

耳鼻科感染症診断に有用な細菌定量培養法及び 常在菌種・菌量について

大阪大学医学部中央臨床検査部

浅利 誠志・網野 信行・宮井 一潔

大阪大学医学部耳鼻咽喉科

荻野 仁・松永 亨

Seishi Asari, Nobuyuki Amino, Kiyoshi Miyai

The Central Laboratory for Clinical Investigation, Osaka University Medical school.

Hitoshi Ogino, Toru Matsunaga

Department of Otolaryngology, Osaka University Medical school.

耳鼻咽喉科領域感染症における原因菌の検索の多くは、鼻腔、外耳、咽頭など常在菌叢が存在する部位が対象とされる。また、これらの組織では、吸気、外気、食物摂取等を介し外来抗原と接しているため、絶えず生体防御反応が繰り返されている。このような環境下において常在菌叢が、上気道感染及び耳感染防御に対しどのような役割を担っているのか現在までに定説は得られていない。そこで今回、常在菌叢を定量的、且つ、再現性良く測定する方法と、それによって得られた健常人の年間データを基に耳鼻科領域感染症における常在菌叢の担っている役割の一端を考察する実験を試みた。

対象及び方法

常在菌叢検索の対象は、健常人男性2人(29才, 31才)及び健常人女性1人(23才)とし、右下鼻甲介、右外耳道及び右前口蓋弓より定期的に同一人が採取した。細菌定量培養方法は、table 1 に示すように秤量滅菌綿棒を用い一定手技にて採取後、再度綿棒を秤量しサンプル量を測定する。次に0.45%滅菌食塩水1.8ml中

Table 1

Quantitative Analysis with Spiral System

1. Sampling with a weighed swab
2. Resuspension (vortex) in 1.8ml 0.45% NaCl solution
3. Serial dilution
4. 50 μ l of solution applied to culture (BA, CA, DHL) with spiral system
5. Overnight incubation in 5% CO₂ at 35°C
6. Quantitative analysis

に綿棒を浸し、これを盪盪器にて30秒～1分間強く攪拌した後、連続希釈をする。このように希釈したサンプルを各々50 μ lづつ、血液寒天(BA)、バシトラシン加チョコレート寒天(CA)、デソキシコレート寒天(DHL)へ、スパイラルシステム(グンゼ産業)を用いて自動塗抹する。さらにプレートを35°C、5%炭酸ガス存在下で1日～3日間培養し、各種常在菌の同定及び定量を行った。

成 績

右下鼻甲介にて検出された菌種、菌量は、table 2 に示すように60例数中Coagulase Negative Staphylococci (以下C.N.S.と略す)が

66.7% (2.09×10^6 CFU/ml) と最も優位に検出され、次にCorynebacterium;20.0% (7.84×10^6), α -streptococcus;11.7% (3.68×10^6), さらに、上気道由来と思われる菌種がわずかに検出された。この中で最も優位に検出されたC.N.S.について3者の年間推移をみると、fig 1 に示すように、やや個人差はみられるが冬期(11月)から春期(5月)にかけて常在菌量が減少する傾向がみられた。右外耳道では、table 3に示すようにC.N.S.が96.6% (1.84×10^7) とほぼ全検体において分離され、次に、Corynebacterium;15.5% (1.74×10^6), α -streptococcus;1.7% (3.6×10^4) Bacillus sp.;1.7% (7.2×10^4) であった。下鼻甲介と同様に外耳において最も優位に検出されたC.N.S.について年間の推移をみると、fig 2 に示すように7月から10月の期間に3者共に $10^7 \sim 10^8$ CFU/ml以上の高いピーク値がみられた。右前口蓋弓では、table 4に示すように扁桃部常在菌叢とされている Neisseria sp.;100% (9.14×10^6), α -streptococcus;100% (1.99×10^7) が全検体において検出され、以下6種類の菌がみられた。また、上記2材料と同様に年間の推移を α -streptococcusについてみるとFig 3に示すように四季を通じて 1.99×10^7 CFU/ml前後の菌量が検出され、上記2材料とは異なり季節変動はみられなかった。さらに、表には示していないが同一人における採取部位の左右差は、菌種及び菌量共に今回の検索ではみられなかった。

