

1%小川培地耐性検査と Löwenstein-Jensen 培地 耐性検査の比較 (喀痰での検討)

東 村 純 雄

国立療養所大府荘 (荘長 勝沼六郎博士)

名古屋大学医学部内科第一講座 (主任 日比野進教授)

受付 昭和 38 年 11 月 1 日

結核菌の耐性検査には、わが国以外の諸外国では Löwenstein-Jensen 培地¹⁾ が広く使用されているのに対して、わが国では 1%小川培地²⁾ が使用されることが多い (主として間接法に用いられるが、国療大府荘では直接法に用いている)^{3)~5)}。したがって、われわれの使用している方法での耐性検査成績が世界的な標準法 (Löwenstein-Jensen 培地に中和喀痰液を接種する方法) と比較していかなる関係にあるかを知っておく必要がする。したがって、この研究はわれわれの 1%小川培地直接法がどの程度まで標準法と一致するかを知るために行なった。

方 法

1%小川培地および Löwenstein-Jensen 培地 (以下 L-J 培地) はともに試験管 (17-18×170 mm) に 8 ml ずつ分注し、90°C 60 分滅菌した。薬剤は滅菌前に添加し、添加濃度をそのまま表示した。

喀痰に等量の 4% NaOH 液を加え、37°C に 20~30 分放置して液化し、まずその 0.02 ml を渦巻白金耳⁶⁾ で 1%小川培地に接種した。ついで 0.04% phenol red を 2 滴指示薬として加え、20% HCl 液を滴加して中和し、その 0.1 ml をピペットで L-J 培地に接種した。両培地ともに 37°C 6 週間培養したのち、発育を判定した。

使用した薬剤濃度は表 1 に示したとおりである。

成 績

(1) 耐性度の比較

発育程度を次の 5 段階に分けて、対照培地と同程度またはそれより一段階低い発育を示す最高濃度を耐性度と定義した。発育：卍：全面的膜状発育；卍：一部集落融合；+：多数の分離集落 (151 以上)；実数：分離集落 51~150；実数：分離集落 50 以下。対照培地の集落数が 150 以下の場合は発育を示す最高濃度をとる。

耐性度の比較成績は表 1 のとおりで、大部分の場合、両者の耐性度判定はよく一致し、一致率は 80~93% に達した。ただし、viomycin (VM) の場合のみ一致率が

Table 1. Comparison of the Degree of Drug Resistance in Tubercle Bacilli Contained in Sputa Determined by 1% Ogawa Medium (Direct Method without Neutralization) with That by Löwenstein-Jensen Medium (Direct Method with Neutralization)

Degree of resistance	Number of cases						
	SM	PAS	INH	KM	1314TH	CS	VM
A=B	119	132	133	133	139	84	66
A>B	26	18	14	17	11	3	23
A<B	5	0	3	0	0	3	1
Total	150	150	150	150	150	90	90
Rate of agreement	80%	88%	89%	89%	93%	93%	73%

A=Direct method by use of 1% Ogawa medium without neutralization procedure.

B=Direct method by use of Löwenstein-Jensen medium with neutralization procedure.

Drug concentrations used for comparison are as follows:

SM (dihydrostreptomycin sulfate)=0; 10; 100; 1,000 µg/ml;

PAS (sodium p-aminosalicylate)=0; 1; 10; 100 µg/ml;

INH (isoniazid)=0; 0.1; 1; 10 µg/ml;

KM (kanamycin sulfate)=0; 25; 50; 100 µg/ml;

1314 TH (ethionamide)=0; 10; 20; 30; 50; 100 µg/ml;

CS (cycloserine)=0; 25; 50; 100 µg/ml;

VM (viomycin sulfate)=0; 25; 50; 100 µg/ml;

"Resistance degree" was read as the highest concentration, on which either growth similar to control or one-step less growth than control was observed (Criteria of growth are shown in table 2).

