

原 著

抗酸菌の試験紙法による硝酸塩還元試験の検討

正 井 秀 雄

関東中央病院臨床検査科

受付 昭和 50 年 6 月 20 日

NITRITE-REDUCTION TEST OF MYCOBACTERIA
BY MEANS OF TEST PAPER

Hideo MASAI*

(Received for publication June 20, 1975)

There is an easy and simple test-paper nitrite-reduction test called BM test N developed by Boehringer for the purpose of detecting bacteria in urine. The present author applied this method to differentiating mycobacteria.

Forty five strains of mycobacteria isolated at the Kanto Chuo Hospital were examined both by the paper and conventional methods, and the results were compared.

The reactions were classified into 5 categories: (卅), (卅), (+), (±), and (-). The results of the test-paper method on two-fold dilutions of standardized nitrite solution showed one stage weaker reactions than that of the conventional nitrite-reduction test.

The results of the conventional method and of the test-paper method on 45 strains agreed in 43, and the ratio of agreement being 95.6%. In two strains in which the two methods showed discrepancy, the conventional nitrite-reduction test was (+) while the test-paper method was (±).

Whereas tubercle bacilli, *M. kansasii* and *M. fortuitum* showed (+) reaction in the nitrite reduction test, *M. scrofulaceum* and *M. intracellulare* showed (-) reaction.

In the case of the conventional nitrite reduction test it is necessary to prepare three different kinds of reagents, but in the case of the test-paper method no reagent is necessary. Accordingly, the test-paper nitrite reduction test is simpler than the conventional method, and if this test-paper method is applied together with the Niacin test, the differentiation of mycobacteria might become much easier.

緒 言

近年、非定型抗酸菌の報告が次第に増加しており、抗酸菌の鑑別が重要となつてきた。抗酸菌を鑑別する検査法の一つとして、硝酸塩還元試験はナイアシンテストとともにまことに優れた検査法である。

今回試験紙によつて尿中における細菌の有無を Greiss 反応の硝酸塩還元判定がないうとして、Boehringer より BM テスト N¹⁾が開発された。私はこの BM テスト N を用いることによつて抗酸菌の硝酸塩還元試験を

容易にできうるのではないかと思ひ、この試験紙の有用性を硝酸塩還元試験の原法²⁾と比較し、抗酸菌鑑別に於いての精度を検討したので報告する。

研究対象および方法

関東中央病院臨床検査科で分離した抗酸菌のうち、結核菌以外の抗酸菌 24 株を含む 45 株を小川培地に継代し、その 4 週培養を被検菌とした。

硝酸塩還元試験の原法および試験紙法は、下記のように実施した。

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

原法、試験紙法とも小試験管に M/100 NaNO₂ 溶液 (pH 7.0 の M/45 phosphate buffer) 2 ml に抗酸菌を 1 白金耳量入れ、この液を振盪後 37°C に 2 時間温浴する。

原法では、試薬(A)水で 2 倍に希釈した塩酸を 1 滴、(B) 0.2% sulfanilamide 水溶液を 2 滴加える。さらに (C) 0.1% N-(1-Naphtyl)-ethylendiamine dihydrochloride 水溶液を 2 滴滴下し、5 分後に陽性、陰性の判定をした。判定は試験管の液が濃紫紅色から桃色まで着色したものを陽性とし、その色調の濃淡により卍~±までに分けた。透明のままを陰性とした。陰性のものについては、ごく少量の亜鉛末を投入して赤変することを確かめた。

試験紙法では、BM テストN試験紙を投入し、30 秒後に下辺部の濾紙の着色の有無によつて陽性、陰性を判定する。紅紫色から桃色のものを陽性として卍~±に分け、着色の認められないものを陰性とした。

硝酸塩検出能

原法および試験紙法の硝酸塩還元試験の標準液の作製は M/100 NaNO₂ 1 ml を蒸留水 57 ml で希釈したものを原液 (12 mcg/ml) とする。原液の 2 倍希釈の系列を作り、おのおのの検査操作を行い、各試験管の色調を判断

