

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4報 STC 含有培地の分離培養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 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 4: Study on Application of 0.01% STC-containing
Media for Isolation Culture from Sputum

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. In the next paper authors reported the results of the application of STC-containing media in different concentration for earlier detection of mycobacterial growth and reported that 0.01% (100 mcg/ml) was the appropriate concentration incorporating into the media (Kekkaku, Vol. 47, p. 269).

This paper presents the results of isolation culture using 0.01% STC-containing media from sputa.

The methods and results were summarized as follows:

Experiment 1;

Ogawa's media modified by Kudoh were used for this study. STC was added into the media before inspissation to make 100 mcg/ml (0.01%) STC-containing media. Sputa were treated with 4% NaOH (volume ratio 1:4) and inoculated 0.1 ml for a pair of original and STC-containing media. The reading of bacillary growth was performed at 2, 3, 4, 6 and 8 weeks after the inoculation.

The results were shown in Table 1. As seen in this table, the difference in the culture positive rate between original and STC-containing media was not observed. Comparing the time of first growth between both media however 7.6% of positive culture on STC-containing media showed earlier growth than original media.

Experiment 2;

3% Ogawa's media were used for this study. The pretreatment of sputa, the method of

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

inoculation and the time of reading were the same as experiment 1.

The results were shown in Table 2. The positive culture on original and STC-containing media was not different, however, the time of first growth was different on both media; 14.6 % of positive culture on STC-containing media showed earlier growth than on original media.

The result of contamination was shown in Table 3. The contamination rate was not different significantly between original and STC-containing media.

The niacin reaction using the stained colonies by STC was performed in small scale and reported in previous paper (Kekkaku, Vol. 46, p. 335). This time the niacin test using colonies isolated from each medium was performed and the results were shown in Table 4. As seen in this table, the difference of niacin reaction between colonies on original and on STC-containing media was not observed.

In conclusion, 0.01% STC-containing media was useful for earlier detection of mycobacterial growth from pathological specimens.

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 の 0.5% 水溶液の添加は結核菌発育の早期判定に有用であることは第 1 報²⁾, 第 2 報³⁾において報告した。さらに STC 含有培地について検討し, 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 含有濃度は 0.01% (100 mcg/ml) であることを第 3 報⁴⁾において報告した。

今回は 0.01% STC 含有卵培地を用い, 喀痰からの分離培養を実施した成績を STC を含有しない対照培地の分離培養成績と比較して報告する。また STC 溶液によつて紫赤色に着色した菌集落のナイアシン反応は, STC を加えない集落の反応と差のみられなかつたことは第 1 報²⁾で報告した通りであるが, 今回は STC 含有培地で分離された多数の菌集落を用いてナイアシン反応を実施し, STC を含有しない培地に発育した同じ検査材料から得られた菌集落を用いた反応と比較した成績を報告する。

研究 方法

検査材料は当所入院患者あるいは外来患者の喀痰で, 前処理として 4% NaOH を 4 倍量加え, 攪拌器で均等化しその 0.1 ml を対照培地 (STC 非含有) と 0.01% (100 mcg/ml) STC 含有培地の 1 本ずつに接種した。

観察は 2, 3, 4, 6 および 8 週に行つた。

使用培地は昭和 46 年 3 月から 46 年 6 月の間に実施した第 1 回の実験では工藤変法小川培地, 46 年 8 月から 47 年 1 月の間に実施した第 2 回の実験では 3% 小川培地を用いた。工藤変法小川培地を用いた理由は, 当所の検査室においては 4% NaOH による前処理が可能で (雑

菌汚染を少なくするため), 発育した菌集落の生菌数が長く保たれるなどの理由によつて, 変法培地が用いられているからである⁵⁾。また第 2 回の実験で 3% 小川培地を用いたのは, 3% 小川培地が分離培地として広く用いられているからである。

STC 含有培地は生培地に 0.01% (100 mcg/ml) の割合に STC を加えて混合し, 試験管に分注して凝固滅菌を行つて作製したが, この時対照としての STC 非含有培地も同時に作製した。作製直後の STC 含有培地は軽度紫色の色調を示したが, 保存によつてこの色調は漸次褪色する。分離培養を実施した件数は第 1 回実験は 1,030 件, 第 2 回実験は 994 件である。

研究 成績

工藤変法小川培地を用いた第 1 回の分離培養成績は表 1 に示したように, 1,030 件中 163, 15.9% に菌発育が認められたが, この 163 のうち対照培地と STC 含有培地の両培地に菌発育を認めたものは 144, 88.3% で, 対照培地上にのみ発育のみられたものは 8 件 4.9% (うち 2 件は STC 培地は汚染により判定不能), STC 含有培地上にのみ菌発育のみられたものが 11 件 6.7% (うち 2 件は対照培地は汚染によつて判定不能) であり, 両培地間の菌陽性率には大きな差はみられない。しかし両培地に菌発育を認めた 144 件について初めて菌の発育を認めた時期を比較すると, 表 1 に示したように対照培地上の発育の早かつたものは 1 件 0.7% であるのに対し, STC 含有培地上の発育が早く認められたものは 11 件 7.6% を示した。

