

## STC [2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride]

の応用による結核菌発育の早期判定に関する研究

## 第1報 STC の応用による結核菌発育の早期判定に関する基礎的研究

大 里 敏 雄

結核予防会結核研究所附臨床養所

清 水 久 子

結核予防会結核研究所

受付 昭和 46 年 4 月 20 日

STUDIES ON EARLIER DETECTION OF MYCOBACTERIAL  
GROWTH BY APPLICATION OF STC [2,3-DIPHENYL-  
5-THIENYL-(2)-TETRAZOLIUM CHLORIDE]\*Report 1: Experimental Study on Earlier Detection of  
Mycobacterial Growth by Application of STC

Toshio OHSATO and Hisako SHIMIZU

(Received for publication April 20, 1971)

Several workers reported the results of tetrazolium salts—such as TTC (Triphenyl tetrazolium chloride), NTC (Neotetrazolium chloride) for earlier detection of mycobacterial growth. Tetrazolium salts, however, was not used widely because of the inhibitory effect for mycobacterial growth.

Recently, we had the opportunity to perform the experimental studies on the application of a new tetrazolium salt—STC [2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride]—for the earlier detection of mycobacterial growth. STC was synthesized by Prof. S. Kakimoto and has the molecular structure shown in Figure 1. The addition of 0.5% aqueous solution of STC demonstrates the brown red colouring of mycobacterial colonies.

This paper presents the results of the appropriate adding time of STC, the comparative results between NTC and STC for the earlier detection of bacillary growth of tubercle bacilli. The results of the application of STC for indirect resistance test were also presented. In these studies 0.1 ml of 0.5% STC solution was added on the slopes of 1% Ogawa's media.

The methods of experiments and results were as follows ;

Experiment 1 : The relation between the time of addition of STC and the bacillary growth was studied on 1% Ogawa's media inoculated with  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  and  $10^{-6}$  mg/ml of H<sub>37</sub>Rv strain. The results were shown in table 1. The inhibitory effect of STC addition on bacillary growth was not observed even in the case of the earlier addition (7 or 10 days after inoculation).

Experiment 2 : The decrease of viable bacilli in coloured colonies stained by STC was not observed in comparison with that in not stained colonies. The subculture for new media from

\* From the Research Institute Sanatorium, Japan Anti-Tuberculosis Association, Kiyose-shi, Tokyo 180-04 Japan.

stained colonies was performed easily.

Experiment 3: Niacin, catalase and peroxidase reaction using the stained colonies showed the same results as those of original  $H_{87}R_v$ .

Experiment 4: Stained colonies were decoloured by methanol but not by water.

Experiment 5: The 0.5% aqueous STC solution could be stored for a long time in the refrigerator or under the room temperature. The action of STC solution has not been influenced by heating at 100°C for 60 minutes.

Experiment 6: A comparative study was made between STC and NTC.  $10^{-8}$  and  $10^{-6}$  mg of  $H_{87}R_v$  and Kurono strain were inoculated on 1% Ogawa's media. At different time (immediately, 7, 10, 14, 21 and 28 days after the inoculation), 0.5% STC or 0.5% NTC solution was added on the media. The results adding STC or NTC at 0, 7 and 10 days on the media inoculated with  $10^{-6}$  mg bacilli were shown in table 2. As seen in this table, the earlier addition of STC was useful for the earlier detection of bacillary growth, while the earlier addition of NTC was not useful but harmful for bacillary growth.

Experiment 7: The application of STC for indirect resistance test.

STC solution was added immediately after the inoculation on the drug-containing media inoculated with  $10^{-8}$  mg of the strains which were isolated from 3 previously untreated tuberculosis children and 2 infection sources. The results were shown in table 3.

STC was applied for the indirect resistance test of 3 strains isolated from the patients treated with many antituberculous drugs. The results of a strain which showed the marked difference in bacillary growth between addition and without addition of STC were shown in table 4.

