

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2報 薬剤耐性との関係ならびに臭化シアン—アニリン法
と臭化シアン—ベンチジン法との比較

小川辰次・大谷典子

北里研究所附属病院 (院長 福住貞吉)

受付 昭和37年2月21日

I 緒 論

われわれは、第1報¹⁾において人型結核菌の集落数および発育の程度と陽性率の関係を検討し、この方法は、用いる菌量さえ十分であれば人型結核菌と他の抗酸性菌との鑑別に役立つことを認めた。それでわれわれは、さらに SM, PAS, INH 等に対して耐性を示している人型結核菌はナイアシンテストに対してどのような態度を示すかをみるとともに、同一菌株について臭化シアン—アニリン法²⁾³⁾ (以下アニリン法と略す) と臭化シアン—ベンチジン法 (以下ベンチジン法と略す) とを比較したので報告する。

II 実験方法

① 対象:

第1報の場合とほぼ同様であつて、通常検査として SM, PAS, INH の3者につき耐性結核菌の検査を終了したものを材料とした。耐性検査は、直接法では塗抹陽性の略痰を4% NaOH で処理し接種、間接法では直接法での再検査および喉頭粘液その他の可検材料より分離したものの菌液を接種し検査したものである。間接法での菌液は4% NaOH で処理して 10^{-2} mg を接種した。直接法、間接法ともにほぼ1カ月で判定した。耐性検査用培地は3% 小川培地を台としたものであつて、これらの材料を方法別にみると直接法255株、間接法324株である。耐性を中心にすると次の3種になる。すなわち、

感性菌……3種の抗結核剤が混入しているいずれの培地においても集落を認めなかつた場合の対照培地に発育した菌株……37株

耐性菌……3種の抗結核剤の種々の濃度に発育した菌株。このときは、もちろん混入濃度の最高の

濃度に発育したものとつた。……314株
感性菌と耐性菌の混入している菌株……3種の抗結核剤の混入された培地のいずれかに菌が発育している場合の対照培地に発育している菌株……
……208株

さらに、耐性菌を区分すると次のようになる。

	0.1 γ	1 γ	5 γ	10 γ	100 γ	計
SM				78	78	156株
PAS		26		28		54株
INH	29	18	57			104株

② 集落数および発育度の決め方:

第1報と全く同様であつて、集落数を --- ~ $+$ の5段階に、また発育の度を a, b, c の3段階に分けた。

③ ナイアシンテストの実施方法および判定法:

耐性菌との関係についてはアニリン法によつた。またアニリン法とベンチジン法との比較では、テスト完了後ただちに読むと同時に同一材料を一定の時間をおいて3時間後まで読み比較した。その他のことは第1報と全く同じであつて、判定は陰性(-)、疑陽性(\pm)および陽性に分け、陽性は弱陽性(+), 中等度陽性(++), 強陽性(+++)の3段階に分けた。

III 実験成績

i. 薬剤耐性との関係

材料を前述のように感性菌, SM 耐性菌, PAS 耐性菌, INH 耐性菌および感性菌と耐性菌との混合の5群に分け、さらに耐性菌については、各薬剤の耐性の度に従つて分けて、これらの各群につき、発育度と集落数よりみた陽性率を比較した。その結果は、各薬剤の耐性の度によつても、また SM, PAS, INH の耐性菌

の間にも、陽性率の出現のうえに傾向の差を認めることができなかつたので、これらを一括し耐性菌群とした。したがつて、ここでは感性菌群、耐性菌群、感性菌と耐性菌との混合群の 3 群に大別することになる。

① 感性菌群

37 株である。成績は表 1 のようで、株数が少ないのではつきりしないが、集落数の多くなるに従つて、また発育の程度よくなるに従つて陽性率が増している。

② 耐性菌群

314 株であるが、表 2 でみるように集落数の増すにつれ、また発育のよくなるにつれ陽性率は増す。この傾向は感性菌群と全く同じであるが、株数が多いので前群よりもはつきりしている。

③ 感性菌と耐性菌との混合群

208 株である。この場合も、前 2 群と同様であつて、集落数が増し発育度がよくなるにつれ陽性率は増している。

ii. アニリン法とベンチジン法との比較

① 直後の成績

767 株について実験した。材料は i. の場合とほぼ同じである。そして、反応の成績を 5 段階に分けて両反応の相関関係をみた。成績は表 4 のようであり、両反応で成績の一致したものは □ 中の数字である。これを合計すると 659 株であつて、これは検査株数 767 株の 85.9 % に当たる。次に一致しなかつたものについては、アニリン法がベンチジン法に比し反応が強く出たものは 41 株、5.3 % であり、ベンチジン法が強く出たものは 67 株、8.7 % である。+、++, ≡ を全部陽性として陽性率をみると、アニリン法で 581 株、75.7 %、ベンチジン法で 600 株、78.5 % である。

② 反応の読みまでの時間の影響

読みまでの時間によつて成績が影響されるかどうかを、まず 118 株について、テスト完了後ただちに読んだ成績とそれを放置して 30 分、1 時間、1 時間半後に読んだ成績とを、さらに 69 株については 1 時間、2 時間、3 時間後の成績とを比較した。その成績はベンチ