3% 小川培地を用いた第 2 回の研究成績をみると表 2 に示したように, 994 件中 196, 20.2% に菌発育が認められ, このうち対照培地, STC 含有培地の両培地に菌発育を認めたものは 164, 83.7% で, 対照培地のみを発

Table 1. Results of Application of 0.01% (100 mcg/ml) STC-containing Media for Isolation Culture from Sputum (Kudoh's modified media)

| | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|--------------|
| No. of specimens examined | | 1,030(100%) |
| No. of unreadable result | | 2*1 (0.19) |
| No. of readable result | | 1,028 (99.8) |
| No. of readable result | | 1,028(100%) |
| No. of negative culture | | 865 (84.1) |
| No. of positive culture | | 163 (15.9) |
| No. of positive culture | | 163(100%) |
| No. of positive culture | On both media | 144 (88.3) |
| | On original media | 8*2 (4.9) |
| | On STC-containing media | 11*3 (6.7) |
| No. of positive culture on both media | | 144(100%) |
| Time of first growth | Same time on both media | 132 (91.7) |
| | Earlier on original media | 1 (0.7) |
| | Earlier on STC-containing media | 11 (7.6) |

Note: A pair of original (STC not containing) and STC-containing media was used for each specimen.

*1 By contamination on both media.

*2 2 among 8 showed contamination on STC-containing media.

*3 2 among 11 showed contamination on original media.

Table 2. Results of Application of 0.01% (100 mcg/ml) STC-containing Media for Isolation Culture from Sputum (3% Ogawa's media)

| | | |
|---------------------------------------|---------------------------------|------------|
| No. of specimens examined | | 994(100%) |
| No. of unreadable result | | 9*1 (0.9) |
| No. of readable result | | 985 (99.1) |
| No. of readable result | | 985(100%) |
| No. of negative culture | | 789 (80.1) |
| No. of positive culture | | 196 (20.0) |
| No. of positive culture | | 196(100%) |
| No. of positive culture | On both media | 164 (83.7) |
| | On original media | 16*2 (8.2) |
| | On STC-containing media | 16*3 (8.2) |
| No. of positive culture on both media | | 164(100%) |
| Time of first growth | Same time on both media | 138 (84.1) |
| | Earlier on original media | 2*4 (1.2) |
| | Earlier on STC-containing media | 24 (14.6) |

Note: A pair of original (STC not containing) and STC-containing media was used for each specimen.

*1 By contamination on both media.

*2 3 among 16 showed contamination on STC-containing media.

*3 6 among 16 showed contamination on original media.

*4 By contamination on STC-containing media.

育を認めたものは16、逆にSTC含有培地のみに発育を認めたものも同じく16件で両培地の菌陽性率に差はみられなかつた。両培地に菌発育を認めた164件について初めて菌発育を認めた時期を比較すると、表2に示したようにSTC含有培地上の菌発育が1週以上早く認められたものは24件14.6%を示したが、対照培地上の発育が早かつたものはわずかに2件1.2%で、しかもこの2件はSTC含有培地に雑菌の発育がみられ、このためにSTC含有培地上の結核菌の発育が遅れたものと思われる。

次に第1、第2回の研究における培地の汚染の状況を見ると、次の表3に示したごとく汚染率は10~14.3%で、対照培地に比べてSTC含有培地の汚染率が多少高い傾向がみられたがあまり著明な差ではなく、汚染によ

る判定不能の率はほとんど差がみられない。

STC含有培地に発育した菌集落は紫赤色に着色しているが、このコロニーを用いてナイアシンテストを実施した成績をみると、次の表4に示したように対照培地上に発育したコロニーの成績と著差はなく、STC含有培地上に発育し着色した集落を用いてもナイアシン反応は実施可能であることがわかる。

以上STC含有培地を分離培養に用いることによつてほぼ11%程度に1週以上菌発育を早く判定できること、汚染率はほとんど差がないこと、STC含有培地上に発育し紫赤色に着色した菌集落を用いてナイアシン反応を実施することは全く支障のないことを報告した。

Table 3. Results of Contamination

| Kind of media | No. of specimens examined | No. of contamination | | | |
|------------------------|---------------------------|----------------------|-------------------|-------------------------|------------------|
| | | On both media | On original media | On STC-containing media | Total |
| Kudoh's modified media | 1,030 (100%) | 17 (2) (1.7) | 39 (5) (3.9) | 47 (6) (4.6) | 103 (13) (10%) |
| 3% Ogawa's media | 994 (100%) | 29 (9) (2.9) | 43 (8) (4.3) | 70 (9) (7.0) | 142 (26) (14.3%) |

Note: Number of contamination which makes the reading impossible is shown in parentheses.

