

菌検査（小川培地・ナイアシントテスト）

（財）広島県環境保健協会 齋藤 肇

はじめに

わが国における結核菌（抗酸菌）検査法に関する優れた研究業績は多々あるが、なかでも小川辰次先生の“定量培養法の構築”（1949-1950年）と、抗酸菌の生化学的鑑別・同定法のパイオニア今野淳先生の“ナイアシントテストの発見”（1956年）を挙げることができよう。以下に両先生の業績の一端を紹介したい。

小川辰次先生の業績

小川は、検体中に結核菌が陽性か陰性かを目標とした従来のいわば定性的な培養法ではなく、一定量の検体中に存在する生菌数（単位）を求めることを目標とした定量培養法を開発した。

I. 小川培地（ KH_2PO_4 培地）の開発

当時、代表的な卵培地としてはPetroff（1915年）、Petragnani（1927年）、Löwenstein（1931年）、岡・片倉（1940年）といった培地が知られていたが、わが国ではそれらの中でも発育支持能のすぐれた岡・片倉培地が一般に用いられていた。

岡・片倉培地の調整法は、原液（ KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 および味の素の各1gを蒸留水100mlに溶解）、鶏卵液200ml（全卵4コ、卵黄1コ）、グリセリン6ml、2%マラカ



8人の外人講習生にかこまれた小川先生

イトグリーン6mlを混和後、ガーゼで濾過し、中試験管に5~7ml宛分注後、血清凝固器またはKoch釜で85、80および80℃、各40分で間欠滅菌する（凝固水のpH:6.8）。

小川は岡・片倉培地の各成分の控除ならびに培地の滅菌法が結核菌の発育に及ぼす効果について検討した。

（1）培地成分の控除

① KH_2PO_4 ：菌の発育は全くみられない。 KH_2PO_4 の最適添加量は1%である。

② Na_2HPO_4 ：菌の発育は多少とも良くなる。

③味の素：菌の発育には影響はない。

④グリセリン：1~5%の添加では菌の発育に差はみられない。10%では多少抑制される。

⑤マラカイトグリーン：培地全量の0.04%に用いられており、結核菌の発育に著しい影響はなく、雑菌の発育阻止力は強く、集落の観察は容易となる。

（2）培地の凝固滅菌

温度、時間は培地により異なるが、いずれも間欠滅菌が行われていた。小川は85~90℃、60分1回の滅菌で従来法に比べて何らの遜色もないことを明らかにした。

上述したような新知見をえた小川は下記組成の卵培地を開発し、岡・片倉培地よりも優れた菌発育支持能を有することを明らかにした。

1%小川培地 （1% KH_2PO_4 培地）

原液	KH_2PO_4	1.0 g*
	味の素（グルタミン酸ナトリウム）.....	1.0 g
	蒸留水.....	100 ml
全卵液.....		200 ml
グリセリン.....		6 ml
2%マラカイトグリーン.....		6 ml

濾過、分注し、90℃、60分1回凝固滅菌。

*2.0g添加により2%小川培地、3.0g添加により3%小川培地を作りうる。

II. 小川培地による結核菌の定量培養法

（1）菌浮遊液

小川培地上発育集落を磨砕し、滅菌蒸留水による1mg/mlの菌浮遊液を調製し、 10^{-5} 、 10^{-6} 希釈液の0.1mlを小

川培地に接種し、培地表面を潤おし、斜面台にねかし、37℃で培養する。その日数は菌株により異なるが、だいたい4週間前後である。

(2) 喀痰

喀痰の塗抹染色で菌陰性の場合には4%NaOHで5～10倍に希釈し、菌陽性の場合にはその菌数の多少によって集落が数えられるように10倍希釈し*、その0.1 ml/宛を3%小川培地に接種・培養し、一定量中の喀痰内菌数を定量的に推定する。

*概略の希釈倍数

Gaffky 1～3号： $10^1 \sim 10^3$ 倍 / Gaffky 4～6号： $10^3 \sim 10^5$ 倍 /
Gaffky 7～10号： $10^4 \sim 10^6$ 倍

本法は従来の硫酸法よりも喀痰が容易に均等化され、また使用培地のpHは6.2であるが、培養後も同様のpH(6.2)に傾くため雑菌の迷入も少ない。本法によれば、一定量の喀痰中の生菌単位を知ることができ、かなり正確にその消長を知ることができる。しかし、採痰時によって排菌数にはかなりの変動があり、連続培養することが推奨されるという。