する。

標準液における原法および試験紙法の成績は、表 1 にみられるごとく、原法では 32 倍で弱い着色が認められたが、試験紙法では 32 倍では着色がなく、16 倍のところまで弱い着色が認められ、標準液において試験紙法の硝酸塩検出能は、原法と比較して 1 段階ずつ色調が弱かった。

成績

硝酸塩還元試験の成績は、表 2 に示すように、抗酸菌 45 株について原法をみると、(卍) のものは 17 株、37.8%、(卍) では 4 株、8.9%、(+) は 6 株、13.3% であり、(±) のものは 1 株も認められず、(-) では 18 株、40.0% であつた。

試験紙法での成績は、(卍) のものは 13 株、28.9%、(卍) は 5 株、11.1% で、(+) では 7 株、15.6%、(±) は 2 株、4.4%、(-) のものは 18 株、40.0% であつた。

原法および試験紙法の成績を表 3 にあらわした。両者の一致をみたものは 45 株中 37 株認められ、その内訳は (卍) の 13 株、(卍) は 2 株、(+) が 4 株、(-) のものが 18 株であつた。不一致のものをみると、原法の (卍) で試験紙法 (卍) のものが 3 株、(+) のものは 1 株認められ、原法の (卍) で試験紙法 (+) のものは 2 株であり、また

Table 1. Test Results with the Standard Solutions of BM Test N and the Conventional Method

	NaNO ₂ (mcg/ml)							
	12	6	3	1.5	0.8	0.4	0.2	0.1
BM test N	卍	卍	卍	+	±	-	-	-
Conventional method	卍	卍	卍	卍	+	±	-	-

Table 2. Results of 45 Mycobacterial Strains with the Two Nitrite-reduction Tests

	卍	%	卍	%	+	%	±	%	-	%	Total	%
Conventional method	17	37.8	4	8.9	6	13.3			18	40.0	45	100.0
BM test N	13	28.9	5	11.1	7	15.6	2	4.4	18	40.0	45	100.0

Table 3. Correlation between the Conventional Nitrite-reduction Method and the Test-paper Method

	BM test N						Total
	卍	卍	+	±	-		
Conventional method	卍	13	3	1			17
	卍		2	2			4
	+			4	2		6
	±						
	-					18	18
Total	13	5	7	2	18	45	

原法の(+)で試験紙法(±)の2株であつた。不一致では試験紙法が原法よりやや低いように思われた。

しかし、硝酸塩還元試験の判定を明らかな陽性を示す原法の(+)と試験紙法の(+)と、それぞれの(±)、および(-)に区分して対比してみると、明らかな陽性は抗酸菌45株中25株、(±)のものは試験紙法に2株のみ認められ、陰性株は18株であつた。一致は45株中43株、95.6%であり、不一致と認められたものは原法で(+)を示し、試験紙法で(±)を認めた2株、4.4%のみであつた。

考 察

抗酸菌を鑑別する検査法として、Virtanen は抗酸菌の硝酸塩還元作用について詳細な報告があり、また優れた検査法の一つとして結核菌検査指針をはじめとして、成書⁹⁾および学術誌¹⁰⁾に数多くの報告をみている。しかし、硝酸塩試験を実施するにさいして、検査試薬を3種類も作製する必要があり、それらの試薬が着色したり、また沈殿が生じたりした場合は使用できず、常に試薬を新しく作製しなければならず、かなり煩雑である。

尿中における細菌の有無を硝酸塩還元試験紙によるものとして、BMテストNが開発されたので、私はこの試験紙を抗酸菌の鑑別に応用しようのではないかと思ひ、原法と比較してみた。

BMテストN試験紙は硝酸塩溶液に菌を入れ、37°C 2時間温浴後、試験紙を入れるだけでよく、あとは試験紙の色調を読むことにより陽性が陰性を判定する。したがつて3種類もの試薬を作製する必要がなく、硝酸塩還元試験を容易に実施しうる。私の成績でみると、試験紙のほうに原法より硝酸塩還元反応が弱く現われたものは(±)で1株、(+)が1株、(±)の2株と計4株が認められ、試験紙のほうに原法より強い反応を示したものは1株もなく、試験紙のほうに弱い成績を示したものが多く認められた。