Table 2
Incidence of Organisms detected from Nose (60 cases)

Organisms	Frequency	Mean \pm 2S.D.
<i>S. epidermidis</i> (C.N.S.)	66.7%	$2.09 \times 10^6 \pm 8.39 \times 10^6$
<i>Corynebacterium</i> sp.	20.0%	$7.84 \times 10^6 \pm 1.28 \times 10^7$
α -streptococcus	11.7%	$3.68 \times 10^6 \pm 8.17 \times 10^6$
<i>Neisseria</i> sp.	8.3%	$1.17 \times 10^6 \pm 1.92 \times 10^6$
<i>S. aureus</i>	3.3%	$2.03 \times 10^4 \pm 2.28 \times 10^4$
γ -streptococcus	1.7%	6.4×10^4
no growth (less than 10^3 CFU/ml)	21.7%	

Table 3
Incidence of Organisms detected from Ear (58 cases)

Organisms	Frequency	Mean \pm 2S.D.
<i>S. epidermidis</i> (C.N.S.)	96.6%	$1.84 \times 10^7 \pm 4.49 \times 10^7$
<i>Corynebacterium</i> sp.	15.5%	$1.74 \times 10^6 \pm 3.15 \times 10^6$
α -streptococcus	1.7%	3.6×10^4
<i>Bacillus</i> sp.	1.7%	7.2×10^4
no growth (less than 10^3 CFU/ml)	3.4%	

Table 4
Incidence of Organisms detected from Throat (49 cases)

Organisms	Frequency	Mean \pm 2S.D.
<i>Neisseria</i> sp.	100 %	$9.14 \times 10^6 \pm 1.021 \times 10^7$
α -streptococcus	100 %	$1.99 \times 10^7 \pm 2.34 \times 10^7$
<i>H. parainfluenzae</i>	73.5%	$2.55 \times 10^6 \pm 5.07 \times 10^6$
<i>Corynebacterium</i> sp.	24.5%	$1.56 \times 10^7 \pm 2.68 \times 10^7$
γ -streptococcus	24.5%	$9.09 \times 10^6 \pm 9.77 \times 10^6$
<i>S. epidermidis</i> (C.N.S.)	18.4%	$5.49 \times 10^6 \pm 1.115 \times 10^7$
<i>S. aureus</i>	6.1%	$6.00 \times 10^5 \pm 6.07 \times 10^5$
β -streptococcus	4.1%	$5.50 \times 10^5 \pm 4.95 \times 10^5$

Fig 1
Transition of C.N.S. Derived from Nose

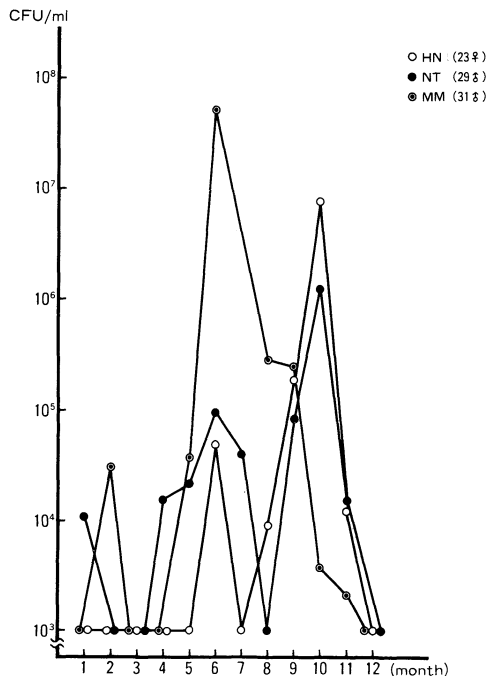
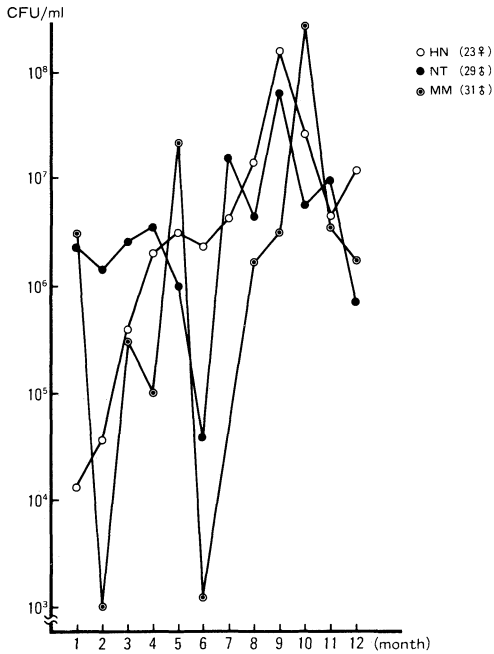


