

人型結核菌と他の抗酸菌との鑑別法と してのナイアシンテスト

第5報 ナイアシンテストに対して不安定な反応を
示した人型結核菌について

小 川 辰 次・大 谷 典 子・宮 城 小 枝 子

北里研究所付属病院（院長 福住定吉）

受 付 昭 和 38 年 11 月 20 日

NIACIN TEST FOR DIFFERENTIATION OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS VER. HOMINIS FROM OTHER ACID-FAST BACILLI

V. Studies on human tubercle bacilli with
inconstant niacin test results

Tatsuji OGAWA, Noriko OOTANI and Saeko MIYAGI*

(Received for publication November 20, 1963)

This is a report of a strain of human tubercle bacilli which showed inconstant niacin test results. This strain was isolated from a patient one month prior to his death, who expired inspite of chemotherapy for 1 year at a certain hospital and combined chemotherapeutic and surgical treatment at Kitasato Institute Hospital for the following 3 years.

After having completed monthly routine sensitivity tests during about 2 years of his first admission to the hospital, niacin tests were performed on 25 strains on 10 occasions, which had been grown on the various sensitivity test media. Among these, 12 strains showed weakly positive results, 2 strains doubtful and 11 strains negative. However, all the tests repeated after successive cultures of these negative strains were strongly positive.

The niacin tests performed on 6 strains which were isolated during the terminal phase of his illness were all negative in the first generation of cultures, and even after each successive culture of these strains until the 4th generation, all the strains showed doubtful or negative results except for a single strain with weekly positive result.

From the results obtained, unless the results of niacin tests are constant, it is desired that various other bacteriological examinations are added to the niacin test in order to differentiate human tubercle bacilli from other acid fast bacilli.

* From Kitasato Institute Hospital, Shiba Shirogane Sanko-cho, Minato-ku, Tokyo, Japan.

1. 緒 論

われわれは、ナイアシンテスト（以下 N.T. と略す）を
通常検査に移す予備実験として種々検討してきたが^{1)~4)}、
たまたま重症の肺結核患者の喀痰より2カ年の間の種々
の時期に分離された結核菌が、分離された時期によつて

あるいは同じ時期でも発育した培地によつて、N.T. に
対する態度が種々であつた一連の菌株を経験した。この
事実は N.T. の成績を解釈するに当たつては、慎重であ
るべきことを示唆するものであると思ひ、ここに発表す
る次第である。

2. 方 法

すべて、臭化シアノーベンチジン法によつた。これは、臭化シアノーアニリン法²⁾に比してより正確であることを経験したからである。そしてその成績を次のように区別した。

- 一（陰性）……白い沈澱だけのもの。
 ±（疑陽性）……ごくかすかなピンクの呈色を認めたもの。
 +（弱陽性）……軽度の
 ++（中等度陽性）……中等度の } ピンクの呈色を認め
 +++（強陽性）……高度の } たもの。

なお検査にあつては、その都度、陽性の対照として人型抗酸菌 $H_{37}R_v$ 株を、陰性の対照としては非病原性抗酸菌を併用した。また菌の集落数¹⁾をⅢ, Ⅲ, Ⅲ, Ⅲ, Ⅲ, Ⅲに、その發育を a, b, c と區別して記載した。

3. 臨床経過と抗酸菌の性状

(1) 臨床経過

上田氏, 8, 43 才でツ反応陽転の時期ははつきりしない。昭和 18 年, 右渗出性肋膜炎にかかった。昭和 20 年, フィリッピンで右肺に空洞をはじめて発見された。療養により元気になつて仕事をしていたが昭和 33 年 1 月再発し, 翌 34 年 11 月まで某病院に入院, SM と PAS と INH による化学療法を受け, その後当院に転院した。X線所見は, 結核病学会の分類では *b II₂ r Pl* であつた。入院後は, 表 1 でみるように, SM, PAS, INH, カナマイシン (以下 KM), サイクロセリン (以下 CS), エチオナミド等が使用され, 右肺の外科手術が 3 回施されたが, 病状は依然として快方に向かわず, 喀痰の毎月の検