亜硝酸塩検査用試験紙BMテストNの最少検出量は、尿中において0.05 mg/100 ml であるという。抗酸菌の

場合は、明らかな陽性の判定の限界は1.5 mcg/ml であつた。

抗酸菌45株の菌の分類と硝酸塩還元試験の成績を、表4に示した。人型結核菌21株、*M. intracellulare* 10株、*M. scrofulaceum* 8株、*M. kansasii* 3株、*M. fortuitum* 3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。

硝酸塩還元能陽性は人型結核菌21株中、原法21株、試験紙では19株認められ、また*M. kansasii* 3株、*M. fortuitum* 3株は全株、原法、試験紙法とも陽性であつた。硝酸塩還元能で疑陽性を示した2株は人型結核菌であつた。硝酸塩還元能陰性のものは一致しており、*M. intracellulare* 10株、*M. scrofulaceum* 8株の18株であつた。

硝酸塩還元試験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、27株中25株、92.5%の一致率をみた。(±)以上を陽性とする、成績は完全に一致する。

硝酸塩還元試験における陽性率で Kubica⁷⁾ は人型結核菌は98%、*M. kansasii* では99%、*M. fortuitum* も98%としており、また Runyon⁸⁾ は生化学的検査でナイアシンと硝酸塩がともに陽性なら人型結核菌と同定してよいとしている。先にナイアシン試験紙“Patho Tec”および“北研”を報告⁹⁾したが、ナイアシンと硝酸塩を試験紙によつて、結核菌を非定型抗酸菌と鑑別できるといふことは、臨床検査科において抗酸菌の同定がきわめて簡易にできるようになるものと考えられる。

結 論

抗酸菌45株を用いて、亜硝酸塩試験法と通常の試薬を用いた原法を比較検討した。試験紙法は、亜硝酸塩の明らかな陽性は1.5 mcg/ml であり、弱い陽性を示す限界は0.8 mcg/ml であつた。明らかな陽性で判定した場合、45株中43株、95.6%の一致率を示した。硝酸塩還元試験で原法では、3種類の試薬を作製する必要があり、その2種類は常に新しく作製しなければならない。

Table 4. Comparison of the Two Nitrite-reduction Tests in Various Species of Mycobacteria

	BM test N				Conventional method			
	+	±	-	Total	+	±	-	Total
<i>M. tuberculosis</i>	19	2		21	21			21
<i>M. kansasii</i>	3			3	3			3
<i>M. scrofulaceum</i>			8	8			8	8
<i>M. intracellulare</i>			10	10			10	10
<i>M. fortuitum</i>	3			3	3			3
Total	25	2	18	45	27		18	45

試験紙法では試薬の作製が不要であり、単に濾紙を投入するだけでよく、検査を実施するにあたり簡便であった。さらにナイアシン試験紙と併せて用いるならば、抗酸菌の同定がよりいつそう容易に実施しうるものと考えられる。

稿を終わるにあたり、結核研究所高橋昭三先生にご指導、ご校閲を賜わり心から感謝いたします。また若宮診療所江波戸欽弥先生、当院の野坂謙二部長および二階堂和彦、野崎俊行両氏のご援助、ご協力にお礼申し上げます。

文 献

- 1) Schaus, R.: J. A. M. A., 161 : 528, 1956.
- 2) Virtanen, S.: Acta. Tuberc. Scand., Suppl. 48 : 1, 1960.
- 3) 結核菌検査指針: 日本公衆衛生協会, 1972.
- 4) 結核菌の臨床細菌学: 結核予防会, 1970.
- 5) 斎藤肇: 胸部疾患, 6 : 252, 1962.
- 6) Baravskane, L. P.: Probl. Tuberk., 50 : 72, 1972.
- 7) Kubica, G. P.: Amer. Rev. Resp. Dis., 107 : 9, 1973.
- 8) Runyon, E. H.: Tubercle, 55 : 235, 1974.
- 9) 正井秀雄・藤野湜: 結核, 49 : 285, 1974.