

結核菌と他の抗酸菌との鑑別方法としてのナイアシンテスト

第9報 人工的に人型結核菌の重耐性菌を作つたときの
ナイアシンテストの成績

小 川 辰 次

北 里 研 究 所

受付 昭和 42 年 3 月 28 日

NIACIN TEST FOR DIFFERENTIATION OF MYCOBACTERIUM
TUBERCULOSIS VAR. HOMINIS FROM
OTHER ACID-FAST BACILLI*IX. Niacin Test on Human Tubercle Bacilli Rendered
Resistant to Multiple Drugs *in vitro*

Tatsuji OGAWA

(Received for publication March 28, 1967)

A small number of niacin-negative strains were found among the human tubercle bacilli isolated from the patients who had received a prolonged combined chemotherapy¹⁾. It was also noted that the proportion of strongly positive strains in niacin test was lower in the group of the drug-resistant strains²⁾. On the basis of these observations an assumption was raised that there might be some relationship between the ability of niacin production and the drug resistance, particularly multiple one.

The serial passage method was applied to 64 niacin-positive patient strains which had been confirmed eugonic and resistant to one or more drugs. At the beginning of the transfer, 39 strains were found strongly positive to the test, 19 strains moderately and 6 weakly positive. Each strain was then exposed on Ogawa egg slants to progressively and simultaneously increasing concentrations of the three-major drugs (1.25 to 640 mcg per ml).

On transfer at monthly intervals, all the tubes were subjected to niacin test, with the exception of those showing poor or no growth. Tables 1~6 represent changes in level of the niacin test in the course of these passages. It can be seen that none of the strains became negative throughout the period. One strain, however, whose initial test had proved moderately positive became doubtfully positive after 6 passages, the culture growing in the presence of 80 mcg per ml each of the drugs. This strain was lost by mistake so that no further information was obtained. Although a decrease or even an increase in the extent of niacin test was noted in a considerable number of the strains, no definite correlation was found between these fluctuations and the number of passages or the level of multiple resistance attained.

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

(1) 研究目的

抗酸性菌の鑑別にあたって、ナイアシンテスト（以下 NT と略）陽性の菌株は人型結核菌であることには間違いないとしても、細かにみるとそこに例外を見出だす。すなわち化学療法¹⁾の長い患者から分離された人型結核菌には NT 陰性のものがみられる。これらの菌は種々の化学療法薬に対して耐性のことが多い。

またわれわれ²⁾は耐性の人型結核菌は感性のものに比して弱い陽性を示すものが多いことを認めている。以上のような成績から NT 陰性の人型結核菌には、耐性が関係しているのではないが、そしてその耐性は個々の耐性よりは重耐性のほうが影響する力大きいのではないかと推定のもとに、人型結核菌を用いて、人工的に SM, PAS, INH の種々の程度の重耐性菌を作り、これらの菌株が NT に対して、果たしてどのような態度を示すかをみた。そして NT の成績判定の場合の一助にしようと考えた。

(2) 方法

① 使用した菌株と重耐性の度を高める方法

使用した人型結核菌の株数と、そのときの SM, PAS, INH に対する耐性および NT の成績は次のようである。

NT の成績	株数	耐性の区分		
		1 剤	2 剤	3 剤
卍……………	39 株	23 株	15 株	1 株
卍……………	19	9	8	2
十……………	6	2	3	1

これらの人型結核菌は入院および外来の肺結核症患者の耐性検査時に、対照培地に発育したものを適宜選んだものである。これらの菌株を 1% 小川培地に 1 白金耳ずつ塗抹継代し、コルク栓をして 37°C で約 1 カ月培養した。次にこれらの菌株を SM, PAS, INH のそれぞれ 1.25 mcg, 2.5 mcg/ml に混入した 1% 小川培地に塗抹継代し、1 カ月前後培養した。さらに 5.0 mcg, 10 mcg, 20 mcg, 40 mcg/ml……等の培地に継代して、次第に重耐性の度を上昇するようにした。

② ナイアシンテストの実施の方法

前述のようにして人工的に作った種々の重耐性の人型結核菌、および重耐性にする前の菌をその都度 NT を実施した。NT は臭化シアン-ベンジジン法によつた。大部分は SM, PAS, INH の混入培地に発育した重耐性菌をそのまま使用したが、INH の混入濃度が高いときは NT は紫色を呈し、判定が不確実となるので³⁾、この場合は抗結核剤の混入していない 1% 小川培地に継代し、NT の再検査を行ない判定した。NT の成績は次のように区分した。

