

# 人型結核菌と他の抗酸性菌との鑑別方法と してのナイアシンテスト

## 第4報 培地による差異

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4月4日

### 1. 緒 論

鶏卵培地で分離されあるいは継代された人型結核菌についてのナイアシンテスト<sup>1)</sup> (以下 NT と略す) は、ほぼ満足すべき結果を示したことはさきに発表したようである。しかし、結核菌の分離培養、耐性の検査は鶏卵培地だけでなく、少数には寒天培地によつても行なわれている。それで NT は寒天培地でも鶏卵培地同様に実施できるかどうかを、これらの培地に発育した人型結核菌について検討したので報告する。

### 2. 実験方法

#### (1) 使用した寒天培地

	血清寒天培地	保存全血液寒天培地
4% NaOH 処理用	変法Ⅲ Kirchner 寒天培地 <sup>2)</sup>	BⅡ 寒天培地 <sup>3)</sup>
中和処理用	Kirchner 寒天培地	BⅠ 寒天培地

なお他に Tarshis 培地対照として鶏卵培地の3%、1%小川培地を使用した。血清寒天培地には血清が10%に、また雑菌阻止のために0.1%のマラカイト緑液が、基汁100ccに対して0.25cc混入されている。また保存全血液寒天培地のBⅡ、BⅠ培地では、保存全血液が10%に、Tarshis 培地では30%に混入されている。雑菌阻止のために、BⅡ、BⅠ培地では0.1%マラカイト緑液が3.0cc、Tarshis 培地では、ペニシリンが混入されている。なお変法Ⅲ Kirchner 寒天培地とBⅡ寒天培地では、4% NaOH 処理液接種後の培地のpHがほぼ中性になるように、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>の量がKirchner 寒天培地やBⅠ寒天培地に比して多く入っている。これらの培地はすべて中試験管に5cc宛分注し、斜面として固めた。

#### (2) 菌株の分離方法

指示薬としてフェノールレッドを0.004%に混入した4% NaOH 液で喀痰を均等化して4% NaOH 用培地にさらに8% HCl で中和したものを中和用培地にそれぞれ0.1cc宛を接種後、斜面全体をうるおして、2~3日孵卵器に斜面を上にして水平にねかし、液のほぼ乾燥したところでゴムキャップにかえ、立てて培養し、1~2カ月観察した。

#### (3) 使用した菌株の集落数および発育度

菌株は前述の分離方法により発育した初代の分離株であつて、第1報<sup>1)</sup>と同様に集落数をⅢ~Ⅰの5段階に、集落の発育の度をa, b, cの3段階に分けた。

#### (4) NT の実施方法および判定

同一患者の喀痰を、前述の4% NaOH 処理用培地と中和処理用培地の全部、あるいはその2~3種類によつて同時に分離されたものが大部分であるが、一部4% NaOH 処理用のみあるいは中和用のみで分離されたものもある。NT の実施にあつては、同時に使用した培地にほぼ同数の集落数を示し、発育もほぼ同じものを選んだ。方法は、第1報同様 Runyon の変法に準じて行なつた。大部分は臭化シアン-アニリン法 (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) とを併用したが、一部一方のみを行なつたものもある。なお、保存全血液寒天培地に発育した菌株の NT 実施には必ず使用していない培地を1本立てて対照とした。判定はその直後に行ない、成績は陰性(-)、疑陽性(±)、弱陽性(+)、中等度陽性(++)、強陽性(+++)とした。そして、上記の基準によつて判定すると同時に、各培地において判定の簡単にできたもの、判定の難しかったもの、また他の培地でははつきり陽性を示しているにもかかわらず、培地よりのマラカイト緑あるいは血色素の混入によつて陰性を示したもの、すなわ

ち見せ掛けの陰性を示した例,あるいは判定のできなかつた例を集めてみた。

3. 成 績

検査株数は 366 株で, アニリン法で延べ, 1,101 株, ベンチジン法で延べ 1,154 株, 合計 2,255 株の実験である。

(1) 判定困難, 判定不能および見せ掛けの陰性を示した率の培地による差異

判定困難な例とは, 一見すると判定は難しいがよくみると判定できるものであつて, 判定不能の例とはその名のように判定できなかつたものである。見せ掛けの陰性を示したものは, 同時に実施した他の培地では陽性であるのに, マラカイト緑, あるいは血色素の混入のために菌の発育していない対照培地の呈色と差がなく, 陰性を示したものである。

種々の培地に発育した人型結核菌を材料として, ベンチジン法によつて実施した NT の中で (+) 以上を陽性とし, 陽性率を集落数と発育の度とに区別して集めた。もちろん判定不能のものは除いた。

① 保存全血液寒天培地

B II 培地による 160 株, B I 培地 156 株の成績を表 2, 表 3 に示した。表でみるように, 集落数の多くなるに従つて, また集落の大きいほど陽性率が増している。

