

人型結核菌と他の抗酸性菌との鑑別方法と してのナイアシントテスト

第3報 培養期間の影響

小川辰次・大谷典子

北里研究所付属病院 (院長 福住定吉)

受付 昭和38年3月9日

1. 緒 論

ナイアシントテストの正しい通常検査への応用を目標として、従来まで種々検討し、その2~3¹⁾²⁾についてはすでに発表した³⁾が、今回は培養期間による影響を検討した。人型結核菌以外の抗酸性菌でも、長い培養では陽性を示すことが、諸先進により証明されているので、陰陽性の判定にあたって、培養の期間をどのように考慮するか⁴⁾の基礎資料としたいと考えたからである。ご批判を仰ぎたい。

2. 方 法

1) 菌 株

使用した保存菌株は人型菌2株、牛型菌2株、鳥型菌1株、非定型抗酸性菌6株で、これらは1%小川培地に継代され1~10カ月の種々の期間培養された。新鮮分離株は人型結核菌と推定されるもの567株、非病原性抗酸性菌と推定されるもの51株であり、これらはすべて喀痰、喉頭粘液、胃液等より分離培養されたものである。この中の人型結核菌を推定されたものは、初代分離のものおよび直接法、間接法によつて耐性検査を実施した時の対照培地に発育したものであつて、3~6週の種々の期間、3%小川培地に培養された。非病原性抗酸性菌と推定されるものは1%小川培地に継代され、1~8カ月の期間37°Cに培養された。保存菌株および新鮮分離の非病原性抗酸性菌と推定されるものは、継代してあるために大部分は発育がよく、培養期間が異なることによつても、集落数およびその発育の度はほぼ同様であつた。なお集落数および発育を区分する場合には、第1報のように集落数は卍~十の5段階に、発育の度は a, b, c の3段階に分けた。

2) 方 法

Runyon 変法のベンチジン-臭化シアン法によつて行なつた。これはアニリン-臭化シアン法に比して、ベンチジン-臭化シアン法のほうが、はつきりした成績を示したからである。判定は第1報のように- (陰性), ± (疑陽性), + (弱陽性), 卍 (中等度陽性), 卍 (強陽性) に区分したが、単に陽性と記載したのは+, 卍, 卍の合計である。

3. 成 績

1) 保存菌株の成績

表1に示したように、1カ月までと、それ以上2, 3..., 10カ月までにわたつて培養した菌株の成績を総括した。まず人型菌の H₃₇RV 株は、1カ月では卍であつたが、2カ月では卍と増し、9カ月までは卍で差がない。竹橋株は、3カ月までの間では卍で差はない。

次に牛型菌の Ravenel 株は、2カ月までは陰性を示したが、3カ月には±, 4カ月には±または+のように次第に陽性となつているが、5カ月後もほぼ+である。また BCG 株では最初の1カ月に+であるがその後9カ月まではいずれも+で、培養の期間による影響は認めない。

次に非定型抗酸性菌では Photo-chromogen の PP 8 株は、6カ月の間の5回の検査ではいずれも-であつたが、PP 1 株は4カ月までは-で、6カ月で+を、9カ月で±を示した。Nonphoto-chromogen の NP 23, NP 39 株、Skoto-chromogen の SP 29, SP 38 株では、2カ月まではすべて-であつたが、3カ月では+あるいは±となりそれ以後の検査でも、3カ月とはほぼ同様の成績を示している。