In summary, a new tetrazolium salt-STC-was useful for the earlier detection of bacillary growth in the mycobacterial examination using the stock strains and the isolated strains. The inhibitory effect of STC was not observed in the case of 0.1 ml addition of 0.5% aqueous solution.

Further studies on application of STC for isolation culture or direct resistance test should be performed.

## 緒 言

結核菌の還元作用を応用して、菌液あるいは菌集落を着色させることによつて、生菌数の判定、菌発育の早期判定に利用しようとする研究は、垂テル酸カリ<sup>1)2)</sup>、あるいは TTC (Triphenyl tetrazolium chloride)<sup>3)~5)</sup>、NTC (Neotetrazolium chloride)<sup>6)</sup>などの tetrazolium 塩を用いて行なわれたが、コロニーの着色が鮮明でないことがあり、明瞭な着色の得られるように濃度をこくすると菌の発育に阻害作用を及ぼすことが少なくないため、広く用いられるにいたらず、最近はこのような研究はほとんどみられないようである。

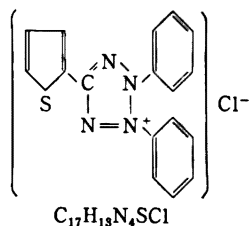
今回われわれは 柿本ら<sup>7)</sup>によつて新たに合成された tetrazolium 塩-STC-の結核菌発育の早期判定に対する有用性を検討した結果、優秀な成績を得たので、第1報として STC 溶液の適当な添加時期、菌発育に及ぼす影響、NTC との比較、間接耐性検査に応用した成績など

について報告する。

## 実験方法および実験成績

実験に用いた STC の構造式は図に示したごとくである。STC の 0.5% 水溶液は抗酸菌の集落を赤褐色に着色させ判定が容易になる。本実験は 0.5% 水溶液を用いて実施した。

Fig. STC



2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride

実験 1: STC の添加時期と菌発育状態の検討

Table 1. Influence of STC (0.5% aqueous solution) Addition on Growth of Tubercle Bacilli ( $H_{37}R_v$ )

Inoculum size	Time of STC addition	Time of reading						
		10 days	14 days	17 days	3 weeks	4 weeks	5 weeks	6 weeks
$10^{-5}$ mg	No addition	0	60		163	163	164	152 c
	10 days	0	89		102	102	106	98 c
	14 days		(60) 65		122	122	101	95 c
	17 days			111	106 c	133 c	130 c	130 c
	3 weeks				(110) 119	120	130	121 c
	4 weeks					(100) 117	103 c	117 c
$10^{-6}$ mg	No addition	0	7		26	28	30	30
	10 days	0	6		14	30	26 c	26 c
	14 days		4		26	40	70	70
	17 days			11	16	16	18	18
	3 weeks				16	24	31	31
	4 weeks					16	29	30

Notes: ( ) Before STC addition, c=Confluent growth. Number in table indicates colonies.

実験方法:  $H_{37}R_v$  株を用い、手振り法によつて 1 mg/ml の菌液を作製し、これを希釈して  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  および  $10^{-6}$  mg をおのおの 6 本の 1% 小川培地に接種した。各接種段階のうち 1 本を対照とし、他の培地は菌接種 10, 14, 17 日, 3 および 4 週後に 0.5% STC 水溶液 0.1 ml を添加し、6 週まで培養を続け菌の発育状況を観察した。

成績: 表 1 に示したように、各培地間の菌数は多少のバラツキはあるが、菌接種後 10~14 日に STC 溶液を添加した場合もその後の菌発育にとくに阻害作用を及ぼしていないようである。また  $10^{-5}$  mg 接種 14 日後, 3 週後および 4 週後に STC を添加した培地では、STC 添加によつて添加前に比して観察しうるコロニー数が増加した。

実験 2: STC によつて着色した菌集落の生菌数の検討

実験方法: 実験 1 の  $10^{-5}$  mg 接種群の 6 週判定後対照および各時期に STC を添加した培地上の菌集落をかきとり、手振り法によつて 1 mg/ml の菌液を作製し、これを希釈して、 $10^{-5}$  および  $10^{-6}$  mg をおのおの 2 本の小川培地に接種し、4 週後に発育した菌数をしらべた。