- 卍(強陽性)……高度のピンクの呈色
- 卍(中等度陽性)……中等度のピンクの呈色
- 十(弱陽性)……一見してピンクの呈色は分かるが、前者よりは弱いもの
- ±(疑陽性)……よくみないと、分からないような、うすいピンクの呈色
- (陰性)……ピンクの呈色を認めないもの

(3) 成績

比較を正しくしかつ簡単にするために、集落数が斜面全体に菌膜様であり、しかも集落ののびのよいものであつて、継代の 3 代以上できた菌株を選んで、継代数別にまた同じ成績を重耐性の度別に分けて比較した。したがつて集落数や発育がこの程度以下のもの、継代の途中で発育の止まつたもの等は成績より除外した。

① 重耐性以前のナイアシンテストが強陽性(卍)であつた 39 株の成績

NT を実施したものの中で成績の中に取り入れることのできた延べ総株数は 140 株である。継代数を 3 代, 4~6 代, 7~9 代, 10~12 代と 4 つに区切つて成績を比較してみると表 1 のようで、いずれの継代においても疑陽性、陰性を示したものは 1 株もない。陽性のものを陽性反応の度によつて分けてみると、重耐性以前の卍のものは、いずれの継代においても減少している。最も減少しているのは 4~6 代であつて、重耐性以前の約 1/6 である。その他の継代においても約 1/2~1/3 に減少している。このような減少率は必ずしも継代数の増加とは比例していない。前者の成績をそのまま反映して、重耐性以前の卍よりも弱い反応を示す株がいずれの継代においてもみられるが、当然のことながらこの弱い反応を示した株の率も継代数とは必ずしも平行していない。

次に同じ材料を 1 桁, 2 桁, 3 桁の 3 つの重耐性の度に区分して、各区分における NT の成績を比較してみると、表 2 のようであつて、卍を示すものの減少はいずれの重耐性においても認めるが、この減少の率は重耐性の度とは平行しない。すなわち 2 桁の重耐性において最も多くて約 1/6 である。重耐性以前の反応よりも弱い反応を示す菌株の出現の率も、重耐性の度とは必ずしも平行せず、最も多いのは 2 桁の重耐性のものであつた。

以上の成績を総括すると、重耐性にした場合は NT の弱くなるものがあるが、その弱くなる率は継代数や重耐性の度とは、必ずしも平行しないことを示している。

② 重耐性以前のナイアシンテストが卍であつた 19 株の成績

NT を実施したもののうち、成績の中に取り入れることのできた延べ実験株数は 82 株である。①同様にまず継代数別に 4 つに区分した。最高の継代が 10~15 代であることは①と多少異なる。継代別に成績を比較してみ

Table 1. Changes in Niacin Test Resulting from Serial Passages of 39 Strongly Niacin-Positive Strains of Tubercle Bacilli on Ogawa Egg Media with Increasing Concentrations of Triple Mixture of SM, PAS and INH

(a) Relationship between the number of passages and the extent of niacin test

Passage No.	Total no. of cultures to be tested	Cultures not tested owing to			No. of cultures tested	Niacin test*			
		Transfer discontinued	Poor growth	No growth		#	+	±	~ -
3	39×(3)	0	49	3	65	34 (52.3%)	19 (29.2%)	12 (18.5%)	0
						47.7%			
4~6	117	23	48	5	41	7 (17.1%)	19 (46.3%)	15 (36.6%)	0
						82.9%			
7~9	117	68	17	7	25	8 (32%)	10 (40%)	7 (28%)	0
						68%			
10~12	117	105	0	3	9	3 (33.3%)	3 (33.3%)	3 (33.3%)	0
						66.6%			

Note : * #.....Strongly positive +.....Moderately positive +.....Weakly positive ±.....Doubtfully positive
-.....Negative

Table 2. Changes in Niacin Test Resulting from Serial Passages of 39 Strongly Niacin-Positive Strains of Tubercle Bacilli on Ogawa Egg Media with Increasing Concentrations of Triple Mixture of SM, PAS and INH

(b) Relationship between the level of multiple resistance and the extent of niacin test

Concs. of three-major drugs tolerated (mcg/ml)	No. of passages	Total number of cultures tested	Niacin test*			
			#	+	±	~ -
1.25~5	3~6	46	31 (67.4%)	11 (23.9%)	4 (8.7%)	0
			32.6%			
10~80	3~11	86	15 (17.4%)	39 (45.3%)	32 (37.2%)	0
			82.5%			
160~640	10~12	8	6 (75%)	1 (12.5%)	1 (12.5%)	0
			25%			

N.B. : * See the footnote in Table 1.

