

## 人型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8報 ナイアシンテストに及ぼす結核菌の発育（続報）および  
一次抗結核剤に対する耐性

小川辰次・飯塚素子

北里研究所

受付 昭和42年9月20日

NIACIN TEST FOR DIFFERENTIATION OF MYCOBACTERIUM  
TUBERCULOSIS VAR. HOMINIS FROM  
OTHER ACID-FAST BACILLI\*VIII. Significance of Growth Condition and Resistance to  
the Primary Antituberculous Drugs in Niacin Test

Tatsuji OGAWA and Motoko IZUKA

(Received for publication September 20, 1967)

In a previous experiment<sup>1)</sup> niacin test on the cultures of tubercle bacilli grown on Ogawa egg slant with an airtight rubber stopper revealed that approximately 28% of the test strains were negative. Such a high incidence of the negative strains was considered to be due to an insufficient amount of the growth used. The objective of this paper is, firstly, to confirm the above assumption using a large number of strains and, secondly, to answer the question whether or not the resistance to the primary antituberculous drugs brings about the negative reaction in the bacilli.

472 strains isolated from treated or non-treated patients were submitted to the routine drug-susceptibility test. Each of the control cultures was transferred by loop onto four Ogawa egg slants which were then divided into equal two; the first two tubes were sealed with an airtight rubber stopper while the other with a cork stopper. After 4 weeks of incubation at 37°C, each one tube exhibiting more abundant growth was directly subjected to the niacin test according to BrCN-benzidine method. The results were summarized in Table 1. It is seen that the niacin positive rate in the series with cork stopper was 98.7% while the rate of the series with airtight rubber stopper was 89.4%. Moreover, the difference in degree of the positive reaction was observed between the two series. Namely, most of the cultures with cork stopper, 93.6%, revealed strongly or moderately positive reaction, whereas in the series with rubber stopper about 80% of the cultures were found to be only weakly or doubtfully positive. Tables 1 and 2 show that the amount of growth as well as the number of colonies developed was superior in the series of cork stopper. It will be suggested that in order to perform direct niacin test the culture tube must be sealed with such a stopper or cap allowing free-entry of air.

Despite the precaution mentioned above there are still a small number of the patient strains which are eugonic but only doubtfully positive or even negative to the niacin test. As it is assumed that such strains are mostly obtained from the patients having received a prolonged

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

chemotherapy and are resistant to various drugs, a relationship between the niacin test and the drug resistance or the history of contact with the drugs was inquired.

Both niacin and drug-susceptibility tests were carried out on another series of 1,063 freshly isolated strains, of which 381 were obtained from non-treated patients and 682 were from treated patients. Drug 'resistant' strain was defined as the strain capable of growing in the presence of 10 mcg (in non-treated) and 20 mcg (in treated) of SM, 1 mcg of PAS, or 0.1 mcg of INH per ml. of Ogawa egg medium. The results are recorded in Tables 3 and 4. It can be seen that all of the strains from non-treated patients were positive to the niacin test irrespective of their drug susceptibility and that among those from treated patients a few strains were doubtfully positive or negative. It is also shown that the proportion of the strains having the strongly positive reaction varies according to the previous history concerning the chemotherapy and to the drug susceptibility; in the case of the sensitive and resistant strains from treated patients the proportion was 81.8% and 71.7%, respectively, as compared to 91.2% and 88.7% in the sensitive and resistant strains from non-treated patients. There is no evidence to support a special correlation between the INH-resistance and the niacin production (Table 5).

These results suggest that the prolonged chemotherapy with the primary antituberculous drugs have some influence on the niacin producing ability of the organisms harbored. Further studies, however, are necessary to draw a definite conclusion on this problem.

## 1. 研究目的

われわれ<sup>1)</sup>は以前に人型結核菌の発育とナイアシンテスト(以下NTと略)との関係を発表したが、そのときは耐性検査に $10^{-3}$  mgを接種し、無孔のゴムキャップ使用の対照培地に発育した菌株をそのまま使用したので、人型結核菌であつてもNT陰性を示した株が28.4%もみられた。今野が何回も述べたことであるが、NTの正しい実施を行なうためにはよい発育を示す菌の培養が望まれる。前回の実験では、見せかけの陰性を示すものでも、塗抹接種して、コルク栓をして継代培養すれば、この目的を達成することを少数株について認めたので、今回はこの点をさらに確認するために多数株について実験した。