査ではほとんど常に塗抹陽性を示した。昭和37年6月、すなわち入院2年8ヵ月後に小康を得て退院したが、同年11月に増悪して再び入院した。そして、INH, エチオナミド, バイオマイシン（以下VM）の投与を受け、左肺の手術を受けたが、同年12月心臓衰弱のために死亡した。入院の期間は約3カ年である。なお菌の耐性検査の成績は菌の性状の項で記すことにする。

(2) 抗酸菌の性状

前述のように、入院中の毎月の検査ではほとんど塗抹陽性で、ガフキー 1 号から 7 号の間を動揺していた。塗抹標本は Ziehl-Neelsen 法によつて染色しているが、中等度の長さの桿菌であつて、この形態は毎回の検査でほとんど同一であつた。また抗酸性の程度は普通であつた。当院では、塗抹陽性の場合には直接法により、培養陽性の場合には間接法による耐性検査がなされるので、以下述べる集落の種々の性状はこの場合の対照培地に発育した菌株を対象にしたものである。KM は寒天培地により、その他は鶏卵培地によつて実施されている。

これらの菌が N. T. に対して不安定な反応を示すことに気がついたのは、37 年 11 月に再入院したときであつて、それ以前は陰性であつても、菌量が少ないためかも知れないと簡単に片づけ、検査後は捨ててしまつたので発育の期間、集落の型程度しかわからない。ここで示すその他の性状は主として、上田-1 株、上田-2 株、上田-3 株、上田-4 株、上田-5 株、上田-7 株（後述）の再入院時に連続的に分離した一連の菌によるものであるが、集落は 37°C の孵卵器で発育するまでに 3~4 週を要している。継代することによつて多少早くはなるが、1 週以内で発育することはない。集落は R 型であり、均等な菌液となりにくい。普通寒天培地には発育しない。ま

Table 1. Clinical Course of a 43 Year-old Patient U.

[illegible]

Notes: 1) S, P, H, C, K, T, V denote respectively, streptomycin, paraaminosalicylic acid, isonicotinic acid hydrazid, kanamycin, cycloserine, ethyonamide and viomycin.

2) G and figures under "G" denot Gaffky scales and numbers, and figures in circle number of colonies on culture media.

Table 2. Series of Sensitivity during Hospital Stay

Day of tests	Method	Number and size** of colonies on control media	Result of resistance*						
			SM	PAS	INH	KM	CS	TH	VM
1960 11	Indirect method	++ b	100 r C	S	0.1 r I				
1961 1	Direct method G 2	++ b	100 r C	10 r C	1 r I				
2	〃 G 1	139 a	100 r I	10 r I	1 r I				
3	〃 G 1	9 a	1 r I	1 r I	1 r I	S	S		S
4	〃 G 5	+++ b	100 r C	10 r I	5 r I	S			
5	〃 G 5	+++ b	100 r C	10 r I	5 r I	S	100 r I		
6	〃 G 5	+++ b	100 r I	10 r C	5 r C	10 r I	100 r C	S	
7	〃 G 2	+++ b	100 r I	10 r C	5 r I	10 r I			
12	〃 G 3	++ b				100 r I		S	
1962 3	Direct method G 4	39 a	10 r C	10 r C	1 r C	100 r I		S	
5	〃 G 1	++ b	100 r C	10 r I	5 r C	100 r I			
11	〃 G 4	+++ b	100 r C	10 r C	5 r C	100 r C		S	

Notes: *C, I and S denote respectively, complete and incomplete resistance and sensitive.

**a: large, b: medium.

た室温では発育しない。コード形成能は陽性、カタラーゼは陰性である。

なお耐性は入院時すでに SM 100 r 完全耐性, PAS 感性, INH 0.1 r 不完全耐性であつたが, 表2でみるように, その後 PAS, INH, KM, CS に耐性ができ, 37年11月に再入院したときは SM 100 r, PAS 10 r, INH 5 r, KM 100 r の完全耐性を示していたが, エチオナミドに対しては感性であつた。そして再入院時の耐性は6株ともほとんど同じであり, また継代3代後に再検査したその中の5株の成績も原株とほとんど同じ耐性を示した。

