

結核菌の迅速間接耐性検査法

第1報 Triphenyl Tetrazolium Chloride, Neotetrazolium Chloride
および Potassium Tellurite を使用した場合の基礎実験

坂 本 芳 子

弘前大学医学部大池内科 (教授 大池弥三郎)

国立弘前病院 (院長 中村豊弥)

受付 昭和 40 年 8 月 20 日

STUDIES ON THE RAPID INDIRECT DRUG-SUSCEPTIBILITY TEST FOR TUBERCLE BACILLI*

I. Fundamental Experiment on Triphenyl Tetrazolium Chloride,
Neotetrazolium Chloride and Potassium Tellurite

Yoshiko SAKAMOTO

(Received for publication August 20, 1965)

Introduction: The rapid method for determination of drug-susceptibility of tubercle bacilli is important for the clinical treatment of tuberculous patients. It takes 4 or 6 weeks to get the results, according to the direct drug-susceptibility test which is performed as routine in Japan, using the Ogawa's egg culture media. Moreover, it takes additional 4 or 6 weeks in case of the indirect drug-susceptibility test.

Triphenyl tetrazolium chloride (TTC), neotetrazolium chloride (NTC) and potassium tellurite (PT) were added, respectively, to the Kuroya's modified Dubos' liquid media, so that the media colored when tubercle bacilli were cultivated in the media. In this way, it was attempted to shorten the period for the indirect drug-susceptibility test.

Method: The modified Dubos' media was sterilized at 120°C for 30 minutes. Each reducing agent, such as TTC, NTC or PT and ox serum and Tween 80 to be added to the media were sterilized at 57°C for 30 minutes once a day for 3 successive days.

Penicillin was added to the media at the rate of 100 u/ml to prevent the contamination of the media.

As the TTC solution or the TTC medium got red by the exposure to sunlight, the experiments were carried out by avoiding sunlight.

The Aoyama B strain, human tubercle bacillus, was cultivated in Sauton media for 3 weeks, and used for the experiments.

Another experiment was performed in order to see whether these media would color or not when the media were contaminated by such ordinary bacteria as staphylococcus, streptococcus, E. coli, candida, B. subtilis or pneumococcus.

Results:

1. The bacilli amount necessary was 0.1 ml of more than 2 mg suspension of tubercle bacilli.
2. The most suitable concentration of the reducing agents was 0.01% in NTC, 0.004% in NTC and 0.006% in PT.

* From Medical Clinic of Prof. Y. OIKE, Faculty of Medicine, Hirosaki University, Hirosaki City, Aomori Prefecture, Japan.

3. The TTC media got fresh red 72 hours after the cultivation of tubercle bacilli, although the media containing no TTC or no tubercle bacilli did not color. The NTC media got faint violet 5 days after, and the tubercle bacilli were detected deeply colored at the bottom of the media. The PT media got grey 5 days after. All the control media did not color.

4. These media did not color, even when streptomycin was added to the media in such a high concentration as 1,000 γ /ml, or para-aminosalicylic acid in concentration of 100 γ /ml. But, when isonicotinic acid hydrazide was added to the media, the TTC media got fresh red in the absence of any bacilli, but the other media as NTC and PT media did not color.

All these media colored sometimes when they were contaminated by various bacteria other than tubercle bacilli.

Conclusions :

1. The period necessary for the indirect method to estimate the drug-susceptibility of tubercle bacilli can be shortened by means of these media.

2. The TTC media are superior to the NTC media in getting deeper color and in the shortness of the test period, but are unsuitable for the susceptibility test of isonicotinic acid hydrazide, for which the NTC media can be used.

3. Consideration are required to the point that these media can be colored by the contamination of various kinds of bacteria other than tubercle bacilli.