次にわれわれ<sup>2)</sup>は、発育のよい人型結核菌であつてもNTが陰性か、疑陽性を示すものをみている。今回の実験でもこのような菌株をみている。これらの菌を出している患者は、長期にわたり種々の抗結核剤が使用されているにもかかわらず、常にたくさんの結核菌を排出しており、しかもその結核菌は種々の抗結核剤に対して耐性を示していた。この事実は、われわれに、耐性とNTとはなんらかの関係があるのではないかと推定させたので、この点もあわせて追及した。

## 2. 研究方法

(1) コルク栓とゴム栓を使用して培養した人型結核菌の発育のNTに及ぼす影響

① 被検の菌株：入院および外来の患者より分離した人型結核菌であつて、耐性検査の終了したときに、その対照培地より菌苔をかきとり、4本の1%小川培地の斜面に1白金耳ずつ平等に塗抹接種し、2本の培地はコルク栓を、他の2本の培地はゴム栓(無孔)を使用して37°Cに約1カ月培養したものの中から、発育の最もよい1本ずつを選び出した472組の菌株である。

② 集落数および発育の分類

イ 集落数 次のように4段に区分した。

卍……斜面全体に菌膜様の発育をしたもの

卍……斜面全体に発育しているが、集落が個々に分離しているもの

卍……前者よりもまばらの分離した集落

十……集落の数えられるもの(1~150コ)

ロ 発育 次のように3段に区分した。

a……集落の十分もり上がっているもの

b……集落のもり上りの軽度のもの

c……集落がもり上がらないで、平面的にべたつとしているもの

③ NTの方法と成績の区分：臭化シアアン-ベンジジン法により実施し、成績を次の5段階に区分した。

卍(強陽性)……濃いピンクの沈殿

卍(中等度陽性)……前者よりもうすいピンクの沈殿

十(弱陽性)……一見してピンクの沈殿は分かるが、前者よりもさらにうすい沈殿

±(疑陽性)……注意しないと見落すような、かすかなピンクの沈殿

一(陰性)……白色の沈殿

(2) 一次抗結核剤耐性のNTに及ぼす影響

① 被検の菌株

イ 抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した人型結核菌

厚生省結核療法研究協議会細菌科会の昭和42年度の研究として取上げられた抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した人型結核菌の一次抗結核剤耐性の研究において、われわれの分担した菌株の中で、1%小川培地にコルク栓を用いて継代したときに、冊の集落数でaの発育を示し、かつ一次抗結核剤に対する耐性のはつきり分かっているもの154株および同会の関東甲信越地区の各委員が耐性検査を行なった菌株の一部を借りて、1%小川培地に継代培養したものうち前同様の発育を示した227株、合計381株である。

ロ 抗結核剤の投与を受けたことのある患者より分離した人型結核菌

(1)の実験において、コルク栓を使用して継代培養した人型結核菌472株中、集落数が冊で、発育がaを示し、しかも一次抗結核剤に対する耐性の分かっている335株と、さらに同様の目的でその後集めたものうち、前述の条件にかなった347株、合計682株である。

② 耐性菌の決め方

イ 抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した人型結核菌

培地1mlについてSMは3, 10, 100mcg, PASは0.2, 1, 10mcg, INHは0.1, 1, 5mcgの混入濃度の培地を使用して耐性検査を実施したときに、SMは10mcg, PASは1mcg, INHは0.1mcg, 不完全耐性以上の耐性を示したときに耐性菌とし、上述の混入濃度に発育しなかつたものを感性菌とした。さらに前述の混入濃度において完全耐性以上の耐性を示したものを耐性菌として取扱つてみた。

ロ 抗結核剤の投与を受けたことのある患者より分離した人型結核菌

培地1mlについてSMは10mcg, 100mcg, PASは1mcg, 10mcg, INHは0.1, 1, 5mcgの表示濃度で耐性検査をしたときに、SMは10mcg, PASは1mcg, INHは0.1mcgの不完全耐性以上の耐性を示したときに耐性菌とし、上述の表示濃度に発育しなかつたものは感性菌とした。

培地はイ、ロともに1%小川培地を使用し、接種菌量は $10^{-3}$ mgである。以上で分かるようにイでは混入濃度であるから、イのSMの耐性をロの表示濃度に換算すれば5mcgとなる。PASとINHでは混入濃度と表示濃度はほぼ同様と考えてよい。なお耐性菌は1剤, 2剤,

Table 1. Relation of Niacin Test to the Growth of Human Tubercle Bacilli in Tubes Sealed with Two Different Types of Stoppers