4. 実験成績

(1) 初回入院時の N. T. の成績

昭和35年11月より昭和37年5月までの約1年半の間に10回, 菌株数合計25株につき検査されたが, いずれも耐性検査の完了後に種々の耐性検査培地に発育した集落について, 別の目的で無選択的に実施されたものをあとで集めたものであつて, このときの耐性値は表2に示されている。なおこの中には継代して再検査したものが5株, はじめから継代して検査したものが4株ある。おかしいと感じたのは, 前述のように再入院時の昭和

Table 3. Results of Niacin Test during His First Admission

Day of sensitivity tests (isolation of bacilli)	Method	Egg media (1% or 3% Ogawa media)									Serum agar media (Modification III (Kirchner agar) media)		
		SM		PAS		INH			CS	TH	KM		
		0 r	100 r	1 r	10 r	0.1 r	1 r	5 r	100 r	10 r	0 r	1 r	10 r
1960 11	Indirect method	++ a +	++ b +										
1961 1	Direct method	++ b +			++ b +		++ b +						
2	〃	+ a +	+ b - (+++ b +)		+ b - (+++ b +)		+ b - (+++ b +)						
3	〃	(+++ a +)	(+++ a +)	(+++ a +)		(+++ a +)					+++ a +	++ c ±	
5	〃	+++ b +	+++ b +		++ b - (+++ a +)			++ b +					
6	〃				+++ b -			++ b - (+++ a +)	++ b -				
7	〃										++ b ±		
12	〃												+++ b +
1963 3	Direct method				+ b +								
5	〃	++ b -			++ b -								

Notes: Number and size of colonies are shown in the left side of columns and results of niacin test in the right.

Parentheses indicate results of tests after successive cultures.

37年11月15日の成績が分かつてからのことである。成績は表3のようで、35年11月、36年1月はともに弱陽性であつたが、36年2月、36年3月、36年5月は弱陽性、疑陽性、陰性が入り混じつており、36年6月、36年7月では疑陽性、陰性、36年12月、37年3月では再び弱陽性、37年5月では再び陰性を示した。昭和36年2月、5月、6月にN.T.陰性を示したものは集落数が少なかつたためではないかと推定されたし、3月に分離培養した菌の4株も集落数が少ないので、あらかじめその一部をとつて1%小川培地に継代し、37°Cに4~5週培養し、発育の最高を示したと思われる時期に再びN.T.を実施してみた。その成績は表3の()内に示した。すなわち表3でみるように、そのいずれの場合でも強陽性を示した。また3月に最初から継代して実施した4株もみな強陽性を示した。

以上表3の成績から、初回入院中のN.T.の成績は一見かなり不定で、しかも普通の菌株に比して弱いのではないかと推定されたが、一部の菌株を継代培養して再検査したときはその全部が強陽性を示したことから、われわれの推定は間違いであつて、ことN.T.に関しては普通の菌株と大差のないことが分かつた。

(2) 再入院時(死亡1カ月前)のN.T.の成績

37年11月に喀痰が多くなり再入院した。喀痰中の結核菌の有無を精査する目的で、表4に示したように11月14日より同月21日までの間に6回検査したが、6回とも塗抹陽性であつた。これを培養するといずれも集落を認めた。これらの菌株を次のようによぶことにする。

上田-1株……昭和37年11月14日分離
 上田-2株…… “ 11月16日 “
 上田-3株…… “ 11月20日 “
 上田-4株…… “ 11月21日 “
 上田-5株…… “ 11月22日 “
 上田-7株…… “ 11月15日 “

成績は表4に示したように、初代では全部陰性、2代では上田-2株が疑陽性を示したほかは全部陰性、3代では上田-1株が弱陽性となり、上田-3株と上田-5株が疑陽性を示し、他の3株は陰性を示した。次に、4代の6