成績: 対照培地に発育した菌集落中の生菌数は  $1.255 \times 10^7$ /mg であったが、10 日後 STC を添加した培地上の菌集落では  $8.6 \times 10^6$ , 14 日後添加  $1.02 \times 10^7$ , 17 日後添加  $1.585 \times 10^7$ , 21 日後添加  $5.59 \times 10^6$ , 28 日後添加の菌集落は  $6.9 \times 10^6$ /mg であり、STC の添加は生菌数に大きな影響を与えないと考えてよいようである。

また STC によつて着色した菌集落の 1% 小川培地への継代は容易であり、発育したコロニーは親株の色調にもどつた。

実験 3: STC によつて着色した菌集落のナイアシン、カタラーゼ、およびペルオキシダーゼ反応はいずれも STC 非添加の対照培地上の集落と同程度の反応を示した。

実験 4: STC によつて着色したコロニーはメタノールによつて完全に脱色されたが、水では全く脱色されなかつた。

実験 5: 0.5% STC 水溶液の保存性と耐熱性

0.5% STC 水溶液は 4°C 1 カ月の保存では、コロニー着色までの時間、色調に全く変化はなく、200 日の保存では着色までの時間がやや遅延する傾向はあつたが、色調は変化を認めなかつた。また 0.5% STC 溶液は 100°C, 1 時間加熱しても菌の着色に全く変化はなかつた。

実験 6: STC と NTC の比較実験

実験方法:  $H_{37}R_v$  株、クロノ株を用いその  $10^{-3}$  および  $10^{-5}$  mg をおのおの 26 本ずつの 1% 小川培地に接種し (計 104 本)、両菌株の各接種菌量群について 2 本を対照とし、残りの培地 2 本ずつに菌接種直後 (0 日), 7, 10, 14, 21, 28 日後に 0.5% STC 溶液あるいは 0.5% NTC 溶液 0.1 ml を添加し、菌接種後 10, 14, 21, 28, 42 日に菌発育状況を観察した。

成績:  $10^{-5}$  mg 接種, 0, 7, 10 日後に STC あるいは NTC 溶液を添加した成績を表 2 に示した ( $10^{-3}$  mg 接種および 14 日以後の添加成績は省略)。表にみるように STC を早期—とくに菌接種直後—に添加することは菌発育の早期判定に最も有用であり、またその後の菌発育に阻害作用を示さないことが判明した。これに比して NTC の添加は菌発育の早期判定に有用でないばかりでなく、早期に添加すると菌発育に阻害作用を示した。

Table 2. Comparison between STC and NTC on Earlier Detection of Bacillary Growth (10<sup>-6</sup> mg inoculation)

Strain	Time STC or NTC addition	STC or NTC	Time of reading (days)				
			10	14	21	28	42
H <sub>37</sub> Rv	No addition		(—)	56 72	++ 200~250	++ ~250	++
	0*	STC	5 5	110 120	++	++	++
		NTC	(—)	~20 10	++	++	++
	7 days	STC	5 6	170 200	++	++	++
		NTC	4? (—)	50 50	++	++	++
	10 days	STC	(—)	150 150	++	++	++
		NTC	(—)	100 ~150	++	++	++
	Kurono	No addition		(—)	47 72	121 157	136 141 c
0*		STC	10 30	150	150	150	143 c
		NTC	(—)	8 7	41 28	53 47	63 70
7 days		STC	10 10	80~90 ~90~	140 126	160 142	144 c 136 c
		NTC	2 (—)	54 30	80 65	94 66	89 c 79
14 days		STC	13 5	100~ 90~	125 110	150 126	150 115 c
		NTC	(—)	28 49	55 67	66 80	78 71 c

\* Added immediately after inoculation. c: confluent growth.

