

原 著

抗酸菌の試験紙法によるナイアシンテストの検討

正 井 秀 雄

関東中央病院臨床検査科

藤 野 湜

東京通信病院臨床検査科

受付 昭和 49 年 7 月 6 日

NIACIN TEST OF MYCOBACTERIA BY MEANS OF TEST PAPER

Hideo MASAI* and Shiyoku FUJINO

(Received for publication July 6, 1974)

Although Niacin test, one of the methods to differentiate atypical mycobacteria from tubercle bacilli, is widely employed, its disadvantage is to use dangerous reagents. To substitute these reagents for safe method, two kinds of Niacin test paper have been tested: The "PathoTec" and "Kita-ken". This report presents results of these tests comparing "PathoTec" with the Aniline method and "Kita-ken" with the Benzidine method. Fifty eight strains of mycobacteria isolated at Kanto Chuo Hospital were employed.

Observations were made by using standardized Niacin solution. The reaction of above tests were classified into four categories: (⊕), (+), (±), and (-).

The results of "PathoTec" and Konno's Aniline methods, both of which show yellow positive reaction for Niacin, were shown in Fig. 1. Out of 58 strains 51 (88.0%) showed the same results, 6 strains (10.3%) one category difference and 1 strain (1.7%) showed ⊕ on Aniline and ± on Patho Tec.

The results of "Kita-ken" and Benzidine methods, both of which present pinkish red positive reaction to Niacin, were presented in Fig. 2. Out of 58 strains, 46 (79.3%) showed the same results, 11 strains (19.0%) one category difference and 1 strain (1.7%) showed + on Benzidine and doubtful on Kita-ken.

These results show that there were no marked difference between the "PathoTec" or "Kita-ken" Niacin test paper method and the conventional method. Moreover, when the former method is employed, there is no danger in carrying out the Niacin test. It may be concluded, therefore, that the Niacin test paper method is appropriate for screening in differentiating tubercle bacilli with atypical mycobacteria.

緒 言

近年、とくに呼吸器科領域において、結核菌類似の非定型抗酸菌による感染症の報告があいついでおり、検体から分離された抗酸菌の鑑別が必要になってきた。

非定型抗酸菌を結核菌から鑑別する検査法として、ナイアシンテスト¹⁾は誠に優れた方法である。最近この検査法を簡単に試験紙によつて行うという試みから2つの試験紙が考案されている。1つはアメリカの Warner-Clicott Laboratories 開発の「PathoTec」²⁾であり、い

* From the Kanto Chuo Hospital, 6-25-1, Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158 Japan.

ま1つはわが国の北里研究所で考案されたナイアシンペーパー「北研」⁹⁾である。われわれはこの2種類のナイアシン試験紙を入手したので、これら試験紙の有用性を検討してみた。すなわち「PathoTec」はナイアシンテスト原法のアニリン法と比較し、「北研」はナイアシンテスト原法のベンジジン法と比較し、抗酸菌鑑別についての精度を検討したのでここに報告する。

研究対象および方法

昭和48年1月から6月までの半年間に、関東中央病院臨床検査科において、1,007件の喀痰培養から分離された抗酸菌のうち、結核菌以外の抗酸菌15株を含む58株を小川培地に継代し、その4週培養を被検菌とした。

「PathoTec」、「北研」およびアニリン法、ベンジジン法は下記のように実施した。小川培地上の菌苔に滅菌蒸留水を約1.5ml注ぎ、培地表面をおおうように試験管を傾斜し、15分から20分間放置して培地および菌体のナイアシン滲出をはかる。次いでその抽出液約1mlを別的小試験管に移し、ナイアシン試験紙を入れて15分後に、「PathoTec」の場合は試験管底部の液の色調を読み、これが黄色に変色したものを陽性、透明のままを陰性とした。また「北研」の場合は投入した濾紙上部の色調の変化を読み、これが桃赤色になつたものを陽性、変化しないものを陰性とした。アニリン法、ベンジジン法は抽出液0.2mlを用い、常法に従つて行つた。

同時に100mcg/mlから0.3mcg/mlまでのナイアシン標準液系列を作製し、アニリン法、「PathoTec」法、ベンジジン法および「北研」法それぞれによりナイアシンテストを行いその色調を検した。

成績

各方法のナイアシン検出能

表1にみられるごとく、アニリン法、「PathoTec」法

Table 1. Sensitivity of Four Methods to Detect Niacin

Niacin mcg/ml	100	50	30	20	10	5	2.5	1.2	0.6	0.3
Aniline	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
PathoTec	+	+	+	+	+	+	±	-	-	-
Benzidine	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-
Kita-ken	+	+	+	+	+	+	±	±	-	-

