

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2報 STC の分離培養および直接耐性検査への応用に関する研究

大 里 敏 雄

結核予防会結核研究所附属療養所

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 2: Studies on Application of STC for Isolation Culture and Direct Resistance Test

Toshio OHSATO and Hisako SHIMIZU

(Received for publication April 20, 1971)

The usefulness of the application of STC —a new tetrazolium salt— for the earlier detection of bacillary growth in the mycobacterial examination using the stock strains and the isolated strains was presented in the report 1.

This paper presents the results of the application of STC for the isolation culture and the direct resistance test. First, the influence of 1% NaOH treatment on the application of STC was examined.

10^{-3} and 10^{-5} mg of $H_{37}Rv$ and Kurono strain treated with 1% NaOH were inoculated on 1% Ogawa's media. 0.1 ml of 0.5% aqueous STC solution was added immediately, 1, 7 and 14 days after the inoculation, and bacillary growth was examined at 10, 14, 21, 28 and 42 days after the inoculation. The results were shown in table 1. In the case of 1% NaOH treatment, the immediate addition of STC solution was also favourable for the earlier detection of bacillary growth, similar to the results presented in the report 1. The inhibitory effect of STC was not seen even in the case of immediate addition of STC solution.

The addition of STC solution was applied for the direct resistance test in which the sputa treated with 1% NaOH were inoculated on 1% Ogawa's media containing drugs. The results were shown in table 2. In the last case discharging atypical mycobacteria, the bacillary growth was seen earlier on the STC added media than the control media.

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

結 言

著者は第1報¹⁾において、柿本ら²⁾によつて新しく合成された tetrazolium 塩である STC—[2,3-diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride]—の 0.5% 水溶液 0.1 ml を 1% 小川培地に添加することによつて、菌液を用いる実験および間接耐性検査の場合に発育した菌集落は赤褐色に着色し、判定しやすく、STC を添加しない場合に比べて菌発育を早期に判定しうること、ナイアシン反応などに影響を及ぼさないことを報告した。また STC 溶液の添加時期は菌液接種直後が有利であり、この程度の量の添加では従来の tetrazolium 塩のような菌発育阻害作用を認めなかったことを報告した。

STC を結核菌の臨床検査に応用するためには、喀痰からの分離培養、喀痰を用いての直接耐性検査における有用性について検討する必要がある。そこで本報においてはこの点について検討した成績を報告する。

研究方法と研究成績

実験1：1% NaOH によつて作製した菌液を用いた実験における STC の応用

実験方法：1% NaOH の影響について検討するため、H₃₇Rv およびクロノ株を用い、1% NaOH 液を用いて 1 mg/ml の菌液を作製し、これを 1% NaOH で 100 倍に希釈し (10⁻² mg/ml) その 0.1 ml を 10 本ずつの 1% 小川培地に接種し (10⁻³ mg 接種)、10⁻² mg/ml の菌液は 1% NaOH でさらに 100 倍に希釈し (10⁻⁴ mg/ml)、0.1 ml を 10 本ずつの 1% 小川培地に接種した (10⁻⁶ mg 接種)。したがつて各菌株について 20 本の培地を使用した。各接種群のうち 2 本は STC を添加しない対照培地とし、残りの培地の 2 本ずつに菌液接種直後 (0 日)、1 日、7 日、14 日後に 0.5% STC 溶液 0.1 ml を添加した。菌発育の判定は 10、14、21、28、42 日に行なつた。

成績：以上の実験成績は表 1(a) および (b) に示したごとく、10⁻³ mg 接種群では 7 日までに STC を添加した培地では 10 日判定で明らかに菌の発育を認めたが、非添加の培地では菌発育はみられなかった。すなわち 1% NaOH で菌液を作製した場合でも STC の添加は菌接種後早期に行なうほうが有利であり、STC によるコロニーの着色に 1% NaOH 処理は認むべき影響を及ぼしていないことが判明した。また早期に STC を添加した場合でもその後の菌発育に阻害作用を及ぼさないことは滅菌蒸留水を用いて菌液を作製した場合の実験成績¹⁾と同様であつた。

実験2：1% NaOH 処理喀痰を用いた直接耐性検査における STC の応用

前述の成績から 1% NaOH 処理は STC の応用にとく

Table 1(a). Influence of NaOH Treatment on Application of STC for Earlier Detection of Bacillary Growth (H₃₇Rv strain)