緒言

結核に対して、的確な化学療法を行なうためには、治療に先だつて、菌の抗結核剤に対する耐性を、なるべく早く正確に知ることが必要である。これまで多くの人びとによつて、いろいろの迅速耐性検査法が発表されているが^{1)~5)}、それらは、判定日数は短縮されても、手技が繁雑であつたり、また判定に熟練を要するなどの理由で、一般法としては、あまり用いられていないようである。

現在の厚生省指針による小川培地使用の標準直接耐性検査法では、判定までに4~6週を要し、間接法ではさらに4~6週を要する。この間接法の判定期間を短くする目的から、私はDubos変法液体培地にいろいろの還元色素剤を添加し、これに結核菌を短期間培養して、その培地の呈色の状態により、早期に結核菌の耐性を知らうと試みた。今回はその基礎実験について報告する。

実験 I Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) に関する基礎実験

1) 実験方法

a) 培地中のTTCの濃度ならびに菌浮遊液の濃度について

黒屋氏変法Dubos培地を使用した。その処方次第は次のとおりである。すなわち $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ (6.3g), KH_2PO_4 1.0gを100mlの蒸留水に溶解させ、これに850mlの蒸留水を加え、さらにこれに、Asparagin 2.0g, ヘプトン(ポリ) 2.0g, クエン酸鉄アンモニウム

0.05g, 0.05% 硫酸マグネシウム 1.0ml, 0.01% 塩化カルシウム 1.0ml, 0.01% 硫酸亜鉛 1.0ml, 0.01% 硫酸銅 1.0ml, 10% Tween 80 0.5mlを加え、pH 6.8として、これを基礎培地とした。この基礎培地 900mlに牛血清 100ml, 50% 葡萄糖 10mlを加えた。

還元色素剤のTTC白色粉末を滅菌蒸留水で所要の濃度に溶解して、培地に添加した。基礎培地は、120°C 30分の加熱滅菌を行なつたが、これに添加するTTC, Tween 80 および牛血清等は、57°C 30分3日間の間欠滅菌を行なつた。

さらに雑菌混入繁殖防止のために、ペニシリンを100u/mlの割合に添加した。

培地内のTTCの濃度は、0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 0.0005% および 0.0001% になるように添加して、8段階の培地を作製した。

またSauton培地に3週間培養した青山B菌を用いて、10mg/ml, 5mg/ml, 4mg/ml, 3mg/ml, 2mg/ml, 1mg/ml および 0.1mg/mlの7段階の菌浮遊液を作つた。

8段階のTTC添加培地は、段階ごとに、口径を揃えたおのおの5本の試験管に0.9mlずつ分注されたが、これらの試験管の全部に10mg菌浮遊液0.1mlずつを加えた。なお対照として、TTCを加えない培地および菌を加えない培地がおかれた。同様にして、このTTC添加培地の一列に5mg菌浮遊液の0.1mlを加えた。4mg, 3mg, 2mg, 1mg, 0.1mgの菌浮遊液についても同様に行なつた。

に呈色していた。1 mg 菌浮遊液においては、0.01%、0.005% および 0.001% の培地においてだけ淡く呈色していた。0.1 mg 菌浮遊液においては、呈色はみられなかつた。

7日後では、Table 2c に示すように、0.1 mg 菌浮遊液を除いて、全浮遊液を通じて、0.01%、0.005%、0.001% の濃度において呈色が強かつた。

なお TTC を添加しない培地に菌浮遊液を添加して培養しても、また菌を添加しない TTC 培地を孵卵器中に保存しても、まったく呈色しなかつた。

すなわち 10 mg ないし 1 mg の菌浮遊液の 0.1 ml を用いる場合には、一般的にいつて、培地中の TTC の濃度は 0.01%、0.005% あるいは 0.001% が適当であることが知られた。ただし培養日数の長短によつて、培地の呈色の割合には、多少の変動がみられた。

b) Dihydrostreptomycin, Para-Aminosalicylic Acid Sodium あるいは Iso-Nicotinic Acid Hydrazide を含む TTC 培地に結核菌を培養した成績

i) Dihydrostreptomycin (DHSM) について

0.5%, 0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 0.0005% の7段階の TTC 培地を作つて、そのおののに DHSM (注射用アンプル入粉末) が 0.1 r/ml, 0.5 r/ml, 1 r/ml, 10 r/ml, 100 r/ml, 1,000 r/ml の割合に含まれるように、それぞれ添加した。

以上の各種の培地の5本ずつに、青山B菌5mg菌浮遊液の0.1mlずつを加えて培養した。

培養4日後の呈色状態は、Table 3 に示すようであつた。すなわち DHSM 0.1 r/ml および 0.5 r/ml の培地では、DHSM が入つていない対照の培地に比べると、いずれの TTC 濃度の培地においても、やや呈色が弱かつたが、それでも明らかに呈色していた。DHSM 1 r/ml の培地では 0.005% TTC 培地において、かすかに呈色していたほかは、まったく呈色はみられなかつた。また菌をまったく加えずにただ DHSM 1,000 r/ml だけを加えた培地では、呈色はまったく認められなかつた。すな

