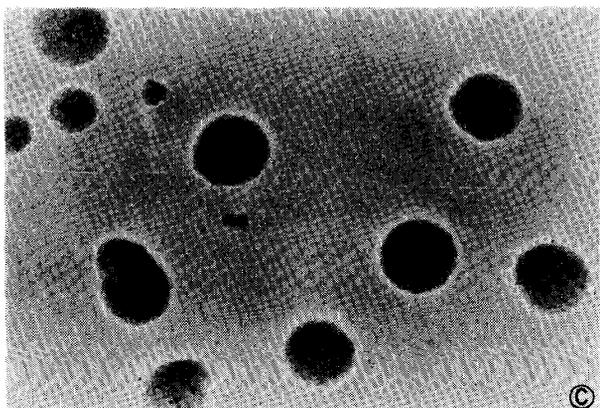
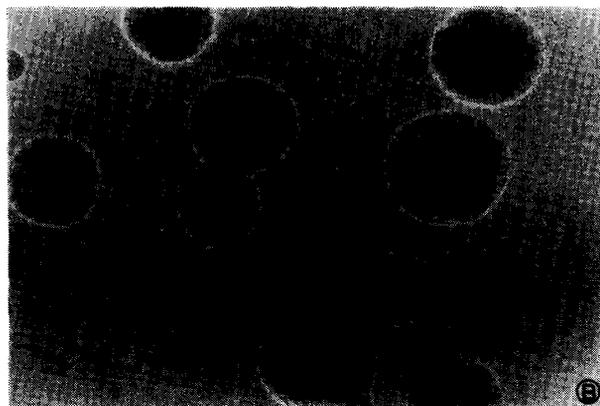
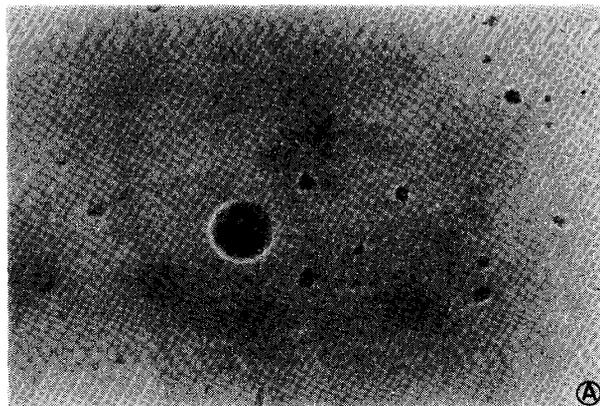


写真2 ① *M. tuberculosis* (H37Rv) DA, 7日目
② *M. tuberculosis* (H37Rv) DA, 12日目
③ *M. tuberculosis* (患者株) DA, 7日目
④ *M. tuberculosis* (患者株) DA, 12日目

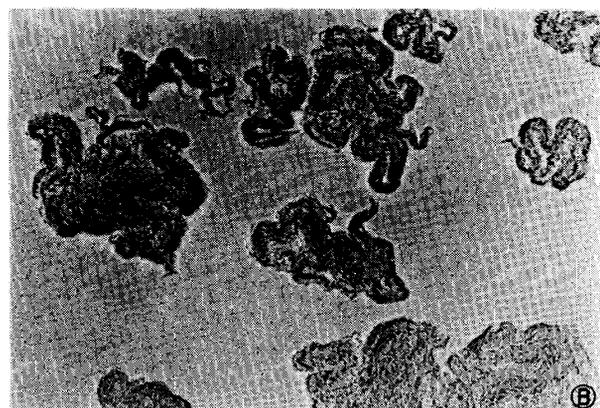
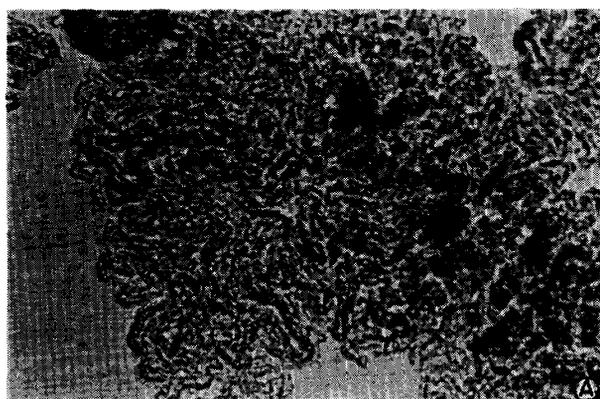


