

## BACTERIOLOGY OF CHRONIC OTITIS MEDIA

Keiko Ito, Satoshi Sogano, Keisuke Mizuta, Toshimi Kojima,  
Miyoko Yanagida, Yatsuji Ito, Hideo Miyata

Department of Otorhinolaryngology, Gifu University School of Medicine

Kunitomo Watanabe, Kazue Ueno

Institute of Anaerobic Bacteriology, Gifu University School of Medicine

Bacteriology of chronic otitis media has already been reported in several studies. But in most studies, the details about the techniques of collection, transportation and processing of clinical specimen were rarely described. Therefore, we conducted this study with attention to the above.

Twenty-one patients with chronic otitis media participated in this study. All medication was discontinued at least 3 days before drainage was obtained for cultures.

After cleaning the external auditory canal with a cotton pledget soaked in 10% povidone iodine three times, discharge was collected with the thin cotton pledget bent in the tympanic cavity. The specimen was diluted in 2ml of prereduced enriched thioglycolate broth, promptly transported to the laboratory, and serially diluted to  $10^{-4}$ . An aliquot of the appropriate dilutions immediately inoculated onto a set of

aerobic and prereduced anaerobic plates, which were incubated in appropriate conditions. Most specimen was completely processed within one hour.

A total of 57 bacteria, including 50 aerobic and 7 anaerobic bacteria, was isolated from 19 chronically affected ears, yielding an average of 3.0 species per positive ear (2.6 aerobes and 0.4 anaerobes). Two specimen had no growth. Monomicrobial flora, aerobes only, were found in 3 ears. Mixed flora were found in 16 ears, with 11 ears isolated aerobes only and with 5 ears isolated both aerobes and anaerobes. Bacterial concentration ranged from  $10^3$  to  $10^9$  CFU per ml of specimen. The organisms most frequently isolated were *Staphylococcus aureus* (11), *Corynebacterium* spp. (8), *Staphylococcus epidermidis* (7), *Pseudomonas aeruginosa* (5) and *Peptostreptococcus* spp. (4).

## 慢性中耳炎の細菌学的検討

伊藤 敬子 曾賀野 悟史 水田 啓介 小島 俊己  
柳田 三洋子 伊藤 八次 宮田 英雄

岐阜大耳鼻咽喉科

## 渡辺 邦友 上野 一恵

### 岐阜大嫌気性菌実験施設

#### I. 緒 言

慢性中耳炎の耳漏からの検出菌についての報告は少なくない。しかしこれらの報告で外耳道の消毒、検体の採取・輸送方法、培養開始までの時間、培養方法などにつき詳しく述べられているものは少ない。従って、これらの因子に大きく影響されることが知られている嫌気性菌の慢性中耳炎における関与の実態についてはまだ不明の点が多い。

今回、嫌気性菌の分離率に影響すると考えられる検体量、迅速な検体処理、選択培地の併用などの点に留意して、慢性中耳炎の耳漏からの細菌の詳細な分離を試みた。

#### II. 対 象

1989年10月より1990年4月までに岐阜大学耳鼻咽喉科を受診した慢性中耳炎21例21耳を対象とした。年齢は5歳から70歳(平均42.6歳)の各年齢層に分布し、性別は男性11例、女性10例であった。耳漏採取前3日以内は全身的にも局所的にも抗生剤投与されていない患者を対象とした。

#### III. 検 査 方 法

検体採取から菌名同定までの過程をFig.1に示した。まず外耳道の耳漏を除去した後、

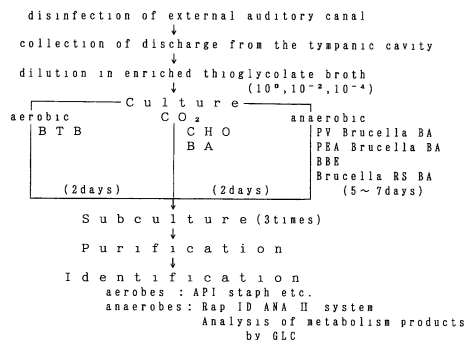


Fig. 1. Method in this study

外耳道を10%ポビドンヨードで3回清拭し、細いアルミ軸綿棒で外耳道に触れないようにして鼓室内より耳漏を採取した。すぐにEnriched Thioglycolate (以後ETGと略す)液体培地(BBL Microbiology Systems, USA) 2 ml内で綿棒に付着した耳漏を浮遊させた。このようにして得られた検体を前述のETG培地を用いて $10^{-4}$ まで10倍階段希釈し、その $10^0$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-4}$ の希釈液の0.1mlを各種平板培地に塗抹した。好気培養にはBTB (Bromthymol blue) 乳糖寒天培地を、 $CO_2$ 培養にはチョコレート寒天培地と5%ヒツジ血液寒天培地を用い、 $37^\circ C$ で48時間培養した。嫌気培養には非選択培地としてBrucella HK (Hemin, Vitamin K) 血液寒天培地、選択培地としてPV (Paromomycin-Vancomycin) 加Brucella HK血液寒天培地、PEA (Phenylethylalcohol) 加Brucella HK血液寒天培地、BBE (Bacteroides bile esculin) 寒天培地を用い、GasPak Pouch (BBL Microbiology Systems, USA) を用いて $37^\circ C$ で5~7日間嫌気培養した。なお嫌気性菌用の培地は、全てアネロメイト中に還元状態で保存したもの(予備還元されたもの)を使用直前にアネロメイトを開封して、開封後30分以内に使用した。各平板上に出現した色調、形状など肉眼的所見の異なる全ての集落を注意深く釣菌し、平板培地上で3回継代培養を反復した後、純培養菌を得た。

