

人型結核菌と他の抗酸性菌との鑑別法としてのナイアシンテスト

第 1 報 人型結核菌の集落数および発育度との関係

小川辰次・大谷典子

北里研究所附属病院 (院長 福住定吉)

受付 昭和 37 年 2 月 21 日

I 緒 論

今野ら^{1)~8)}は、人型結核菌のナイアシンの産出量が、他の病原性結核菌および非病原性抗酸性菌に比し 10 倍も多いことから、人型結核菌とそれ以外の抗酸性菌との鑑別が化学的にできることを発表し、氏らの直接法により鑑別していた。その後、結核菌の発育した固形培地に水を加えて、菌体の抽出液を用いて実施する Runyon⁹⁾の変法と発展したが、最近は今野ら¹⁰⁾¹¹⁾もこの方法に準じて行なうように改良している。われわれは、このナイアシンテストを臨床検査に用いて種々利益を得ているが、人型結核菌であろうと推定されたものでも、陰性を示すものが多々あった。このことは、今野らも述べているように、使用した菌量の少ないことによるが、このような間違いの陰性は、今野の Dubos Tween albumin 液体培地を用いることにより、あるいは Runyon の変法によつてかなり救われるようになったとはいえ、実際検査にたずさわる人にとっては大きな問題である。そこでわれわれは、このナイアシンテストの正しい使い方について研究することが必要であると考へた。まず第一に臨床検査において培養、陽性を示した人型結核菌について種々の集落数および発育度の異なるものにナイアシンテストを実施し、ナイアシンテスト陽性を示すにはどの程度の集落数と、どの程度の発育が必要なのかを検討したので御批判を仰ぎたい。

II 実験方法

① 対 象

予備実験には、保存人型結核菌、保存牛型結核菌と同時に、肺結核症の患者より分離した非病原性抗酸性菌を用いた。本実験には SM, PAS, INH の耐性検査において、対照培地あるいは抗結核剤の混入された培地に発育した菌株を用いた。これらは、中試験管にゴムキ

ャップの施された培地に 1~2 カ月 37°C で培養されたもので、いずれも人型結核菌であり、発育の程度および集落数は種々である。

② 集落数および発育度の決め方

集落数は

| | |
|---|-------------------------|
| { | 卍……斜面全体に菌膜様に発育 |
| | 卍……斜面全体に発育しているが集落が個々に分離 |
| | 卍……斜面 2/3 程度に発育 |
| | 卍……斜面 1/2 程度に発育 |
| | +……1~200 コの集落数のもの |

の 5 段階とし、発育度は

| | |
|---|-----------------------------|
| { | a……集落の伸びのよいもの (優性発育) |
| | b……集落の伸びの普通のもの |
| | c……集落の伸び悪く小さい点状を示すもの (劣性発育) |

の 3 段階に分けた。そしてこれらは、ナイアシンテストの直前に観察し記録した。

③ ナイアシンテストの実施および判定方法

a. 実施方法: 方法は、Runyon の変法を今野がこれに準じて改良した方法によつた。すなわち、結核菌の発育している中試験管の培地に生理的食塩液を 1 ml 入れて軽く振盪し、斜面台にねかして菌体によく接触するようにする。5~10 分後液を中試験管に移しとる。これを抽出液とする。① 臭化シアン-アニリン法; 抽出液 0.25 ml を 2 本の試験管にとり、その一方に 4% アニリンエタノール液 (95% のエタノールにアニリン 4% に加えたもの) と 10% 臭化シアン (臭化シアンを水に溶かしたもの) とを 0.1 ml 宛加える。他の 1 本は対照とし 10% 臭化シアンの代りに蒸留水 0.1 ml を加える。② 臭化シアン-ベンチジン法; ① の 4% アニリンエタノールの代りに 3% ベンチジンエタノール (95% エタノールにベンチジンを 3% の割りに加えたもの) を用いるだけで他は ① と全く同様である。