写真3 ① *M. kansasii* (T3518) KA, 13日目
② *M. kansasii* (T3518) DA, 7日目

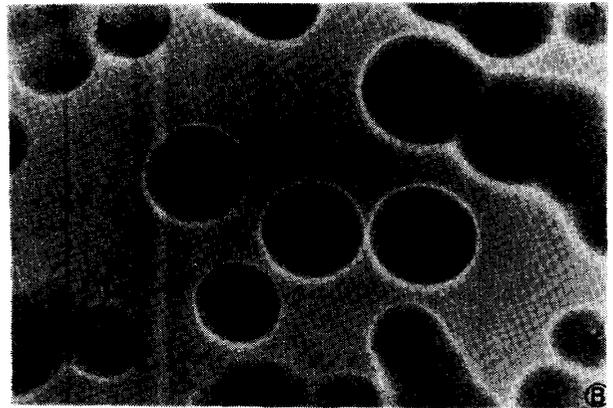
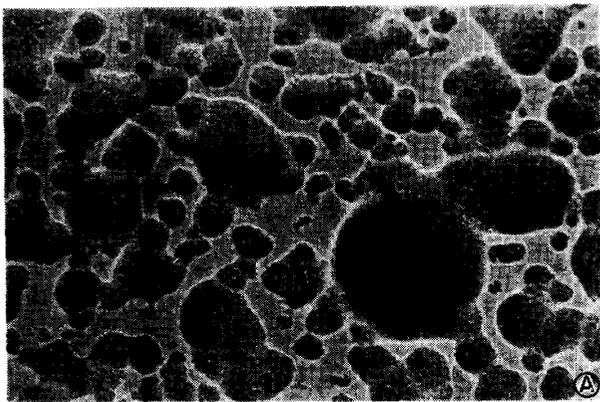


写真4 ① *M. intracellulare* (P48) KA, 9日目
② *M. intracellulare* (No. 24) DA, 12日目

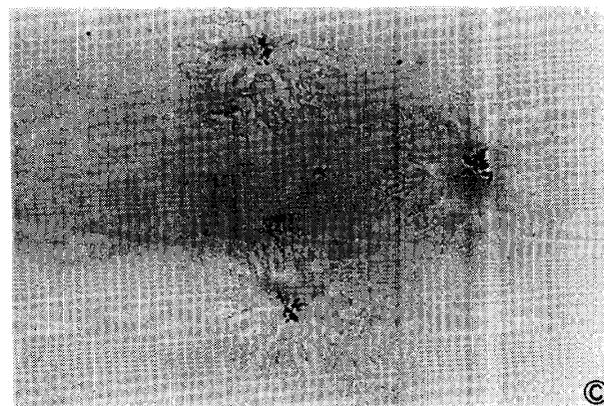
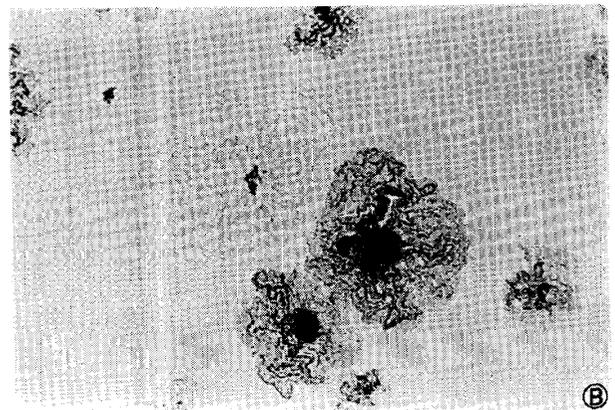
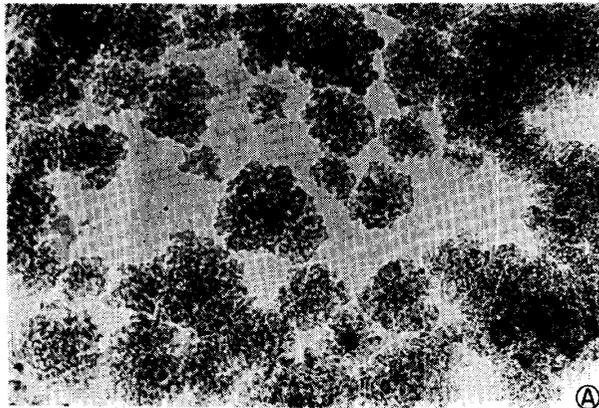