Fig 2

Transition of C.N.S. derived from Ear



結果及び考察

1, スパイラルシステムを用いた細菌定量培用法について

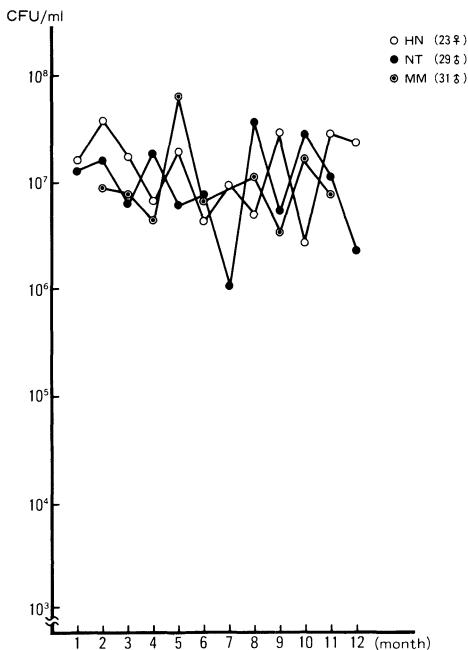
現在, 多くの検査室で実施されている上記材料の検査法は, 採取した綿棒を直接培地の一部に塗布しこれを白金耳で画線する用手法が用いられている。しかし, その検査結果は個人差が大きく再現性も悪い。今回, 我々の実験に応用したスパイラルシステムは, 液体材料の一定量を培地に自動塗抹できる機器であり, 用手法による希釈定量法とも良く相関する²⁾。このシステムと選択培地を組み合わせることにより, 個人差のない客観的なデータが得られる。ただ, 今回の検索では, 希釈条件と機器の原理上10³CFU/ml未満の菌量は, 検出感度以下として処理した。

2, 下鼻甲介, 外耳道及び右前口蓋弓の常在菌叢について

下鼻甲介及び外耳道における常在菌叢としては, 両部位共にC.N.S.が最も優位に検出されているが, 下鼻甲介においては検出感度以下 (10³CFU/ml)が多くみられ常在菌量が外耳に比し少ないと思われる。また, 上記両部位では, 外気温の低下による影響によるものと思われるが冬期にやや減少傾向がみられている。一方, 右前口蓋弓における常在菌としては, *α-streptococcus*及び*Neissera sp*が優位に検出され, 季節変動はみられなかった。この α -streptococcusについてはSpruntの報告³⁾にもあるように, α -streptococcusがバクテリオシンを産生することは知られている。事実, 血液寒天培地上において, α -streptococcusの産生するそれにより, 歯学領域及びcompromised hostで重要視されている*Capnocytophaga sp*の発育が抑制される。このため, *Capnocytophaga*を分離するには, 第一にこの菌種の発育を抑制する物質を培地に添加しなければならない。さらに, このバクテリオシンは*S.pyogenes*の増殖をも抑制するというSan-

