

A NEW METHOD FOR ESTIMATING THE BACTERIAL POPULATION OF THE NASOPHARYNX

Michio Tomiyama MD et al

Department of Otolaryngology Niigata University,
School of Medicine, Niigata

It is difficult to quantify the bacterial flora of the nasopharynx. This difficulty was encountered by us in the determination of bacterial pathogens in nasopharyngeal microbiologic flora because the various species of bacteria were present in the nasopharyngeal cultures. We proposed a new method for estimating the bacterial population of the nasopharynx and measured the percentage of bacterial pathogens in

nasopharyngeal microbiologic flora. The study was designed to compare the findings of microbiologic flora of the nasopharynx in children with chronic sinusitis at exacerbation with those in children without such observable disease. In result, bacterial pathogens stood high percentage in nasopharyngeal microbiologic flora in children with chronic sinusitis at exacerbation.

上咽頭細菌叢の検索(第2報)

—量的判定方法について—

新潟大学医学部耳鼻咽喉科学教室

富山道夫・田中久夫

今井昭雄・中野雄一

秋田赤十字病院耳鼻咽喉科

荒井辰彦

秋田赤十字病院細菌検査科

後藤 晃

はじめに

従来無菌性中耳炎とされてきた滲出性中耳炎(以下 OME と略す)について、近年 *H. influenzae*, *S. pneumoniae* などの細菌の関与が重要視されつつある。これは、OME の発症に

上咽頭細菌叢の関与が注目されるようになったことによると思われる。¹⁾ しかし咽頭のよ
うな多数の常在菌が生息している場所では、
起炎菌の決定方法や細菌培養の再現性について
いろいろな問題がある。

そこでわれわれは上咽頭細菌叢の新しい定量培養方法を考案し、これらの問題について検討を加えたので報告する。

対 象

対象は、昭和61年4月より昭和62年3月までの1年間に、秋田赤十字病院耳鼻咽喉科を受診した小児で耳鼻咽喉に著変のない正常例5名と、慢性副鼻腔炎急性増悪例で過去1ヶ月以内に抗生物質を投与されていない5名である。

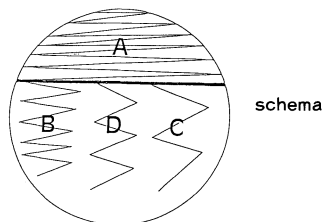
方 法

1. 検体採取方法

Medical Wire and Equipment 社製の transwab を使用し、各症例について上咽頭粘液を同時に2検体採取した。採取は杉田²⁾の方法に準じて、口腔経由法によって行った。

2. 細菌培養方法

検体を採取後、ただちに血液寒天培地およびチョコレート寒天培地へ新しく考案した方法(以下説明の便宜上富山法と略す)で接種した(図1)。以下に実際の手順を示す。



実際の培地

図1 富山法による検体接種方法

- ①培地をABCD 4つの section に分けて、まず検体を培地上方のA-section に接種する。
- ②ついで白金耳を用いてA-section の細菌をB-section に密に塗り付ける。

- ③さらに白金耳を殺菌した後に、新たに A-section より細菌を採取しC-section に粗に塗りつける。

- ④同様にD-section にその中間の塗り付けを行う。

検体接種後、培地を恒温槽内で37℃24時間好気性培養し、以下のごとく検出菌の量的判定を行った。

3. 検出菌の量的判定方法

- ①C-section において、細菌がまばらになっている末端部の colony を count し、末端部における各検出菌の百分率を10%単位でもとめる。

- ②①でもとめた百分率と他の section における培養状況を総合的に判断し、上咽頭細菌叢百分率を決定する。

4. 菌種同定方法

菌種の同定は、培地上で特異の形態を有する集落の塗抹グラム染色標本を検鏡後に、上原ら³⁾の方法に準じて行った。細菌の持つ病原性より判断して、*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes* を病原菌として取り扱った。なお検体の採取、培地への接種、検出菌の量的判定および細菌の同定検査は同一人が行った。

結 果

耳鼻咽喉正常例と慢性副鼻腔炎急性増悪例の病原菌の検出率は、両者ともに5名中4名(80%)であり、まったく差は認められなかった。一方上咽頭細菌叢百分率では、耳鼻咽喉正常例において、*Neisseria*, *Viridance group*, γ -streptococcus などの常在菌の占める割合が高かった(表1)。これと対象的に、慢性副鼻腔炎急性増悪例では、病原菌の占める割合が高かった(表2)。以上のごとく富山法で上咽頭細菌叢百分率をもとめたところ、上咽頭細菌検査が臨床的所見に良く反映する結果となった。