写真5 ① *M. intracellulare* (No. 19) CMA, 12日目〔II型〕
② *M. intracellulare* (No. 57) CMA, 12日目〔II型〕
③ *M. intracellulare* (No. 73) CMA, 12日目〔Va型〕

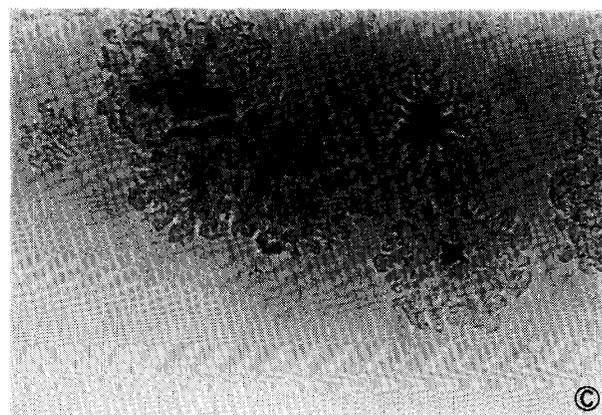
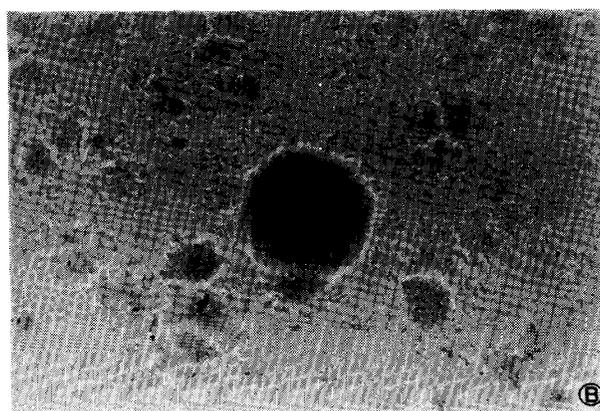
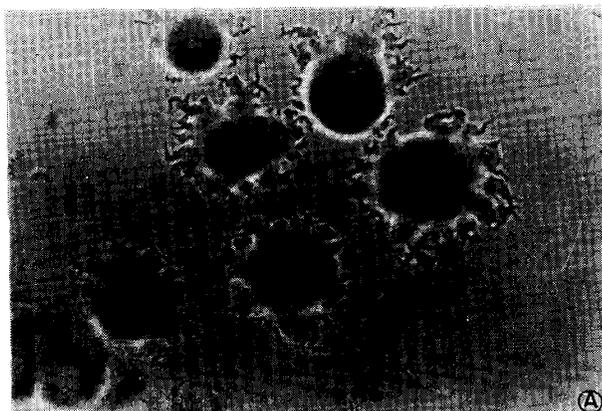


写真6

- ① M. intracellulare (No. 35) CMA, 12日目
〔Ⅳ_a型〕
- ② M. intracellulare (No. 64) CMA, 12日目
〔Ⅳ_b型〕
- ③ M. intracellulare (No. 41) CMA, 12日目
〔Ⅳ_c型〕

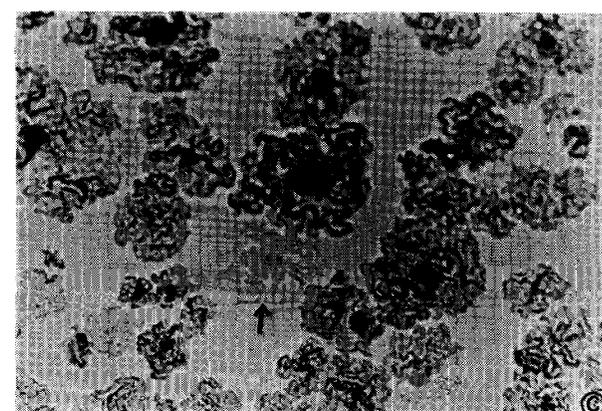
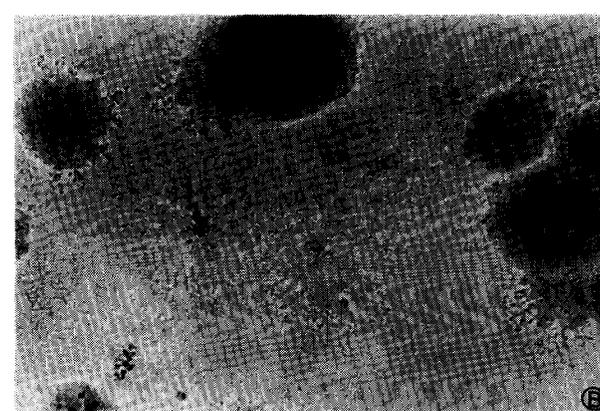
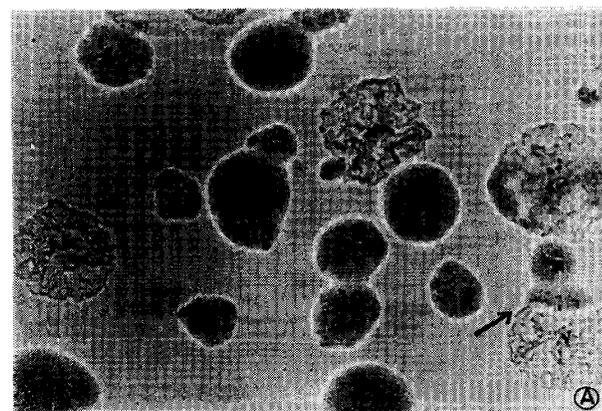