Fig 3

Transition of α -streptococcus derived from Throat



ders⁴⁾及びChristine⁵⁾らの報告もある。以上より、常在菌叢の担っている役割を考察すると、各部位で菌量的に最も優位な菌がその部位の環境を整えており、各菌種間の存在比及び絶対数を左右していると思われる。そして、その部位において一定量以上の菌量を保持しつづけるということが、逆に特定の病原菌の増殖を抑え感染防御に非常に大きな役割を演じていると思われる。また、感染成立機序の一端としては、これら常在菌叢が外環境因子の急激な変化(気温、気圧、湿度、紫外線)や、化学療法による影響(線毛運動の抑制、気道粘液の分泌低下、抗体の分泌低下、抗生剤耐性菌の増殖)等により乱される結果、病原性の強い菌種が増殖できる環境に変化してしまうことが感染症成立の引き金になっていると思われる。また、細菌の上皮細胞への付着性を検討した馬場ら⁶⁾によると、健常者の上気道粘膜由来の扁平上皮細胞には α -streptococcusと考えられる常在グラム陽性球菌の付着数が慢性扁桃炎をもつ患者のそれよりも高い傾向がみられ、さらに、これらが他菌種の上皮細胞への付着を抑止しているとの報告があるが、我々の成績はこれらを客観的に裏付けていると思われる。

ま と め

1、耳鼻科感染症材料の細菌学的検索には、常在菌叢をも十分に考慮に入れ、再現性が良く個人差のない定量培養法を用いることが重要と考えられる。

2、下鼻甲介及び外耳道における常在菌は、C.N.S.がそれぞれ $2.09 \times 10^6 \pm 8.39 \times 10^6$, $1.84 \times 10^7 \pm 4.49 \times 10^7$ CFU/mlと両部位で最も優位に存在し、冬期に菌量の低下という季節変動がみられた。右前口蓋弓では、 α -streptococcus及びNeisseria spが優位に存在したが、季節変動はみられなかった。今回の検索より右前口蓋弓では α -streptococcusの産生するバクテリオシンが、中心的な役割を果たし常在菌

叢のバランスを制御しているものと考えられる。さらに、常在菌の絶対量として一定量以上 ($1.99 \times 10^7 \pm 2.34 \times 10^7$ CFU/ml) を維持することが、他菌種の上皮細胞への付着を阻止し感染防御に非常に大きな役割を果たしているものと思われる。

3、問題点

今回の検索では、 10^3 CFU/ml 未満の菌種、Capnocytophaga 及び嫌気性菌については検索しなかったが、今後、すべての菌種を対象にした常在菌叢の詳細な検索と、原因菌が検出された材料の常在菌種・菌量を併せて検討することにより、常在菌の役割をさらに解明していくことが重要と思われる。また、現在の化学療法における薬剤選択においては、広域スペクトルを有する薬剤が繁用されがちであるが、上記常在菌叢の果たしている役割を十分に考慮し、原因菌の抗生剤感受性結果の判明後はできる限り常在菌叢に影響の少ない薬剤に変更することが望ましいと思われる。一方、慢性化・複雑化している症例では、最も優位に検出された菌種がすべて原因菌とは判定しがたいケースも少なくないため、常在菌種・菌量及びそれらの β -lactamase 産生能等を慎重に検索したうえで化学療法を再考することが、生体のホメオスタシスに基づいた有用な感染症治療に結びつくと思われる。

文 献

- 1) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (8 edit), 1974.
- 2) Walsh, T.J.; W.E., et al : Quantification of Medically Important Candida Species and Torulopsis glabrata by a Spiral Inoculation System : Correlation with Pour Plate and Spread Plate Methods. J.Clin.Microbiol. 5 : 745~747, 1985.
- 3) Sprunt, K. and Redman, W., : Evidence-suggesting importance of role of inter bacterial inhibition in maintaining balance

of normal flora. *Ann Int Med* : 579~590, 1968.

- 4) Sanders, E. : Bacterial interference. I. Its occurrence among the respiratory tract flora and characterization of Inhibition of Group A streptococci by viridans streptococci. *J. Infect. Dis* 120 : 698~707, 1969.
- 5) Christine, C. et al : Bacterial interference. II. Role of the normal throat flora in prevention of colonization by Group A streptococcus. *J. Infect. Dis* 128 : 532~532, 1973.
- 6) 馬場 駿吉 : 第28回日本耳鼻咽喉科感染症, 上気道細菌感染の成立機序とその臨症, 1~31, 1987.