

原 著

ナイアシン-テスト試験紙法の改良

田 村 奈 保 美

新潟県柏崎市刈羽郡総合病院

佐 野 敬 元・小 川 辰 次・斉 藤 嘉 鶴

北 里 研 究 所

受付 昭和 48 年 7 月 12 日

A TRIAL TO IMPROVE A NIACIN TEST PAPER*

Naomi TAMURA, Yoshimoto SANO, Tatsuji OGAWA
and Kazuru SAITO

(Received for publication July 12, 1973)

Several modified methods of the niacin test have been made with a reagent-impregnated paper strip. As it was thought that various methods have to be improved in their stability, sensitivity and feasibility, the authors prepared a new niacin test paper and compared with the routine niacin test.

I) Method to prepare the test paper

Following reagents were used; 50% aqueous chloramine T, 60% KSCN in 8% citric acid and 10% para-aminosalicylic acid (PAS) in 95% ethanol. Filter paper was cut into 50mm by 3mm strips. Acryl sheet was cut into the same size. One set of our test paper needs two paper strips and one acryl sheet. Using a capillary pipette, one drop of 60% KSCN in 8% citric acid and 3 drops of 50% aqueous chloramin T were added to the strip (a). Two reagents were not allowed to diffuse into one another on the paper strip. One drop of 10% PAS in 95% ethanol was added to the strip (b). Acryl sheet was placed between the two paper strips. Strip (b) is the front and strip (a) is the back of the test paper. They are covered with the vinyl sheets. The front of the cover is colorless transparent vinyl, and the back is the white one. The vinyl cover was sealed except its foot (Fig. 2). This test paper is kept in a brown, transparent plastic bottle with silicagel and left at room temperature.

II) Method of experiments

1.5ml of sterile distilled water was added into the 1% Ogawa's egg media with well grown colony, and laid down on the slope for 5 minutes to gain the extract. 0.2ml of the extract was divided into a test tube for the routine niacin test. The test paper was placed in a tube of 1% Ogawa's egg media for 15 minutes. The foot of the test paper is set in the extract. The development of a orange color at the part of the PAS is positive, and the absence of this color is negative. (Fig. 1)

III) Results

1) The test paper method and the routine niacin test showed nearly the same results, and the test paper presented positive reaction to 2mg/ml niacin. (Table 1)

* From Kariwa-gun General Hospital, Kashiwazaki City, Niigata Prefecture 945 Japan.

2) The both methods presented nearly equal reactions in 158 strains isolated from sputa of pulmonary tuberculous patients. (Table 2)

3) The effect of the quantity of the sterile distilled water added into 1% Ogawa's egg media to gain the niacin extract was examined with 11 strains isolated from sputa of pulmonary tuberculous patients. 10^{-2} mg of each strain was inoculated and cultured. The less the quantity of the water, the stronger the reaction. (Table 3)

In conclusion, the merits of our test paper were summarized as follows;

- (a) There is no fear of gas poisoning.
- (b) This method does not need a procedure to divide the extract containing numerous bacilli.
- (c) A paper is easily preserved.

1. 緒 言

喀痰等より分離される抗酸菌については、人型結核菌と他の抗酸菌を区別するために、わが国では結核菌検査指針¹⁾に基づいてナイアシン-テストが広く行われている。これは有力な方法であるが、手技は必ずしも容易ではない。最近試験紙を用いてより簡便に行う方法が Kirburn²⁾, William³⁾, 榮研, 杉山^{4)~7)}らにより開発・報告されている。しかしこれらも感度や保存の面でさらに改良の余地があると思われる。そこでわれわれの1人佐野が Kirburn と同じ試薬を用いて改良を試みたナイアシン-テストペーパー北研を、従来の指針法と比較検討した。

