

## 今野 淳先生の業績

### I. 今野のナイアシンテスト発見の端緒

ナイアシンテストとは、多種の抗酸菌のうち結核菌のみが多量のナイアシンを産生することを利用し、化学的にそれを定性あるいは定量して結核菌をそれ以外の抗酸菌から鑑別する方法である。以下に先生の本研究の主たるご業績について紹介したい。

ナイアシン（ニコチン酸）は生物の発育に欠くことができないビタミンの1種である。普通の生物ではナイアシンは酸化還元に必要な働きをもっている coenzyme I, II に合成される。しかし、抗酸菌の発育には培地にナイアシンを加える必要はなく、発育に際して自己でアスパラギンなどの窒素源からナイアシンを合成する能力をもっているが、その産生能が抗酸菌種によって異なっていることを発見したのが、今野のナイアシンテストの端緒である。

Konno (1953年) は諸種抗酸菌の Sauton 培養濾液中に産生されたニコチン酸を定量し、結核菌のみが多量の本物質を産生することを報告した。さらに Konno (1956年) は諸種抗酸菌の業室株ならびに野生株の Löwenstein-Jensen 培地上 1~3 カ月培養菌の 2~3 白金耳を用いてアニリン-ブROOMシアン法でナイアシンテストを行ったところ、結核菌は毒力、INH 感受性に関係なく全株陽性であったのに対して、ウシ型菌を含むその他の抗酸菌では全菌株が陰性であったという。

### II. ナイアシンテスト測定法

ナイアシン定量法としては、*Lactobacillus arabinosus* を用いる微生物学的方法とアニリン-ブROOMシアンを用いる化学的方法があり、後者は定性的測定法としても用いられる。

1. 微生物学的方法：*Lactobacillus arabinosus* を利用して測定する方法で、ニコチン酸に特異的、かつ下記の化学的方法による検出可能な 100 分の 1 の微量でも測定可能であるが、操作が煩雑、かつ時間を要する。

2. 化学的方法：ナイアシンはアミンおよびブROOMシアンと反応して種々の色を発する (König 反応)。種々のアミンを用いてのブROOMシアンとの反応の鋭敏性はほぼ 0.5~1.0  $\mu\text{g}$  で、黄色または桃色を呈する。褪色の点を考慮すると、その遅い、黄色に発色するアニリン-ブROOMシアン法と褪色しない桃色に発色するベンジジン-ブROOMシアン法がよく、共にコントラストもよく、判定が容易である。

諸種抗酸菌を Sauton 培地に表面培養して、上記の 2 測定法によるナイアシン産生量を比較すると、微生物学的



今野淳先生

方法において化学的方法におけるよりも多少とも高い値を示したが、共に結核菌において、それ以外の抗酸菌におけるよりも遥かに高いナイアシン産生量を示した。

### III. ナイアシンテストの実施法

以下の手順に従って行った。

50コロニー以上、あるいは培地の 3 分の 1 以上を覆う程度の発育菌

↓  
熱水約 1.5 ml を培地に注ぎ、振盪後 5 分間水平に静置

↓  
0.2 ml 宛を 4 本のスクリュウキャップ付小試験管に分注

↓  
①アニリン-ブROOMシアン法

4% アニリンエタノール液……0.1 ml

10% ブROOMシアン液……0.1 ml

4% アニリンエタノール液……0.2 ml

(対照)

②ベンジジン-ブROOMシアン法

3% ベンジジンエタノール液……0.1 ml

10% ブROOMシアン液……0.1 ml

3% ベンジジンエタノール液……0.2 ml

(対照)

判定

陽性

陰性

アニリン-ブROOMシアン法

黄変

変化なし

ベンジジン-ブROOMシアン法

ピンク色沈殿

白色沈殿

(結核菌)

(結核菌以外の抗酸菌)

#### 留意点

(1) 菌量：本テストを行ううえで最も重要なことで、菌量が少なくと疑陽性ないし陰性となる。アニリン-ブROOMシアンおよびベンジジン-ブROOMシアンの両法とも少なくとも 50 コロニー以上あるいは培地の 3 分の

1以上の発育がないと陽性に出ない。他方、結核菌以外の抗酸菌では相当量の菌を用いても陽性にならない。

(2) 菌の培養期間：結核菌は固型培地上で初発2～3週後頃から陽性となり、1カ月も経つと強陽性を呈するようになり、1年培養して菌が乾燥、死滅しても反応は陽性である。他方、結核菌以外の抗酸菌では1年間培養しても陰性である。患者喀痰よりの固型培地上での分離菌量が少ない場合には液体培地(3 ml)へ継代し、増菌して反応を行うと、固型培地へ継代してアニリン-ブロームシアンテストを行うよりも時間の短縮になり、かつ黄色調はより鮮明で、判定はより容易になる。