Table 3. Changes in Niacin Test Resulting from Serial Passages of 19 Moderately Niacin-Positive Strains of Tubercle Bacilli on Ogawa Egg Media with Increasing Concentrations of Triple Mixture of SM, PAS and INH

(a) Relationship between the number of passages and the extent of niacin test

Passage No.	Total no. of cultures to be tested	Cultures not tested owing to			No. of cultures tested	Niacin test*			
		Transfer discontinued	Poor growth	No growth		#	+	±	~ -
3	19×(3)	0	19	0	38	9 (23.7%)	18 (47.4%)	11 (28.9%)	0
						28.9%			
4~6	57	13	12	3	29	7 (24.1%)	11 (37.9%)	10 (34.5%)	1 (3.4%)
						37.9%			
7~9	57	38	6	4	9	2	3	4	0
						44.4%			
10~15	114	106	1	1	6	0	4	2	0
						33.3%			

N.B. : * See the footnote in Table 1.

Table 4. Changes in Niacin Test Resulting from Serial Passages of 19 Moderately Niacin-Positive Strains of Tubercle Bacilli on Ogawa Egg Media with Increasing Concentrations of Triple Mixture of SM, PAS and INH

(b) Relationship between the level of multiple resistance and the extent of niacin test

Concs. of three-major drugs tolerated (mcg/ml)	No. of passages	Total number of cultures tested	Niacin test*			
			≡	≡	+	±~-
1.25~5	3~4	23	5 (21.7%)	11 (47.8%)	7 (30.4%)	0
			30.4%			
10~80	3~10	44	11 (25%)	17 (38.6%)	18 (40.9%)	1 (2.3%)
			43.2%			
160~320	3~15	12	2 (16.7%)	8 (66.7%)	2 (16.7%)	0
			16.7%			

N.B. : * See the footnote in Table 1.

Table 5. Changes in Niacin Test Resulting from Serial Passages of 6 Weakly Niacin-Positive Strains of Tubercle Bacilli on Ogawa Egg Media with Increasing Concentrations of Triple Mixture of SM, PAS and INH

(a) Relationship between the number of passages and the extent of niacin test

Passage No.	Total no. of cultures to be tested	Cultures not tested owing to			No. of cultures tested	Niacin test*			
		Transfer discontinued	Poor growth	No growth		≡	≡	+	±~-
3	6×(3)	0	4	3	11	1	0	10	0
4~6	18	4	4	2	8	0	3	5	0
7~9	18	14	2	1	1	0	0	1	0
10~12	18	16	1	0	1	0	0	1	0

N.B. : * See the footnote in Table 1.

ると、表3のようで4~6代で±を示したものが1株あつただけで、これ以外に±、あるいは陰性を示したものは、いずれの継代においても減少しているが、減少の率は継代数とは平行しない。また≡よりも弱い反応を呈したのも、いずれの継代においてもみられたが、この場合の出現の率も継代数に比例していない。なお重耐性以前の≡よりも強い≡を示したものが、10~15代を除いた継代にみられた。次に重耐性の度別にNTをみると、表4のようで前述の成績を反映して、いずれの重耐性の度においても重耐性以前の≡を示した株の減少がみられるし、それと同時に重耐性以前の≡よりも弱い反応を示す株の出現がみられた。これらの現象は重耐性の度とは平行しない。

以上の成績は①とほぼ同じような傾向を示している。

③ 重耐性以前のナイアシンテストが±であつた6株の成績

前同様にして継代数別に、重耐性度別に比較した。成績は表5、6に示したが、最初の出発が6株であり、成績に取り入れた延べ実験株数も21株であつたので、これらの成績は参考程度にしかならないが、ただこの場合にもNTが±、-を示したものが1株もなかつたことと、重耐性以前のNTが±であつたのに、継代とともにある

Table 6. Changes in Niacin Test Resulting from Serial Passages of 6 Weakly Niacin-Positive Strains of Tubercle Bacilli on Ogawa Egg Media with Increasing Concentrations of Triple Mixture of SM, PAS and INH

(b) Relationship between the level of multiple resistance and the extent of niacin test

Concs. of three-major drugs tolerated (mcg/ml)	No. of passages	Total number of cultures tested	Niacin test*			
			≡	≡	+	±~-
1.25~5	3~4	9	1	0	8	0
10~80	3~10	12	0	3	9	0

N.B. : * See the footnote in Table 1.