写真7

- ① M. intracellulare (Aiba) CMA, 12日目
〔Ⅱ型+Ⅲ型〕
- ② M. intracellulare (No. 27) CMA, 12日目
〔Ⅲ型+Ⅳ型〕
- ③ M. intracellulare (Shimamoto) CMA,
12日目〔Ⅱ型+Ⅳ型(↑)〕

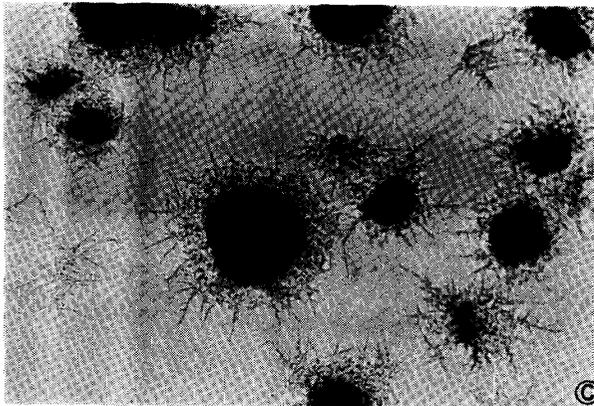
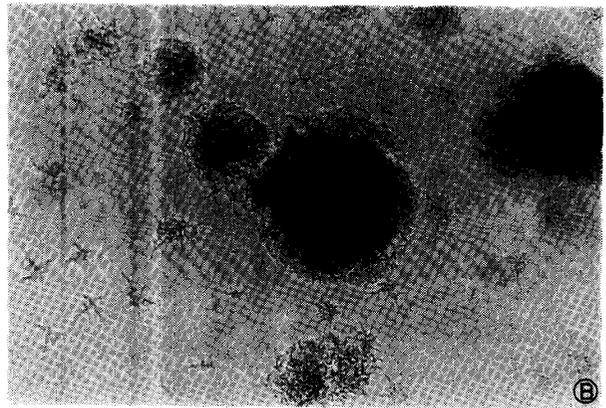
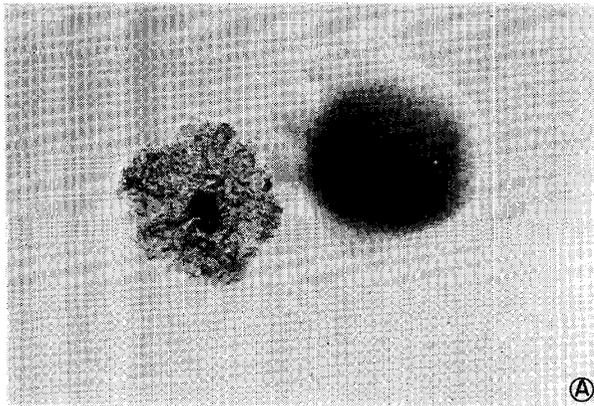


写真8

- ① *M. gordonae* (No. 3) CMA, 7日目
- ② *M. fortuitum* (ATCC 6841) CMA, 2日目
- ③ *Nocardia* CMA, 7日目