Table 3. Grades of Tint of Media 4 Days after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 5 mg bacilli suspension—

Concentration of TTC (%)	Dihydrostreptomycin concentration of media (r/ml)						No. bacil. 1,000
	0	0.1	0.5	1	10	100	
0.5	±	—	—	—	—	—	—
0.1	卍	卍	+	—	—	—	—
0.05	卍	卍	卍	—	—	—	—
0.01	卍	卍	卍	—	—	—	—
0.005	卍	卍	卍	±	—	—	—
0.001	卍	卍	卍	—	—	—	—
0.0005	卍	+	+	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—	—

Table 4. Grades of Tint of Media 5 Days after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 5 mg bacilli suspension—

Concentration of TTC (%)	Concentration of PAS (r/ml)					
	0	0.1	1	10	100	No. bacil. 100
0.1	+	+	—	—	—	—
0.05	卍	+	—	—	—	—
0.01	卍	卍	—	—	—	—
0.005	卍	+	+	—	—	—
0.001	卍	+	—	—	—	—
0.0005	+	—	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—	—

わち TTC 濃度が 0.05%、0.01%、0.005%、0.001% の培地において、呈色の状態が良好であつた。

ii) Para-Aminosalicylic Acid Sodium (PAS) について

0.1%, 0.05%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 0.0005% の6段階の TTC 培地を作つて、そのおののに PAS (注射用アンプル入粉末結晶, PAS-Na·2H₂O) が 0.1 r/ml, 1 r/ml, 10 r/ml, 100 r/ml の割合に含まれるようにそれぞれ添加した。

以上の各種の培地の3本ずつに、青山B菌5mg菌浮遊液の0.1mlずつを加えて培養した。

培養5日後の呈色状態は、Table 4 に示すようであつた。すなわち PAS 0.1 r/ml の培地では、PAS が入っていない対照の培地に比べると、呈色がやや弱かつたが、明らかに呈色していた。PAS 1 r/ml の培地では、TTC 0.005% の濃度において、淡い呈色があつたが、その他の培地では呈色はみられなかつた。また、菌をまったく加えずにただ PAS 100 r/ml だけを加えた培地では、呈色はまったく認められなかつた。すなわち、DHSM の場合と同様に、PAS の場合にも、TTC 濃度が 0.01% ないし 0.005% のときに、呈色が良好であつた。

iii) Iso-Nicotinic Acid Hydrazide (INH) について

0.5%, 0.1%, 0.005%, 0.01%, 0.005%, 0.001%, 0.0005% の7段階の TTC 培地を作つて、そのおののに INH (注射用アンプル入水溶液) が 1 r/ml, 5 r/ml, 10 r/ml, 50 r/ml の割合に含まれるように、それぞれ添加した。

以上の各種の培地の3本ずつに、5mg 青山B菌浮遊液の0.1mlずつを加えて培養した。

培養48時間後の呈色状態は、Table 5a に示すようであつた。すなわち INH が入っていない対照培地では、TTC 濃度 0.05% において呈色がやや強かつたが、INH 1 r/ml の培地では 0.05% および 0.005% において弱い呈色があり、5 r/ml, 10 r/ml, 50 r/ml というように INH の濃度が濃くなるにつれて、どの培地にも次第に強い呈色があり、しかも INH の入っていない対照培地

Table 5a. Grades of Tint of Media 48 Hours after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 5 mg bacilli suspension—

Concentration of TTC (%)	Concentration of INH (γ /ml)					No bacil. 10	No bacil. 50
	0	1	5	10	50		
0.5	—	—	—	+	+	+	+
0.1	—	—	+	+	+	+	+
0.05	+	+	+	+	+	+	+
0.01	+	—	+	+	+	+	+
0.005	+	+	+	+	+	+	+
0.001	—	—	+	—	+	+	+
0.0005	—	—	—	—	+	+	+
0	—	—	—	—	—	—	—

Table 5b. Grades of Tint of Media 5 Days after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 5 mg bacilli suspension—