Table 2. Niacin Reaction According to Various Methods

Niacin Method	+	%	±	%	-	%	?	%	Total	%
“PathoTec”	17	29.3	4	38.0	15	25.8			58	100.0
Aniline	20	34.5	1	38.0	15	25.8			58	100.0
“Kita-ken”	15	25.8	6	38.0	14	24.2	1	1.7	58	100.0
Benzidine	19	32.8	1	39.7	15	25.8			58	100.0

ではナイアシン含有量1.2mcg/ml以下のものは(-)であり、2.5mcg/mlは(±)、5mcg/mlから10mcg/mlまでは(+),20mcg/ml以上含むものの色調は(++)と規定しえた。同様にベンジジン法、「北研」法は0.6mcg/ml以下のものが(-),1.2mcg/mlから2.5mcg/mlまでのものが(±)、5mcg/mlから10mcg/mlまでは(+),20mcg/ml以上のものを(++)と区分しえた。以下の実験におけるナイアシンテストの色調の判定はこの規準に従つて行つた。

「PathoTec」とアニリン法、「北研」とベンジジン法の4方法のナイアシンテストの成績は表2に示した。「PathoTec」ではナイアシン(++)を示したものは17株、29.3%、(+)のものは22株、38.0%であり、(±)のものは4株、6.9%、(-)は15株、25.8%認められた。対照のアニリン法で(++)のものは20株、34.5%あり、(+)は22株、38.0%で、(±)は1株、1.7%、(-)のものは15株、25.8%であつた。

「北研」のナイアシン(++)のものは15株、25.8%であり、(+)は22株、38.0%認められ、(±)のは6株、10.3%であり、(-)のものは14株、24.2%認められた。他に濾紙全面がうすい茶色の色調を示し、陽性が陰性か判定できないものが1株、1.7%あつた。対照のベンジジン法で(++)を示したものは19株、32.8%、(+)のは23株、39.7%であり、(±)のものは1株、1.7%で、(-)は15株、25.8%認められた。

これらの成績のうちでナイアシンテスト判定のさい、陽性が同じ黄色の反応を呈する「PathoTec」法とアニリン法を比較すると図1に示すようになる。両者の一致を認められるものは58株中51株、88.0%であり、その内訳は(++)のものは16株、(+)は19株、(±)のは1株、(-)は15株であつた。また一致をみたものからのおの1ランクのずれをみると、「PathoTec」が(++)でアニリン法が(+)のものは1株、「PathoTec」が(+)でアニリン法は(++)が3株、「PathoTec」は(±)でアニリン法が(+)のは2株の計6株、10.3%認められた。不一致のものは「PathoTec」の(±)でアニリン法が(++)の1株、1.7%のみであつた。(±)以上を反応陽性と判定した場合、人型結核菌とその他の抗酸菌を上記の2法は同様に鑑別した。

陽性反応が桃赤色を呈する「北研」法とベンジジン法の比較は、図2にみられるように一致を示したものは58

Fig. 1. Comparison between "PathoTec" and Aniline

		"PathoTec"				Total
		#	+	±	-	
Aniline	+	○○○○○ ○○○○○ ○○○○○ ○	○○○	○		20
	+	○	○○○○○ ○○○○○ ○○○○○ ○○○○○	○○		22
	±			○		1
	-				○○○○○ ○○○○○ ○○○○○	15
Total		17	22	4	15	58

○ M. tuberculosis
 ⊙ Atypical mycobacteria

Fig. 2. Comparison between "Kita-ken" and Benzidine

		Kita-ken					Total
		#	+	±	-	?	
Benzidine	+	○○○○○ ○○○○○ ○○○○○	○○○○○				19
	+	○	○○○○○ ○○○○○ ○○○○○ ○○	○○○○○		○	23
	±			○			1
	-			○	○○○○○ ○○○○○ ○○○○○		15
Total		15	22	6	14	1	58

