

TTC test の 定 量 化 に つ い て

京都大学医学部泌尿器科学教室（主任：吉田 修教授）

高 橋 陽 一
福 山 拓 夫TTC TEST FOR QUANTITATIVE DETERMINATION
OF BACTERIAL COUNTS

Yoichi TAKAHASHI and Takuo FUKUYAMA

*From the Department of Urology, Kyoto University School of Medicine
(Director: Prof. O. Yoshida, M.D.)*

The TTC-test has been utilized for qualitative demonstration of a significant bacteriuria but not so widely because of its disadvantages such as a high threshold value to be positive and inavailability of quantitative expression. In view of these points, a standard curve was made from the number of bacteria and the amount of formazan produced by reduction of TTC. Formazan was extracted with ethyl acetate and determined colorimetrically at 480 m μ . In clinical cases, the bacterial counts by this standard curve correlated well with the counts determined by quantitative culture. The TTC test might be utilized as a quantitative evaluation of bacteriuria.

尿路感染症の臨床上尿中細菌の定量培養が重要であることはよく知られているが、その操作が煩雑なため、これに代って日常臨床において簡易に一定量以上の細菌が存在するかどうかを判定する目的で TTC-test が開発された。一時はその試薬が測定セットとして発売されるまでになったが、繁用されるに至らず現在ではほとんど使用されていないようである。その理由の一部はこのテストが定量性を欠いており、とくにいちおう尿路感染症の病因菌判定基準とされている 10⁵/ml 程度の菌数では肉眼的判定がむずかしくなる点にあると考えられる。われわれは TTC-test において、生じた色素を抽出し比色することにより、あらかじめ作製した標準曲線から菌数を判定する方法を試みたので報告する。

方 法

Simmons and Williams¹⁾ の方法に従って、TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 750mg を Na₂HPO₄ の飽和溶液 100 ml に溶解し stock solution と

した。working solution は stock solution の 4 ml を Na₂HPO₄ 飽和溶液にて 100 ml に希釈して作製した。けっきょく TTC 0.3 mg/ml の濃度の Na₂HPO₄ 飽和溶液が TTC 試薬になるわけである。

1) 標準曲線の作製: *Escherichia coli* O₅₅ 株を純培養したものゝを 8 段階に希釈しそれぞれ定量培養法により菌数を調べる一方、TTC 試薬 0.5 ml をこれら試料 2.0 ml とともに 24 時間 incubate し、発生した formazan を酢酸エチル 3.0 ml を加えて振とうし分離抽出した。formazan の酢酸エチル層への移行はきわめて容易である。これを光電比色計（波長 480 m μ ）にて比色し、菌数の指数を横軸に Fig. 1 のごとき標準曲線を作製した。

2) 臨床例における菌数測定: *E. coli* による急性膀胱炎 15 例の尿中菌数を定量培養法で測定するとともに、尿 2.0 ml に TTC 試薬 0.5 ml を加え 24 時間 incubate し、発生した formazan を酢酸エチル 3.0 ml にて 1) と同様抽出し比色をおこなった。この吸光度から、上記標準曲線により相当する菌数を読み

とり、定量培養法の結果と比較した。

結 果

Fig. 2 は TTC 試薬により発色せしめた状態であるが、 $6 \times 10^5/\text{ml}$ 程度以上の菌数では肉眼的にも発色は明らかであった。Fig. 3 は酢酸エチルによる色素の移行状態を示したもので、b の試験管にみられるよ

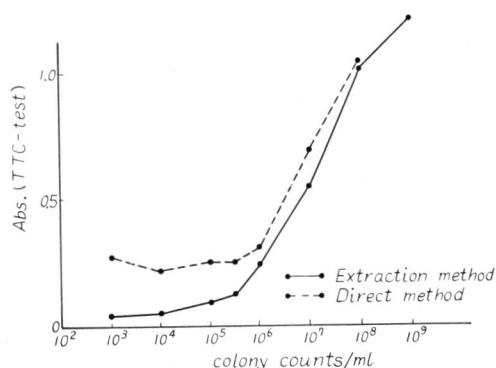


Fig. 1. Standard curve.

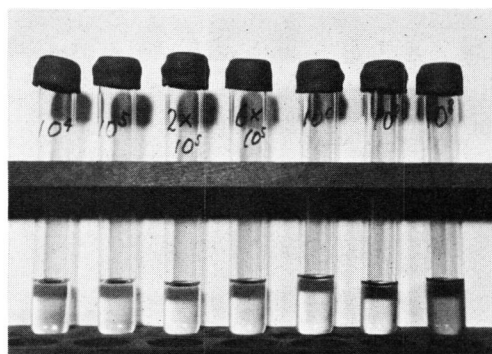


Fig. 2. 各種菌数での TTC-test による発色状態

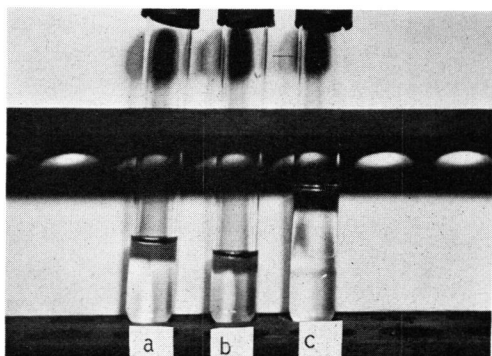


Fig. 3.