Table 1. Results with Sensitive Strains

No. of colonies		Size of colonies				
		≡	≡	≡	++	+
a.	No. of strains tested	0	1	1	0	2
	No. of strains with positive reaction (percentage)	0	1 (100%)	1 (100%)	0	1 (50.0%)
b.	No. of strains tested	5	10	10	1	2
	No. of strains with positive reaction (percentage)	5 (100%)	10 (100%)	10 (100%)	1 (100%)	1 (50%)
c.	No. of strains tested	0	1	2	2	0
	No. of strains with positive reaction (percentage)	0	1 (100%)	1 (50%)	0 (0%)	0

Table 2. Results with Resistant Strains

No. of colonies		Size of colonies				
		≡	≡	≡	++	+
a.	No. of strains tested		2	9	35	11
	No. of strains with positive reaction (percentage)		2 (100%)	9 (100%)	35 (100%)	9 (81.8%)
b.	No. of strains tested	1	18	47	67	20
	No. of strains with positive reaction (percentage)	1 (100%)	17 (94.4%)	45 (95.7%)	48 (71.6%)	5 (25.0%)
c.	No. of strains tested		7	23	61	13
	No. of strains with positive reaction (percentage)		6 (85.7%)	10 (43.5%)	10 (16.4%)	0 (0%)

Table 3. Results with Mixtures of Resistant and Sensitive Strains

Size of colonies		No. of colonies				
		⦿	⦿	⦿	⦿	+
a.	No. of strains tested		5	13	14	8
	No. of strains with positive reaction (percentage)		5 (100%)	13 (100%)	13 (92.9%)	5 (62.5%)
b.	No. of strains tested	13	46	36	27	11
	No. of strains with positive reaction (percentage)	13 (100%)	46 (100%)	29 (80.6%)	20 (74.0%)	7 (63.6%)
c.	No. of strains tested	6	10	9	5	5
	No. of strains with positive reaction (percentage)	6 (100%)	7 (70.0%)	6 (66.7%)	1 (20.0%)	0 (0%)

Table 4. Comparison of Cyanogen Bromide-benzidine Method with Cyanogen Bromide-aniline Method

1. Results immediately after completion of reaction

Cyanogen bromide-benzidine method	Cyanogen bromide-anilin method					Total
	-	±	+	⦿	⦿	
-	85	14	3	0	0	102
±	21	35	9	0	0	65
+	3	28	432	8	0	471
⦿	0	0	9	55	7	71
⦿	0	0	0	6	52	58
Total	109	77	453	69	59	767

Note: 1) Figures indicate number of strains.
 2) □ Figures indicate number of strains with results coinciding.

ジン法, アニリン法ともに時間の経過につれ反応が増強されたり弱くなつたりする株がでてくる。しかし, ベンチジン法ではこの傾向は弱く, 第1実験では1時間半後でも91.5%が, 第2実験では3時間後でも85.5%が安定であるのに比し, アニリン法では不安定であつて, 時間の経過とともに減弱するものが多い。

IV 総括および考察

ナイアシンテストは, INH 耐性菌のように毒力の弱くなつたものでも, 人型結核菌であれば陽性を示すことは今野ら⁴⁾⁵⁾のつとに証明したところである。その後, S. Gliarin ら⁶⁾, 友田ら⁷⁾も同様の成績を示している。われわれの成績も, 種々の程度の INH 耐性菌について実験したのであるが, 菌量さえ十分であればその成績は常に陽性を示している。なお Jensen⁸⁾が, INH 耐性菌中, 標準株の512倍の耐性比を示した41株の中

Table 5. Comparison of Cyanogen Bromide-benzidine Method with Cyanogen Bromide-aniline Method

2. Influence by elapse of time

Changes in results		Method Elapse of time (hours)	Cyanogen bromide-benzidine method					Cyanogen bromide-aniline method				
			0.5	1	1.5	2	3	0.5	1	1.5	2	3
Experiment I. 118 strains	Unchanged		112 (95.0)	109 (92.4)	108 (91.5)			111	99	95		
	Increased		6	9	9			3	4	3		
	Decreased		0	0	1			4 (3.4)	15 (12.7)	20 (17.9)		
Experiment II. 69 strains	Unchanged			61 (87.0)		60 (85.5)	60 (85.5)		51		14	7
	Increased			3		4	4		2		0	0
	Decreased			5		5	5		16 (23.2)		55 (79.7)	62 (88.3)

Note: Figures indicate number of strains and () represents percentage to total number tested.