Notes: 0.1ml of 0.5% STC or NTC aqueous solution was added on slope of 1% Ogawa's media. Number in table indicates colonies.

Table 3. Application of STC for Indirect Resistance Test (10<sup>-8</sup> mg inoculation)

Strain	Time of reading	STC addition	Kind of drug and concentration (mcg/ml)							
			0	SM		PAS		INH		
				10	100	1	10	0.1	1	5
M. O	6 W	(-)	##	##	##	180	0	++	0	0
		(+)	##	##	##	++	3	++	0	0
K. I	3 W	(-)	##	0	0	0	0	0	0	0
		(+)	##	0	0	+	0	0	0	0
	4 W	(-)	##	0	0	++	0	0	0	0
		(+)	##	0	0	##	7	0	0	0
	6 W	(-)	##	0	0	##	20	0	0	0
		(+)	##	0	0	##	53	0	0	0
K. I	3 W	(-)	##	0	0	0	0	0	0	0
		(+)	##	0	0	+	0	0	0	0

Notes: 0.1 ml of 0.5% STC solution was added immediately after inoculation.

Strains isolated from previously untreated children or their infection sources, were examined.

The results showing difference between STC added and not-added media are presented in the table.

Table 4. Application of STC for Indirect Resistance Test  
Strain No. 3 (H. N.) isolated from patient

Time of re-adding	Addition of STC	Kind of drug and concentration (mcg/ml)																							
		0*	SM		PAS		INH			KM		TH		CS		VM		EB			CPM				
			10	100	1	10	0.1	1	5	10	100	25	50	20	40	10	100	2.5	5	10	25	100	1,000		
10 days	(-)	?	0	0	0	0	?	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0			
	(+)	++	0	0	+	0	++	0	0	++	++	0	0	++	0	++	0	++	++	+	++	++	0		
2 weeks	(-)	?	0	0	0	0	?	0	0	?	?	0	0	0	0	0	0	?	?	?	?	?	0		
	(+)	##	+	0	+	0	##	0	0	##	##	0	0	##	0	##	0	##	##	##	##	##	+		
3 weeks	(-)	++	+	+	+	0	##	0	0	##	##	0	0	##	0	##	0	##	##	>##	##	##	0		
	(+)	##	##	##	##	+	++	+	0	++	++	+	0	##	0	##	0	##	##	##	##	##	1		
4 weeks	(-)	##	##	##	##	+	##	0	0	##	##	+	0	##	+	##	<0	0	##	##	##	##	>##	0	
	(+)	##	##	##	##	+	++	+	>+	##	##	+	0	##	+	##	1	##	##	##	##	##	##	4	
6 weeks	(-)	##	##	##	##	+	##	+	0	##	##	++	0	##	##	##	<0	2	##	##	##	##	##	+	
	(+)	++	++	++	++	+	++	++	+	##	##	++	+	##	##	##	=0	1	##	##	##	##	##	+	

Notes: 0.1 ml of 0.5% STC solution was added immediately after  $10^{-3}$  mg inoculation.

Concentration of SM, KM and VM was demonstrated in assumed concentration after inspissation.

0\* → 0 mcg/ml.

実験 7: STC の間接耐性検査への応用に関する検討  
実験方法: 昭和 45 年に未治療小児結核患者 3 人, 感染源 2 人から分離した菌株の間接耐性検査に STC を応用した。 $10^{-8}$  mg を一次耐性検査培地 2 組に接種し, 1 組には菌接種直後に 0.5% STC 溶液 0.1 ml を添加し, 3, 4, 6 週後に判定した。また入院患者から分離した 3 株の一次剤, 二次剤耐性検査において同様に STC 添加の有効性を 10 日, 2, 3, 4, 6 週後の菌発育の状況から検討した。

成績: 上記の実験のうち STC 添加と非添加培地間の菌発育に差が認められた場合の成績を次の表 3 および表 4 に示した。表にみられるように, STC は間接耐性検査における菌発育の早期判定に有用であり, STC の応用によつて判定の期間がかなり短縮できる場合が少なくないものと思われる。