以上の成績のように、抗酸性菌の中には、培養期間の長びくとともに、陽性のものはその度を増し、陰性のものでも疑陽性あるいは陽性を示す菌株のあることが明らか

Table 1. Experiments Using Stock Cultures

Type of acid fast bacilli		Length of culture in month									
		~I	~II	~III	~IV	~V	~VI	~VII	~VIII	~IX	~X
Human tubercle bacilli	H ₃₇ RV	卅, 卅, 卅	卅, 卅	卅, 卅	卅, 卅		卅, 卅, 卅	卅		卅, 卅	
	Takehashi	卅	卅	卅							
Bovine tubercle bacilli	Ravenel		-	±, ±	+, +, ±, ±	+	+, +	+, +		±, +	
	BCG	+	+, +, +	+		+	+	+	+	+	
Avian mycobacterium	Kirchberg	±	+	+, +, +	+, +	+	+, +	+		+	+, +
Atypical acid fast bacilli	Photo-chromogens	PP 1	±, ±	-	-	-		+			±
		PP 8	-, -	-		-		-			
	Nonphoto-chromogens	NP 23	-, -	-	+	+		±		+	
		NP39	-, -	-	±	±		±		±	
	Skoto-chromogens	SP 29	-, -	-	+	+		+			+
		SP38	-, -	-	±	±		±			±

Notes: 1) In the column of the length of culture, (~I) indicates within 1 month, (~II) more than 1 month but less than 2 months, and the rest in the same manner.
 2) Several results were reported in some columns since tests were repeated at intervals within those periods.

Table 2. Experiments Using Freshly Isolated Strains Considered to Be Mycobacterium Tuberculosis Var. Hominis

Length of culture	Number of colonies & growth rate, Results of niacin test																						
	Numerous (卅~卅卅)						Countable (+1~200)																
	a & b			c			a & b			c													
	-	±	+	卅	卅	total	-	±	+	卅	卅	total	-	±	+	卅	卅	total					
3 weeks		30	2			32	7	4	10			21	1		3			4	2			2	
		6.3%					47.6%																
4 weeks		4	166	12	1	183	18	13	35	1	67	8	6	15				29	12	1	1	14	
		7.1%					53.7%						51.7%										
5 weeks		1	84	11	2	98	4	5	22		31	5		11				16	2			2	
		13.3%					61.0%						68.8%										
6 weeks		1	39	9	1	50	2	4			6	2	5	4				11	1			1	
		20.0%										81.8%											
Total		6	319	34	4	363	31	26	67	1	125	14	8	34	4			60	17	1	1	19	

Note: Figures indicate the number of strains.

かになつた。しかし、人型菌以外の抗酸性菌では、陽性になつたとしても+程度であつて、長期の培養によつても、人型菌のように卅あるいは卅といつたように中等度あるいは強い陽性は示していない。

2) 新鮮分離菌株の成績

① 人型結核菌と推定される菌株

検査株数は567株である。集落数および発育の程度がさまざまであつたので、これを表2のように、数を有数と無数に、発育の普通あるいは普通よりよい a, b 群ととくに発育の悪い c 群とに分けて3週~6週の種々の期間に培養された菌株によつて実験した。

培養の期間を週単位にしたのは、耐性あるいは分離検

査の観察終了後、間もなく実験したものが大部分であるからである。その成績の評価方法として、集落数が無数で a と b の発育の群では大部分が陽性を示すので、中等度の卅および高度の卅の陽性率を、無数で c の発育の群と有数で a と b とを示す群では、陽性を示すものが少ないので、+, 卅, 卅を合計した陽性率をみた。成績は表2のように、無数の a & b 群では3週で6.3%, 6週で20%, 無数の c 群では3週で47.6%, 5週で61%といつたように培養の期間の長びくとともに陽性率は増している。有数の a & b 群では数が少ないのはつきりしないが、ほぼ同様の傾向を示している。なお、有数の c 群では数が少ないので評価から除外した。

Table 3. Experiments Using Freshly Isolated Strains Considered to Be Non-Pathogenic Acid Fast Bacilli