また同時に採取した2検体の比較では、全症例においてほぼ同じ百分率で各種細菌が検出され、富山法の再現性が確認された。

考 案

従来無菌性中耳炎とされてきたOME について、近年上咽頭細菌叢の関与が重要視されつつあり、OME 罹患児における上咽頭細菌培養の報告が散見されるようになった^{1) 4) 5)}。しかし血液や髄液など、本来無菌であるべき検体から細菌が検出されれば起炎菌と判定出来るが、多種類にわたる常在菌が生息している上咽頭では、その判定が難しい。

一般的には細菌の持つ病原性より判断して、*H. influenzae*, *S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. pyogenes* などが咽頭病原菌とされている。³⁾ しかしこれらの細菌は、表1に示すごとく少数であれば耳鼻咽喉正常例においても常在しているので、検出されただけでは起炎菌とは判定できない。常在菌の含まれる検体の評価には定量培養が必要であり、病原菌が常在菌に対してどの程度の割合を占めているかが重要な所見となる。⁶⁾ したがって上咽頭では症例の年齢、臨床的所見などとともに、細菌叢百分率を重視して起炎菌を決定すべきである。

われわれは、耳鼻咽喉正常例と慢性副鼻腔炎急性増悪例において、上咽頭細菌叢の定量培養を行った。その結果、病原菌検出率では両者に差は認めなかったが、細菌叢百分率では、慢性副鼻腔炎急性増悪例において病原菌が高い割合を占めていることがわかった。すなわち上咽頭細菌培養を定量的に行うことにより、臨床的所見を良く反映する結果が得られた。

現在一般の細菌検査室では図2に示すような検体接種が行われている。培地上方のA-section に検体を接種し、これを白金耳で培地

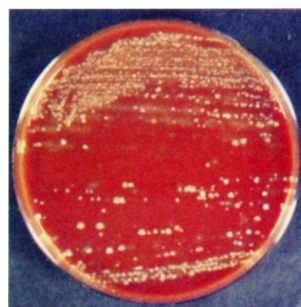
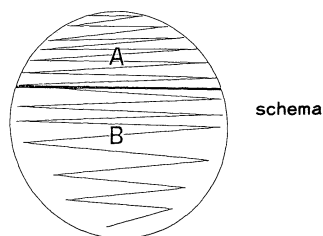


図2 一般に行われている検体接種方法

下方のB-section に塗り広げる方法である。検出菌の量的判定は培地の半分以下である程度有意に繁殖している場合1+, 半分までであれば2+, それ以上が3+と判定されており、細菌叢の中で占める割合については検討されていない。

この方法で、慢性副鼻腔炎急性増悪例6名を対象に上咽頭細菌培養を行った結果を表3に示したが、検査の再現性に問題があった。図3-①は白金耳の塗り始めと末端部で細菌の培養状況が異なり、細菌繁殖にむらを生じたことを示している。図3-②はA-section とB-section で培養状況が異なり、A-section よりの細菌の採取に問題があったことを示している。細菌の培養過程でこのような colony のかたよりが生じたため、再現性に乏しい結果となったと思われる。

富山法の特徴は、塗り付けを3通り行い各 section の総合判定で細菌叢百分率をもとめる点にある。かりに一つの section で図3に示したような colony のかたよりを生じて、4つの section の総合判定で量的判定を行うため

表3 一般に行われている方法による
上咽頭細菌検査の再現性
(慢性副鼻腔炎急性増悪例の上咽頭細菌培養)

症例NO	検体①	検体②
1	H. influenzae 3 +	H. influenzae 1 + S. pneumoniae 2 +
2	S. pneumoniae 2 + S. aureus 1 +	S. pneumoniae 2 + H. influenzae 2 +
3	S. pyogenes 2 + H. influenzae 2 +	S. pyogenes 1 + S. aureus 1 +
4	H. influenzae 2 +	正常細菌叢
5	S. pneumoniae 3 +	正常細菌叢
6	H. influenzae 3 +	S. aureus 1 +