Table 4. Results of Niacin Reaction Using Colonies on Each Medium

| Kind of media | Degree of niacin reaction | | | | | |
|------------------------|---------------------------|---------------|-------------|-------------|-----------------|-----------------|
| | No. of cultures examined | Orig.=STC | Orig.>STC | Orig.<STC | Orig.(+) STC(-) | Orig.(-) STC(+) |
| Kudoh's modified media | 100 (100%) | 85 (85) | 9 (9) | 4 (4) | 1 (1) | 1 (1) |
| 3% Ogawa's media | 144 (100%) | 126 (87.5) | 9 (6.3) | 8 (5.6) | 1 (0.7) | 0 |
| Total | 244 (100%) | 211 (86.5) | 18 (7.4) | 12 (4.9) | 2 (0.8) | 1 (0.4) |

Notes: Orig.→original media, STC→STC-containing media.

考 案

柿本ら¹⁾によつて合成された新テトラゾリウム塩, STCの0.5%水溶液の使用は研究室レベルにおける菌液接種, 分離培養, 間接および直接耐性検査における菌発育の早期判定に有利であることはすでに報告した²⁾。さらにSTCを後に添加する手順を省き広く検査室レベルにおいて応用するための基礎研究としてSTC含有培地について検討し, 0.01% (100 mcg/ml) にSTCを含有する小川培地が最も適当であるとの結論を得たことはすでに第3報⁴⁾において報告した。

今回は0.01% STC含有小川培地を用い, 患者喀痰からの分離培養を実施した成績を検討したが, 工藤変法小川培地, 3%小川培地を用いた第1および第2実験の成績を総合するとSTC含有培地において菌発育を1週以上早く判定したものが11.4%に認められた(STC含有培地上の菌発育の早く認められたものはコロニー数はごく少ない例が大部分であつた。

以上のようにSTC含有培地をRoutineの分離培養に応用することは有用であることが認められ, 雑菌による汚染率も差がなく, またSTC含有培地に発育し紫赤色に着色した菌集落を用いてナイアシン反応を実施することも全く支障がなかつた。

すでに報告したように²⁾STCによつて非定型抗酸菌も着色するほか雑菌も着色することが少なくないので, STC含有培地に発育した菌を肉眼的な集落性状から結核菌, 非定型抗酸菌, 雑菌に区別することは困難なこともあることが考えられるが, 観察者の目がなればあまり問題は無いものと思われる。しかし実際上の分離培養においては(STCのコストもあまり安くはないので), 普通の培地とSTC含有培地の1本ずつを1組として用いることによつて, 菌発育の早期判定も可能となり, 集落性状からの鑑別の困難さは少なくなるであろう。もちろん肉眼性状のみから鑑別の困難なものにおいては, STCによつて着色したコロニーを用いて一あるいは継代して同定検査を実施することは全く支障がないことは

第1報²⁾および今回の成績からみて明らかであろう。

観察するものによつて何よりも有用なことは, コロニーの着色によつて菌発育の有無, コロニーカウントが容易になることである。

小川⁶⁾, 工藤⁸⁾も拡散法による耐性検査にSTC含有培地を用いることによつて阻止帯の判定が容易であることを報告している。

希釈法による耐性検査においては, 耐性培地上に発育する微小コロニーのカウントは観察者にとつて大きな負担であるが, STC含有培地を用いることによつて菌発育の有無の判定のみならずカウントの負担が非常に軽減されることが期待される。希釈法による耐性検査において, 菌接種後にSTC溶液を添加することは, 耐性培地上の菌発育の早期判定に有用であることはすでに報告したが²⁾, STC含有耐性検査培地は直接法, 間接法のいずれにも応用できるものと思われるので, 今後STC含有培地の薬剤耐性検査への応用について検討を加えたい。

結 論

0.01% (100 mcg/ml) STC含有小川培地を喀痰よりの結核菌分離に応用した。

第1回の研究は工藤変法小川培地を用い1,030件, 第2回の研究は3%小川培地を用い994件の分離培養を実施した。

その結果, 菌陽性率, 汚染率はSTCを含有しない対照培地とSTC含有培地の間に差がみられなかつたが, STC含有培地上の菌発育がより早期に認められたものはSTC含有および非含有の両培地に菌発育を認めたものの11.4%にみられ, STC含有培地の菌発育の早期判定に対する有用性が証明された。

また, STC含有培地上に発育した着色コロニーを用いてナイアシン反応を実施したが, 対照培地上のコロニーの反応と差が認められなかつた。

ご助言をいただいた工藤祐是博士に感謝いたします。

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 47 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., Kuze, A.: *Ame. Rev. Resp. D.*, 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) 大里敏雄・清水久子: *結核*, 47: 269, 1972.
- 5) 工藤祐是・工藤禎: 第 47 回日本結核病学会総会演説.
- 6) 小川政敏: 第 47 回日本結核病学会総会演説.