

## 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6報 二, 三の手技についての検討

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11月20日

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

## VI. A few notes on evaluation of procedures

Tatsuji OGAWA and Noriko OOTANI\*

(Received for publication November 20, 1963)

We have performed niacin test by using cyanogen bromide benzidine method on many strains of human tubercle bacilli with various number of colonies and varying degrees of growth, which were isolated on 3% Ogawa media from sputa or laryngeal swabs. And we investigated whether or not solvent for the extraction had to be heated and whether or not the false positive results due to the insufficient amount of bacilli could be reduced to zero by prolonging the extraction time or by microtechnique devised by M.S. Tarshis. The following were results obtained.

1) Solvents for extraction: Comparative examinations were carried out on each of 56 strains by using hot and cold distilled water and on each of 65 strains by using hot and cold physiologic saline, which revealed no remarkable differences in the positive rates.

2) Extraction time: Each of 47 strains was extracted with cold physiologic saline for 10, 30 and 60 minutes and the results of these three groups were compared, revealing similar positive rates. Namely, for the practical purpose, no more than 10 minutes was required for the extraction.

3) Microtechnique: Conventional and micro-techniques were applied to each of 354 strains and the results compared, which revealed no significant difference. The positive rate could not be raised with microtechnique.

\* 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) を通常検査で正しく行なうための基礎的な研究を行ない、その都度発表してきた<sup>1)~5)</sup>が、今回は手技的な問題として、ナイアシンの抽出に用いる抽出液、抽出時間、なら

びに微量法について検討した。抽出液は熱水と冷水について比較した。それは、岡、今野<sup>6)</sup>の共同研究として発表した1960年の記載では熱水で、1961年<sup>7)</sup>には冷水で、さらに翌年1962年の今野<sup>8)9)</sup>の記載は再び熱水で抽出液を作ることに規定しているけれども、外国の研究者たちの記載をみると、E. H. Runyon<sup>10)</sup>ら(1959)は普通法

において滅菌蒸溜水あるいは生理食塩水で抽出しているし、M. S. Tarshis<sup>11)~13)</sup>(1960), (1961), M. L. Koch<sup>14)</sup>ら(1961)の微量法、J. M. Gutierrez-Uáquez<sup>15)</sup>ら(1960)の Spot Test では、滅菌蒸溜水や生理的食塩水を用いて抽出を行ない、熱水は用いていないからである。また、抽出時間を検討したのは、抽出液を作るのに使用できる菌量が多ければ問題はないが、少ない場合には抽出時間を延ばすことによつて陽性率を高めることができなかつたかと思つたからであるし、微量法を実験したのも、この方法のように濃厚な抽出液を用いることによつて、陽性率を高めることができなかつたかと思つたからである。

2. 方 法

(1) N. T. の実施方法

N. T. の方法は臭化シアン-ベンチジン法によつた。そして、その成績を次のように区別した。

- (陰 性) … 白い沈澱だけを認めたもの。
  - ± (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
  - +++ (強 陽 性) … 高度の
- } ピンクの呈色を認め  
} たもの。

対象は、喀痰、喉頭粘液等より3%小川培地によつて分離されたもので、培養の期間は4~8週のものである。なお第1報<sup>1)</sup>のように集落数は+++、++, ++, +と区分し、集落の大きさは、a, b, cと区別した。

(2) 実験方法

① 抽出液の検討

蒸溜水と生理食塩水の両者について、沸騰水の中に約30分加温したものと常温のものについて比較した。これを一度に同一材料で行なうことはできないので、まず、同一患者の喀痰等より同時に分離した集落数も集落の大きさもほぼ同程度の発育を認めた2本の培地について、一方は蒸溜水の冷水を、他は熱水を1cc宛入れ、10分間抽出を行ない比較した。次に別の材料について、生理

食塩水で同様の実験を行なつて比較した。なお生理食塩水と冷水、熱生理食塩水と熱水についても比較した。

② 抽出時間の検討

抽出にかける時間は、5分以上と規定されているが、われわれは一つの菌株について生理食塩水を1.5cc入れて、型のごとく斜面を水平にして室温にねかし、10分、30分、60分と同一材料より3回に分けて0.25cc宛をとり、この抽出液について比較実験した。

③ 微量法

集落の発育している3%小川培地に、生理食塩水を最初0.25cc(約10滴分)を入れて10分後、その2滴をとり、下のような方法で微量法を行ない、その後同一培地に0.75ccの生理食塩水を入れてさらに10分抽出したのち、その0.25ccをとつて普通のN. T.を行ない比較した。微量法は、M. S. Tarshisの方法に準じて行なつたが、高圧滅菌はしていない。すなわち磁製の凝集板にまず前述のようにして抽出した抽出液2滴をとり、これに3%ベンチジンエタノール液1滴、10%臭化シアン液1滴を加えて、凝集板を手で動かしてよく混ぜ、ただちに判定を行なつた。成績は普通法と全く同じに、一、±、+、++、+++の5段階に大別した。そして、同時に行なつた普通法と比較した。

3. 実 験 成 績

(1) 抽出液

蒸溜水における熱水と冷水との比較は56株につき、生理食塩水における熱水と冷水との比較は65株につき実施した。

成績は表1のようである。

陽性率をみると、蒸溜水の加温したものでは73.2%、加温しないものが75%、また生理食塩水では加温したもの78.5%、加温しないもの75.4%であつて、蒸溜水、生理食塩水とも、加温したものと加温しないものとの間には差はほとんどない。なお、加温しない蒸溜水と生理食塩水、加温した蒸溜水と生理食塩水でも10株宛行なつたが差を認めなかつた。