3-Bのごとく緊密な紐状の発育が認められた。

(iii) *M. intracellulare*

KA 上には写真4-Aのごとく、多くの菌株で円形で不透明なドーム様の集落が認められ、DA 上でも写真4-Bのごとく本質的に同様な円形で表面平滑なドーム様集落が認められた。CMA においては、*M. intracellulare* は種々多様な集落形態を示すことが観察された。大別すると基本的に次の3形態がある様である。

- ① 写真1-Dに示される円形で表面平滑で不透明なドーム様の集落。周辺も平滑で分葉は認められない。(III型と仮称する)
- ② 写真5-Aおよび5-Bに示したごとく、KA上の *M. tuberculosis* に観察された紐状ないし毛髪状に近い粗な集落。(II型と仮称する)
- ③ 写真5-Cに示したごとく、きわめて透明で薄い周辺が大きく分葉した花卉状の集落。(IV型と仮称する)

以上3種類の典型的な集落形態のほかに、これらの移行型もしくは垂形と思われるものおよび同一菌株でもこれらの形態の混在が認められ

た。ことにIV型の垂形と思われるものは多く観察され、III型にきわめて近いと思われる円形ドーム様集落の周辺に小さい太陽のコロナ様突起の認められるもの(写真6-A, IV_a型と仮称する)から、次第に周辺に分葉が著明になり(写真6-B, IV_b型と仮称する)、さらに円形ドーム様構造と周辺に分葉構造が両者共著明に観察されるもの(写真6-C, IV_c型と仮称する)にいたり、ついには写真5-Cに示した透明な薄い花卉状の集落(IV_a型と仮称する)までのものが観察された。

2種類の集落の混在はII型とIII型(写真7-A), III型とIV型(写真7-B), II型とIV型(写真7-C)に認められ、これら3種の集落形態は相互に移行することが想像される。写真7-Aに示したものはII型とIII型との混在しているものであるが、写真の右下(矢印)には、II型とIII型の同一集落中での混在が認められ、III型からII型への移行ではないかと想像される。

(iv) *M. scrofulaceum*

M. intracellulare にくらべると、今回検討し

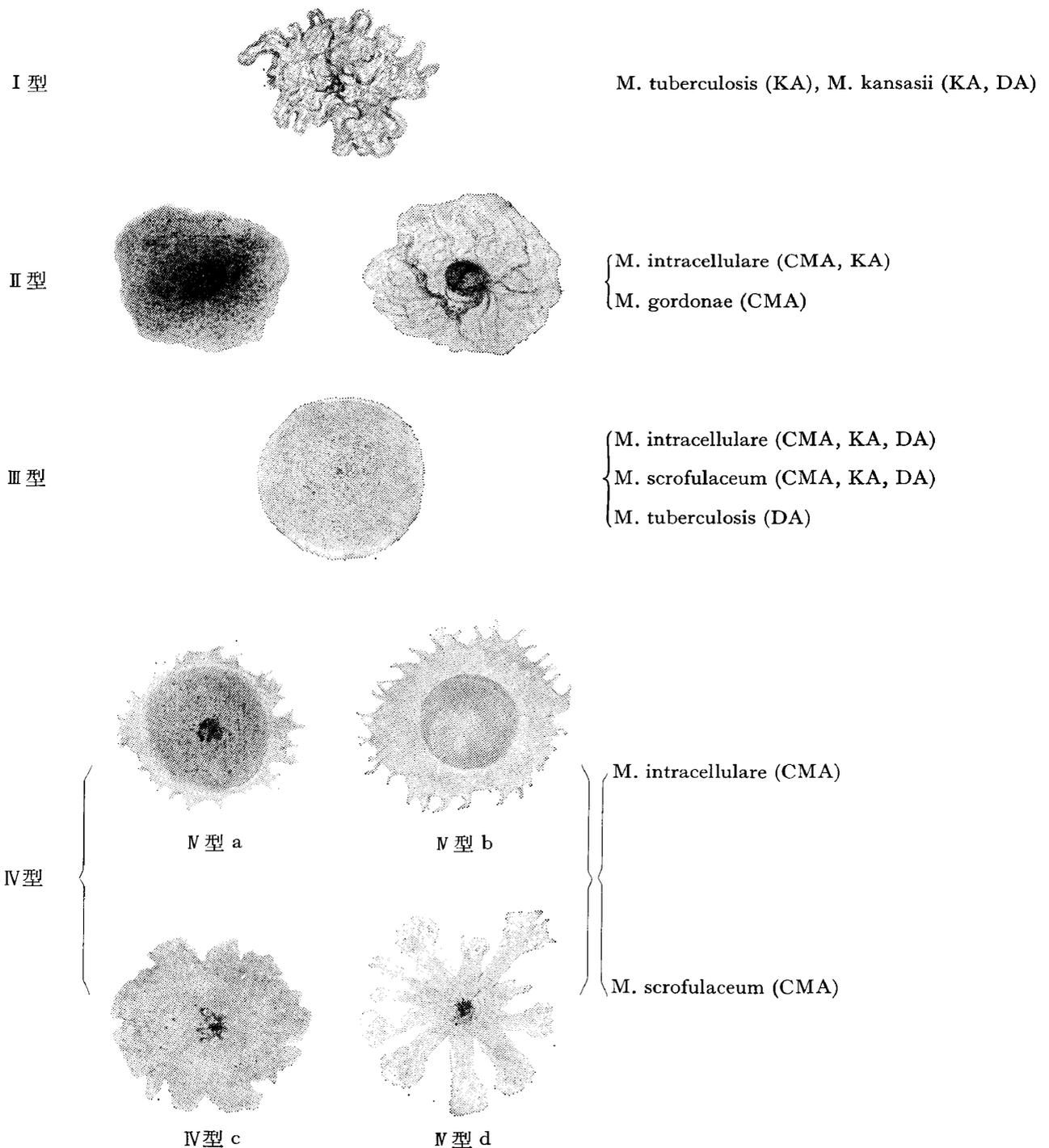
た *M. scrofulaceum* の菌株数はきわめて少なく一定の傾向を論じ得ないが, *M. intracellulare* で認められた集落形態以外のものは認められなかった。即ち **III型** と **IV型** の集落が主として認められ, 又, **III型** と **IV型** の混在も認められた。