- a. 原 尿
- b. TTC-test により発色した状態
- c. 重積した酢酸エチル層(上層)への色素の移行

うな発色が酢酸エチルとの振とうによって容易にcの試験管のように上層の酢酸エチル層に移行する。Fig. 1 のように *E. coli* O₅₅ 株についての標準曲線を得たが、酢酸エチルによる抽出をおこなわずそのまま吸光度を測定した場合 (Fig. 1 の破線) には $10^6/\text{ml}$ 以下の菌数では適当な勾配が得られなかった。Table に *E. coli* による急性膀胱炎15例について定量培養法による菌数と TTC-test による菌数測定結果の比較を示した。定量培養法に対し、菌数が比較的小さい場合にはやや誤差が大きくなるが、ほぼ良好な一致をみた。Fig. 4 に Table に示したデータにより、TTC-test の吸光度に対応して定量培養法による菌数を取り点によって示した。この点を通る水平線と標準曲線との交点までが誤差ということになるが、これら各点はほぼ標準曲線に沿う傾向が認められる。

Table *E. coli* 性急性膀胱炎15例の尿中菌数

No.	定量培養	TTC-test	差
1	$864 \times 10^4/\text{ml}$	$915 \times 10^4/\text{ml}$	(+) 51
2	740	850	(+) 110
3	540	660	(+) 120
4	524	560	(+) 36
5	446	540	(+) 94
6	440	440	0
7	128	190	(+) 62
8	120	140	(+) 20
9	120	192	(-) 28
10	118	185	(+) 67
11	92	85	(-) 7
12	86	100	(+) 14
13	66	56	(-) 10
14	62	84	(+) 22
15	24	50	(+) 26

(+) : overestimation

(-) : underestimation

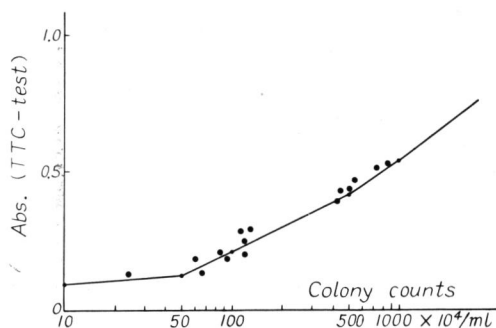


Fig. 4. Standard curve and 15 clinical cases.

考 察

さきにも述べたように、従来の TTC-test がその簡便性を喧伝されながら一般に使用されるに至らなかったのは、その定量性の欠如と、 $10^5 \sim 2 \times 10^5/\text{ml}$ 程度での判定に問題があるためと考えられるが、本法ではこの二点についてまず問題ないと考えられる。

酢酸エチルによる色素の抽出については、2～3分の振とうにより全く容易かつ完全に抽出される。また尿中の他の色素の移行も多少あるが、波長 480～600 $m\mu$ の間ではほとんど formazan の比色のじゃまにはならない。Fig. 5 に示すように triphenyl for-

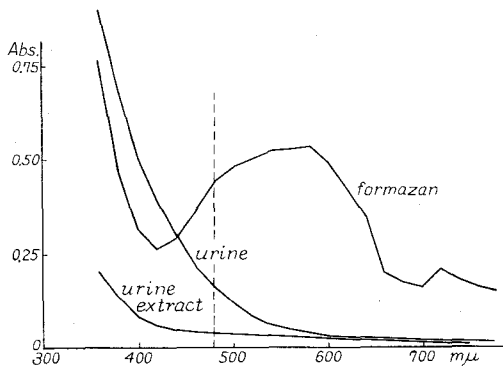


Fig. 5.

mazan の吸光度は波長 500～600 $m\mu$ にピークがあり、いっぽう尿そのものの酢酸エチルによる抽出では 450 $m\mu$ 以下の波長でいくらかの吸光値を示す。したがってわれわれが用いた 480 $m\mu$ の比色でも支障はないが、500 $m\mu$ 台の波長ならさらに安全と考えられる。尿をそのまま比色計にかけると 600 $m\mu$ 程度まで吸光値を呈するので、抽出をおこなわず尿をそのまま比色する場合には、濁度も加わって正確な比色にならない危険がある。