No. of* colonies & amount of growth**	Niacin test on the cultures in tubes with												
	Cork stopper						Airtight rubber stopper						
	冊	冊	+	±	-	Total	冊	冊	+	±	-	Total	
冊	a	351	43	2	5	0	401	28	14	8	0	0	50
	b	14	4	2	0	0	20	7	20	124	6	2	159
	c	0	0	3	0	0	3	0	0	2	0	1	3
冊	a	8	9	4	0	0	21	4	3	7	1	0	15
	b	7	1	6	0	0	14	1	16	135	25	3	180
	c	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1
冊	a	1	1	0	0	0	2	0	1	0	0	0	1
	b	2	0	3	0	0	5	1	2	43	11	0	57
	c	0	0	2	0	0	2	0	0	2	0	0	2
+	a	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1
	b	0	1	1	0	0	2	0	1	1	0	0	2
	c	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Total		383 (81.1%)	59 (12.5%)	24 (5.1%)	6 (1.3%)	0 (0%)	472 (100%)	41 (8.7%)	57 (12.1%)	324 (68.6%)	44 (9.3%)	6 (1.3%)	472 (100%)

Note: 1) Figures in table indicate the number of cultures.

2) \* Number of colonies: 冊……innumerable and completely confluent, colonies over the surface of medium; 冊……innumerable but separated colonies over the surface; 冊……uncountable colonies; +……countable colonies.

3) \*\* Amount of growth: a……markedly raised, b……moderately raised, and c……not raised.

4) Niacin test according to BrCN-benzidine method: 冊……strongly positive, 冊……moderately positive, +……weakly positive, ±……doubtfully positive, and -……negative.

3剤の耐性菌に分けたが、イにおいてはその一部の菌株について二次抗結核剤の耐性検査を実施したところ、耐性を示すものが少数みられ、ロにおいてはそのほとんど全株について二次抗結核剤の耐性検査を実施しているが、二次抗結核剤に耐性を示すものが多かつた。

③ NTの方法と成績の区分。(1)の実験と全く同様である。

3. 研究成績

(1) コルク栓とゴム栓を使用して培養した人型結核菌の発育のNTに及ぼす影響

成績は表1にみるようで、コルク栓をして培養した菌株のNTの成績は、卍は81.1%で最も多く、次に卄の12.5%で、+は5.1%、±は1.3%の順であつて、陰性を示したものは1株もない。これに反してゴム栓をして培養した菌株のNTの成績は、最も多いのは+の68.6%で、次に卄の12.1%、±の9.3%であつて、卍は8.7%であつた。そして陰性を示したものが1.3%あつた。すなわちコルク栓をして培養した菌株は、ゴム栓をして培養した菌株に比して強い陽性反応を示すものが

Table 2. Comparison of Growth Amount of Human Tubercle Bacilli in Tubes with Two Different Types of Stoppers

Amount of growth	Tubes sealed with	
	Cork stopper	Rubber stopper
a	425(90.0%)	67(14.2%)
b	41( 8.7%)	398(82.2%)
c	6( 1.3%)	7( 1.5%)
Total	472( 100%)	472( 100%)

Note: The figures and symbols are the same as those for Table 1.

Table 3. Relation of Drug Resistance to Niacin Test of Human Tubercle Bacilli Isolated from Non-Treated Patients

Susceptibility	No. of cultures tested	Niacin test					Total number of positive cultures
		卍	卄	+	±	-	
Sensitive	319	291 (91.2%)	27 ( 8.5%)	1 (0.3%)	0	0	319 (100%)
Resistant	62	55 (88.7%)	7 (11.3%)	0	0	0	62 (100%)
Resistant to one drug	44	38 (86.4%)	6 (13.6%)	0	0	0	44 (100%)
Resistant to two drugs	16	15 (93.8%)	1 ( 6.3%)	0	0	0	16 (100%)
Resistant to three drugs : SM, PAS & INH	2	2 (100%)	0	0	0	0	2 (100%)

Note: The figures and symbols are the same as those for Table 1.

多い。このことは表1でみるように、コルク栓使用の培養においては、集落数の卍のものが多数を占めること、また表2でみるように、aの発育が大部分であつたのに、ゴム栓においては卍と卄がほぼ同数であつたこと、またbの発育を示すものが大部分であつたことに原因している。

(2) 一次抗結核剤耐性のNTに及ぼす影響

イ 抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した人型結核菌

成績は表3に示した。耐性菌は62株で、残りの319株は感性菌であつた。ナイアシンテストとの相関の成績は、表3に示すようであつて、卍、卄、+を合計して陽性率をみると、耐性菌、感性菌ともに100%陽性である。次に陽性反応の強さをみると、感性菌の1株だけが+であつて、その他の菌株はすべて卍、卄であつた。しかも大部分が卍であつて、卍の率は耐性菌と感性菌の間に著明の差はないし、また実験株数は少ないが、1剤、2剤、3剤の耐性別に区分してみても著明の差はない。