Material	Length of culture in month													
	~I		~II		~III		~IV		~V		~VI		~VII	
	Number tested	Number of positive reaction	Number tested	Number of positive reaction	Number tested	Number of positive reaction	Number tested	Number of positive reaction	Number tested	Number of positive reaction	Number tested	Number of positive reaction	Number tested	Number of positive reaction
Sputa	19	0	21	0	11	4	4	1	3	1	6	1	4	1
Laryngeal swabs	29	0	16	1	15	0	1	0	1	0	2	1	6	4
Gastric lavage	3	0	2	0	4	1			1	0	1	0		
Total	51	0	38	1 (2.6%)	30	5 (16.7%)	5	1 (20.0%)	5	1 (20.0%)	9	2 (22.2%)	10	5 (50.0%)

Table 4. Changes in Results of Niacin Test Performed on Freshly Isolated Non-Pathogenic Acid Fast Bacilli which Showed Negative Reaction Initially and Became Positive on Further Cultivation

Source of material	Name of strain	Character of colonies on primary culture	Number of colonies on primary culture	Length of culture in month						
				~I	~II	~III	~IV	~V	~VI	~VII
Sputa	Takahashi	light yellow, S	+1	-		+	+	+	+, ±	±
	Horikawa	light yellow, S	+1	-	-, -	+				
	Hirose	orange, S	+1	-	-	-, +				
	Ochiai	light yellow, S	+1	-	-	+				
	Goto	orange yellow, SR	+1	-						+
Laryngeal swabs	Tanaka	light yellow, S	+1	-		±	±		+, ±	+
	Kakuma	orange, SR	+1	-						+
	Nishibori	light yellow, S	+1	-						+
	Okai	orange yellow, S	+1			+				
	Takahashi	orange, S	+1	-						+
Gastric lavage	Miyamoto	light yellow, S	+1	-	-	-, +		±		

Note: same as table 1.

以上の成績から、新鮮分離の人の型結核菌でも、培養期間の長びくとともに、中等度および強陽性の率、あるいは陽性の率が増してくることは明らかである。このことは、保存人型結核菌の場合とほぼ同様である。

② 非病原性抗酸性菌と推定される菌株

実験した菌株は51株、延べ実験回数は149回である。1~8カ月までの種々の期間培養したものについて実験した。表3は月別に分けて陽性回数をみたものであるが、1カ月までのものでは、1株も陽性例はないが、2カ月で2.6%、3カ月で16.7%と陽性率は増している。それ以後は検査例数が少ないので確実ではないが、3カ月までとほぼ同様の傾向を示しているように思われる。

次に、実験の期間中、1回でも陽性を示した菌株11株を集めて、ナイアシンテストが培養の期間によつてどのような消長を示すかをみたのが表4である。この成績を

みると、陽性といつても弱陽性が全部であるし、一度陽性を示した菌株はそれ以後の培養でも、弱陽性が疑陽性を示している。これらの菌株の集落の性状および初発集落数は、培養の期間中引きつづき陰性を示した菌株との間に大差を認めない。

以上の成績から、新鮮分離の非病原性抗酸性菌でも、培養の期間が長びけば陽性となる菌株があること、しかし陽性といつても弱陽性であり、その後の培養を継続しても、陽性の度が増強されないことが明らかとなった。このことは、保存の非定型抗酸性菌と同様である。