尿培養法以外の尿中細菌検査法としては TTC-test, catalase 試験, Griess nitrite test などの生物学的方法があるが、これらのなかでは TTC-test が一時期最も普及したようである。これらの方法の成績を文献的に比較すると, Gagnon et al.²⁾ の方法による catalase 試験の陽性率は 60.7～95%³⁻⁵⁾, Griess nitrite test は 28～97.4%^{6,7)}, TTC-test は 65～94%^{1,8-10)} と報告されており、いずれもかなり区々の成績である。TTC-test は Wundt (1950)¹¹⁾ により開発され, Simmons and Williams (1962)¹⁾ が発展せしめた方法であるが, Simmons らの方法によれば、細菌の還元により生じた赤色の triphenyl formazan を含む沈殿物を裸眼でみて判定する場合に、細菌数 $10^5/$

ml 以上なら 94% 陽性率が得られ、 $10^5/\text{ml}$ 以下なら 2% 陽性率であったとしている。ここで起こる当然の疑問は、菌数が連続的に減少する場合に、還元力の減少につれて formazan も連続的に減少するわけであるが、はたして菌数 $10^5/\text{ml}$ を境にして肉眼で陽性と陰性を画然と判定しうるものかどうかという点である。実際上は $10^5/\text{ml}$ の境界線前後の症例は少ないかもしれないが、少数の菌数においても、その還元力に応じた formazan は生じているはずであるから、陰性症例がよく観察すれば陽性であったというようなことも起こりうるわけで、肉眼判定に対する疑問は残るわけである。このような方法の成績が区々であるのも原因はそのような点にあると思われるが、本法のように色素を比色すればその点の問題は全くない。

TTC-test を用いて標準曲線から菌数を算定する方法は、定量培養による菌数との一致およびその簡便さから、じゅうぶん実用になる方法であると考えられるが、*E. coli* の一つの株について検討したのみであるので、実用化のためには向後さらに、各種尿路感染症起炎菌の TTC に対する還元力の検討がなされねばならない。

要 約

従来 TTC-test は尿中細菌の有意の増加に対する定性的検査として利用されていたが、陽性にでる閾値が高いことおよび定量的表現ができない、などの不利のため繁用されるに至らなかった。これらの点にかんがみてわれわれは TTC-test の定量化のため、細菌数と TTC の還元により生じた formazan 量との間の標準曲線の作製を試みた。formazan は酢酸エチルで抽出し、480 $m\mu$ にて比色定量した。この標準曲線による菌数測定結果は、臨床例において、定量培養法による測定結果と良好な一致を示した。

本論文の要旨は第 32 回日本泌尿器科学会東部連合地方会 (1967 年 10 月 28 日)、第 18 回日本泌尿器科学会中部連合地方会 (1967 年 11 月 3 日) において発表した。吉田教授のご校閲を感謝する。

文 献

- 1) Simmons, N. A. and Williams, J. D.: Lancet, **1**: 1377, 1962.
- 2) Gagnon, M. et al.: Anal. Chem., **31**: 144, 1959.
- 3) Braude, A. I. et al.: J. Lab. Clin. Med., **57**: 490, 1961.
- 4) Brenner, B. M. et al.: Amer. J. Sci., **245**: 31, 1963.

- 5) 上田 泰：日内会誌, **53**: 1231, 1965.
 6) Smith, L. G. et al.: Ann. Int. Med., **54**: 661, 1961.
 7) Linzenmeier, G. et al.: Klin. Wschr., **41**: 919, 1963.
 8) 斉藤豊一・ほか：日泌尿会誌, **56**: 622, 1965.
 9) 山本隆司・ほか：日泌尿会誌, **56**: 625, 1965.
 10) Guze, L. B. et al.: Amer. J. Med. Sci., **246**, 691, 1963.
 11) Wundt, W.: Dtsch. med. Wschr., **75**: 1471, 1950.

(1973年10月6日受付)

血 尿 抗アレルギー作用
 排尿困難 に 抗炎症作用
 排尿痛 上皮賦活作用
 尿意頻数 CPP (毛細管透過性亢進) 抑制作用

のある

- ▷特発性腎出血、急性出血性膀胱炎（小児出血性頻尿症）の血尿、術後出血をすみやかに消失させる。
 ▷血精液症ないし出血性精囊炎の血精液を消失させる。
 ▷アレルギー性および非細菌性尿道炎の尿糸、炎症を消退させる。
 ▷急性膀胱炎、前立腺肥大症に伴う排尿困難、排尿痛、尿意頻数、残尿感を消退させる。

▶適応症

特発性腎出血、急性出血性膀胱炎（小児出血性頻尿症）、急性膀胱炎、急性膀胱尿道炎、非細菌性尿道炎、血精液症、術後出血



強力ネオミ/ファージン C

包装 2ml 10管・100管, 5ml 5管・50管, 20ml 5管・30管 健保薬価 2ml 26円, 5ml 34円, 20ml 139円

M5058 文献御申越先 ミノファージン製薬学術部 〔〒107〕東京都港区赤坂8の10の22（ニュー新坂ビル）