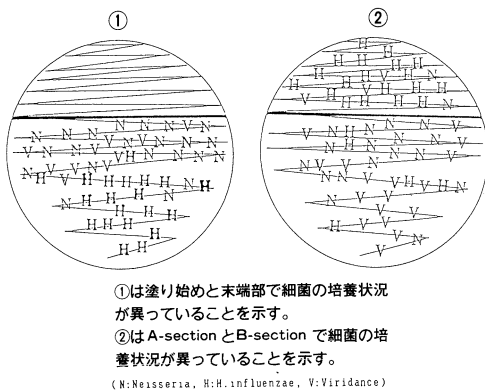


図3 細菌培養の過程で生じた colony のかたより

に問題となりにくい。密に塗り付けた section では、細菌が均等に分布し細菌叢の量的構成を良く反映する場所が得られやすい反面、colony の count がしにくい欠点がある。逆に粗に塗り付けた section では、細菌が白金耳で塗り付けた線上に分布し colony の count がしやすい反面、細菌が均等に分布しにくい欠点がある。そこで密、粗およびその中間の3通りを行い、塗り付けの際に起きる弊害を少なく

した。

過去に報告されている細菌の定量培養方法としては、希釈法や液体ブイヨンを用いる方法など種々の報告^{6) 7) 8) 9)}がある。しかし希釈法では検体を接種した部分より塗り広げる際に、先に述べたようなむらを生じた場合、希釈が進むにつれてむらが増幅される危険性がある。また液体ブイヨンを用いて混濁血液平板を作る方法については、平板の表面と深部の集落の異同は判定し難く、必ずしも検体中の構成菌の割合を反映しないとの意見もある。いずれにせよ富山法と比較した場合簡便さに欠け、経費がかかるのが欠点である。

ま と め

新しい定量培養方法を考案し、上咽頭細菌叢について検討を加えた。その結果従来の方法と比較して、臨床的所見を良く反映ししかも再現性が高いという結果を得た。今後富山法を用いて、OME罹患児を始めとする各種耳鼻咽喉科疾患の上咽頭細菌叢を検索する予定である。

参 考 文 献

1. Sundberg L et al.: The effect of erythromycin on the nasopharyngeal pathogens in children with secretory otitis media. Acta Otolaryngol 97:379-383, 1984.
2. 杉田麟也: 上気道. 臨床検査27: 1230-1237, 1983.
3. 上原すず子: 小児咽頭細菌叢とその問題点. 小児科 8: 1090-1101, 1967.
4. Freijd A et al: The Nasopharyngeal Microflora of Otitis-prone Children with Emphasis on H.influenzae. Acta Otolaryngol 97:117-126, 1984.
5. 友永和宏, 他: 滲出性中耳炎の細菌学的検討. 日耳鼻感染症研究会誌 5: 10-15, 1987.

6. 坂崎利一, 他: 原因病原菌の決定。感染症学の進歩: 1172~1180, 1985.
7. Dunlap MB: Host influence on upper respiratory flora. The New England Journal of Medicine 4:640-650, 1956.
8. 寺島周: 小児期咽頭細菌叢に関する研究。日児誌 81: 692-704, 1977.
9. Schwartz R et al.: The nasopharyngeal Culture in Acute Otitis Media. JAMA 241: 2170-2173, 1979.

表1 富山法による上咽頭細菌検査の再現性
(耳鼻咽喉正常例の上咽頭細菌叢百分率)

症例NO	検体NO	Neisseria	Viridance	γ -st	GNR	H.influenzae	S.pneumoniae	S.aureus
1	①	80	20	<10		<10		
	②	80	20	<10		<10		
2	①	60	20	10		<10		10
	②	50	40	10		<10		<10
3	①	60	40					
	②	50	40	10				
4	①	40	10	10	20	<10	20	
	②	40	20	20	10	<10	10	
5	①	40	30			30		
	②	30	20	10		40		

表2 富山法による上咽頭細菌検査の再現性
(慢性副鼻腔炎急性増悪例の上咽頭細菌叢百分率)

症例NO	検体NO	Neisseria	Viridance	γ -st	S.pyogenes	H.influenzae	S.pneumoniae	S.aureus
1	①	40	10		30	20		
	②	30	20	<10	30	20		
2	①	40	10	10	30			10
	②	30	10		40			20
3	①	40	30	10		10	10	
	②	50	20	10		<10	20	
4	①	10	<10	<10		60	30	
	②	30	<10	10		30	30	
5	①	60	30	10				
	②	50	40	10				