低い。不一致の場合は大部分、1%小川培地の成績が L-J 培地の成績より高く出たためである。(表 1)

(2) 耐性または感性の判定がどの程度一致するか
いま、次の濃度を「限界濃度」(critical concentrations)

としてとり、この濃度に対照と同程度または一段階低い発育を示す場合を「耐性」と定義することとした。限界濃度に上述の発育が認められない場合が「感性」となる。

「限界濃度」: dihydrostreptomycin (SM) 10 γ/ml ; PAS-Na 1 γ/ml ; INH 0.1 γ/ml ; kanamycin (KM) 100 γ/ml ; ethionamide, 30 γ/ml ; cycloserine (CS), 25 γ/ml ; viomycin (VM), 25 (または 50) γ/ml 。

この定義で「耐性」または「感性」の判定を行なうと、表2の結果が得られた。すなわち、両者での「耐性」ま

Table 2. Comparison of the Rate of Resistance Cases Determined by 1% Ogawa Medium without Neutralization Procedure with that by Löwenstein-Jensen Medium with Neutralization Procedure (Both the Direct Methods)

Determination (R=Resistance S=Sensitiveness)	Number of cases						
	SM	PAS	INH	KM	1314TH	CS	VM
{Method A=R Method B=R	118	118	144	47	40	21	38 (6)
{Method A=R Method B=S	13	7	2	7	4	3	20 (11)
{Method A=S Method B=R	3	0	0	0	0	0	1 (0)
{Method A=S Method B=S	16	25	4	96	106	66	31 (73)
Total	150	150	150	150	150	90	90 (90)
Rate of agreement	90%	96%	99%	96%	98%	97%	77% (88%)

Method A=Direct method by 1% Ogawa medium without neutralization procedure.

Method B=Direct method by Löwenstein-Jensen medium with neutralization procedure.

"Resistance" was defined as any growth similar to control or one-step less growth than control on the following critical concentrations: SM 10 $\mu g/ml$; PAS 1 $\mu g/ml$; INH 0.1 $\mu g/ml$; KM 100 $\mu g/ml$; 1314 TH 30 $\mu g/ml$; CS 25 $\mu g/ml$; VM 25 (or 50) $\mu g/ml$.

Growth was classified into the following criteria:

‡: confluent growth; †: partially confluent growth;

+: many discrete colonies (more than 151); actual number: discrete colonies (less than 150); actual number: discrete colonies (less than fifty).

たは「感性」の判定は大部分でよく一致し、一致率90~99%に達した。ただしVMについては、この場合も一致率がやや悪い。VM耐性の「限界濃度」をどこにとるべきかは明らかでないが、25 γ/ml をとるよりも、50 γ/ml をとったほうが一致率はよくなる。不一致の場合の大部分は、やはり、1%小川培地で「耐性」、L-J培地で「感性」となった例が多く、この場合も1%小川培地での耐性判定がやや高くでる傾向があることがうかがわれる。

考 察

上述の比較は喀痰についてであるが、M. tuberculosis H₃₇R_V株および青山B株を用いて、試験管内実験で比較すると(actual count法⁵⁾⁶⁾、最小発育阻止濃度はSMおよびKMで2~4倍、CS, PAS, VMで2倍、1%小川培地のほうが高くでる。INHとethionamideについては大差がない⁹⁾。

1%小川培地とL-J培地の組成で注目されるのは、前者のほうが約2倍量のKH₂PO₄を含有することである。SMの抗菌作用が磷酸塩の存在で減弱することはDonovickなど¹⁰⁾により報告され、KMおよびVMの磷酸塩による抗菌作用の減弱は東村(道)¹¹⁾により、CSの抗菌力減弱はBönicke¹²⁾により報告されているので、磷酸塩の量の差が成績に影響を与えていることが想像される。

しかるに喀痰について検討した場合には、上記のごとく、両培地の成績は比較的良好に一致する。もちろん、1%小川培地のほうが耐性度が高くでる傾向は認められた。しかし、この傾向は基礎的比較で差がないINHおよびethionamideについても多少とも認められるので、この説明は簡単ではない。一つには、1%小川培地非中和法での結核菌の発育が、L-J培地中和法での発育よりも若干よい傾向にあることが関係しているかもしれない。先にわれわれが提唱した「Löwenstein変法培地」¹³⁾では菌の発育は1%小川培地法よりややまさる傾向がある。しかし、Löwenstein変法培地と1%小川培地との耐性度は基礎的実験でほとんど差がない。喀痰についても耐性度の差もほとんどないようにみられる。