○ M. tuberculosis
 ⊙ Atypical mycobacteria

株中 46 株, 79.3% であつた。内訳は (++) のものが 14 株, (+) のものは 17 株, (±) は 1 株, (-) のものは 14 株認められた。これらから 1 ランクのいずれは「北研」で (++)、ベンジジン法は (+) のものが 1 株, 「北研」が (+) であつてベンジジン法の (++) が 5 株, 「北研」の (±) でベンジジン法 (+) は 4 株, 同じく「北研」の (±) でベンジジン法 (-) が 1 株あり, 1 ランクのいずれは計 11 株, 19.0% 認められた。不一致を示したものは「北研」で茶色の発色を示し, 判定不能としたもので, ベンジジン法では (+) の 1 株, 1.7% であつた。(±) 以上を陽性とした場合, ベンジジン法は人型結核菌と他の抗酸菌をすべて区別したが, 「北研」法では人型結核菌以外の抗酸菌中 1 株が (±) の反

応を示した他は陰性を示し, 人型結核菌は陽性と判定された。

考 察

非定型抗酸菌を結核菌から鑑別する検査法として, 1956 年今野が人型結核菌および 1~2 の菌はナイアシンを多量に産生し, 多くの非定型抗酸菌はナイアシンをほとんど産生しないことを認めた。それを応用したナイアシンテストが人型結核菌と非定型抗酸菌鑑別のアプローチとして広く用いられ, 多くの追試^{4)~10)} によつてこの方法は高く評価されている。しかしナイアシンテストを実施するにあたり, 近年ベンジジンが製造および使用禁止

となり、事実上ベンジジン-ブロームシアン法を用いてのナイアシンテストが不可能になった。また毒物であるブロームシアンやアニリンを使用するため常用しがたい点がある。この危険を避けるために開発されたのが、アメリカの「PathoTec」やわが国の北里研究所の田村⁹⁾らのナイアシン試験紙「北研」である。

この両ナイアシン試験紙を用いて、「Patho Tec」は原法のアニリン法と、「北研」はベンジジン法と比較した。ベンジジン法もアニリン法も原法は2種類の試薬作製も含めて、やや複雑で危険な操作を必要とする。

「Patho Tec」法は培地、菌体からの抽出液を小試験管に移して、試験紙を入れるだけでよい。また「北研」法の操作は培地に蒸留水を注入したのち、試験紙を培地に入れるだけでよく、あとはナイアシン試験紙の色調、あるいは投入液の色調を読むことにより陽性が陰性を判定する。したがって危険な試薬であるブロームシアン、アニリン、ベンジジンの作製、取り扱いを避けられることで検査を実施するさい、ナイアシンテストを極めて安全かつ容易にしうる利点がある。Droubi¹¹⁾はナイアシン試験紙 Kirburn 法を用いての成績では原法アニリン法との一致は 92.9% であるが、感度がやや低いと報告している。われわれの成績でみると試験紙の方に原法よりナイアシン反応が弱くあらわれたものは、「PathoTec」(+)が3株、(±)は4株の計7株であり、また「北研」(+)は4株、(±)が5株計9株が認められた。試験紙の方が原法より強い反応を示したものは「PathoTec」、「北研」ともに1株ずつであった。以上のごとく試験紙の方に弱いナイアシン反応を示したものが多く認められた。

ナイアシン試験紙「北研」について田村⁹⁾らはベンジジン法とよい相関関係があり、試験紙によるナイアシン検出の限界は 2 mcg/ml と発表している。また大里¹²⁾らの成績でも「北研」法とベンジジン法の成績はよく一致しており、ナイアシンの最少検出量は 5 mcg/ml であるという。われわれの成績でも「北研」法とベンジジン法はよい相関関係を示しており、明らかな陽性の判定の限界は 5 mcg/ml であつた。

ナイアシン試験紙「PathoTec」法でもアニリン法と

の相関関係があり、明らかな陽性の限界は 5 mcg/ml であつた。

抗酸菌 58 株の菌の分類とナイアシンテストの成績を表 3 に示した。人型結核菌 43 株, *M. intracellulare* 10 株, *M. scrofulaceum* 3 株, *M. fortuitum* 1 株であつた。これらに関しては他の生物学的, 生化学的, 抗結核剤耐性検査によつて同定した。1 株はナイアシン陰性の人型結核菌を疑い, 現在国立予防衛生研究所に同定を依頼中である。ナイアシンテスト陽性は人型結核菌 43 株中, アニリン法, ベンジジン法に 42 株ずつ, 「Patho Tec」法に 39 株, 「北研」法に 36 株と *M. intracellulare* 1 株に認められた。ナイアシンテスト疑陽性を示した株はアニリン, ベンジジンに 1 株, 「PathoTec」に 4 株, 「北研」に 6 株あつた。この 4 法に疑陽性を示した 1 株は人型結核菌であるが, 多種の抗結核剤に常用検査濃度で完全耐性であつた。人型結核菌の 1 株が「北研」法で茶色の発色を示し, 判定不能であつたが同一株を用いて再検の成績は陽性を示した。今回の 4 法のいずれにおいてもナイアシン反応陰性のものは一致しており, 人型結核菌を疑つた 1 株, *M. intracellulare* 10 株, *M. scrofulaceum* 3 株, *M. fortuitum* 1 株の 15 株であつた。