に4株が(-)を示したと称しているが、これはおそらく使用菌量の少なかったことによるのではないと思われる。われわれはまた今回、INH 耐性菌だけでなく、SM, PAS 等の耐性菌についてその耐性度によつて分けナイアシンテストを実施した。またこれら耐性菌と感性菌の混合したものおよび感性菌についてもナイアシンテストを行なつた。その結果陽性の出現の傾向は、耐性の種類、耐性の度、また耐性たると感性たるとの如何を問わず全く同じであつて、集落数とその発育の程度によつて左右されることが分かつた。この事實は、ナイアシンテストは薬剤耐性を考慮する必要のないことを示すものであつて、人型結核菌の鑑別のうゑに大きな進歩をもたらしたものと見える。

次に今野らは、ナイアシンテストには、アニリン法とベンチジン法とを併用することが望ましいとしているが、実際問題として、この両方法を同時に併用する必要は、両反応が互いに欠点を補ひあつて、成績判定のうゑに利益をもたらすものでなければならぬ。それでわれわれは、同じ菌株についてこのテストを同時に実施してみた。その成績は、まず陽性率のうゑでは両テスト間に差はないが、岡・今野ら³⁾の基礎実験からも推定できるように、ベンチジン法はアニリン法に比して、陽性がはつきり現われる傾向を認めた。このことは反応の弱いところで著明であるから、誤りの陰性を除くことができる。次に、アニリン法は反応直後にみることに規定されているが、何かの都合で直後にみれないようなことになると、黄色は褪色してしまふことがある。その点、ベンチジン法のピンクの沈澱は、アニリン法に比し安定である。また、アニリン法の場合、弱陽性の黄色の弱い反応は、夕方、あるいは電灯の光でみるときはその判定が難しいが、ベンチジン法では判定を誤ることがない。次に、アニリン法ではマラカイト緑の色素が出現することがないことと記されているが、われわれのように、NaOH 処理の材料をそのまま3%小川培地に接種する方法では、培地の軟らかいことが多いためか、ときどきマラカイト緑が判定の邪魔をすることがある。ベンチジン法では影響ない。以上のような成績から分かるように、ベンチジン法はアニリン法に比し優れているし、アニリン法がベンチジン法を補うところは全然ないから、実際にはベンチジン法一本槍でもよいのではないかと思われる。

V 結 論

人型結核菌の耐性菌と感性菌においてナイアシンテストのうゑに差があるかどうか、また臭化シアンーアニリン法と臭化シアンーベンチジン法とを比較検討するために、SM, PAS, INH について耐性検査を実施した種々の集落数および種々の発育の程度の人型結核菌を材料として、Runyon の変法により検査し、次のような成績を得た。

1) 感性菌 37 株, SM 耐性菌 156 株, PAS 耐性菌 54 株, INH 耐性菌 104 株, 耐性菌と感性菌の混入しているもの 208 株についてアニリン法によつて検査した結果、感性菌であつても耐性菌であつても、また耐性が SM, PAS, INH の如何を問わず、耐性の度がどうであつても陽性の出現する傾向は全く同じであつて、菌量さえ十分であれば常に陽性を示すことを認められた。

2) 767 株の菌株について臭化シアンーアニリン法と臭化シアンーベンチジン法とを比較した結果、陽性率は大差ないが、ベンチジン法はアニリン法に比し反応の強く出るものが多く、またテスト完了後読みまでの時間が長びくとともにアニリン法では褪色するものがあるが、ベンチジン法では安定なものが多く、かつ培地の緑色による障害はアニリン法では受けるがベンチジン法では受けない。このようなことから、方法としては、ベンチジン法が實際的である。

文 献

- 1) 小川・大谷：結核，37：184，昭37。
- 2) 岡・今野：日本細菌学雑誌，15：968，昭35。
- 3) 岡・今野 他：第36回日本結核病学会，示説，19，1961。
- 4) 今野：結核，33：362，昭33。
- 5) Kiyoshi Konno et al.：Am. Rev. Tbc.，75：529，1957。
- 6) S. Gliari et al.：Tubercle，39：396，1958。
- 7) 友田 他：呼吸器診療，15：96，昭35。
- 8) K. A. Jensen：結核文献の抄録速報，9：75，昭33より引用。

Niacin Test for Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis Var. Hominis from Other Acid-fast Bacilli. II. Its relation to drug sensitivity, and comparison of cyanogen bromide-aniline method with cyanogen bromide-benzi-

dine method.

The authors studied whether or not there was a difference in the results of the niacin tests obtained from the drug resistant and sensitive myco. tbc. var. hominis, and compared

cyanogen bromide-aniline method with cyanogen bromide-benzidine method by Runyon's modification, obtaining the following results.

1) Thirty seven drug sensitive strains, 156 streptomycin resistant strains, 54 PAS resistant strains, 104 INH resistant strains and 208 mixtures of sensitive and resistant strains were tested by cyanogen bromide-aniline method. Similar results, namely positive reaction at any time with an adequate volume of organisms, were obtained irrespective of degree of sensitivity and kinds of drugs to which organisms were resistant.

2) Cyanogen bromide-aniline method and cyanogen bromide-benzidine method were compared using 767 strains of *myco. tbc. var. hominis*,

but no striking difference was observed in the results obtained by the two methods. However, in many instances, reaction by the benzidine method was stronger than that by aniline method. In some instances, with the delay in reading results after the completion of the tests by the aniline method, the color began to fade, while discoloration was not experienced in the reaction by the benzidine method. There may be some difficulty in reading the reaction by the aniline method when malachite green in the medium is intermixed, whereas the benzidine method is not influenced. It is concluded that the benzidine method is more practical than the aniline method.