#### IV. ナイアシンの追試報告

ナイアシンの追試報告はオーストリア(Marek A, 1957年), ドイツ(Bönicke R, 1958年), デンマーク(Jensen KA, 1958年), イギリス(Gilanis, 1958年), メキシコ(Gutierrez-Vasquez JM, 1958年), アメリカ(Runyon EH, 1959年), イタリア(Besta B, 1959年), 日本(友田恒典, 1960年)の諸国で追試され、集計すると結核菌1,084株中1,060株(97.8%)が陽性であったのに対して、ウシ型菌149株中140株(94%)並びに非結核性抗酸菌269株(トリ型菌31株, 非定型抗酸菌131株, 雑菌性抗酸菌107株)のうち268株(99.6%)は陰性であったという。

#### V. 近年得られた知見

今野のナイアシンテストに関する報告後、次のような知見が得られており、参考までに紹介する。

##### 1. ナイアシンテスト試験紙法

ナイアシンテストの従来法(試験管法)ではブロームシアン, 芳香族アミン(ベンジジン, アニリン)といった毒性あるいは発がん性のある試薬が用いられていた。今日ではクロラミンT, チオシアン酸カリウム, パラアミノ安息香酸ナトリウムを含む試験紙を用いた, より安全かつ簡便な検査法が一般に行われている。

##### 2. 結核菌以外のナイアシン陽性菌

結核菌以外の抗酸菌では*M. simiae*の多くの菌株がナイアシン陽性であるが, BCG, *M. africanum*, *M. marinum*, *M. ulcerans*, *M. chelonae*, *M. avium* complexの中にも稀ながら陽性を示した菌株の報告がある。

##### 3. 結核菌のナイアシンテスト陽性機序

抗酸菌はすべてナイアシンを産生するが, 結核菌などのナイアシンテスト陽性菌ではフリーのナイアシンがニコチン酸モノヌクレオチドになる代謝経路がブロックされているため, ナイアシンが菌体内に蓄積し, 培地中に分泌されるものと考えられている。

#### VI. 抗酸菌の鑑別・同定法の進展と ナイアシンテスト

抗酸菌を結核菌とそれ以外の抗酸菌とに鑑別することの重要性は言うまでもないが, 近年ではそれにとどまらず, 菌種の同定までが求められている。わが国においてはDDHテストにより主要な抗酸菌の同定が日常検査として行いうるようになった。

他方, 近年, 小川培地上発育菌の1白金耳量, または液体培地での微濁発育菌を用い, 短時間で行いうる, 特異性の高い, 結核菌同定用キット, “キャピリアTB”が開発された。

上記2つの検査キットの開発により近年ではナイアシンテストはほとんど行われなくなった。しかし, 今野のナイアシンテストの発見は, それまで困難とされていた抗酸菌の生化学的分類法の可能性を示唆するものであり, これを契機としてこの方面の研究が国際的レベルで行われ, 顕著な進展をもたらした観点からも高く評価されよう。

##### [主要参考文献]

- 1) Konno K: New chemical method to differentiate human-type tubercle bacilli from other mycobacteria. *Science*. 1956 ; 124 : 985.
- 2) Konno K, Kurzmann R, Bird KT: The metabolism of nicotinic acid in mycobacteria. A method for differentiating tubercle bacilli of human origin from other mycobacteria. *Amer Rev Tuberc*. 1957 ; 75 : 529-537.
- 3) Konno K, Kurzmann R, Bird KT, et al.: Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli. *Amer Rev Tuberc*. 1958 ; 77 : 666-674.
- 4) Konno K, Sbarra AJ: Differentiation of human tubercle bacilli from atypical acid-fast bacilli. *Amer Rev Tuberc*. 1959 ; 79 : 810-812.
- 5) 今野 淳: ナイアシンテスト, Niacin test—人型結核菌の化学的同定法—。結進. 1959 ; 26 : 73-87.
- 6) Konno K: Reliability of the niacin test. *Amer Rev Respir Dis*. 1960 ; 82 : 422-424.
- 7) 岡 捨己, 今野 淳, 長山英男, 他: 抗酸菌の生化学的分類. 日胸. 1961 ; 20 : 797-804.
- 8) 今野 淳, 長山英男, 岡 捨己: ナイアシンテストの検討. 日胸. 1961 ; 20 : 867-873.
- 9) 今野 淳: 抗酸菌の生化学的分類. 日本臨床. 1962 ; 20 : 1736-1748.
- 10) Runyon EH, Selin MJ, Harris HW: Distinguishing mycobacteria by the niacin test. *Amer Rev Tuberc*. 1959 ; 79 : 663-665.
- 11) 斎藤 肇: 抗酸菌の同定. 「結核菌検査指針2007」, 第1版, 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会編集, 財団法人結核予防会, 東京, 2007, 51-80.