② 血清寒天培地

変法 III Kirchner 寒天培地による 168 株, Kirchner 寒天培地による 35 株の成績を表 4, 表 5 に示した。この場合も, 保存全血液寒天培地同様の傾向を示した。これらの例を合計すると 519 株になるが, 陰性を示したものは B II 培地で 25 株, B I 培地 32 株, 変法 III Kirchner 寒天培地 41 株, Kirchner 寒天培地 4 株であつて, これを合計すると 102 株となり, 519 株に対して 19.7%

Table 1. Incidences of Test Results Which were Difficult or Impossible to Evaluate, and Were False Negative

Medium and method of pre-treatment			Aniline BrCN method			Benzidine BrCN method		
			Number of strains tested	Number of strains evaluated with difficulty	Number of strains evaluation impossible and false negative	Number of strains tested	Number of strains evaluated with difficulty	Number of serains with evaluation impossible and false negative
Egg media	3% Ogawa	4% NaOH	348	3 (0.9%)	14 (4.0%)	366	0	1 (0.3%)
	1% Ogawa	Neutralized	215	0	2 (0.9)	216	0	0
Whole blood agar media	B II	4% NaOH	162	8 (4.9)	17(10.5)	168	6 (3.6%)	8 (4.8)
	B I	Neutralized	162	6 (3.7)	15 (9.3)	166	3 (1.8)	10 (6.0)
	Tarshis	Neutralized	31	7(22.6)	6(19.4)	35	9(25.7)	4(11.4)
Serum agar media	Modification III Kirchner	4% NaOH	148	0	0	168	0	0
	Kirchner	Neutralized	35	0	0	35	0	0

成績は表 1 のようである。まず鶏卵培地をみると, アニリン法では 3% 小川培地が 1% 小川培地に比してこれらの株が多い。ベンチジン法では, 3% 小川培地に判定不能のものが 1 株あつただけで, 1% 小川培地では 1 株もない。

次に保存全血液寒天培地をみると, アニリン法では Tarshis 培地がとび離れてもつとも多く, 次に B II, B I 培地であつて, この両培地ではほとんど差がない。ベンチジン法でもやはり, Tarshis 培地が著明に多く, B II, B I 培地と続いているが両者の間にはほとんど差はない。

血清培地では, 方法の如何を問わず, また種類の如何を問わず, これらの例は 1 株もみられない。以上を方法別にみると, 血清寒天培地は問題外として, Tarshis 培地では両方法間に差はないが, B II, B I 培地, 鶏卵培地等では, アニリン法が多い。

(2) 種々の培地における人型結核菌の陽性率

である。これら陰性の例をみると, 発育がよくても集落

Table 2. Resulte Obtained with B II Medium

Size of colonies		Number of colonies				
		冊	冊	冊	冊	+1-200
a	Number tested		1	1	6	37
	Number of positive tests		1	1	6	25
	(percentage)		(100)	(100)	(100)	(67.6)
b	Number tested	1	21	35	23	15
	Number of positive tests	1	21	34	23	10
	(percentage)	(100)	(100)	(97.1)	(100)	(66.7)
c	Number tested		7	6	6	1
	Number of positive tests		6	5	2	0
	(percentage)		(85.7)	(83.3)	(33.3)	

Table 3. Results Obtained with B I Medium

Size of colonies		Number of colonies				
		冊	冊	冊	冊	+1-200
a	Number tested		1	5	8	37
	Number of positive tests (percentage)		1 (100)	5 (100)	8 (100)	23 (62.2)
b	Number tested		18	23	22	20
	Number of positive tests (percentage)		18 (100)	23 (100)	20 (90.9)	9 (45.0)
c	Number tested		4	12	2	2
	Number of positive tests (percentage)		4 (100)	11 (91.7)	0	0

Table 4. Results Obtained with Modification III Kirchner's Agar Medium

Size of colonies		Number of colonies				
		冊	冊	冊	冊	+1-200
a	Number tested		3	10	7	14
	Number of positive tests (percentage)		3 (100)	10 (100)	7 (100)	12 (85.7)
b	Number tested		11	34	26	12
	Number of positive tests (percentage)		11 (100)	34 (100)	24 (92.3)	6 (50.0)
c	Number tested		6	14	26	5
	Number of positive tests (percentage)		5 (83.3)	8 (57.1)	7 (26.9)	0

Table 5. Results Obtained with Kirchner's Agar Medium

Size of colonies		Number of colonies				
		冊	冊	冊	冊	+1-200
a	Number tested			2	2	8
	Number of positive tests (percentage)			2 (100)	2 (100)	7 (87.5)
b	Number tested		3	8	7	3
	Number of positive tests (percentage)		3 (100)	8 (100)	7 (100)	2 (66.7)
c	Number tested			2		
	Number of positive tests (percentage)			0		