以上のように、抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した人型結核菌の大部分は、耐性菌だと感性菌だとを問わず大部分は卍、卄を示し、ことに卍を示すものが約80~90%もみられた。

ロ 抗結核剤の投与を受けたことのある患者より分離した人型結核菌

成績は表4に示した。この場合の耐性菌は506株、感性菌は176株であるが、この感性菌の中には、前述のように二次抗結核剤に対して耐性を示すものが多数株にみられた。

イ 同様にして陽性率をみると、耐性菌、感性菌、それぞれ98.6%、99.4%で大差はない。また耐性菌では、1剤、2剤、3剤の耐性菌の間にもほとんど差はない。

Table 4. Relation of Drug Resistance to Niacin Test of Human Tubercle Bacilli Isolated from Treated Patients

Susceptibility	No. of cultures tested	Niacin test					Total number of positive cultures
		卍	卄	+	±	-	
Sensitive	176	144 (81.8%)	28 (15.9%)	3 (1.7%)	1 (0.6%)	0	175 (99.4%)
Resistant	506	363 (71.7%)	120 (24.3%)	16 (3.2%)	6 (1.2%)	1 (0.2%)	499 (98.6%)
Resistant to one drug	151	106 (70.2%)	35 (23.2%)	5 (3.3%)	5 (3.3%)	0	146 (96.7%)
Resistant to two drugs	202	153 (75.7%)	42 (20.8%)	6 (3.0%)	1 (0.5%)	0	201 (99.5%)
Resistant to three drugs : SM, PAS & INH	153	104 (68.0%)	43 (28.1%)	5 (3.3%)	0	1 (0.7%)	152 (99.3%)

Note : The figures and symbols are the same as those for Table 1.

Table 5. Relation of INH-Resistance to Niacin Test of Human Tubercle Bacilli Isolated from Treated Patients

Susceptibility	No. of cultures tested	Niacin test				
		卍	卄	+	±	-
INH-resistant	426	310 (72.8%)	102 (23.4%)	13 (3.1%)	0	1 (0.2%)
Resistant to						
{ INH only	86	64 (74.2%)	19 (22.1%)	3 (3.5%)	0	0
{ INH & one more	187	142 (76.0%)	40 (21.4%)	5 (2.7%)	0	0
{ INH & two more	153	104 (68.0%)	43 (28.1%)	5 (3.3%)	0	1 (0.7%)
Resistant to one or more drugs except INH	80	53 (66.3%)	18 (22.5%)	3 (3.8%)	6 (7.5%)	0

Note : The figures and symbols are the same as those for Table 1.

しかし抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した人型結核菌の100%の陽性率に比べるとわずかに低い。次に陽性反応の強さをみよう。まず卍の率をみると、耐性菌では71.7%、感性菌では81.8%であつて、推計学的には1%の危険率で有意の差がある。さらに1剤、2剤、3剤の耐性菌に分けて卍の率をみるとそれぞれ70.2%、75.7%、68%であつて有意の差はない。これをイの抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した菌株と比較すると、いずれもその率は低い。卄の率をみると、耐性菌では24.3%、感性菌では15.9%で、推計学的には1%の危険率で有意の差がある。次に卄の率を、1剤、2剤、3剤の耐性に分けてみるとそれぞれ23.2%、20.8%、28.1%で有意の差はない。これをイの抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した菌株と比較すると、著明に多い。また十は耐性菌で16株、感性菌で3株で、これを合計すると19株であつて、これは検査総株数682株中の約2.7%にあたる。こ

れはイの381株中の1株すなわち約0.3%に比較するとかなり多い。また±、一の菌株が8株みられたがイにおいては1株もみられなかつた。

なおINH耐性菌だけを抜き出してINH以外の耐性菌と、卍の率を比較してみると、表5でみるようにそれぞれ72.8、66.3%であつて有意の差はない。また卄の率も両耐性菌の間にはほとんど差はない。次に+、±、一の合計の率は、INH耐性菌では3.3%、INH以外の耐性菌では11.3%であつて、5%の危険率で有意の差がある。

以上の成績を総括すると、耐性菌では感性菌に比してNTの陽性反応の弱いものが多いが1剤、2剤、3剤の耐性の間には大差なく、またINH耐性菌だけを抜き出してみても、INH耐性菌においてとくに陽性反応の弱いものが多いこともない。