試薬を加えたらよく振盪し、ただちに判定する。抽出液の少ない場合には、一方法のみを用いた。また対照をおこなった場合もある。なお、本実験には、陽性の標準菌株として H₃₇Rv 株 (1% 小川培地にコルク栓をして 2~3 週培養したもの) を併置して実験した。

b. 判定: 判定はテスト実施完了の直後に行なつた。アニリン法では液が透明な黄色となつたときに、またベンチジン法ではピンクの沈澱を生じたときに陽性とし、この陽性の度をその程度により次の段階に分けた。

+ (弱陽性) …誰がみてもはつきり陽性を示しているもの

++ (中等度陽性) …陽性の程度が前者よりも強いもの

+++ (強陽性) …前者よりもさらにはつきりしているもの

そして陽性が陰性かはつきりしないものを ± (疑陽性) とし、黄色の着色がないものあるいは白い沈澱だけのものは - (陰性) とした。なおアニリン法で培地のマラカイト緑による緑色のために、判定不可能のものは判定不能として除いた。

III 実験成績

① 予備実験

保存菌株は、人型結核菌 H₃₇Rv 株、黒野株、H₂ 株および牛型結核菌 Revenel 株の 1% 小川培地にコルク栓を施し約 1 カ月培養した菌株について実施した。これらはいずれも集落数も多く発育もよかつたが、成績は人型結核菌は菌株の如何にかかわらずいずれもアニリン法、ベンチジン法ともに +++、++ を示した。また牛型菌ではアニリン法、ベンチジン法ともに ± を示し、結核症患者の可検材料より分離した非病原性抗酸性菌と推

定される 12 株は、ともに陰性を示した。

② 本実験

a. 集落数および発育度との関係

i. 初代培養

耐性検査を実施したときの材料を初代培養とよぶことにする。これに属する菌株 559 株を、集落数と集落の発育度によつて区分し、おのおのの群についての陽性率をみた。成績はアニリン法によるものであり、この場合の陽性は、+++、++、+ の 3 者を全部合併したものである。成績は表 2 のようであつて陽性率は、集落の数とその発育度によつて影響されることがはつきりしている。すなわち、集落の数えることのできた + では、a の発育で 71.4%、b の発育で 39.4%、c の発育では 0 の陽性率であるし、集落数 +++ のところでみると、a の発育では 100%、b では 98.6%、c では 77.8% の陽性率を示している。これを合計すると、559 株中の 400 株、すなわち 71.6% が陽性を示したことになる。

ロ. 継代培養

初代培養でアニリン法 -, ± を示すであろうと推定された (実際には + を示したものもある) 集落の少ないものあるいは発育の悪い菌株 93 株を、テスト実施前に 1% 小川培地にコルク栓を施して継代培養し、約 1 カ月後に再検査して初代培養の成績と比較してみた。

成績は表 3 のようであつて、初代で - を示した 56 株はいずれも陽性となり、± を示した 25 株も 1 株を除いては皆陽性となつた。しかもその大部分は ++、+++ を示していた。また、+ の 12 株も 2 株を除いて ++、+++ を示した。継代後もなお ± を示した 1 株は、集落数は +++ であつたが発育は c のものであつた。その他のものはいずれもよい発育を示したものである。

Table 1. Results of Preliminary Tests

| Type | Strain | No. of colonies | Size of colonies | No. of tests | Results of niacin test | | | | | |
|----------------------------------|---------------------------|-----------------|------------------|--------------------------|------------------------|-----|----|---|---|----|
| | | | | | Method | +++ | ++ | + | ± | - |
| Myco. tbc. var. hominis | H ₃₇ Rv strain | +++~++++ | a-b | 11 | BrCN-an. | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | Kurono strain | +++ | a | 1 | BrCN-be. | 8 | 3 | 0 | 0 | 0 |
| | | | | | BrCN-an. | 1 | | | | |
| | | | | | BrCN-be. | 1 | | | | |
| H ₂ strain | +++ | a | 1 | BrCN-an. | 1 | | | | | |
| | | | | | BrCN-be. | 1 | | | | |
| Myco. tbc. var. bovis | Ravenel strain | +++ | a | 1 | BrCN-an. | | | | | 1 |
| | | | | | BrCN-be. | | | | | 1 |
| Non-pathogenic acid-fast bacilli | | +++~++++ | a~b | 12 (once in each strain) | BrCN-an. | | | | | 12 |
| | | | | | BrCN-be. | | | | | 12 |