数の少ないもの、あるいは集落数が多くても発育の悪いものであった。

4. 総括および考察

現在行なわれている間接法による NT の判定に当たつて、鶏卵培地に混入されたマラカイト緑や血液寒天培地の血色素が、抽出液に混じつて呈色反応を邪魔することは直接法に比し少なくなつたとはいえ、なお存することは E.H. Runyon ら<sup>4)</sup>によつて認められたところであるが、培地によつてあるいはアニリン法とベンチジン法によつてどの程度の差があるのかといつた細かい点についての記載はない。それでわれわれはこの点について実験した結果、色素の混入の少ない血清寒天培地では、両方法とも全然認めなかつたが、鶏卵培地では3%小川培地が1%小川培地に比して多かつた。方法のうえからいえば、アニリン法がベンチジン法に比して多いことを認めた。

1%小川培地に比して3%小川培地が多いのは、3%小川培地では  $KH_2PO_4$  の量を多くして酸性としてあるために、緑の色が濃く、NaOH 処理液を接種したのちには、菌抽出液と同時に抽出されるマラカイト緑も多いのではなからうかと思われる。次にアニリン法で多くベンチジン法に少ないのは、陽性の色がアニリン法では黄色であるために、マラカイト緑や血色素により呈色反応のはつきりしなくなるのに、ベンチジン法では桃色であるため呈色反応が邪魔されないことによる。それで3%小川培地であつても、ベンチジン法で実施すればマラカイト緑による障害はさけることができる。

次に保存全血液培地中の Tarshis 培地では、ベンチジン法でも、アニリン法でも全く同様でほぼ40%を示した。これはわれわれの実験ではもつとも多い。われわれの B II, B I 培地では、Tarshis の培地に比しこれら例が少なかつたが、これは血液が Tarshis 培地の 1/3 量混入されているためである。B II, B I 培地においても、アニリン法にこのような例が多くベンチジン法に少ないのは、前述のように陽性の呈色反応の差によるものであらう。

以上のことから、血清寒天培地はどちらでもよいが、鶏卵培地を用いるならベンチジン法がよいし、保存全血液寒天培地は NT には不向きのように思われる。

次に保存全血液寒天培地および血清寒天培地に発育した人型結核菌の陽性の出方をみた。結果は予期したように、保存全血液寒天培地でも血清寒天培地でも、陽性率は集落数と集落の大きさに左右されることが明らかにされた。また、発育の悪いものにおいては、いずれの培地でも集落数が多少多くとも陰性を示すことは注目すべきであらう。したがつて、このような場合は継代して再検

様である。継代してテストするとき M. S. Tarshis<sup>5)</sup> は Tween Albumin ナイアシンテスト培地, Tween Charcoal ナイアシンテスト培地を考案しているが、これは発育のすぐれたしかも色素の障害のないようにとの意味らしいが、継代の場合でも鶏卵型地で十分であつて、とくにその必要はなさそうである。

これを要するに、いずれの培地においても集落が多く、しかも発育が旺盛な人型菌なら、ほとんど NT 陽性であるといえる。

## 5. 結 論

喀痰を 4% NaOH 液で処理して、鶏卵培地の 3% 小川培地、血清混入の変法Ⅲ Kirchner 寒天培地および全血液混入の保存全血液Ⅱ寒天培地に、またそれを中和して、鶏卵培地の 1% 小川培地、血清混入の Kirchner 寒天培地、全血液混入の保存全血液Ⅰ寒天培地および Tarshis の培地にそれぞれ 0.1 cc 宛接種して、1~2 カ月の観察の期間中に発育した人型結核菌について Runyon 変法のアニリン法およびベンチジン法を併用して（一部一方法のみ）ナイアシンテストを実施し、これらの培地からのマラカイト緑、血色素等の結核菌抽出液中への混入による呈色反応の障害のために、判定しにくいものおよび判定できないものがどの程度あつたかについて検討するとともに、血清混入および保存全血液混入の培地における陽性率出現の傾向をベンチジン法によつて実験し、次のような成績を得た。

1) 判定困難、判定不能および見せ掛けの陰性の率

① アニリン法：もつとも多いのは、Tarshis 培地の 42.0%、BⅡ、BⅠ培地の 15.4% および 13.0% がこれに次ぎ、以下 3% 小川培地の 4.9%、1% 小川培地の 0.9% の順であつた。変法Ⅲ Kirchner 寒天培地、Kirchner 寒天培地ではそのような例は 1 株もみられなかつ

た。

② ベンチジン法：もつとも多いのは、Tarshis 培地の 37.1% で、BⅡ培地の 8.2%、BⅠ培地の 7.0% がこれに次ぎ、さらに 3% 小川培地の 0.3% であつて、1% 小川培地および血清寒天培地ではこれらの例は 1 株も認めない。