Table 1. Evaluation of Temperature of Solvents

Solvents	Temperature	Results of niacin test						
		Number of strains tested	Number of positive strains (positive rates)	Detail of results				
				-	±	+	++	+++
Distilled water	Hot	56	41 (73.2%)	7	8	40	1	
	Cold		42 (75.0%)	7	7	41	1	
Physiologic saline	Hot	65	51 (78.5%)	8	6	50		1
	Cold		49 (75.4%)	8	8	46	3	

Notes : Figures in "detail of results" indicate the number of strains.  
Hot means heated and cold does room temperature.

Table 2. Evaluation of Extraction Time

Extraction time	Results of niacin test						
	Number of strains tested	Number of positive strains (positive rates)	Detail of results				
			-	±	+	++	###
10 min.	47	30 (63.8%)	11	6	28	2	
30 min.		31 (66.0%)	9	7	29	1	1
60 min.		31 (66.0%)	11	5	29	1	1

Note : same as Table 1.

(2) 抽出の時間

47株につき行ない比較した。成績は表2のようであつて、10分よりは30分のほうが陽性率は多少増加するが、有意の差はない。また、30分と60分とでもほとんど差がない。

(3) 微量法

354株につき比較した。成績は表3のようである。

Table 3. Evaluation of Microtechnique

		Conventional technique					Total
		-	±	+	++	###	
Microtechnique	-	59	1				60
	±	11	25	2			38
	+		10	204	2		216
	++			4	17	1	22
	###				1	17	18
Total		70	36	210	20	18	354
				248 (85.0%)			

Note : Figures indicate the number of strains.

すなわち、陽性率は普通法で85%、微量法86.2%であつて、微量法が多少よいが有意の差はない。相関関係をみると、354株中差のなかつたものは322株であつて、差を認めたものは32株(約7%)である。その差のあつたものをみると、いずれも一段の差であるが、微量法で強く出たものは、32株中の26株(約81%)、普通法で強く出たものは6株(約9%)であつた。

4. 総括および結論

われわれの成績は、前述のように、抽出に用いる液は熱水にしたところでとくに検出を高めることには成功しなかつたし、冷水としては、滅菌蒸溜水と生理食塩水では差のないことを認めた。したがつて、菌の抽出に用いる液は、加温しない蒸溜水でも生理食塩水でもよいことになる。

また、抽出時間を長びかせても、結局、陽性率を高めることには成功しなかつた。したがつて、10分程度で十分であるし、菌量が少ないと考えられる場合でも、30分でよい。次に、微量法は本来は簡単で、効果的で、安全

であるといつたことから実施されているようであるが、われわれは前述のように菌量の少ない場合の間違いの陰性をなるべく少なくしようと思つて実施したのであるが、微量法は、この目的にはそいえないものであることがわかつた。

5. 結 論

われわれは N. T. を臭化シアノン-ベンチジン法によつて、喀痰、喉頭粘液等より3%小川培地で分離された種々の集落数および種々の発育の人型結核菌の多数について、菌よりの抽出を行なうのに熱する必要があるかどうか、抽出する時間を延ばすことにより、さらには、M. S. Tarshis に準じて実施した微量法により、菌量不足による間違いの陰性を、とり除くことができないものかどうかを検討した結果、次のような成績を得た。

- 1) 抽出液：蒸溜水の熱水と冷水については56株につき、生理食塩水の熱水と冷水については65株について比較検討した結果、蒸溜水と生理食塩水、およびそれらの熱水と冷水との間には、陽性率の上において大差のないことを認めた。
- 2) 抽出時間：47株について、生理食塩水の冷水により、10分、30分、60分と抽出して成績を比較した結果、これら3者の間には陽性率に大差なく、実際には10分間の抽出で十分であることがわかつた。
- 3) 微量法：354株につき、普通法と微量法を行なつて比較した結果、陽性率においては差なく、微量法によつても、陽性率を高めることはできなかつた。

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) 小川辰次・大谷典子・宮城小枝子：結核，39：100，1964.
- 6) 岡捨己・今野淳：日本細菌学雑誌，15：968，1960.
- 7) 岡捨己・今野淳・長山英男：第36回日本結核病学会，示説：20，1961.
- 8) 今野淳：結核，37：315，1962.

- 9) 今野淳：結核, 37 (特別号) : 30, 1962.
- 10) E.H. Runyon, M.J. Selin and H. Wm. Harris :  
Am. Rev. Tbc. & Resp. Dis., 79 : 663, 1959.
- 11) M.S. Tarshis : Am. Rev. Tbc. & Resp. Dis.,  
82 : 733, 1960.
- 12) M.S. Tarshis : Tubercle, 42 : 101, 1961.
- 13) M.S. Tarshis : Acta Tbc. et Pneumol. Scand.,  
41 : 47, 1961.
- 14) M.L. Koch, Joseph w. Daigneanlt, Toyce w.  
Gehrke : Am. Rev. Tbc. & Resp. Dis., 84 : 750,  
1961.
- 15) J.M. Gutierrez-Vázquez : Am. Rev. Tbc. &  
Resp. Dis., 81 : 412, 1960.