(3) 実験動物由来検体

内臓の還元培養には従来は喀痰と同様硫酸処理し、その遠心沈渣を培養する方法が採用されてきた。その後、定量法が試みられたが培地の汚染率が高く、かつ操作もあまりにも煩雑で実用的でなかった。小川(1949年)は検体を1～2% H_2SO_4 で処理し、岡・片倉培地で培養する方法を開発したが、検体が均等になりにくく、また古い病巣の培養では菌の発育が不良であった。小川はその改良法として、内臓を可及的に汚染をさけて採取し、1% H_2SO_4 よりも臓器を均等化しやすい1%NaOHを用い、1%小川培地に0.1 mlを接種することとした。

Ⅲ. 抗酸菌分離培養法の現状

わが国における抗酸菌の分離培養法は1990年代に入り急速な進歩をとげ、なかでも液体培地ならびにその自動培養システムの導入など液体培養法には著しい進歩がみられた。他方、固形培地としては、わが国では卵をベースとした培地が主流をなしており、小川培地が汎用されている。

小川は喀痰、その他の検体からの結核菌の分離培養にはNaOHをその消化・汚染除去剤として用い、自己の開発した第1 磷酸カリ培地(小川培地)での培養法を開発した。その後、喀痰の消化・汚染除去には、NaOHの抗酸菌に対する傷害作用の軽減を図ったN-アセチル-L-システイン・水酸化ナトリウム(NALC-NaOH)法が用いられ、小川の用いた3%小川培地に代えて2%小川培地が用いられている。

〔主要参考文献〕

- 1) 小川辰次, 佐波 薫: 結核菌の定量的培養法について(その1) 菌浮遊液を培養する場合. 結核. 1949; 24: 13-18.
- 2) 小川辰次: 結核菌の定量的培養法について(その2) 動物臓器よりの培養法. 結核. 1949; 24: 19-24.
- 3) 小川辰次, 石井和夫: 結核菌の定量的培養法について(その3) 臓器よりの結核菌培養に及ぼす2, 3の影響と非病原性抗酸菌の出現. 結核. 1949; 24: 25-29.
- 4) 小川辰次, 大島登輝夫, 鳴海吾郎: 結核菌の定量培養に就いて(その4) 実験的結核症の天竺鼠臓器よりの培養……(1) 結核. 1949; 24: 80-84.
- 5) 小川辰次, 大島登輝夫, 鳴海吾郎: 結核菌の定量培養に就いて(その5) 実験的結核症の天竺鼠臓器よりの結核菌の定量培養……(2) 結核. 1949; 24: 97-101.
- 6) 小川辰次: 結核菌の定量培養に関する研究(その6) 前処理と鶏卵培地中に混入された磷酸塩との関係(第1報). 結核. 1949; 24: 403-409.
- 7) 小川辰次, 佐波 薫, 鈴木つき: 結核菌の定量培養に就いて(その7) 喀痰中結核菌の定量培養に就いて. 結核. 1950; 25: 207-214.
- 8) 小川辰次: 結核菌の定量培養に就いて(その8) 家兎の実験的結核症の臓器よりの培養. 結核. 1950; 25: 302-305.
- 9) 小川辰次, 工藤祐是, 高倉 廉, 他: 結核菌の定量培養に就いて(その9) 静脈播種によって感染した二十鼠の実験的結核症の臓器よりの培養. 結核. 1950; 25: 647-655.
- 10) 小川辰次: 「結核菌検索の基礎と応用」, 第2版, 保健同人社, 東京, 1952, 1-250.
- 11) Kent PT, Kubica GP: Isolation procedures. In: Public Health Mycobacteriology, A Guide for the Level III Laboratory, US Department of Health and Human Services, Public Health Service, CDC, Atlanta, 1985, 31-56.
- 12) 工藤祐是, 斎藤 肇, 高橋 宏: 結核菌. 「微生物検査必携 細菌・真菌検査」, 第3版, 厚生省監修, 日本公衆衛生協会, 東京, 1987, F90-133.
- 13) Siddiqi SH: 「BACTEC 460 TB System 抗酸菌迅速検査装置. 製品および操作説明書」, 斎藤肇監修, 日本ベクトン・ディッキンソン, 東京, 1991, 1-73.
- 14) 斎藤 肇: 分離培養法. 「抗酸菌検査法 遺伝子技術による迅速診断」, 第1版, 斎藤 肇, 阿部千代治監修, 医歯薬出版, 東京, 1997, 6-33.
- 15) 斎藤 肇: 結核菌培地. 結核. 1998; 73: 329-337.
- 16) 斎藤 肇: 分離培養法. 「結核菌検査指針2007」, 初版, 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. 31-50.

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 μg 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

今野のナイアシンの追試報告後、次のような知見が得られており、参考までに紹介する。

1. ナイアシンの追試試験紙法

ナイアシンの追試試験紙法(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追試陽性機序

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追試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われるようになった。

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, 短時間で行われる, 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.