イ、ロの成績を総括すると、抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離された人型結核菌は、最も強い

陽性反応を呈し、次に強い陽性反応を示すものは、抗結核剤の投与を受けたものから分離されたものの中で、一次抗結核剤に対して感性のものであり、最も弱い陽性反応を示すものは、一次抗結核剤に対して耐性を示すものである。

#### 4. 総括および考察

菌苔を白金耳でかきとり、これを培地斜面上に平等に塗抹継代し、通気を良くするために、コルク栓をして培養した菌株は、ゴム栓に比してNTの陽性率が高く、しかも同じ陽性であっても、ゴム栓に比して強い陽性反応を示すものが多いことを再確認した。今回のゴム栓をして培養した菌株のNTの陽性率が、同じゴム栓をして培養した前回に比して高かつたのは、前述のように今回は塗抹継代したのに、前回は通常の耐性検査の対照培地に発育した菌株を用いたので、集落数が比較的少かつたことによると思われる。なおコルク栓を用いた培養で、集落数が多く、しかも発育のよい菌株であっても、NTが弱陽性か疑陽性を示すものがみられた。この事実は次のような実験を行なつた一つの原因でもあつた。その実験はNTと一次抗結核剤に対する耐性ととの関係をみるために、抗結核剤の投与を受けたことのない患者、および投与を受けたことのある患者より分離した人型結核菌について、耐性を検査し、NTの成績を対比してみたことである。その結果抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離した菌株は、その耐性たると感性たるとを問わずNTは比較的強い陽性反応を示すものが大部分であつたのに、抗結核剤の投与を受けたものでは、感性菌であっても、比較的強い陽性反応を示すものは前者に比して少なく、耐性菌では感性菌に比してさらに少かつた。そして抗結核剤の投与を受けないものではみられなかつた疑陽性、陰性の菌株が抗結核剤の投与のものにみられた。抗結核剤の投与を受けたことのない患者の感性菌が強い陽性反応を示すものが多かつたのに、投与を受けたことのある患者よりの感性菌が強い陽性反応を示すものが少かつたのは、後者には二次抗結核剤に対する耐性を示す菌株が多数含まれていることによると思われる。

これを要するに今回の実験より、抗結核剤の投与はNTにある程度の影響を与えることが推定される。このことは化学療法時代の結核菌の性状の変化の一面を示すものであろう。したがつてわれわれはこのような事実のあることを念頭において菌の鑑別に当たる必要がある。

以上の成績は集落も多く発育もよかつた菌株だけのも

のであつて、発育の悪い菌株については除外したが、これらの菌株の中には発育のよい菌株に比してさらに興味ある事実が秘められているかもしれない。

#### 5. 結 論

##### (1) 人型結核菌の発育の影響

人型結核菌 472 株を 1% 小川培地に塗抹継代し、コルク栓をしたものとゴム栓をしたものに分けて、1 カ月培養し、得た菌株について NT を実施し比較した。その結果コルク栓のほうが陽性率が高く、かつ強い陽性反応を示すものが多かつた。これはコルク栓では集落が多く、しかももり上がった発育を示すものが多かつたためである。

##### (2) 人型結核菌の一次抗結核剤耐性の影響

抗結核剤の投与を受けたことのない患者および投与を受けたことのある患者より分離した人型結核菌につき、一次抗結核剤に対する耐性を検査するとともに、耐性検査の終了したときに、1% 小川培地にコルク栓をして塗抹継代し、1 カ月培養において集落が全斜面上に発育し、しかも集落ののびのよいもののみを集めて NT を実施し、耐性ととの関係をみた。

実施した菌株は、抗結核剤の投与を受けたことのない患者より分離したものは、感性菌 319 株、耐性菌 62 株、抗結核剤の投与を受けたものでは、感性菌 176 株、耐性菌 506 株であつた。耐性菌としたのは化学療法を行なつていない場合は 5 mcg、化学療法を行なつた場合は 10 mcg、PAS では両者とも 1 mcg、INH では両者とも 0.1 mcg 不完全耐性以上のものである。その結果陽性率はこれら 4 群の間には大差がないが、陽性反応の強さは、抗結核剤の投与を受けないものは耐性菌たると感性菌たるとを問わず最も強く、次に強いのは抗結核剤の投与を受けたものの中の感性菌で、抗結核剤の投与を受けたものの中の耐性菌は最も弱かつた。

菌株の使用および成績の一部の引用を許可してくださつた厚生省結核療法研究協議会細菌科会長柳沢謙博士およびこのことに対して種々便宜を与えていただいた川村達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・宮城小枝子：結核，39・100，昭 39.