2. 実験方法

1) 試験紙の製法

使用薬剤は 50% クロラミンT水溶液・60% チオシアン酸カリ 8% クエン酸水溶液・10% パラアミノサリチル酸 95% エタノール溶液である。発色の原理は図1のごとくである。すなわちクロラミンTとチオシアン酸カリにより ClCN を発生させ、これによつてナイアシンを分解し、アミンと反応させて試験紙上に発色させる。試験紙の製法は図2に示すごとくである。すなわち東洋濾紙 No.2 を長さ 50 mm, 幅 3 mm の短冊としたもの2枚, 濾紙と同じサイズのアクリルシート1枚で、試験紙1組分となる。図2のごとく、濾紙(a)上に 60% チオシアン酸カリ 8% クエン酸水溶液1滴, 50% クロラミンT水溶液3滴を落とす。各試薬同志が拡散により接しないように注意する。濾紙(b)上に 10% パラアミノサリチル酸 95% エタノール溶液1滴を滴下する。両濾紙が

Fig. 1. Principle of Chemical Reactions Occurring in the Formation of Orange Color
The back side of the test paper

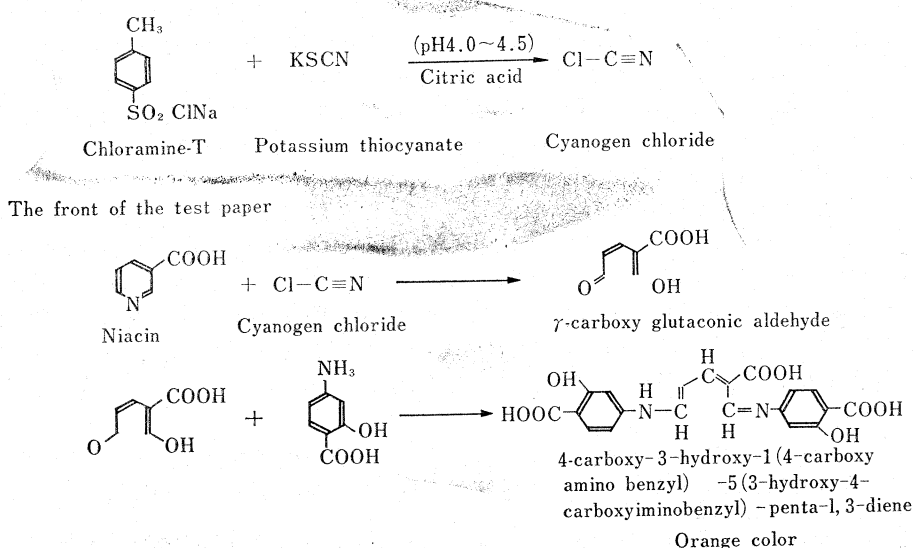
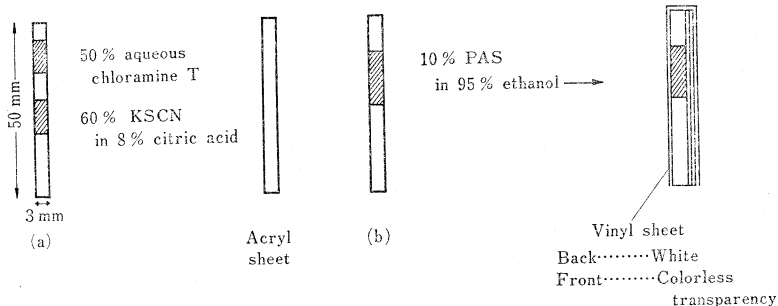


Fig. 2. Schematic Structure of the Niacin Test Paper



互いに接するのを避けるため、間にアクリルシートをはさむ。この全体に、表側には無色透明、裏側には白色のビニールシートをあて、電気鍍で下端以外を封じる。呈色反応の場合はパラアミノサリチル酸の滴下されている部分であるから、濾紙(b)が表側にくるようにする。

2) 比較の方法および判定

被検菌株がよく発育している1%小川培地の試験管に滅菌蒸留水⁹⁾ 1.5 ml を加え、5分間斜面台に寝かせて抽出液を作る。各菌株に対し試験管1本ずつ用意し、抽出液 0.2 ml を分注して指針法に用いる。十分に抽出液の残っている1%小川培地試験管に試験紙を投入すると、試験紙上で呈色反応が行われる。すなわち陽性ではパラアミノサリチル酸の部分 オレンジ色となり、陰性では呈色しない。これを試験紙法と呼ぶことにする。指針法は5分で、試験紙法は15分で判定した。

3. 実験成績

まずナイアシン粉末で希釈液を作り、試験紙法と指針法とを比較した。表1に示すように、両法はほぼ一致する傾向を示した。またこの試験紙法では2 mcg/ml まで(+)であった。