写真8-A は *M. gordonae* と思われる1菌株に認められた **II型** と **III型** の混在である。

(v) *M. fortuitum*

M. fortuitum と *M. chelonae* に関しても検討した菌株数は少なく, ただ *M. fortuitum* に **写真8-B** の如く針状の突起を持った集落形態が特徴的である様に思われた。又, **写真8-C** に *Nocardia* の集落をしめしたが, *M. fortuitum* の集落形態はこれとかなり類似している様に思

図1 抗酸菌集落形態の模式図



われた。

3) 集落形態の分類とまとめ

以上の観察結果より、主として Slow Grower についての集落形態を前述のⅠ型、Ⅱ型、Ⅲ型およびⅣ型に大別して模式的に示したのが図1である。右欄にはそれぞれの集落形態を示した菌種と使用培地を示した。

考 案

一般細菌検査用の平板培地を用いた抗酸菌集落の形態学的観察は Fregnan と Smith⁵⁾ によってすでに試みられている。oleic acid albumin agar を用いたこの報告では、10数種の集落形態を記載しているが、その記載方法として、(1) smooth か rough か、(2) コード形成の有無 (Cs)、(3) transparent か dome 様か (T, D)、さらに、(4) 色素沈着の有無 (y, s) とか、(5) 菌の group 名および菌種 (S, A, F) にいたるまで形態記載の記号に用いており、個々の集落形態の記載は詳細であるにかかわらず、分類上の見地からみるとかなり繁雑な感じをまねがれない。

smooth と rough の区別を強調しすぎることは菌の毒性または免疫学的な性質との混乱をまねく恐れがあるし、一方流動的で種々な集落形態の相互移行もあると思われる Mycobacterium の形態を誤って一面的にとらえ易い可能性もあると思われる。又、平板培地で培養早期に観察する時は色素沈着も明確でなく、肉眼的な誤りをおかし易いし、菌種とか菌 group の名称は集落形態の流動性をさらにゆがめることにもつながると思われる。私共がこれらの用語の記載をさけた理由である。

以上の諸点は念頭において、Fregnan 等の観察結果と私共の結果とを照合してみると、Rough-Cs は私共のⅠ型に相当し、Rough-R、Rough-Ry、および Rough-A と記載されているものは私共のⅡ型に大体相当している様である。今回の私共の観察では、Ⅰ型は *M. tuberculosis* と *M. kansasii* にかかなり特異的で、KA 上でこの形態を示す時は鑑別同定の面から重要