Note: 1) Method

BrCN-an.: Cyanogen bromide-aniline method

BrCN-be.: Cyanogen bromide-benzidine method

2) Figures in results of niacin tests indicate the number of strains,

Table 2. Relation between Results of Niacin Tests, Number of Colonies and Size of Colonies in Primary Culture

| Size of colonies | No. of colonies | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 |
|------------------|--|--------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 | 冊 |
| a | No. of strains tested | | 8 | 23 | 49 | 21 |
| | No. of strains with positive reaction (percentage) | | 8 (100%) | 23 (100%) | 48 (98.0%) | 15 (71.4%) |
| b | No. of strains tested | 19 | 74 | 93 | 95 | 33 |
| | No. of strains with positive reaction (percentage) | 19 (100%) | 73 (98.6%) | 84 (90.3%) | 69 (72.6%) | 13 (39.4%) |
| c | No. of strains tested | 6 | 18 | 34 | 68 | 18 |
| | No. of strains with positive reaction (percentage) | 6 (100%) | 14 (77.8%) | 17 (50.0%) | 11 (16.2%) | 0 (0%) |

Table 3. Results of Niacin Tests after Subculture of Strains with Negative, Doubtful or Weakly Positive Reaction in Original Culture

| Results in primary culture | Results in subculture | | | | Total |
|----------------------------|-----------------------|----|----|----|-------|
| | ± | + | 冊 | 冊 | |
| - | 0 | 10 | 10 | 36 | 56 |
| ± | 1 | 4 | 5 | 15 | 25 |
| + | 0 | 2 | 3 | 7 | 12 |
| Total | 1 | 16 | 18 | 58 | 93 |

Note: Figures represent the number of strains.

IV 総括および考察

ナイアシンテストが人型結核菌と他の抗酸性菌との鑑別に役立つことは、多く追試した学者^{12)~15)}によつても証明されたところであるが、実際の運用についての研究はまだなされていない。そこでわれわれは、まず第一に通常検査で検出された結核菌がナイアシンテスト陽性を示すのはどの程度であるかを集落数および発育度の2点を考慮して実験してみたところ、陽性率が案外低いのに驚いた。すなわち、検査総例数の 28.4% は陰性を示している。これら陰性の例は、今野らもいつているように、十分の菌量に達していないことを意味するのであるが、最近の通常検査の材料では、集落数の少ないもの、集落の発育の悪いものが多いことを示している。しかし、継代培養して菌量の十分な材料を用いたときはそのほとんどが陽性を示しているから、初代で陰性を示しても継代培養をして再検査を実施する必要があるし、継代しても菌の発育の悪いものは検査不能として、ナイアシンテスト以外の検査方法によるべきであろう。なおわが国ではあまり問題とならないかもしれないが、牛型菌は、われわれの成績でも他の多くの研究者によつても疑

陽性を示すもののあることが証明されているから、判定にあたっては ± は陽性の中に入れてはいけないほうがよい。牛型菌を避ける意味では、Rudolf Bönicke¹⁶⁾¹⁷⁾は今野らの用いている König の反応よりも弱い Pekknicke 反応、Asmus-Garschagen 反応を用いたほうがよいといっているが、König 反応でもはつきり陽性にでたもののみをとれば、これは避けることができると思われる。なおわれわれは、継代してナイアシンテストを実施したとき、同一菌株で一度は陽性を、一度は陰性を示した場合がある。これを精査した結果、陰性だったのは、コリネバクテリアの混合汚染があつたことが分かつた。したがつて疑わしいときには、必ず Ziehl-Neelsen で染色してその抗酸性を確かめてみる必要があろう。

V 結 論

保存人型結核菌、保存牛型結核菌、肺結核患者から分離した人型結核菌および非病原性抗酸性菌につき、ナイアシンテストを Runyon の変法に準じて行ない、次のような成績を得た。