以上、要するに喀痰の場合では成績判定の差は少なく、実用的には両者をほぼ一様に判断してよいように思われる。しかし、1%小川培地のほうが若干耐性度が高くでる傾向があることは気をつけるべきであろう。そして、この理由として磷酸塩の量が関係していることが考えられるが、要因は複雑のようで、一義的に磷酸塩量のみで説明することもできないように思われる。

喀痰の場合に、1%小川培地とL-J培地の耐性度の比較成績がほとんど一致する理由については次のように考えられる(前述のように1%小川培地のほうが若干耐性度が高くでる傾向はあるが)。この主な原因は、使用した薬剤濃度が厳密な「限界濃度」よりやや高めにとつてあることが関係しているように思われる。たとえば、INHの場合、感性株(H₃₇R_V、青山B)の最小発育阻止濃度は1%小川培地でもL-J培地でも0.03 γ/ml であるが、われわれは「限界濃度」として0.1 γ/ml をとつた。また、PASの場合の最小発育阻止濃度は1%小川培地で0.1~0.2 γ/ml 、L-J培地で0.05~0.1 γ/ml であるが、われわれは喀痰では1 γ/ml をとつた。KMで

は最小発育阻止濃度は1%小川培地で 25 r/ml , L-J 培地で 4~8 r/ml であるが、「限界濃度」は 100 r/ml をとつた。このように、「限界濃度」を最小発育阻止濃度よりやや高めにとることは(ただし高くとりすぎにはならないが)、けつして不合理ではなく、むしろ合理的であると思われる。なぜならば、耐性の上昇は決して漸増的に起こるものではなく、ほとんど常にとびとびに起こるからである(東村道雄¹⁴⁾)。たとえば、上記の INH, PAS の場合、最小発育阻止濃度に発育しうる菌は INH 0.1 r/ml または PAS 2~3 r/ml まで耐性であつて、耐性度の上昇は INH 0.02 r/ml →0.1 r/ml , PAS 0.1 r/ml →2 r/ml のごとく「躍進的」に起こるからである。KM の場合でも、一たん耐性菌が出現する場合には速やかに 100 r/ml 耐性菌が出現し、中間耐性の時期は認めがたい⁶⁾。以上のごとく、耐性の上昇がとびとびであることが、1% 小川培地と L-J 培地で比較的良好成績が一致した原因であり、またわれわれがやや高めの「限界濃度」を採用しうる理由であるように思われる。

総 括

喀痰についての直接法で、1%小川培地法(非中和喀痰接種)と Löwenstein-Jensen 培地法(中和喀痰接種)との耐性度を比較すると両者の成績は比較的良好一致した。したがつて、ここでわれわれが採用したごとき濃度を「限界濃度」として用いた場合、両者の成績をほぼ相並行するものと考えてよいと思われる。

御指導を受けた国立療養所大府荘長、勝沼六郎博士、

名古屋大学医学部、日比野進教授ならびに国立療養所大府荘、東村道雄博士に謝意を表する。

文 献

- 1) Jensen, K. A.: Bull. Union Internat. Tuberc., 24: 81, 1954.
- 2) Ogawa, T.: Kekkaku, 24: 403, 1949.
- 3) Tsukamura, M. and Kasai, E.: Chemotherapy, 4: 227, 1956.
- 4) Tsukamura, M. and Kasai, E.: J. Antibiotics, A, 10: 219, 1958; Chemotherapy, 5: 101, 1957; 6: 171, 1958; 7: 106, 1959.
- 5) Tsukamura, M.: Med. and Biol., 49: 87, 1958.
- 6) Tsukamura, M., Abo, T. and Katsunuma, R.: Kekkaku, 34: 625, 1959.
- 7) Tsukamura, M., Abo, T. and Kasai, E.: Kekkaku, 36: 361, 1961; 37: 141, 1962.
- 8) Tsukamura, M. and Kasai, E.: Kekkaku, 35: 397, 1960; 36: 38, 1961.
- 9) Tsukamura, S. and Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., in press.
- 10) Donovan, R., Bayan, A.P., Canales, P. and Panegy, F.: J. Bacteriol., 56: 125, 1948.
- 11) Tsukamura, M.: Med. and Biol., 51: 140, 1959.
- 12) Bönicke, R.: Beitr. Klin. Tuberk., 127, 1963.
- 13) Tsukamura, M.: Kekkaku, 37: 278, 1962.
- 14) Tsukamura, M.: Jap. J. Tuberc., 9: 43, 1961.