4. 総括および考察

われわれの成績では、培養期間の長びくとともに、人型結核菌では陽性の度が増してくるし、その他の抗酸性菌の中には弱陽性を示すものがある。この成績は、

J. M. Gutierrez-Vázquez³⁾ (1960), M. S. Tarshis⁴⁾ (1962), M. S. Tarshis⁵⁾ (1961), 今野⁶⁾ (1962) の人型結核菌についての成績, 牛型の J. M. Gutierrez-Vázquez (1960), 非定型抗酸菌の J. M. Gutierrez-Vázquez (1960), 佐藤⁷⁾ (昭37) の成績とはほぼ同じである。しかし, 牛型についての S. Gilani⁸⁾ ら (1958) の常に陰性を示した成績, M. S. Tarshis (1961) の保存の如何にかかわらず常に弱陽性を示した成績, 鳥型については, 2~10週で陰性を示した S. Gilani (1958) の成績, 98日まで常に陰性を示した J. M. Gutierrez-Vázquez (1960) の成績, 非病原性菌についての2~10週まで陰性を示した S. Gilani (1958) の成績, 常に陰性を示した M. S. Tarshis (1961) の成績, 60日, 1年まで陰性を示した今野 (1962) の成績と異なる。このように人型結核菌ではほとんど同じ傾向を認めるのに, その他の抗酸性菌による成績が多少のくいちがいがあるのは, 人型結核菌では中等度あるいは高度の陽性であるのに, 他の抗酸菌では弱陽性がほとんどであり, われわれは方法としてもつとも鋭敏なベンチジン法によつたので, 他の研究者との間に差が生じたのであろう。

以上のように, 人型結核菌以外の抗酸性菌の中にも, 培養期間の長いものは陽性を示すものがあることは, それが弱陽性であるとはいえ, 人型結核菌でも弱陽性の場合もありうることなので, 一応, ナイアシメントでは, 人型結核菌と他の抗酸性菌との鑑別はむずかしいということになる。しかし, われわれの成績では, 人型菌以外の抗酸性菌が陽性を示すのは, 培養2カ月以後であるから, 培養の期間をほぼ1カ月と規定し, もし発育が悪い等のことで1カ月以後に検査するときには, 判定の基準をかえて陽性の度の強いもののみを陽性とし, 弱陽性を陰性と判定するか, あるいは継代して1カ月以内に普通のように検査するようにならうであろう。

従来までは, 人型結核菌がなるべく陽性になるようにとの考慮から, 主として集落の大きさあるいは数について規定されていたが, さらに人型菌以外の抗酸性菌が陽性にならないような配慮のために, 前述のように培養期間を規定しておけば, より正しい判定ができるのではないかと思われる。

5. 結 論

ナイアシメントの成績の判定に当たつて, 検査した菌株の培養期間をどのように考慮すべきであるかを明らかにするために, 保存株として人型2株, 牛型2株, 鳥型1株, アメリカ由来の非定型抗酸菌6株を1%小川培

地に継代したもの, また新鮮分離菌株として, 3%小川培地で分離されあるいは耐性の検査を実施完了した人型結核菌と推定されるもの567株, 非病原性抗酸性菌と推定される51株を1%小川培地に継代したものについて, 延べ実験回数149回, 培養の期間を最低1カ月から最高10カ月の間の種々とし, Runyon 変法のベンチジン-臭化シアン法によつてナイアシメントを実施し, 次のような成績を得た。

1) 人型結核菌: はじめから陽性のものは, 培養の期間の長くなるとともに陽性の度が増加するし, 集落数が少ないかあるいは発育のよくないために陰性を示したもので, 培養の期間の長びくとともに陽性となるものが多いが, 陽性の度の増したものは, その後の培養期間が長びいても, 陽性の度は同じであつた。

2) 人型結核菌以外の抗酸性菌: BCG ははじめから弱陽性であるが, 期間が長びいても陽性の度は変わらない。その他の抗酸性菌では, 培養1~2カ月では陰性を示したものであつても, 培養の期間の長びくとともに疑陽性となりあるいは弱陽性となるものがあつた。そして弱陽性となつたものは, さらに培養の期間が増しても, 陽性の度が増強されることはなかつた。

以上の成績から, ナイアシメントの判定にあつては, 集落数やその発育を基準にした十分な菌量ということだけでなく, 培養の期間をほぼ1カ月と決めて従来どおりの判定をするか, 2カ月以上の培養の判定にあつては弱陽性は陰性と判定したほうがよい。