いは重耐性の度の高まるとともに、それよりも強い≡、±を示す株がみられた。これらの成績は前回の①や②の成績とはほぼ同様の傾向を示している。

(4) 総括および考察

われわれの実験は期待に反し、重耐性以前のNTが±のような株であつても、なかなか陰性にはならなかつた。重耐性以前のNTが≡に属する1株が、継代6代、80mcgの重耐性のときに±を示した。残念ながらその菌株を得た当時、性状も、再現性も、安定性も調べておらず、また動物実験も行なつていないから、果たして人型

結核菌の変異であつたかどうかはつきりしない。しかしわれわれの実験では、重耐性以前の陽性反応の度がどうであつても、重耐性を獲得した株では、NT が弱くなるのみをみた。すなわち重耐性以前の陽性反応と同じ程度の陽性反応を示した株が減少し、同時にそれよりも弱い陽性反応を示す株がみられた。この場合重耐性以前と同程度の反応を示す株の減少の率、またそれよりも弱い陽性反応を示す株の出現の率は、継代数や重耐性の度とは平行しなかつた。また重耐性以前の NT が卍や十であつた株が、継代とともにそれらの陽性反応の度よりも強い卍あるいは卍を示すこともみられた。

これらの成績は重耐性の獲得は、NT の陽性反応となんらかの関係がありはしないだろうかということ、また NT の人型結核菌における陽性反応はある程度安定ではあるけれども、陽性反応の強弱の度は必ずしも安定ではないことを示しているように思われる。

なお、われわれの実験成績に取り入れた株は、重耐性以前と同様に、集落数が培地の斜面に菌膜様に発育し、しかも集落ののびのよいもののみであつて、それ以下の菌株は除外してある。このような発育の悪い菌株については検討していないが、このような発育の悪い菌株についてはナイアシンの量を定量してみるべきであつたのかもしれない。これらの菌株はかなり多い。また途中で実験を放棄した株がかなり多かつた。これは一部興味を失つたということもあるが、これらの大部分は NT の成績に変化がなかつたので、継続しなかつたものである。したがつて継代の進むにつれて検査できた菌株の数は次第に減少した。この点も実験の成績を不確実にしたものと思われる。

(5) 結 論

重耐性以前の NT が卍であつた 39 株、卍であつた 19 株、十であつた 6 株の発育のよい人型結核菌を、SM, PAS, INH のそれぞれ 1.25 mcg, 2.5 mcg, 5.0 mcg/ml ……640 mcg と 2 倍ずつに増量して混入した 1% 小川培地に約 1 カ月ごとに、3~15 代にわたつて塗抹継代し、順次重耐性の度を高めてその都度 NT を実施した。そして継代の代数および重耐性の度と NT の関係を追及した。なお成績に取り入れた菌株は発育のよかつた菌株だけであつて、発育の悪かつたものは除外した。その結果、次のような成績を得た。

① NT - を示したものは 1 株もなかつたが、重耐性以前の NT が卍であつた群の中で土を示したものが 1 株みられた。この株は継代 6 代で、重耐性の度は 80 mcg/ml であつた。しかしこの株の詳細の研究は行なつていない。

② 重耐性以前の NT がどのような陽性反応の群においても、継代の途中で陽性反応の弱化する株がみられたが、この株の出現の率は継代数や重耐性の度とは平行しない。

③ 重耐性以前に卍、十の陽性反応を示した株の群の中で、継代の途中で卍、卍のように重耐性以前の陽性反応よりも強い反応を示した株がみられた。

文 献

- 1) 小川辰次・大谷典子・宮城小枝子：結核，39：100，1964.
- 2) 小川辰次：未発表（結核に発表の子定）.
- 3) 小川辰次・飯塚素子：未発表（臨床病理）.