1) 保存人型結核菌 H₃₇Rv 株、黒野株、H₂ 株は臭化シアン-アニリン法、臭化シアン-ベンチジン法ともに陽性を示し、保存牛型菌は両方法ともに疑陽性(±)を示し、肺結核症の患者から分離した非病原性抗酸性菌はともに全部陰性を示した。

2) 559 株の人型菌について、発育の度、集落数により臭化シアン-アニリン法でその陽性率をみると、集落の発育がよくなるとともに、また集落数の増すとともに陽性率は高くなつた。これらの通常検査の中で陰性を示したものは 159 株 28.4% であつた。また、-、± を示したもの、+ を示した一部についてコルク栓をして 1% 小川培地に約 1 カ月継代培養し、それについて同様の検査を行なつた。その結果 93 株中発育の悪か

つた1株のみが陰性を示し、残りは全部陽性を示し、その陽性の度も、ほとんどが中等度、強度陽性を示した。

3) 以上の成績から、ナイアシントテストは、人型結核菌と他の抗酸性菌との鑑別に役立つこと、また正しい成績を得るには、十分な菌量が必要であることが分かった。

文 献

- 1) Kiyoshi Konno : Science, 124 : 985, 1956.
- 2) Kiyoshi Konno et al. : Am. Rev. Tbc., 75 : 529, 1957.
- 3) Kiyoshi Konno et al. : Am. Rev. Tbc., 77 : 669, 1958.
- 4) 今野 他 : 日本臨牀結核, 17 : 504, 昭33.
- 5) 今野 : 結核, 33 : 362, 昭33.
- 6) Kiyoshi Konno : Beitr., Klinik. Tbk., 119 : 1958.
- 7) Kiyoshi Konno : Beitr., Klinik. Tbk., 119 : 7, 1958.
- 8) Kiyoshi Konno et al. : Am. Rev. Tbc. & Resp. Dis., 79 : 810, 1959.
- 9) E. H. Runyon et al. : Am. Rev. Tbc. & Resp. Dis., 99 : 663, 1959.
- 10) 岡・今野 : 日本細菌学雑誌, 15 : 968, 昭35.
- 11) 岡・今野 他 : 第36回日本結核病学会総会示説 ; 結核, 36 : 656, 昭36.
- 12) S. Gliani et al. : Tubercle, 39 : 396, 1958.
- 13) Bruno Besta : Bull. Int. Union against Tbc., 29 : 308, 1959.
- 14) 友田 他 : 呼吸器診療, 15 : 96, 昭35.
- 15) 戸田 他 : 結核, 35 : 59, 昭35.
- 16) Rudolf Bönicke et al. : Tuberkulose-Arzt, 12 : 380, 1958.
- 17) Rudolf Bönicke et al. : Bull. Int. Union against Tbc., 29 : 79, 1959.

Niacin Test for Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis Var. Hominis from Other Acid-fast Bacilli. I. Relation between the number of colonies, growth rate of mycobacterium tuberculosis var hominis and the results to Niacin test.

Niacin tests were performed by the method of Runyon's modification on the stored mycobacterium tuberculosis var. hominis and non-pathogenic acid-fast bacilli isolated from the patients with tuberculosis. At the same time, the number of colonies and size of colonies on the culture media were observed and the following results were obtained.

1) The results of Niacin tests were positive in all 14 strains of stored myco. tbc var. hominis, doubtful in one stored strain of myco. tbc var. bovis and negative in all 12 strains of non-pathogenic acid-fast bacilli isolated from tuberculous patients.

2) The rate of positive reactions among 559 strains of myco. tbc. var. hominis isolated from tuberculous patients increased with an increase in the number of colonies and in the size of colonies. The results were positive in 71.6% of all strains tested. Remaining strains with negative reaction, 28.4%, presented either a small number of colonies or poor growth. On 93 strains which showed either negative, doubtful or weakly positive reaction, subcultures were made and the tests repeated. All exhibited moderately or strongly positive reaction with the exception of one with poor growth.

3) From the above experiments, it is apparent that niacin test is useful for the differentiation of mycobacterium tuberculosis var. hominis from other acid-fast bacilli, and that an adequate amount of organisms is necessary for obtaining proper results.