In-oculum size	Time of STC addition	Time of reading (days)				
		10	14	21	28	42
10 ⁻³ mg	No addition	(—)	++	++	+++	+++
	0*	+	++	++	+++	+++
	1 day	+	++	++	+++	+++
	7 days	+	++	++	+++	+++
	14 days	(—)	(+)	++	+++	+++
10 ⁻⁶ mg	No addition	(—)	+	180	200~	++
	0*	1 2	140 90	180 152	200 158	++
	1 day	(—)	20 37	82 120	95 171	++
	7 days	1 0	55 100	134 148	125c 156	++
	14 days	(—)	7 ?	103 119	100c 126	+

* Added immediately after inoculation.

c : Confluent growth

Notes: Bacillary suspension was made by 1% NaOH. Number in table indicates colonies number. Bacillary growth in parentheses indicates growth before addition of STC solution.

Table 1(b). Influence of NaOH Treatment on Application of STC for Earlier Detection of Bacillary Growth (Kuronos strain)

In-oculum size	Time of STC addition	Time of reading (days)				
		10	14	21	28	42
10 ⁻³ mg	No addition	(—)	++ 200	++ 400	++	++
	0*	20	++	++	++	++
	1 day	+	++	+	++	++
	7 days	+	++	++	++	++
	14 days	(—)	(50) 200 (66) 200	++	++	++
10 ⁻⁶ mg	No addition	(—)	7 4	20 12	26 16	26 19
	0*	(—)	10 9	12 15	15 16	15 16
	1 day	(—)	4 11	14 21	17 21	19 21
	7 days	2	20 14	28 19	27c 20	25c 22
	14 days	(—)	(11) 16 (0) 5	20 14	23 17	25 16c

Note: Number in parenthesis indicates colonies before addition of STC solution.

に影響を及ぼさないと思われたので、塗抹陽性の喀痰を用いて一次剤の直接耐性検査を実施するさいに STC が有用であるか否かを検討した。

実験方法：塗抹陽性の 5 例の喀痰を用い、4 倍量の

Table 2. Application of STC for Direct Resistance Test (Inoculation of 3 smear positive sputa treated with 1% NaOH)

Strain	Time of read- ing	STC addi- tion	Kind of drug and concentration (mcg/ml)								
			0	S M		PAS		INH			
				10	100	1	10	0.1	1	5	
T. N.	2	(-)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	3	(-)	11	4	5	1	0	9	4	1	
		(+)	7	0	0	0	0	9	6	1	
	4	(-)	13	16	26	23	0	15	7	11	
		(+)	10	15	16	5	0	17	17	10	
6 weeks	(-)	11*	17	28	24	10	18	9	3		
	(+)	13	20	18	20	18	20	20	11		
G. K.	2	(-)	+	0	0	0	0	+	+	+	
		(+)	+	0	0	0	0	+	+	+	
	3	(-)	+	0	0	0	0	+	+	+	
		(+)	+	0	0	0	0	+	+	+	
	4	(-)	##	0	0	0	0	##	##	##	
		(+)	##	0	0	0	0	##	##	##	
6 weeks	(-)	##*	0	0	0	0	##	##	##		
	(+)	##	0*	0	0	0*	##	##	##		
T. I. (Atypical)	2	(-)	0	0	0	0	0	0	0	0	
		(+)	+	+	0	+	+	+	0	0	
	3	(-)	+	30	0	0	0	1	1	0	
		(+)	100	+	0	+	+	+	1	0	
	4	(-)	+	+	0	+	+	+	1	0	
		(+)	+	+	0	180	+	+	33	0	
6 weeks	(-)	+	>+	0	+	+	+	100	0		
	(+)	+	+	0	200	20	+	150	0*		

* Contamination

Bacilli isolated from lusted case were identified as atypical mycobacterium (*M. intracellulare*).