Concentration of TTC (%)	Concentration of INH (γ /ml)					No bacil. 10	No bacil. 50
	0	1	5	10	50		
0.5	—	—	—	—	+	+	+
0.1	+	+	—	+	+	+	+
0.05	+	+	+	+	+	+	+
0.01	+	+	+	+	+	+	+
0.005	+	+	+	+	+	+	+
0.001	+	+	+	+	+	+	+
0.0005	+	—	—	—	+	+	+
0	—	—	—	—	—	—	—

より呈色が強くなっていた。また菌をまったく加えずにただ INH 10 γ /ml および 50 γ /ml を加えた培地では強い呈色を示していた。

培養5日後では、Table 5b に示すように、0.5% TTC 培地を除いて、どの培地も呈色を示しており、INH 10 γ /ml、50 γ /ml では INH が入っていない対照培地と同じ程度に強い呈色を示していた。また菌をまったく加えずにただ INH 10 γ /ml および 50 γ /ml を加えた培地でも、INH が入っていない対照培地と同じ呈色状態であった。また中には2日培養の培地より5日培養のそのほうが少し呈色が弱くなっているようにみられるものもあつた。

以上のことから、INH を添加した TTC 培地では、結核菌を培養しなくても、INH そのものによつて培地が赤く呈色してしまうので、この方法によつて結核菌の INH 耐性を検査することは、不可能であることが知れる。

c) TTC そのものに関する実験成績

i) 0.5% TTC 水溶液は 120°C 1 時間加熱しても安定であり、呈色しないし、また呈色能の低下もきたさなかつた。

ii) Dubos 基礎培地に加えられた TTC は、熱に対

して不安定であり、85°C 30 分加熱により、0.01%、0.05% の培地において呈色したが、75°C 30 分加熱ではすべての培地において呈色しなかつた。

iii) 100 W ガス入つて消し電球の電気光線には比較的安定であつて、3~4 時間の照射で呈色しなかつた。

iv) しかし日光には鋭敏に反応して呈色した。したがつて TTC ないし TTC 培地の取扱いは常に日光を遮蔽して行なつた。

v) この変法 Dubos 培地から血清を取り去つたものでは、菌培養後の呈色反応がやや弱かつた。

実験 II Neotetrazolium Chloride (NTC)

に関する基礎実験

1) 実験方法

a) 培地中の NTC の濃度ならびに菌浮遊液の濃度について

培地としては、実験 I に用いた変法 Dubos 培地を用いた。

還元色素剤としては、NTC を滅菌蒸留水で所要の濃度に溶解して使用した。TTC に比し、蒸留水に対して難溶であつた。基礎培地、NTC、Tween 80 および牛血清等は、TTC に関する実験と同様に取り扱つた。

さらに雑菌混入防止のためにペニシリンを 100 u/ml の割合に添加した。

培地内の NTC の濃度が 0.008%、0.006%、0.004% および 0.002% になるように添加して、4 段階の培地を作製した。

また Sauton 培地に 3~4 週間培養した青山 B 菌を用いて、5 mg/ml、3 mg/ml、2 mg/ml および 1 mg/ml の 4 段階の菌浮遊液を作つた。

4 段階の NTC 添加培地は、段階ごとにおのおの 5 本ずつの試験管に 0.9 ml ずつ分注したが、これらの試験管の全部に 5 mg 菌浮遊液の 0.1 ml ずつを加えた。なお対照として NTC を加えない培地および菌を加えない培地がおかれた。同様に、この NTC 添加培地の一列に 3 mg 菌浮遊液 0.1 ml を加えた。2 mg、1 mg の菌浮遊液についても同様に行なつた。実験方法はすべて実験 I の TTC と同様であり、菌添加後は 37°C に培養して、培養液の呈色の状態を観察した。

b) NTC 培地に Dihydrostreptomycin, Para-Aminosalicylic Acid Sodium および Iso-Nicotinic Acid Hydrazide を加えて、これに結核菌を培養し、その培地の呈色状態を観察した。

c) TTC と同様に熱および日光に関する実験を行なつた。

2) 実験結果

a) 培地中の NTC の濃度ならびに菌浮遊液の濃度について

Table 6 に示すように、5 mg 菌浮遊液を用いたもの

Table 6. Grades of Tint of Media 3, 5 and 8 Days after Cultivation of Aoyama B Strain