同定は、まずGram染色、カタラーゼ試験、オキシダーゼ試験、耐気試験を行い、好気性菌はAPIスタフ、API20ストレップ、API20EおよびAPI20NE (いずれもApi Bio Merieux S.A.France) により、嫌気性菌はRap ID ANA II system (Innovative Diagnostic Syst-

ems, Inc. USA) により行った。嫌気性菌の場合はGas Liquid ChromatographyによるPYG (Peptone Yeast extract Glucose) 培地での代謝産物の分析も実施した。ETG培地による増菌培養も14日間併用して行った。

検査上特に注意したことは、検体の空気に対する暴露をできる限り少なくするために、検体採取より分離用平板培地に塗抹・嫌気培養するまでの操作を1時間以内に終わるようにしたことである。

#### IV. 結 果

21耳中19耳 (90%) が培養陽性であった。陰性の2例は耳漏がごく少量で採取綿棒がわずかにぬれるのみの症例であった。Table 1に培養陽性19耳の1耳あたりの分離菌種数を

示した。陽性19耳中3耳が単独菌分離例で、16耳は複数菌分離例で、そのうち2菌種5耳、3菌種6耳、4菌種1耳、5菌種2耳、6、7菌種は各1耳であった。単独菌分離例は3耳とも好気性菌のみであった。複数菌分離の16耳では好気性菌のみ11耳、好気性菌+嫌気性菌の混合5耳であった (Table 2)。

菌種数と菌量の関係をTable 3に示した。菌種数と菌量に明らかな相関は認められなかった。菌量は $10^3 \sim 10^8$  CFU/mlに分布し、 $10^4 \sim 10^6$  CFU/mlにピークがあった。

検出された菌名の一覧表をTable 4に示した。全体では57菌株 (好気性菌50菌株、嫌気性菌7菌株) 検出され、陽性1耳あたり平均3菌株 (好気性菌2.6株、嫌気性菌0.4株) で

No. of species	No. of ears
1	3
2	5
3	6
4	1
5	2
6	1
7	1

Table 1. Number of species isolated per specimen

Isolates	Number
monomicrobial	3
aerobes only	3
anaerobes only	0
mixed flora	16
mixed flora with aerobes only	11
with anaerobes only	0
with aerobes and anaerobes	5

Table 2. Bacteria isolated from patients with chronic otitis media

No. of species isolated per specimen	Bacterial concentration (cfu/ml)				
	1 0 <sup>3</sup>	1 0 <sup>4</sup>	1 0 <sup>5</sup>	1 0 <sup>6</sup>	1 0 <sup>7</sup> (
1	1	2			
2		2		3	
3		4		1	1
4		1			
5			2		
6	1				
7				1	
Total	2	9	2	5	1

Table 3 . Quantitative bacteriological analysis of chronic otitis media

Isolates	No. of Isolates
A e r o b i c	5 0
Gram-positive cocci	
<i>Staphylococcus aureus</i>	1 1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	7
<i>Staphylococcus simulans</i>	5
<i>Staphylococcus capitis</i>	3
<i>Staphylococcus cohnii</i>	3
<i>Staphylococcus hominis</i>	2
<i>Staphylococcus haemolyticus</i>	1
<i>Staphylococcus</i> sp.	1
<i>Streptococcus sanguis</i> II	1
Gram-positive bacilli	
<i>Corynebacterium</i> sp.	8
Gram-negative bacilli	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	5
<i>Alcaligenes denitrificans</i> subsp. <i>xylosoxydans</i>	3
A n a e r o b i c	7
Gram-positive cocci	
<i>Peptostreptococcus magnus</i>	2
<i>Peptostreptococcus asaccharolyticus</i>	1
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	1
Gram-positive bacilli	
<i>Propionibacterium acnes</i>	3

Table 4 . List of bacterial species isolated

あった。検出された好気性菌50株の内訳は、グラム陽性球菌は*Staphylococcus aureus* 11株, *Staphylococcus epidermidis* 7株, *Staphylococcus simulans* 5株, *Staphylococcus capitis* 3株, *Staphylococcus cohnii* 3株, *Staphylococcus hominis* 2株, *Staphylococcus haemolyticus*, *Staphylococcus* sp., *Streptococcus sanguis* II 各1株の34株, グラム陽性桿菌は, *Corynebacterium*属 8株, グラム陰性桿菌は, *Pseudomonas aeruginosa* 5株, *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xyl-oxoxydans* 3株, 計8株であった。