Comparison of Drug Resistance Determination between "1% Ogawa Medium" and "Löwenstein-Jensen Medium" (Examination of Sputum).

The drug resistance test for tubercle bacilli is being made in many countries by use of Löwenstein-Jensen medium¹⁾, whereas in this country it is made usually by use of 1% Ogawa medium²⁾ (usually for indirect method, but also for direct method in our laboratory^{3)~8)}. It is now desirable to know is the relation between the data on these two media. The purpose of this study is to deal with this.

Methods

The composition of 1% Ogawa medium is as follow: basal solution (1% KH_2PO_4 and 1% sodium glutamate), 100 ml.; whole eggs, 200 ml.; glycerin,

6 ml.; 2% malachite green solution, 6 ml. (pH 6.8)..

Both the media, 1% Ogawa medium and Löwenstein-Jensen medium, were poured in 8 ml. quantities into tubes, 17 to 18×170 mm, and slanted by sterilization at 90°C for 60 minutes. The drug used were added prior to sterilization and expressed as the added concentrations themselves.

Specimens of sputum were added with about one-volume of 4% NaOH solution and allowed to stand at 37°C for 20 to 30 minutes. The sputum specimens thus homogenized were inoculated to 1% Ogawa medium (before neutralization process) with a spiral loop delivering 0.02 ml⁹⁾. The specimens were then neutralized by addition of 20% HCl solution, using phenol red as indicator, and inoculated to Löwenstein-Jensen medium by pipette (0.1 ml. per tube). The tubes inoculated were incubated at 37°C for

6 weeks and the growth was observed.

Results

(1) The degrees of resistance obtained on "1% Ogawa medium" concerning the resistances to streptomycin, PAS, isoniazid, kanamycin, ethionamide, viomycin and cycloserine agreed with the degrees obtained on "Löwenstein-Jensen medium" at rates of 80 to 90% (table 1), although there was a tendency that the degrees on 1% Ogawa medium were somewhat higher than those on Löwenstein-Jensen medium.

(2) When the concentrations shown in table 2 were taken as the *critical* concentrations, the definition of "resistance" or "sensitiveness" was well agreed on both media and the rates of agreement were 90 to 99% in with the exception of viomycin resistance. In the case of viomycin resistance, the rate of agreement was 77% when one has taken 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$. as the critical concentration and it was 88% when taken 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$. as the critical one.

(3) In view of the above results, it is considered that the data obtained on 1% Ogawa medium by

direct method of the drug resistance test (without neutralization procedure) agree in most cases with the data obtained by the standard method, in which Löwenstein-Jensen medium was used with neutralization procedure of sputum specimens.

(4) The comparative studies on the drug resistance degrees of *M. tuberculosis*, H₃₇R_V and Aoyama-B strains, revealed that resistance degrees to streptomycin and to kanamycin appeared 2 to 4 times higher on 1% Ogawa medium than did on Löwenstein-Jensen medium, resistance degrees to PAS, viomycin and cycloserine appeared 2 times higher on 1% Ogawa medium than on Löwenstein-Jensen medium, and resistance degrees to ethionamide and to isoniazid appeared similar on the both media. Nevertheless, the above comparison dealing with sputa specimens agreed well on the both media. It is suggested that this good agreement is derived from the following: A little higher concentrations than the critical concentrations determined exactly in *in vitro* studies were taken as the critical concentrations for sputum specimens.