2) 患者の喀痰より分離した抗酸菌153株について、試験管法と指針法を比較した。呈色の強さに多少強弱のばらつきが見られたが、表2に示すごとく陽性と陰性の比率という点ではほぼ一致した。

3) 次に1%小川培地の試験管に加える抽出液を得るための滅菌蒸留水の量によつて、呈色の強さに差が現わ

れるかどうかを検討した。加える蒸留水が少ないほど高濃度のナイアシン抽出液が得られ、したがって呈色も強いことが予想される。それには各試験管の菌量をできるだけ同じにしなければならないので、まず結核菌の定量培養を行った。10⁻¹ mg/dl の結核菌浮遊液を作製し、各菌液 0.1 ml ずつ1%小川培地11本に接種した。それを用いて試験紙法、指針法を行った。成績は表3に示すごとくである。予想通り、加える蒸留水が少ないほど呈色が強く現われる傾向が認められた。

Table 2. The Results Obtained with Our Niacin Test Paper was Compared with that Obtained by Routine Niacin Test

		Test paper method				
		-	±	+	#	Total
Routine niacin test	-	45	1	0	0	46
	±	2	0	1	0	3
	+	0	1	21	18	40
	#	0	0	18	51	69
	Total	47	2	40	69	158

- i) The number in this table shows the number of used strains.
- ii) Routine niacin test.....Test paper
 #...Deep pink.....Deep orange
 +...Pink.....Orange
 ±...Slightly pink.....Slightly orange
 -...White.....Not present orange color

Table 3. The Influence of the Quantity of the Sterile Distilled Water Added into 1% Ogawa's Egg Media to Gain the Niacin Extract

	Routine niacin test	Test paper method			
		The quantity of the distilled water (ml)			
		1.5	1.0	0.5	0.3
#	5	2	3	3	5
+	3	5	3	3	2
±	2	2	1	2	0
-	1	2	4	3	4

- i) The number in this table shows the number of used strains.
- ii) The strains were prepared by quantitative culture.

Table 1. Examination of the Test Paper

	Concentration of niacin (mcg)					
	10.0	5.0	2.5	2.0	1.0	Control
Test paper method	+	+	+	+	-	-
Routine niacin test	+++	+	+	+	±	-

- Routine niacin test
- Test paper
- #...Deep rose pink.....Marked deep orange
- +++...Rose pink.....Deep orange
- +...Pink.....Orange
- ±...Slightly pink.....Slightly orange
- ...White.....Not present orange color

Table 4. The Influence of the Preservation Period

Preservation period(Month)	Number of examined strains	Method	Strains showed positive reaction		
			+	±	Total
0	23	Test paper method	4	11	15
		Routine niacin test	2	13	15
0.5	24	Test paper method	5	15	20
		Routine niacin test	2	18	20
1	50	Test paper method	28	17	45
		Routine niacin test	7	38	45
1.5	151	Test paper method	44	55	99
		Routine niacin test	46	53	99
2	54	Test paper method	14	27	41
		Routine niacin test	12	29	41
3	27	Test paper method	11	9	20
		Routine niacin test	1	20	21

4) 保存による影響について、患者より分離した 329 株の抗酸菌を用いて、3 カ月保存までの試験紙について、指針法と比較しながら検討した。保存法は、シリカゲルを入れた褐色透明のプラスチック容器に入れて蓋をし、室温に放置した。表 4 のごとく、3 カ月目にはやや感度の低下がみられたが、陽性と陰性の区別は可能であった。