Days	Concentration of NTC (%)	Concentration of bacillary suspension (mg/ml)				
		5	3	2	1	0
3	0.008	++	+	-	-	-
	0.006	++	+	-	-	-
	0.004	+	+	-	-	-
	0.002	+	+	-	-	-
	0	-	-	-	-	-
5	0.008	+++	++	++	±	-
	0.006	+++	+++	++	±	-
	0.004	+++	+++	+++	+	-
	0.002	+++	+++	++	+	-
	0	-	-	-	-	-
8	0.008	+++	++	++	+	-
	0.006	+++	+++	++	+	-
	0.004	+++	+++	+++	+	-
	0.002	+++	+++	++	++	-
	0	-	-	-	-	-

NTC: Neotetrazolium chloride.

では、3日培養では、NTC濃度が0.008%、0.006%の培地において紫色の呈色をもつとも強かつた。5日ないし8日培養では、NTCの濃度とは関係なく、菌浮遊液の濃度が高いものほど著明な呈色のみられた。

すなわち5mg菌浮遊液0.1mlを用いるときには、培地中のNTCの濃度は、判定日数を5日以後にする場合は、0.002%でも十分であつた。

3mg菌浮遊液を用いたものでは、3日培養後には全培地が明らかに呈色しておつたが、5日ないし8日培養後には、NTC濃度が0.006%、0.004%あるいは0.002%の培地において著明に呈色した。0.008%の培地では、うすい呈色のみられたのみであつた。

2mg菌浮遊液のときは、3日培養ではまったく呈色しなかつたが、5日ないし8日培養では呈色しており、0.004%の培地においてもつとも強かつた。

1mg菌浮遊液のときは、5日培養では0.004%、0.002%の培地がうすく呈色しており、8日後では0.002%の培地の呈色がやや著明であつた。なおNTCを添加しない培地および菌を加えない培地はまったく呈色しなかつた。

すなわち5ないし1mg菌浮遊液の0.1mlを用いる場合には、培地中のNTCの濃度は0.004%あるいは0.002%が適当である。ただし2mgないし1mgというような薄い菌浮遊液の場合には、5日間以上の培養日数が必要である。

b) Dihydrostreptomycin (DHSM), Para-Aminosalicylic Acid Sodium (PAS) あるいは Iso-Nicotinic Acid Hydrazide (INH) を含む NTC 培地に結核菌を

Table 7. Grades of Tint of Media 6 Days after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 5 mg bacilli suspension—

Concentration of NTC (%)	Dihydrostreptomycin concentration of media (γ/ml)				No. bacil. 100
	0	1	10	100	
0.006	+++	-	-	-	-
0.004	+++	-	-	-	-
0	-	-	-	-	-

培養した成績

i) DHSM について

0.006% および 0.004% の 2 段階の NTC 培地を作つて、そのおのおのに、DHSM (注射用アンブル入粉末) を 1 r/ml, 10 r/ml, 100 r/ml の割合に含まれるように、それぞれ添加した。

以上の各種の培地の 3 本ずつに、青山 B 菌 1 mg 菌浮遊液の 0.1 ml ずつを加えて培養した。培養 8 日後の呈色状態は、DHSM を添加したすべての培地はもちろんのこと、DHSM を加えない対照培地でもほとんど呈色はみられなかつた。

5 mg 菌浮遊液を使用して 6 日培養した場合の成績を Table 7 に示した。呈色状態は NTC 濃度が 0.006% あるいは 0.004% の培地において、DHSM を加えない対照培地の呈色が強かつた。DHSM を添加した培地では、DHSM の添加濃度には関係なくすべての培地において呈色はみられなかつた。また菌をまったく加えずにただ DHSM 100 r/ml だけを加えた培地でも呈色はみられなかつた。

ii) PAS について

0.006%、0.004% の 2 段階の NTC 培地を作つて、そのおのおのに PAS (注射用アンブル入粉末結晶 PAS-Na·2H₂O) が 1 r/ml, 10 r/ml, 100 r/ml の割合に含まれるように、それぞれ添加した。

以上の各種の培地の 3 本ずつに、青山 B 菌 1 mg 菌浮遊液の 0.1 ml ずつを加えて培養してみた。培養 8 日後の呈色状態は、PAS を添加したすべての培地および PAS を加えない対照培地にも呈色はみられなかつた。