週培養では3株は疑陽性、残り3株は陰性を示した。8週培養では上田-1株が再び弱陽性、上田-4株は陰性、残りの4株は疑陽性を示した。

以上の成績は、これらの菌株がN.T.に対して不安定であつたことを示しているが、とくに初回入院時の菌に比して概して反応が弱く、陽性であつても弱陽性であり、疑陽性、陰性が大部分であつたことは注目すべきことである。さらに、上田-1株、上田-2株、上田-3株、上田-4株、上田-5株の菌株を1%小川培地に3代まで継代し、SM, PAS, INH, CT, エチオナミド, VM については1%小川培地で、KM は Kirchner 寒天培地に 10^{-8} mg を接種して耐性検査を実施した。そして耐性を読んだあとに、これらの耐性検査培地に発育した菌株の一部を、

Table 5. Results of Niacin Tests during His Final Admission

2. Results obtained from material used for sensitivity tests

Sensitivity test media	Concentration of antituberculous agents (γ /cc.)	Number of strains tested	Results of niacin test		
			+	±	-
SM	0	5			5
	10 γ	1			1
	100 γ	1			1
PAS	1 γ	1			1
	10 γ	4			4
INH	0.1 γ	1			1
	1 γ	1		1	
	5 γ	5			5
KM	0 γ	3			3
	1 γ	2			2
	10 γ	1		1	
	100 γ	5		3	2
CS	10 γ	2			2
TH	10 γ	1			1
VM	1 γ	1		1	
	10 γ	1			1
Total		35		6	29

Table 4. Results of Niacin Test during His Final Admission

1. Results obtained from isolated strains

Day of tests Year. Month	Generation	Length of culture	Ueda strain #1	Ueda strain #2	Ueda strain #3	Ueda strain #4	Ueda strain #5	Ueda strain #7
			11 14	11 16	11 20	11 21	11 22	11 15
1962	2	1st	++ b -	+ b -	++ b -	+ a -	+ b -	++ b -
	3	2nd	+++ a -	+++ a ±	+++ a -	+++ a -	+++ a -	+++ a -
	4	3rd	+++ a +	+++ a -	+++ a ±	+++ a -	+++ a ±	+++ a -
	5	4th	+++ a ±	+++ a -	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±	+++ a -
	6	6 weeks	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±
		8 weeks	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±	+++ a ±

Notes: Same as Table 2.

Figure under names of strain indicate dates of isolation during 1961.

無選択的に集めて N.T. を行なつた。培養の期間は、4 週が 8 株、8 週が 20 株、11 週が 7 株、合計 35 株である。これらの菌株はいずれも 1 株の集落であり、発育は b であつた。成績をみると、弱陽性の上田-1 株の 7 株中の 1 株が陰性の上田-2 株では 14 株中の 2 株が、疑陽性の上田-3 株では 4 株中の 1 株が、陰性の上田-4 株では 3 株中の 1 株が、疑陽性の上田-5 株では 7 株中の 1 株がそれぞれ疑陽性を示しただけで、その他の菌株では全部陰性を示した。総括すると 6 株が疑陽性、29 株が陰性で、陽性を示したものは 1 株もない。これを耐性値別に分けてみると表 5 のようであつて、N.T. の成績と耐性菌の種類および耐性値との間には関係がない。

5. 総括および考察

われわれは、約 3 年もの長期間入院し、化学療法や外科手術の効もなくついに死亡した重症肺結核患者の死亡 1 カ月前の喀痰から検出された抗酸菌の N.T. が不安定である例を経験した。この菌は染色してみると、普通の抗酸性の中等度の長さの桿菌である。集落の性状は R 型であり、室温では発育せず、コード形成能は陽性であるが、カタラーゼは陰性である。これらの成績は INH 耐性の人型結核菌と全く一致しているが、初回入院時約 1 半年間の期間中に 1 カ月ごとに繰り返された耐性検査の完了した材料で、そのときに行なつた N.T. は 10 回あつたが、これらの成績は、陽性であつても弱陽性であり、疑陽性、陰性を示すものも多かつた。しかし、最初から継代して検査した成績陰性の菌株の一部を継代して再検査した成績では、そのいずれもが強陽性を示したので、このときの菌の N.T. に対する態度は正常であることが分かつた。