4. 考 察

今野⁹⁾は、人型結核菌は多量のナイアシンを産生するが、人型菌以外のほとんどの抗酸菌はナイアシンの産生量が著しく少ないということに着目した。そしてこのナイアシンを、臭化シアンとベンチジンをを用いた呈色反応で定性的に検出することにより人型菌と他の抗酸菌を鑑別する方法を発表した。今日わが国の結核菌検査指針に採用され広く用いられているのは、今野の原法を Runyon ら¹⁰⁾により改良された変法である。これは有力な方法であるが、試薬の臭化シアンが猛毒であるため取扱いに嚴重な注意が必要であること、ベンチジンが入手困難になつてきていることから、より簡便に行いうる方法の開発は意味あることと思われる。Kirburn²⁾、William³⁾、榮研、杉山^{4)~7)}らにより試験紙法が報告されている。指針法の呈色の限界がほぼ 1~2 mcg/ml であるのに対し、Kirburn²⁾、William³⁾らの方法は各 2 mcg/ml、5 mcg/ml と報告されている。杉山法は追試してみたところ、1 mcg/ml であつた。また呈色の場が、Kirburn、William、榮研法では抽出液中で、黄色を示すが、杉山法は試験紙上で桃色に呈色する。液中よりも試験紙上での呈色のほうが判定しやすと思われる。それと従来の指針法によるナイアシン-テストでは抽出液の分注

という操作があるが、簡易化の際にはこの段階を省けないかと考えた。それには液中で黄色の呈色反応では判定しにくい。そこでまず杉山法について検討してみた。杉山氏のご好意により、神奈川療養所で作製後 1.5 カ月の試験紙の分与を受けて追試した。その結果は予想に反して全く呈色しなかつた。これはおそらく保存の点に問題があるのであらうと考えた。杉山氏は 4°C で 6 カ月変化のないことを報告しているが、常温での報告がなかつたからである。そこで杉山氏に従つてわれわれの検査室で作製、直後に使用してみた。すると試験紙上に鮮かな桃色を発色し、従来の指針法に勝るとも劣らないみごとな呈色であつた。保存温度に関し検討したところ、やはり 4°C では力価の低下が認められないが、22°C、37°C では 2 週間ですでに全く呈色反応を示さなくなつてしまう。容器内の空気の窒素置換も試みたが無効であつた。

そこで Kirburn らと同様の試薬を用い、試験紙の形を上述のように変えることにより、試験紙上で呈色し、また小川培地に直接投入することを検討した。感度の点では杉山法のほうが優れているが、感度、保存、使いやすさ、さらには毒ガスの発生を認めないこと等を考えあわせると、われわれの改良法は実用に耐えるものと思われる。

抽出液を得る際、斜面台に 5 分間寝かせたが、この時間を長くすることにより高濃度の抽出液を得ることができ、それにより感度の増強が期待できるのではないかと考えられる。この点については今後の研究に待ちたい。なお抽出に少量の液を用いた実験成績は微量法の可能性を示唆するものであらう。保存に関しては 3 カ月以上追求することや、冷蔵庫保存も今後試みたいと思つている。

5. 結 論

1) ナイアシン粉末で希釈列を作り比較すると、この両方法はほぼ一致した。また試験紙法では2 mg/mlまで陽性を示した。

2) 患者より分離した158株の抗酸菌を用いて両方法を比較しても、ほぼ一致した成績を示した。

3) 患者より分離した抗酸菌11株を1%小川培地に 10^{-2} mg ずつ接種、培養した材料で、抽出に用いる液の量の影響をみると、液の少ないほど、呈色が強かった。

したがって利点として次のことがあげられる。

- ① 有毒ガスが出ない。
- ② 被検菌の抽出菌液を分注する操作が省ける。
- ③ 簡単な保存法でも3カ月間は有効であること。

(この実験は北里研究所付属病院勤務中に行い、本論

文の要旨は昭和48年4月2日第48回日本結核病学会総会において報告した。

文 献

- 1) 厚生省監修・室橋豊穂 他：結核菌検査指針，31頁，1964. 日本公衆衛生協会，東京.
- 2) Kirburn, J. O. et al. : Tech. Bull. Regist Med. Technol., 38 : 244, 1968.
- 3) William, D. Young, Jr. et al. : Appl. Microbiol., 20 : 939, 1970.
- 4) 杉山育男：衛生検査，19 : 449, 1970.
- 5) 杉山育男：衛生検査，19 : 670, 1970.
- 6) 杉山育男：衛生検査，20 : 723, 1971.
- 7) 杉山育男：衛生検査，20 : 867, 1971.
- 8) 小川辰次・大谷典子：結核，39 : 145, 1964.
- 9) Konno, K. : Science, 124 : 985, 1956.
- 10) Runyon, E. H., Selin, M. J. and Harris, H. W. : Amer. Rev. Tuberc. Pulm. Dis., 79 : 663, 1959.