次に 5 mg 菌浮遊液の 0.1 ml ずつを加えて培養してみた。

培養 6 日後の呈色状態は、Table 8 に示すように、PAS を加えない対照培地では、NTC 濃度 0.006% においてうすい呈色のみられたが、0.004% ではそれより強い呈色のみられた。PAS 添加培地では、PAS の添加濃度には関係なくすべての培地において呈色はみられなかつた。また菌をまったく加えずにただ PAS 100 r/ml だけを加えた培地では、呈色はまったく認められなかつた。

すなわち DHSM, PAS を添加した NTC 培地に結核菌を培養した場合にも、培地に添加される NTC の濃度は 0.006% ないし 0.004% でよいことが知られた。

Table 8. Grades of Tint of Media 6 Days after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 5 mg bacilli suspension—

Concentration of NTC (%)	Concentration of PAS (γ/n.l)				
	0	1	10	100	No bacil. 100
0.006	++	—	—	—	—
0.004	+++	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—

Table 9. Grades of Tint of Media 6 Days after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 5 mg bacilli suspension—

Concentration of NTC (%)	Concentration of INH (γ/ml)				
	0	1	5	10	No bacil. 10
0.006	+++	—	—	—	—
0.004	+++	—	—	—	—
0	—	—	—	—	—

iii) INH について

0.006%, 0.004% の2段階の NTC 培地を作り, そのおのおのに INH 1γ/ml, 5γ/ml, 10γ/ml の割合に含まれるように, それぞれ添加した。

以上の各種の培地の3本ずつに, 5mg 青山 B 菌浮遊液の 0.1 ml ずつを加えて培養してみた。

培養6日後では, Table 9 に示すように, INH を加えない対照培地では, NTC 濃度 0.006% および 0.004% の両培地において, 同じ程度の呈色がみられた。INH を添加した培地では, INH の添加濃度には関係なくすべての培地において呈色はみられなかつた。また菌をまったく加えずにただ INH 10γ/ml だけを加えた培地では呈色はみられなかつた。すなわち NTC 培地に INH を添加した場合, TTC 培地にみられたように, 菌を培養しなくても呈色してしまうようなことはなかつた。

c) 0.008% NTC について, TTC 同様熱および日光に関する実験を行なつたが, いずれの場合にも安定であり呈色はみられなかつた。

実験 III Potassium Tellurite (PT) に関する基礎実験

1) 実験方法

a) 培地中の PT の濃度について

培地としては, 実験 I に用いた変法 Dubos 培地を用いた。

還元色素剤としては, PT を滅菌蒸留水で所要の濃度に溶解して使用した。基礎培地, PT, Tween 80 および牛血清等は, TTC に関する実験と同様に取り扱つた。

さらに雑菌混入防止のためにペニシリンを 100 u/ml の割合に添加した。

培地内の PT の濃度が, 0.006%, 0.004%, 0.002% および 0.0005% になるように添加して4段階の培地を

Table 10. Grades of Tint of Media 5 Days after Cultivation of Aoyama B Strain —0.1 ml of 3 mg bacilli suspension—

Concentration of PT (%)	Tints of media			
	No bacil.	0.1 ml of 3 mg		
0.006	—	++	++	++
0.004	—	+	+	+
0.002	—	—	—	—
0.0005	—	—	—	—
0	—	—	—	—

PT : Potassium tellurite

作製した。

また Sauton 培地に4週間培養した青山 B 菌を用いて, 3mg の菌浮遊液を作つた。

4段階の PT 添加培地は, 段階ごとにおのおの5本ずつの試験管に 0.9 ml ずつ分注されたが, これらの試験管の全部に 3mg 菌浮遊液の 0.1 ml ずつを加えた。なお対照として, PT を加えない培地および菌を加えない培地がおかれた。

実験方法はすべて実験 I の TTC と同様であり, 菌添加後は 37°C に培養して培養液の呈色の状態を観察した。

2) 実験結果

a) 培地中の PT の濃度について

48時間培養では, いずれの培地にも呈色はみられなかつた。Table 10 に示すように, 培養5日後では, PT の濃度が 0.006%, 0.004% の培地において灰色の呈色がみられ, 0.006% の濃度のほうが 0.004% のよりいくぶん濃い呈色を示していた。0.002% および 0.0005% のものでは呈色はみられなかつた。