③ アニリン法とベンチジン法の比較：①、②で示したように、Tarshis 培地では両方法で大差ないが、血液混入の BⅠ、BⅡ培地および 3%、1% 小川培地ではベンチジン法が著明に少ない。

以上の成績から、保存全血液寒天培地は NT 用にはつとめて避けたほうがよいし、鶏卵培地で NT を行なうのにはベンチジン法がよい。また血清培地ではどちらの方法でもよい。

### 2) 陽性出現の傾向の差異

集落数の増すとともに、また集落の大きくなるとともに陽性率が増してくるし、陽性の度も強くなる傾向は、保存全血液寒天培地（BⅠ、BⅡ培地）および血清寒天培地（変法Ⅲ Kirchner 寒天、Kirchner 寒天培地）とも同じである。なお、集落数の少ないためにまた集落の小さいために陰性を示したものが、検査株数 519 株中 102 株で 19.7% であつた。

## 文 献

- 1) 小川辰次・大谷典子：結核，37：184，昭37。
- 2) 小川辰次・島田英彦・遠山和明・本庄茂敏：日本細菌学雑誌，14：171，昭34。
- 3) 小川辰次・大谷典子：結核，37：611，昭37。
- 4) E. H. Runyon, M. J. Selin and H. Wm Harris: Am. Rev. Tbc. & Resp. Dis., 79: 663, 1959.
- 5) M. S. Tarshis: Am. Rev. Resp. Dis., 82: 82, 1960.

### Niacin Test for Differentiation of Mycobacterium Tuberculosis Var. Hominis from Other Acid Fast Bacilli. IV. Difference in Results Obtained with Various Media.

Satisfactory results were obtained when niacin test was performed on human tubercle bacilli isolated or successively transferred on the egg culture media, as reported previously. However, egg medium is not the sole medium either for the isolation of tubercle bacilli or for the sensitivity test for chemotherapeutic agents, agar media also being used for such purposes, although smaller in number. Therefore, experiments were made on whether or

not niacin tests can be conducted with tubercle bacilli cultured on agar media as satisfactorily as with those on egg media.

0.1 ml. of sputum treated with 4% NaOH was inoculated on each of 3% Ogawa egg medium, modification III of Kirchner's agar medium containing serum and B II medium containing whole blood, while 0.1 ml. of neutralized sputum pretreated with 4% NaOH was inoculated on each of 1% Ogawa egg medium, Kirchner's agar medium containing serum, B I medium containing whole blood and Tarshis' medium. By using 366 strains of tubercle bacilli with various numbers of and various sizes of colonies

grown for one to two months of observation periods, 1,101 niacin tests were carried out by means of cyanogen bromide-aniline method (anilin BrCN method) modified by Runyon and 1,154 tests by means of cyanogen bromide-benzidine method (benzidine BrCN) in order to see the effects of malachite green and hemoglobin intermixed with the extract of tubercle bacilli on results of the color reaction, that is, how often these substances rendered the evaluation of the test results difficult or impossible. At the same time, the incidence of positive tests obtained from tubercle bacilli grown on the media containing serum or blood was investigated according to the number and the size of colonies.

Following results were obtained.

1) Percentages of test results which were impossible or difficult to evaluate.

i) Aniline BrCN method: The highest rate of 42% was seen with tubercle bacilli grown on Tarshis' medium and the incidence decreased in the order of B II medium (15.4%), B I medium (13.0%), 3% Ogawa medium (4.9%) and 1% Ogawa medium (0.9%). And all the strains grown on the media containing serum were evaluated without difficulty.

ii) Benzidine BrCN method: Also with this method, the highest rate of 37.1% was experienced with Tarshis' medium. The incidence decreased in the order of B II medium (8.2%), B I medium (7.7%) and 3% Ogawa medium (0.3%), and no

strains grown on 1% Ogawa medium or on media containing serum caused difficulty in reading test results.

iii) Comparison of aniline BrCN method with benzidine BrCN method. With regard to Tarshis' medium, as stated above, there was no striking difference between the results obtained by these two methods. However, with B I, B II, 1% and 3% Ogawa media, the incidence of the cases in which the evaluation was difficult or impossible was much lower when benzidine method was employed than when aniline method was employed. It can be concluded from these results that blood agar media are not recommended for the niacin test, that the benzidine method is superior to aniline method when the bacilli are cultured on the egg media, and that either method can be employed when the bacilli are grown on media containing serum.

2) Differences in the incidence of positive tests.

When B II medium, B I medium, modification III Kirchner's agar medium and Kirchner's agar medium were used, the incidence of positive tests and the intensity of the reactions increased as the number of colonies increased and the size of colonies became larger. Such a tendency was also observed when egg media were used as reported previously. On the contrary, 19.7% of the tests were negative because the number or size of colonies was small.