## 考 案

結核菌の還元作用を利用してコロニーを着色させ, 菌発育を早期に判定しようとする試みは亜テール酸カリ<sup>2)</sup>, TTC, NTC<sup>3)</sup> などを用いて実施されたが, これらの応用は菌の発育に阻害作用を示すため, その後この種の研究はほとんど行なわれていない。

今回われわれは柿本ら<sup>7)</sup>によつて新たに合成された tetrazolium 塩—STC—が結核菌発育の早期判定に有用かどうか, 結核菌の発育に阻害作用がないかどうか, 結核菌の性状に変化を及ぼすことがないかどうかを検討した。

STC の 0.5% 水溶液 0.1 ml を菌の発育した 1% 小

川培地に添加すると, コロニーは短時間に赤褐色に着色するが, 結核菌のみならず非定型抗酸菌, その他の抗酸菌も同様に着色する。

今回の検討は初め  $H_{37}Rv$  の菌液を用い, STC 溶液の適当な添加時期を検討した結果, 14 日以前に添加した場合でも菌発育阻害作用は著明でないことが判明した。そこでさらに早期に STC を添加する実験を行なつた結果, 菌接種直後に添加しても菌発育は阻害されず, 非添加の対照に比べて早期に菌発育を認めることができた。同時に実施した 0.5% NTC 溶液 0.1 ml の添加は早期であるほど菌の阻害作用が明らかに認められた。

以上の結果から, STC を間接耐性検査に応用し菌発育の早期判定に有用であるという成績が得られた。

判定者にとつて何よりも有用であつたことはコロニーが鮮明に着色され判定が容易であつたことであり, 早期のマイクロコロニーや劣勢発育を示す場合の判定の時間が短縮された。

STC を臨床上の菌検査に応用する場合に問題になることは, STC によるコロニーの着色の同定検査, 生菌数, 継代に対する影響であろう。これらについて今回検討した範囲内では, 生菌数の減少もなく, 継代も容易であり, ナイアシン, カタラーゼ, ペルオキシダーゼ反応に変化は認められなかつた。

現在までに得られた成績からみると, STC は臨床上の結核菌検査への応用について検討する価値があると考えられるが, これに関する研究成績は第 2 報で報告する予定である。

## 結 論

新しく合成された tetrazolium 塩—STC—の結核菌発育の早期判定に対する有用性について検討した結果次の結論を得た。

1) 0.5% STC 水溶液 0.1 ml を菌の発育している 1% 小川培地に添加するとコロニーは短時間に赤褐色に着色する。

2) STC 溶液の添加時期は菌液接種直後が有利であり、0.1 ml の添加では菌発育に阻害作用は認められなかった。(NTC 溶液の添加は明らかに阻害作用を認めた)

3) STC を間接耐性検査に応用した結果、早期に菌発育を判定するうえに有用であつた。

稿を終わるに当たり工藤祐是博士のご助言を深く感謝

いたします。

また STC を提供された第一化学薬品株式会社に感謝します。

本文の要旨は第 46 回日本結核病学会総会において大里が報告した。

## 文 献

- 1) Sula, L.: Ame. Rev. Tbc., 56: 241, 1947.
- 2) 大戸昌久・杉田輝道: 結核の臨床, 1: 58, 昭 28.
- 3) Vandiviere, H. M., Gentry, W. H., Willis, H. S.: Ame. Rev. Tbc., 66: 95, 1952.
- 4) 金井興美: 日本細菌学雑誌, 9: 27, 昭 29.
- 5) 金井興美: 日本細菌学雑誌, 9: 95, 昭 29.
- 6) Winterscheid, L. C., Glick, M. C., Mudd, S.: Ame. Rev. Tbc., 68: 625, 1953.
- 7) Kakimoto, S., Yamamoto, K., Arima, J., Kuze, A.: Ame. Rev. Resp. Dis. に掲載予定.