すなわち 3mg 菌浮遊液の 0.1 ml を用いるときは, 培地中の PT の濃度は 0.006% が適当であることが知られた。

なお PT を添加しない培地および菌を添加しない培地では, まつたく呈色はみられなかつた。

実験 IV TTC 培地, NTC 培地, PT 培地は, 結核菌以外の菌の培養によつて呈色するか

1) 実験方法

a) 生菌について

実験 I, II および III の結果に基づいて, 0.01% TTC 変法 Dubos 培地, 0.004% NTC 変法 Dubos 培地および 0.006% PT 変法 Dubos 培地を用いた。これらの培地は, それぞれ3本ずつの試験管に 0.9 ml ずつ分注された。

寒天培地に 24~48時間培養した葡萄球菌, 連鎖球菌, 大腸菌 (Aerogenes), Candida, 枯草菌および肺炎球菌の 0.5 mg 菌浮遊液を作つた。この菌浮遊液の 0.1 ml ずつを, 別々に上記の全試験管の1組ずつに添加した。

総括および考案

結核菌による Tellurium 塩あるいは Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC) の還元反応は、古くは Sula⁶⁾により報告されているが、Meyer ら⁷⁾は亜テルル酸カリを用いて結核菌の薬剤耐性検査を行なっている。わが国では宍戸⁸⁾、小川(辰)⁹⁾などが3%小川培地を用いて、Meyer ら⁷⁾の方法を追試しており、吉野¹⁰⁾は、結核菌発育の早期判定に TTC を利用している。

従来の還元反応を利用した結核菌発育の早期判定法の多くは、固形培地を用いたものであり、あらかじめ結核菌を培養して十数日後に、これらの還元剤を培地に添加し、これによつて培地表面に発育したコロニーを呈色させて判定している。

Pital ら¹¹⁾は、結核菌を液体培地に一定時間培養した後、その培地に還元剤としての Resazulin を添加して、培地の呈色の状態により菌発育の有無を判定している。内山¹²⁾は、結核菌の薬剤耐性をみるために、この方法を利用している。Mac Vandiviere ら¹³⁾および金井¹⁴⁾は、Dubos 液体培地に結核菌を培養して一定時間後に、TTC をその培地に添加し、TTC の還元反応を利用して結核菌浮遊液の生菌数測定を行なっているが、TTC 0.01~0.25% の濃度での呈色反応は、結核菌の生菌数とよく比例していると述べている。なお、Mac Vandiviere ら¹⁵⁾は、この方法によつて結核菌の薬剤耐性をもみている。

私は手技の繁雑をさけるためおよび雑菌混入を防止するために、最初から抗結核剤、還元指示薬および結核菌を同時に培地に添加して、7~9日培養後に耐性の判定を試みた。TTC および Neotetrazolium Chloride (NTC) の還元反応の呈色の強さは、この還元剤の添加濃度や菌量などにより相違があるが、ある一定の条件下においては、この迅速耐性検査法は臨床的に用いられうる可能性がある。

結核菌の接種菌量の問題であるが内山は 0.1 mg/ml, 0.1 ml 接種では大量すぎて、接種した菌の増殖とは無関係に、接種した菌そのものによつて Resazulin が還元されて呈色するために、接種菌量は 0.1 mg/ml, 0.1 ml 以下でなければならないとしている。すなわちこの菌量では菌の発育がなくとも培地が強く呈色するので、SM 耐性検査は不可能であつたという。耐性検査では菌の発育をみているからである。

私の TTC, NTC および Potassium Tellurite (PT) の実験では、青山 B 菌 5 mg/ml, 0.1 ml を SM あるいは PAS 含有培地に培養してみたが、SM あるいは PAS の含有量によつて呈色の強さに差があり、不都合はなかつた。1 mg 菌浮遊液の 0.1 ml を使用してみたが、菌量が少なすぎて呈色までに日時を要することが分かつた

ので、2 mg/ml 以上の菌浮遊液を使用した。

液体培地中の菌の量は、日を追つて、培地の一定量を小川培地に定量培養して測定されたが、この菌の量が多いほど、液体培地の呈色は強かつた。また NTC 培地においては、培地の底に沈んでいる結核菌は菌体が染まつているので、菌の発育状態が明瞭であつた。