牛型結核菌, 鳥型結核菌, 非定型抗酸菌の分与を受けた予研佐藤博士に感謝の意を表す。

文 献

- 1) 小川辰次・大谷典子: 結核, 37: 184, 昭37.
- 2) 小川辰次・大谷典子: 結核, 37: 217, 昭37.
- 3) J. M. Gutierrez-Vázquez: Am. Rev. Resp. Dis., 81: 412, 1960.
- 4) M. S. Tarshis: Am. Rev. Resp. Dis., 82: 733, 1960.
- 5) M. S. Tarshis: Tubercle, 42: 101, 1961.
- 6) 今野淳: 結核, 37: 315, 昭37.
- 7) 佐藤三郎・三浦裕: 第11回日本癩病学会東部地方会プログラム, 昭37年10月.
- 8) S. Gilani & J. B. Selkon: Tubercle, 39: 396, 1958.

Niacin Test for Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis Var. Hominis from Other Acid Fast Bacilli. III. Effect of the length of culture.

For the purpose of performing niacin test correctly, the authors conducted several studies, of which the results were partly reported elsewhere.

In the present study, the effect of the length of culture period on the results of niacin test was examined. The procedure employed was a modified Runyon's method using benzidine cyanogen bromide. The stock cultures used were 2 strains of human tubercle bacilli, two of bovine tubercle bacilli, a strain of avian mycobacterium and six of atypical acid fast bacilli, all of which had been successively transferred on 1% Ogawa media at 37°C for 1 to 10 months. Also freshly isolated strains consisted of human tubercle bacilli and atypical acid fast bacilli were used. Among there five hundred sixty seven strains were considered to be human tubercle bacilli which had either been isolated from sputa on 3% Ogawa media, or grown on the control media for the sensitivity tests, and cultivated for 3 to 6 weeks. Fifty one strains were considered to be non-pathogenic acid fast bacilli which had been successively transferred on 1% Ogawa media for 1 to 8 months. The total number of the tests performed was 149, the results of which were expressed as negative (-), doubtful (\pm), weakly positive (+), moderately positive (++) and strongly positive (###). Following were results obtained.

1) On *M. tuberculosis* var. *hominis*

When a stock culture, H₃₇RV was used as a test organism, the reactivity of some strains which were moderately positive in the first month increased in the following 2 months and remained the same thereafter up to the 10th month of the culture. The reactivity of a stock culture Takehashi remained moderately positive for 3 months. The reaction of the freshly isolated strains frequently increased with the increasing culture periods, even when the number and growth of colonies were unchanged. And some strains with negative reaction in the first month became positive with the lapse of

time.

2) On acid fast bacilli other than *M. tuberculosis* var. *hominis*

The results of the tests on BCG, a bovine tubercle bacilli, were weakly positive after one month of the culture but the reactivity did not increase upon further cultivation. On the other hand, the reactions of a strain Ravenel were negative for the first 2 months of the culture which became weakly positive at the 4th month and remained unchanged thereafter.

When a strain Kirchberg, an avian mycobacterium, was tested, the reaction was doubtful for the first month but became weakly positive after 2 months of the culture and remained so thereafter.

Among the 6 strains of atypical acid fast bacilli tested, one remained negative even after the prolonged cultivation, one became weakly positive after 6 months, and two became doubtful after 3 months remaining thereafter unchanged. The other two strains were negative for the first 2 months, becoming weakly positive at the third month, and remained so on further cultivation.

Among acid fast bacilli which were isolated from the sputa, laryngeal swabs and gastric lavage and were considered to be non-pathogenic, all were negative for the first month of the culture but the number of strains with weakly positive reaction increased to about 20% when culture was continued for more than 3 months and about a half of them became weakly positive between the 6th and the 8th month of the culture.

Thus, niacin test sometimes becomes positive even in acid fast bacilli other than human tubercle bacilli with the prolonged culture period. Therefore in its practical application, the following precautions are considered to be necessary: The age of the culture to be used is desirable to be approximately one month: In case the cultures older than one month are used, the reaction should be accepted as positive only when it is strongly positive, and as negative when it is weakly positive.