

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3報 STC 含有培地に関する研究

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 47 年 5 月 20 日

STUDIES ON EARLIER DETECTION OF MYCOBACTERIAL GROWTH
BY APPLICATION OF STC [2,3-DIPHENYL-5-THIENYL-
(2)-TETRAZOLIUM CHLORIDE]*

Report 3. Study on STC-containing Media

Toshio OHSATO and Hisako SHIMIZU

(Received for publication May 20, 1972)

Authors reported the usefulness of STC for the earlier detection of mycobacterial growth in previous papers (Kekkaku, Vol. 46, p. 335 and Vol. 46, p. 341). In these studies 0.1 ml of 0.5% STC solution (aqueous) was added onto the media after the inoculation.

This paper presents the results of examination for the appropriate concentration of STC which was incorporated into the media before inspissation.

The methods and results were summarized as follows :

The concentration of STC which was incorporated into the media were 0.5, 0.1, 0.05, 0.01, 0.005, 0.002, 0.001 and 0.0002% ; and 1% Ogawa's media were used for examination. The strains used for study were H₃₇Rv and Kurono ; the inoculum size was 10⁻⁸ and 10⁻⁵ mg. The reading of bacillary growth was performed at 7, 10, 14, 17, 21 and 28 days after the inoculation.

The results were shown in Tables 1 and 2. As seen in these tables, the appropriate concentration of STC in media was 0.01% (100 mcg/ml) for earlier detection of bacillary growth. On the media containing more than 0.05% of STC the bacilli showed dysgonic growth and on the media less than 0.002% of STC colonies showed only slight violet-red colouring.

In conclusion, the appropriate concentration of STC in STC-containing media was 0.01% (100 mcg/ml) and the application of STC-containing media for isolation culture should be examined.

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

緒 言

柿本ら¹⁾によつて合成された新テトラゾリウム塩-STC-2, 3 diphenyl-5-thienyl-(2)-tetrazolium chloride は、0.5% 水溶液 0.1 ml を結核菌を含む材料を接種した小川培地に添加することによつて、発育した結核菌のコロニーは紫赤色に着色し、これによつて菌発育をより早期に判定しうる場合の少なくないこと、したがつて STC は結核菌発育を早期に判定するうえに有用であることはすでに報告した²⁾³⁾。

しかし、STC を Routine の検査に広く応用するためには、STC 溶液添加の手数を省くことが望ましい。またすでに第1報²⁾、第2報³⁾で述べたように、STC 溶液の添加は菌液あるいは菌含有材料の接種直後に行うことが有利であるが、菌発育前に添加された STC は培地内に拡散し、実質的には STC 含有培地になつているものと考えられる。このような観点から STC 含有培地について検討することにした。

今回は種々の濃度に STC を含有する 1% 小川培地を作製し、結核菌の発育を阻害することなく、かつ菌発育の早期判定に最も適当な STC 含有濃度について検討した成績を報告する。

研究 方法

1) STC 含有 1% 小川培地の作製

必要とする終末濃度の 100 倍の濃度の STC 水溶液を作製し、1% 小川生培地に 1/100 量加え、試験管に分注して凝固滅菌を行った。作製した培地の STC の終末濃度は 0.5%、0.1% (1 mg/ml)、0.05%、0.01% (100 mcg/ml)、0.005%、0.002%、0.001% (10 mcg/ml)、0.0002% である。

2) 使用菌株、菌液の作製、接種および観察

本研究に使用した菌株は H₃₇Rv 株およびクロノ株の 2 株で、H₃₇Rv 株は 1% 小川培地に継代したものをを用い、手振り法によつて 1 mg/ml 菌液を作製した。クロノ株は凍結乾燥して保存されたものを Dubos 液体培地にうえ、培地の Density が 0.2 前後 (日立 EPO-B 型光電比色計、530 μ フィルター) を示したものを 4 mg/ml と推定し、滅菌蒸留水を用いて希釈し 1 mg/ml の菌液を作製した。

菌接種: 1 mg/ml 菌液を滅菌蒸留水で希釈し、10⁻³ mg および 10⁻⁵ mg を STC を含有しない対照培地を含む上記の各 STC 含有培地に接種した。

観察: 菌接種後 7, 10, 14, 17, 21 および 28 日に菌発育状況を観察した。

研究 成績

H₃₇Rv 株およびクロノ株 10⁻³ mg を接種した成績は

Table 1. Bacillary Growth on STC-containing Media in Different Concentration (10⁻³mg inoculation)

Strain	STC concentration	Time of reading (day)					
		7	10	14	17	21	28
H ₃₇ Rv	0	0	+?	+++	+++	+++	+++
	0.1 %	?	+	+++	+++	+++	+++
	0.05	?	+	+++	+++	+++	+++
	0.01 (100mcg/ml)	?	+	+++	+++	+++	+++
	0.005	0	+	+++	+++	+++	+++
	0.002	0	0	+++	+++	+++	+++
	0.001 0.0002%	0	0	+++	+++	+++	+++
Kurono	0	0	+?	++	+++	+++	+++
	0.1 %	?	+100?	++	+++	+++	+++
	0.05	?	+100	++	+++	+++	+++
	0.01 (100mcg/ml)	+2?	+30	++	+++	+++	+++
	0.005	0	+30	++	+++	+++	+++
	0.002	0	+?	++	+++	+++	+++
	0.001 0.0002%	0	+1?	++	+++	+++	+++

* Colouring of colonies was slight.