検出された嫌気性菌7株は, *Peptostreptococcus magnus* 2株, *Peptostreptococcus asaccharolyticus* 1株, *Peptostreptococcus*属 1株, *Propionibacterium acnes* 3株であった。

## V. 考 察

本邦に於ける慢性中耳炎の耳漏からの検出菌についての報告は少なくない。<sup>1)2)3)4)</sup>しかし小西ら<sup>1)</sup>, 木村ら<sup>2)</sup>の報告では, 検体の輸送法についての記載はなく, 培養・分離・同定法に関しても中央検査部で行ったとのみ記載されている。使用培地など詳しく述べられているものは杉田ら<sup>3)4)</sup>の報告であった。杉田ら<sup>3)4)</sup>は, 中央検査室で行った検査であるが, 好気性菌用に4種類, 嫌気性菌用に3種類, 増菌用に2種類の合計9種類の培地を使用し, 37°Cで48~72時間培養したと述べている。しかしこの報告で材料採取から培養まで検体がどのように保存され, 輸送されたかの記載はない。また使用培地がどのような状態で作製・保存されていたかも不明である。Brook<sup>5)</sup>は外耳道をポピドンヨードと70%アルコールで清拭し, カニューレ付針で吸引して採取した検体をチオグリコレート培地で希釈し, ただちに好氣的培地(3種), 嫌氣的培地(2種)および増菌用培地に接種したと述べている。好気培養は24と48時間, 嫌気培

養は48と96時間行っている。今回私共は, 予備還元された嫌気性菌用培地を含む8種類の培地を使用し, 検体採取より培養開始まで20~30分以内に行うように計画した。また*Prevotella*, *Porphyromonas*など発育の遅い菌種ももれなく分離できるように5~7日の長時間の培養を行った。

優位検出菌は今回の検討では, *S.aureus*, *S.epidermidis*, *Corynebacterium* sp., *P.aeruginosa*が主体で, 小西ら<sup>1)</sup>, 木村ら<sup>2)</sup>, 杉田<sup>3)</sup>の報告と同様であった。

複数菌分離例は今回の検討では84.2%であったが, 杉田<sup>3)</sup>は67%であったと報告している。この理由として, 定量培養を併用したためコロニーがとりやすく, また可能な限り多数のコロニーを釣菌したためと考えた。

次に嫌気性菌の分離率は26.3%であった。杉田ら<sup>4)</sup>の分離率は8.2%(760耳中62耳)である。今回の検討では症例数は少ないが, 約3倍の嫌気性菌分離率を示した。これは前述したような適切な培養方法をとったためと考えた。しかしBrook<sup>5)</sup>は, 子供の慢性中耳炎患者48名を対象とし, 54%と私共の約2倍という高率の嫌気性菌を検出している。その要因としては地域差, 人種差, 年齢差, 使用される抗菌剤の差などが考えられるが, 明らかではない。今後症例を増やし, さらに検討を要すると考えている。

## VI. ま と め

慢性中耳炎21例につき細菌学的検討を特に検査方法に留意して行った。

1. 21耳中19耳(90%)が培養陽性であった。
2. 陽性19耳中16耳(84.2%)が複数菌分離例であった。
3. 全体では57菌株検出し, 陽性1耳あたり3菌株であった。
4. 主な分離菌は*S.aureus*, *S.epidermidis*, *Corynebacterium*属, *P.aeruginosa*であった。

5. 嫌気性菌は19耳中5耳(26.3%)に検出され、全分離菌株に対する割合は7/57(12.3%)であった。

#### 文 献

- 1) 小西一夫, 他: 慢性中耳炎耳漏よりの分離菌の変遷と抗生剤感受性の動向, 日耳鼻感染症研究会会誌, 7: 38-45, 1989
- 2) 木村栄成, 他: 慢性中耳炎の細菌学的検討, 日耳鼻感染症研究会会誌, 7: 34-37, 1989

3) 杉田麟也: 慢性中耳炎の細菌学的研究, 日耳鼻, 80: 907-919, 1977

4) 杉田麟也, 他: 慢性中耳炎と嫌気性菌, 耳鼻臨床, 72: 3: 379-385, 1979

5) Brook, I.: Prevalence of  $\beta$ -lactamase-producing bacteria in chronic suppurative otitis media, AJDC, 139: 280-283, 1985

---

#### 質 疑 応 答

**質問** 内藤雅夫(保衛大)

検出された細菌の起炎性をどのように判断したら良いでしょうか。

**応答** 伊藤敬子(岐阜大)

今回分離した菌は少なくとも病巣からの分離菌だと思う。従来の報告より多数の菌が分離されたが、これらの菌の病原的意義については、今後の臨床的検討(特に治療との関係)で明らかにしたい。