だと考えられる。ただ CMA において私共がⅡ型と名付けた集落形態がⅠ型と鑑別困難な可能性がある。*M. tuberculosis* に代表されるⅠ型では、集落全体にわたって紐状または毛髪の束様構造が著明に存在するのに対して、CMA 上で時に *M. intracellulare* 等に見られるⅡ型は、上記の構造がかなり不明瞭で、全体的にフィラメント様構造が密集した集塊といった印象を示すか、(写真5-A 参照) 又は、かなり膨隆した中心部から比較的線細な毛髪用構造物が放射状に周辺部に向っている写真5-Bのごときのものであって相互に鑑別は不可能ではないと思われる。もちろん CMA には *M. tuberculosis* は殆ど発育しないので、この点を考慮すれば誤りは殆どないと思われる。

次に Smooth-S、Smooth-Sy、Smooth-K、Smooth-Kw 等の形態学的な記載は全て私共のⅣ型に含まれ、又、私共がⅢ型と分類した形態は、Smooth-D とか Smooth-F として記載されているごとくである。私共がⅣ_a型として分類したものは Smooth-T として記載されている。さらに Smooth-I の記号で、Smooth-S と Smooth-D との混在を記載しているが、私共もⅢ型とⅣ_a型の混在を観察し得た。(写真7-B 参照)

Kubica 等^{7,8)} の報告も Fregnan 等の集落形態記載法を踏襲している。*M. intracellulare-avium* Group に関して、CMA 上の形態はほぼ私共の観察と一致している。

Runyon¹⁰⁾ は抗酸菌の分類に関して集落形態観察の有用性を強調しているが、1969年に Veterans-Administration から出されたパンフレットに同定に資する集落形態をまとめているが、*M. tuberculosis* の集落形態として tightly corded texture (7H10 medium)、*M. kansasii* の serpentine stranding、*M. intracellulare-avium* complex の thin transparent colony (CMA)、entire circular colony (7H10)、thicker domed colony (CMA)、rough colony (7H10) および rough or RS variant (CMA) 等の形態を記載しているが、これらに相当すると思われるものは全て私共の観察でも認められている。

1%小川培地で *M. intracellulare* を継代保存していて気付くことであるが、最初は全く平滑で湿潤していた集落が次第に粗で乾燥気味の集落に変化することがある。CMAでのII型集落の出現はこの変化と対応している様とも考えられる。

Dunbar および Runyon 等¹¹⁾は *M. intracellulare* の集落形態とマウスに対する病原性との関係を検討しているが、患者からの分離直後のものは殆ど thin-colony type を示しマウスに対する病原性もあるが、継代を重ねていくにつれ domed colony type の割合が次第に増し、マウスに対する病原性も低下していくことを観察している。thin colony type は私共の分類したIV_d型集落に相当し、dome colony type はIII型に相当すると思われる。実験動物に対する病原性を検討する時留意せねばならないことであろう。

次に集落形態の変化に関して私共の観察結果を合せ考案すると、今回の検討ではいずれの菌株も少なくとも2回以上の継代を経たもののみを用いており、所謂IV_d型の集落のみを示した菌株はわずか2株にすぎず、III型の集落を示す菌株が最も多くみられ、そのうち多くはIV型との混在であった。又、2株に殆どII型のみ集落がみられ、数株にII型とIV型の混在がみとめられている。私共は経時的に集落形態の変化を追求していないのでいまだ推定に止まるが、IV_d型とIII型との間に移行形と思われるIV_c、IV_b、IV_a等の集落形態が認められること、又、写真7-Aに示したごとく、III型よりII型へ移行していくとき様相が同一集落内で観察出来るので、現在の所、IV_d型よりIV_c、IV_b、IV_aを経てIII型に変化し、III型よりさらにII型への移行が集落形態の変異の主たる順序ではないかと考えている。今後の検討が必要である。

最後に当初私共の目的であった抗酸菌種の臨床細菌学的な同定という面より観察結果を評価してみると、*M. tuberculosis* の集落形態はKAではきわめて安定しており、特徴的で、この点とCMA上での発育が殆ど認められないことを参照すれば鑑別同定に有用であると思われる。

M. kansasii がKAでは *M. tuberculosis* と殆ど同じ形態を示すことが多く、又、CMA上の発育も同様みとめられないことが多いので、これら両者の鑑別には光発色性試験をはじめとする生化学的検査が重要になって来る。

DAにおいては、*M. tuberculosis* でも一見円形でドーム様集落を示すものが多いのに反して、今回検討した *M. kansasii* の殆んどが、KAにおける *M. tuberculosis* とか *M. kansasii* の集落と同様なI型を示したのは注目すべき所見であった。