表 1 に、10⁻⁵ mg を接種した成績は表 2 に示した。

10⁻³ mg を接種した成績は表 1 に示したように、10 日観察で STC を含有しない培地上における菌発育はいまだはつきり確認できなかったが、0.1~0.005% に STC を含有する培地上では明らかに菌発育が認められた。また 0.002% 以下の STC 含有培地では菌発育を早期に認めることができなかつたばかりでなく、14 日以後菌発育が明瞭になつた場合でもコロニーの着色は淡かつた。

さらに 10⁻⁵ mg を接種した成績をみると、表 2 に示したように 10 日観察で明らかに菌発育を認めたのは 0.01% (100 mcg/ml) STC 含有培地のみであつた。14 日観察では 0.5% STC 含有培地以外の培地ではすべて菌の発育が認められたが、0.05、0.1 および 0.5% 含有培地では 28 日の判定でも菌の発育は dysgonic であり、結核菌発育に対する阻害作用が認められた。また 0.002% 以下の含有培地ではコロニーの着色は淡く、菌発育の早期判定に有用な成績を示さなかつた。

以上の表 1, 2 の成績からみて結核菌発育の早期判定に有用で、かつ菌発育に阻害作用を及ぼさない STC の含有濃度は 0.01%, 100 mcg/ml と考えられる。

考 案

新しく合成されたテトラゾリウム塩である STC¹⁾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成

Table 2. Bacillary Growth on STC-containing Media in Different Concentration

(10⁻⁵ mg inoculation)

STC concentration	H ₃₇ Rv						Kuroko					
	Time of reading (day)						Time of reading (day)					
	7	10	14	17	21	28	7	10	14	17	21	28
0	0	0	70	153	185	++	0	0	10	30	40	45
	0	0	50	150	202	++	0	0	10	35	40	44
0.5 %	?	?	+?	50	150	170	?	+?	+?	+?	+?	12
0.1	?	+?	100	145	150	++	?	?	30	34	38	32 _c
	?	+?	100	180	180	++	?	?	30	40	44	39
0.05	?	+?	100	180	180	++	0	?	60	60	55	49
	?	+?	100	150	150	++	0	?	40	44	46	46
0.01 (100 mcg/ml)	?	4	100	150	150	++	0	2	39	57	61	57 _c
	?	2	100	150	160	++	0	0	31	34	38	44
0.005	0	0	80	120	150	++	0	0	16	35	38	43
	0	0	80	130	140	++	0	0	18	32	36	46
0.002	0	0	50	100	140	++	0	0	24	23	35	39
0.001	0	0	50	110	120	++	0	0	12	42	46	42 _c
	0	0	50	100	140	++	0	0	16	35	39	48
0.0002 %	0	0	50	120	150	++	0	0	14	25	32	32

Notes. c: Confluent growth

*1: Dysgonic growth

*2: Colouring of colonies was slight.

績はすでに報告したが²⁾³⁾, 今回はさらに一歩を進め初めから STC を添加した STC 含有小川培地を作製し, 最も適当な STC の含有濃度について検討した。その結果 0.01% (100 mcg/ml) に STC を含有する培地が最も適当であるという成績が得られた。STC 含有濃度は 0.05% 以上になると菌発育に阻害作用が認められ, また 0.005% 以下の濃度では結核菌発育の早期判定に対する有用性は認められなかった。

STC 含有培地については, 著者らの学会発表後に小川⁴⁾, 工藤⁵⁾らによつて拡散法による耐性検査に応用した成績が報告されている。小川⁴⁾は 0.016% に STC を含有する 1% 小川培地を直立拡散法による耐性検査に応用し, 2週に判定可能なものが多くなること, 阻止帯が判定しやすくすでに Routine の検査に用いていることを報告している。また工藤⁵⁾は 0.01% STC 含有小川斜面培地を用いて Disc による耐性検査を実施しその有用なことを報告している。また固形培地ではないが Dubos 液体培地における菌発育を早期に判定するために, STC 添加—STC 含有 Dubos 培地の有用であることは大熊⁶⁾によつて報告されている。

以上のように適当な濃度に STC を含有する培地は, 研究室レベルのみならず Routine の検査に応用することによつて結核菌の発育を早期に判定しうる場合の少な

くないことが考えられる。

そこで次回は STC 含有培地を分離培養に応用した成績について検討を加えたい。

結 論

新テトラゾリウム塩, STC の 0.5% 水溶液の添加は, 結核菌発育を早期に判定するうえで有用であるが, 今回は初めから種々の濃度に STC を加えた STC 含有 1% 小川培地を作製し, 菌発育に阻害作用を及ぼすことなく, かつ菌発育の早期判定に有用である STC 含有濃度について検討した結果, 0.01% (100 mcg/ml) に STC を含有する培地が最も適当であるという結果が得られた。

稿を終るに当たりご助言いただいた工藤祐是博士に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。

本論文の要旨は第 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) Kakimoto, S., Yamamoto, K., Arima, J. and

- Kuze, A.: *Ame. Rev. Resp. Dis.*, 104:754, 1971.
- 2) 大里敏雄・清水久子: 結核, 46:335, 1971.
 - 3) 大里敏雄・清水久子: 結核, 46:341, 1971.
 - 4) 小川政敏: 第47回日本結核病学会総会報告.
 - 5) 工藤祐是・工藤禎: 第47回日本結核病学会総会報告.
 - 6) 大熊達義・林俊男・木村然二郎・大池弥三郎: 第47回日本結核病学会総会報告.