最初から培地に添加されるべき還元色素剤としては、菌の発育を阻止しない低い濃度で明瞭に呈色することが必要条件と考えられる。河合¹⁶⁾によれば TTC や NTC はその濃度によつては、菌の発育阻止を起こしようとしている。これに反し、吉野は、TTC は結核菌の発育に影響を及ぼさないと述べている。私の実験では濃度によつては結核菌の発育を阻止することを知つた。すなわち TTC では培地濃度 0.5% のときには明らかに結核菌の発育が阻止され、0.1% のときでも発育がやや阻止された。NTC では培地濃度 0.008% のときは菌の発育が一応阻止され、0.006% のときはきわめてわずかに阻止された。

TTC 培地に INH を加えると、それだけで呈色するので、TTC 培地によつて INH の耐性を検査することはできなかつた。NTC 培地においては、そのようなことがないので、INH の耐性検査に利用できる可能性がある。

還元色素剤添加培地における還元呈色反応は、結核菌特有のものではないので、結核菌以外の菌による呈色が問題になるが、ここでは操作はできるだけ無菌的に行なわれ、しかも雑菌混入防止のために培地にペニシリンを 100 u/ml 宛添加したので、雑菌による呈色は問題にならなかつた。しかしペニシリンを添加しない培地を使用してみても雑菌の混入はほとんどみられなかつた。NTC 培地では TTC 培地に比して結核菌以外の雑菌の繁殖が少なかつた。

また NTC 培地では TTC 培地ほどには日光に敏感でないので、操作しやすい利点がある。TTC では培地全体が鮮明に呈色し、NTC では培地全体がうすく呈色するが、しかし NTC 培地では菌塊が沈澱して濃染される。NTC 培地では、TTC 培地より判定日数がやや延長するようである。

液体培地に結核菌を培養して、その培地の混濁度によつて、菌の発育ないし菌の薬剤耐性をみる方法も提案されている。しかし混濁度によつて観察するよりは、呈色の強さによつて観察するほうがより簡明であると思われる。

結 語

Dubos 変法液体培地に Triphenyl Tetrazolium Chloride (TTC), Neotetrazolium Chloride (NTC), あるいは Potassium Tellurite (PT) を添加して結核菌の培

養を行ない、その呈色の状態によつて結核菌の抗結核剤耐性を早期に判定する目的で、基礎実験を行なつた。接種菌量は2 mg以上の菌浮遊液0.1 mlが適当である。

培地に添加されるべきTTCの濃度は0.01%が適当であり、NTCの濃度は0.004%がよく、PTの濃度は0.006%が適当である。

SMおよびPASについては、このTTCあるいはNTCの還元反応を利用して、耐性検査判定日数を現行法よりかなり短縮できると思われる。

TTC培地のほうが強く呈色し、短時日の培養で呈色するという点において、NTC培地よりも優れているが、しかしINHの耐性を検査するにはTTCは不適當であり、NTCは有用である。

TTC、NTCあるいはPT培地に結核菌以外の細菌が繁殖しても、培地が呈色することがあるので、注意を要する。

TTC培地は日光によつて呈色するので、日光を遮蔽して取り扱うことが必要である。

文 献

- 1) 河盛勇造他：結核，25：438，1950.
- 2) 藤村義男：日結，10：17，1951.
- 3) 小川(辰)他：日結，13：119，1954.
- 4) 小川政敏他：日結，12：81，1953.
- 5) 馬場治賢他：最新医学，9：44，1954.
- 6) Sula, L.: Am. Rev. Tuberc., 56：241，1947.
- 7) Meyer, A. & Galland, R.: Press méd., 60：841，1952.
- 8) 穴戸昌夫他：結核の臨床，1：58，1954.
- 9) 小川(辰)：臨床病理，2：363，1954.
- 10) 吉野二男他：日結，16：381，1959.
- 11) Pital, A., Pital, R. C. & Ieise, J. M.: Am. Rev. Tuberc., 78：111，1958.
- 12) 内山一雄：鹿児島大学医学雑誌，14：345，1963.
- 13) Mac Vandiviere, H., Gentry, W. H. & Willis, H. S.: Am. Rev. Tuberc., 66：95，1952.
- 14) 金井興美：日本細菌学雑誌，9：27，1954.
- 15) Mac Vandiviere, H., Rogers, C. O., Melvin, I. G. & Willis, H. S.: Am. Rev. Resp. Dis., 84：399，1961.
- 16) 河合潔：結核，30：621，1955.