1% NaOH を加え攪拌器で均等化し、その 0.1 ml を一次耐性検査培地 (1% 小川培地) 2 組ずつに接種し、1 組には 0.5% STC 溶液 0.1 ml を添加し、2, 3, 4, 6 週後の菌発育状況を観察した。

成績: 5 例のうち 2 例の喀痰を接種した培地は、雑菌汚染による判定不能の培地が多いため今回の研究から除外し、3 例の成績を表 2 に示した。この成績からみると、結核菌の 2 例においては STC 添加の有利さはみられなかったが、第 3 例の非定型抗酸菌 (*M. intracellulare*) 例においては、STC 添加培地では 2 週後に菌の発育が認められ、添加しない培地に比して早期に菌発育の判定が可能であった。この成績からみると、多数の例に応用すれば、1% NaOH 処理喀痰からの分離培養、あるいは直接耐性検査に対して STC が有用な場合が少なくないと考えられる。また STC の添加はこの程度の量では菌発育に阻害作用は認められないので、臨床的に応用するうえでとくに不利な点はないと思われる。

考 案

柿本ら³⁾によつて新たに合成された tetrazolium 塩である STC の 0.5% 水溶液 0.1 ml を菌接種直後に添加することによつて、菌液を用いる研究、あるいは間接耐

性検査の場合に菌発育の有無が判定しやすく、かつ早期に判定しうることはすでに報告したが、今回は STC を分離培養に応用し、その有用性について検討した。

分離培地として 1% 小川培地を使用する場合には、喀痰などの検査材料は 1% NaOH で前処理されることが多いので、1% NaOH 処理の STC 添加に及ぼす影響を検討するため、H₃₇Rv 株、クロノ株を用い、1% NaOH 溶液で菌液を作製し、10⁻⁸ および 10⁻⁶ mg を 1% 小川培地に接種し、その後ただちに 0.5% STC 溶液 0.1 ml を添加して培養し、10, 14, 21, 28, 42 日後に菌発育状況を検討した結果、滅菌蒸留水を用いて作製した菌液を用いた場合の成績と同じく、STC の添加は菌発育の早期判定に有用であると思われる成績が得られた。そこで次に塗抹陽性の喀痰を用い、1% NaOH 前処理後 1% 小川耐性検査培地に接種し、ただちに 0.5% STC 溶液 0.1 ml を添加し、添加しない場合の成績と比較した。その成績からみると、2 例の結核菌例ではとくに差が認められなかったが、これは判定の開始を 2 週間後にしたことによるのかもしれない。他の 1 例の非定型抗酸菌の例では、STC の添加によつてより早期に菌発育を認めることができた。直接耐性検査に用いた 5 例のうち 2 例は STC 添加有無に関係なく培地汚染がみられたため、今回の成績から除外したが、1% NaOH で前処理した材料を 1% 小川培地に接種した場合の汚染率の高いことは広く認められているところであり、routine の分離培養における STC の有用性を検討する場合には汚染率の低い方法を用いて実験を行なう必要がある。

また第 1 報¹⁾ および今回の第 2 報を通じてみると、STC の添加は菌発育をより早期に判定するうえにも、また添加の手数を軽減するためにも菌接種直後が最も有利であるという結論になるが、このような早期に STC 溶液を添加した場合には、STC は培地内に拡散し、実質的には STC 含有培地になるものと考えられる。そこで次の機会には、STC 含有培地の有用性について検討を加えることにしたい。STC 含有培地が有用であれば、別個に溶液を添加する手数もなく臨床に広く応用しうるものと考えられる。

結 論

0.5% STC 溶液 0.1 ml の添加が分離培養における菌発育の早期判定に有用であるかどうかを検討した結果次の結論を得た。

1) 1% NaOH で作製した H₃₇Rv 株、クロノ株の菌液を接種し、その後直ちに STC 溶液を添加することによつて、菌発育をより早期に判定しうる。したがって STC は NaOH 処理による分離培養に応用しうると考えられる。

2) 塗抹陽性喀痰を 1% NaOH で前処理し、1% 小

川耐性検査培地2組に接種し、1組にSTC溶液を添加してSTCの有用性を検討した結果、3例のうち1例(非定型抗酸菌)はSTC溶液の添加によつてより早期に菌の発育を認めることができた。

以上の結果からSTCは分離培養および直接耐性検査に応用しうるものと考えられる。

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いたします。

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) 大里敏雄・清水久子：結核，46：335，昭46.
- 2) Kakimoto, S., Yamamoto, K., Arima, J. and Kuze, A. : Amer. Rev. Resp. Dis. に掲載予定.