KAを用いて *M. tuberculosis* 又は *M. kansasii* の可能性が殆んど否定された場合、次にはCMAでの集落形態を観察するのが有用であろうと思われる。今回の検討では *M. intracellulare-avium* group と *M. scrofulaceum* 又は *M. gordonae* 相互間の鑑別は不可能であった。これらの菌種では一般にKAでは集落形態の多様性にとぼしく、又、集落形態の分化もCMAにおけるごとく明確でない。CMAを用いた場合の集落形態の多様性は同定の面からみると一つの欠点であるが、前述の如く集落形態の変化を動的にとらえて観察すれば、予備的な同定にはその一助として十分使用出来る可能性があり、何よりも、これらの培地を用いることによる観察期間の短縮は一つの大きな利点である。

Rapid Grower に関しては *M. fortuitum* にかなり特徴的な集落形態がみられた他は、私共の検討はいまだ十分でなく次の機会にゆずりたい。

培地に関して、KAは血清を加えるためその透明度にやや難点があり、DAは雑菌の混入が比較的多くみとめられたが、CMAは培地作成手技も簡単で雑菌混入もきわめて少なく、非定型抗酸菌の集落観察には有用であると思われる。

結 論

一般細菌検査用の平板でキルヒナー寒天培地、デュボス寒天培地および corn meal glycerol 寒天培地を用い、諸種の抗酸菌の集落形態を顕微鏡下で観察した。キルヒナー寒天培地にお

る *M. tuberculosis* および *M. kansasii* の集落形態(Ⅰ型)は特徴的で、短期間の予備的な同定に利用可能と思われた。corn meal glycerol 寒天培地上における *M. intracellulare-avium* group の集落形態は種々のものが認められ、それらをⅡ型,Ⅲ型,Ⅳ型に大別し各集落形態およびそれら相互間の関係を考察した。又, corn meal glycerol 寒天培地上には *M. tuberculosis* および *M. kansasii* はほとんど発育せず, 同定の一助にし得ると考えられた。

文 献

- 1) 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ミコバクテリアの分離とその鑑別, 同定——抗酸菌分類委員会試案——, 結核および呼吸器疾患文献の抄録速報, 23: 225~233, 1972.
- 2) Tsukamura, M.: A simple identification system for atypical mycobacteria. *J. Tubercul. Chest Dis.*, 17: 8~17., 1971.
- 3) Kubica, G. P.: Differential identification of mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 107: 9~21, 1973.
- 4) Fregnan, G. B. et al.: Biological and chemical studies on mycobacteria—relationship of colonial morphology to mycoside content for *Mycobacterium kansasii* and *Mycobacterium fortuitum*—. *J. Bact.*, 82: 517~527, 1961.
- 5) Fregnan, G. B. and Smith, D. W.: Description of various colony forms of mycobacteria. *J. Bact.*, 83: 819~827, 1962.
- 6) Navalkar, R. G., Wiegenhaus, E. H. and Smith, D. W.: Relationship of mycoside content and colony morphology for Group II and Group III unclassified mycobacteria. *J. Bact.*, 88: 255~259, 1964.
- 7) Kubica, G. P. and Jones, W. D. Jr.: Differential colonial characteristics of mycobacteria on oleic acid-albumina and modified corn meal agars. I. Investigation of slowly growing mycobacteria. *Zbl. Bakt.*, 196: 53~67, 1965.
- 8) Kubica, G. P. and Jones, W. D. Jr.: Differential colonial characteristics of mycobacteria on oleic acid-albumin and modified corn meal agars. II. Investigation of rapidly growing mycobacteria. *Zbl. Bakt.*, 196: 68~81, 1965.
- 9) Runyon, E. H., Kubica, G. P., Morse, W. C., Smith, R and Wayne, L. G.: *Mycobacterium*, in *Manual of Clinical Microbiology*, eds. Blair, J. E. et al., The Williams & Wilkins Co., Baltimore, Md., p. 112~136, 1970.
- 10) Veterans Administration, brochure by E. H. Runyon, Identification of acidfast pathogens—utilizing colony characteristics. 1969.
- 11) Dunbar, F. P. et al.: *Mycobacterium intracellulare*. Maintenance of pathogenicity in relationship to lyophilization and colony form. *Scand. J. Resp. Dis.*, 49: 153~162, 1968.