患者は一たん多少軽快して退院したのであるが、悪化して約半年後に再入院し、1 カ月後に死亡した。そのとき連続的に分離した 6 株の菌について N.T. を実施したところいずれも陰性であつた。またこれらの菌株を 4 代にわたつて継代し、その都度検査したが、そのうちの 1 株が弱陽性を示したほかは、いずれも疑陽性あるいは陰性を示した。すなわち、N.T. が弱く不定であることを示している。また、3 代目の菌株の耐性検査完了後、それらの耐性培地に発育した菌株によつて実施した N.T. はいずれも疑陽性、陰性を示した。これらの成績を総括してみると、われわれの例は、N.T. が最初は普通であつたのが、なんらかの原因で弱くなつたものであろう。このように、長期にわたり同一患者から分離された菌株の N.T. が陰性化していく状態をみたものはまだない。また、継代により不安定な反応を呈する菌株のあることは、佐藤⁵⁾らが魚系抗酸菌について認めているが、人型菌についてはまだない。

この患者は、入院時すでに 1 年以上の化学療法を受け

ており、SM, PAS, INH 等に対しては高度の耐性を示していたが、入院後も引き続き種々の化学療法を受け、死亡前には KM に対しても耐性を獲得していた。耐性菌であつても N.T. が陽性であることは多くの研究者の一致した意見であつて、われわれもこれを認めてはいる。しかしわれわれの菌株は、入院前 1 年以上、入院後 3 年もの超長期の化学療法を受けた患者から分離されているのであるし、ほかに考えられる原因もないので、これらの菌の出現は超長期の化学療法となんらかの関係があつたのではなからうか。

N.T. 陰性の人型結核菌は、文献にも多少みられる。すなわち K. A. Jensen⁶⁾ は高度の INH 耐性菌の 41 株中の 4 株が疑陽性あるいは陰性を示したと発表しているし、最近平野⁷⁾は、人型結核菌の H₂, 青山 B 株より普通寒天培地に継代することによつて得た菌は、疑陽性あるいは陰性を示したという。

今後は多種類の化学療法が長期にわたり実施されるようになるから、われわれの経験したような菌株がふえてくるかもしれない。したがつて、N.T. の成績を人型結核菌の鑑別に使用するに当たつては、その他の細菌学的な検査も加味して総合的に判断することが望まれる。

6. 結 論

われわれは、某病院で 1 年間化学療法を実施し、さらに当病院での約 3 年間の長期にわたる化学療法や外科手術療法の甲斐もなくついに死亡した重症肺結核症の患者より死亡 1 カ月前に分離された人型結核菌が、N.T. に対して不安定な態度を示したので報告する。

最初の入院の 2 年の間に毎月 1 回ずつ実施された耐性検査完了のときに、種々の耐性検査培地に発育した菌株について、N.T. を 10 回、25 株について実施したところ、弱陽性 12 株、疑陽性 2 株、陰性 11 株であつた。しかし、継代して検査したものではありません。最初陰性のものであつても、いずれも強陽性であつた。また、菌量不足のために最初から継代して実施した 4 株も強陽性を示した。

再入院の死亡近くに、引き続き分離した 6 株は、初代ではみな陰性であつたが、これを 4 代まで継代してその都度検査してみると、弱陽性を示した 1 株があるが、その他のものはいずれも疑陽性あるいは陰性を示した。

継代 3 代の 5 株の原株について耐性検査完了後の種々の耐性検査培地に発育した菌株 35 株についての N.T. では、疑陽性が 6 株、陰性が 29 株であつて、陽性を示したものは 1 株もなかつた。

以上の成績から、人型結核菌と他の抗酸菌との鑑別に当たつて、N.T. が不安定であつたら、他の種々の細菌学的検査も加えて、総合的に判断することが望まれる。

文 献

- 1) 小川辰次・大谷典子：結核，37：184，1962.
- 2) 小川辰次・大谷典子：結核，37：217，1962.
- 3) 小川辰次・大谷典子：結核，38：399，1963.
- 4) 小川辰次・大谷典子：結核，38：459，1963.
- 5) 佐藤三郎・三浦裕：抗酸菌病研究雑誌，16：186，1963.
- 6) K. A. Jensen：結核文献の抄録速報，9：750，1958.
- 7) 平野憲正：日本胸部臨床，21：861，1962.