ナイアシンテストの各方法で, 明らかな強い呈色を示したもの, すなわち判定基準で+とした例をみると, 「PathoTec」とアニリンの組み合わせでは 58 株中 55 株, 94.2% の一致率, また「北研」とベンジジン法では 58 株中 51 株, 88.0% の一致率をみた。±以上を陽性とする, 4 法の成績は完全に一致する。これは 2.5 mcg/ml 以上のナイアシン抽出液にあらわれる場合である。明らかな陽性株, 陰性株を対照株として使用すれば, ±例を陰性とすることはないであろう。従来のナイアシンテスト原法を行つてきた検査機関において, 上記 2 試験紙法を用いても, 今回用いた 15 分間のナイアシン抽出を行えば, 検査成績の質的な差を生ずることは避けられよう。これらのことから臨床検査科において結核菌と非定型抗酸菌鑑別のために, これらナイアシン試験紙をスクリーニングとして用いることは実用的価値のあるものと考ええる。

Table 3. Comparison of Four Methods for Testing Production of Niacin by Mycobacteria

Mycobacteria	No. of strains	Aniline			PathoTec			Benzidine			Kita-ken			
		+	±	-	+	±	-	+	±	-	+	±	?	-
<i>M. tuberculosis</i>	43	42	1		39	4		42	1		36	6	1	
<i>M. tuberculosis</i> ?	1			1			1			1				1
<i>M. intracellulare</i>	10			10		10			10		1			9
<i>M. scrofulaceum</i>	3			3		3			3					3
<i>M. fortuitum</i>	1			1		1			1					1
Total	58	42	1	15	39	4	15	42	1	15	36	7	1	14

結 論

抗酸菌 58 株を用いて 2 種類のナイアシン試験紙 1) 「PathoTec」2), 「北研」と原法のアニリン法, ペンジン法とそれぞれを比較検討した。両試験紙ともナイアシン反応が明らかな陽性を示す限界は 5 mcg/ml であり, 弱い陽性を示す実用的な限界は 2.5 mcg/ml であつた。強い反応で判定した場合, 結核菌と非定型抗酸菌の鑑別は「PathoTec」とアニリン法で 94.2%, 「北研」とペンジン法で 88.0% の一致率を示した。ナイアシン試験紙を結核菌と非定型抗酸菌鑑別のスクリーニングとして用いるのは適切な検査法といえる。両ナイアシン試験紙はナイアシンテストの操作が原法と比べて簡便かつ安全であつた。

稿を終わるに当たり, 若宮診療所江波戸欽弥先生にご指導を, 結核研究所高橋昭三先生にご校閲を賜り心から感謝いたします。また国立予研佐藤直行, 当院小須田達

夫, 野坂謙二, 伊藤不二雄, 二階堂和彦の諸先生方のご援助ご協力にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Konno, K. : Science, 124 : 985, 1956.
- 2) 坂崎利一 : モダンメディア, 18 : 36, 1972.
- 3) 田村奈保美・佐野敬元・小川辰次・斎藤嘉鶴 : 結核, 48 : 447, 1973.
- 4) 友田恒典・金田宣雄・槌谷濤雄 : 呼吸器診療, 15 : 96, 1960.
- 5) Koch, M. L., Daigneault, J. W. and Gehrke, J. W. : Amer. Rev. Resp. Dis., 84 : 750, 1961.
- 6) 小川辰次・大谷典子 : 結核, 37 : 217, 1962.
- 7) 青木正和・大里敏雄・工藤祐是 : 日本胸部臨床, 25 : 814, 1966.
- 8) 下出久雄 : 日本胸部臨床, 26 : 855, 1967.
- 9) 正井秀雄 : 衛生検査, 20 : 161, 1971.
- 10) 小川辰次 : 日本胸部臨床, 32 : 888, 1973.
- 11) Droubi, A. J. : Amer. Rev. Resp. Dis., 104 : 434, 1971.
- 12) 大里敏雄・清水久子 : 結核, 48 : 580, 1973.