

抗酸菌の検出状況について

砂原千寿子・吉田真由美・今田 和子
香西 徹行

I はじめに

1882年に Robert Koch によりヒト型結核菌が発見され、昭和25年には死亡順位の1位にあった結核も、化学療法剤の開発や国の結核対策事業の結果、10~11%の割合で順調に減少してきた。

しかし、1977年頃より鈍化の傾向が見られ最近5年間の年平均減少率は2.9%となっている¹⁾

免疫力の低下した老人や外国人労働者に伴う感染、エイズやステロイド、抗癌剤使用による免疫力の低下による感染等がその原因として考えられる。

昭和50年からの香川県および全国の結核罹患率、死亡率を表1に示す。

また、非定型抗酸菌症(人口10万対)を図1に示す。

ヒト型結核菌以外の非定型抗酸菌症も図1にみるように増加してきている。

香川県の結核罹患率は表1に示すように、昭和50年

表1 結核罹患率および死亡率

年	罹患率 (人口10万対)		死亡率 (人口10万対)	
	香川	全国	香川	全国
昭和50	142.2	96.6	11.2	9.5
55	103.1	60.7	6.6	5.5
60	78.0	48.4	3.1	3.9
平成元	69.1	43.1	3.5	2.9
2	72.8	41.9	3.8	3.0
3	61.7	40.8	3.6	2.7
4	57.1	39.3	2.8	2.7

142.2、60年78.0、平成4年57.1と減少の傾向にあるが、まだ平成4年全国平均39.3と比べると、大阪府と並び高い罹患率を示している。

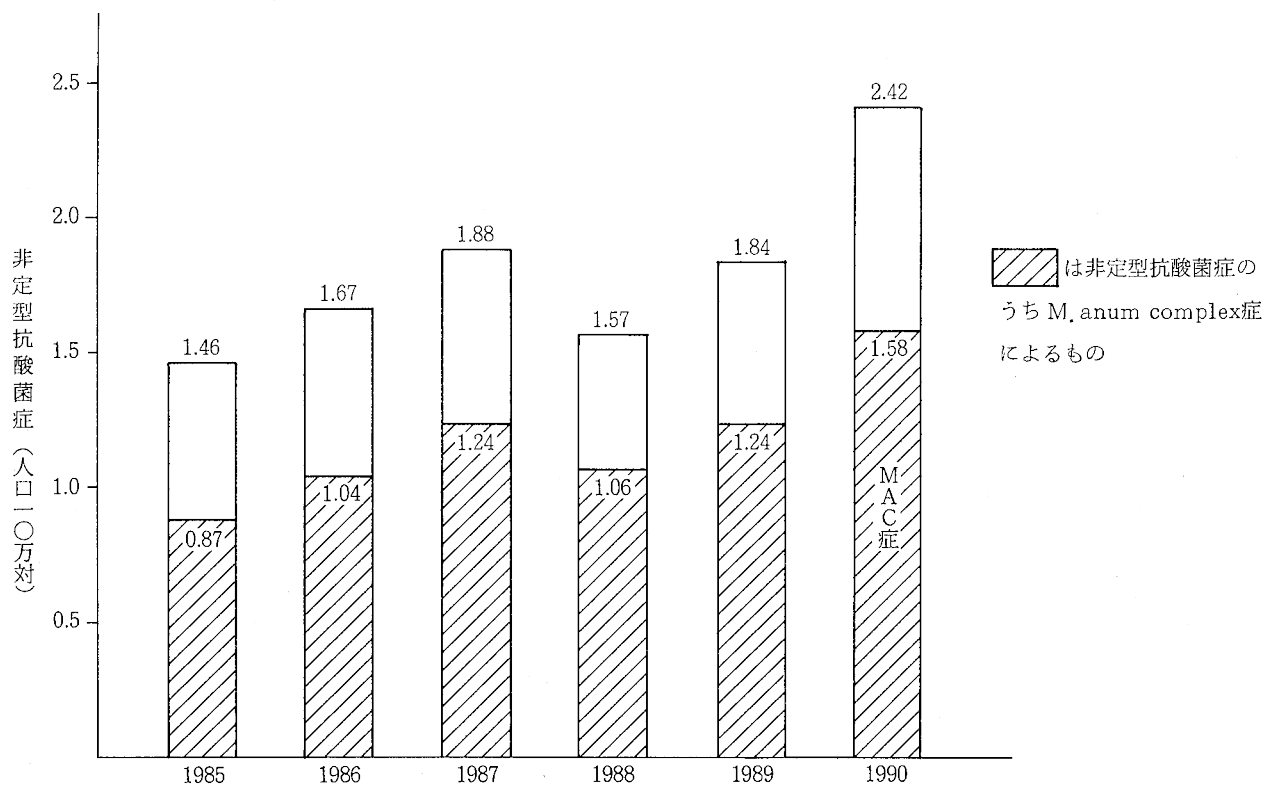


図1 非定型抗酸菌症罹患率

平成4年の有病率も徳島県、岐阜県について高く、結核の高まん延地域といえよう。

今回、当所において検査した、過去3年間の喀痰中の抗酸菌分離状況について検討したので報告する。

II 材料と方法

1. 材 料

県下7保健所からの結核精密検診受診者および患者家族等の喀痰

(平成3年4月から平成6年3月までの1,024件)

2. 方 法

塗抹染色はチールネルゼン法による。

喀痰の前処理は2% NaOH (1/10量の塩化ベンザルコニウム添加)を喀痰と等量加え、混和後37°C30分放置し、1%小川培地、ツィーン卵培地に各0.1ml接種する。

37°Cで一週間ごとに観察をしながら8週目まで培養を続ける。

菌の発育を見ればチールネルゼン法で染色し、抗酸菌の有無を確認し陽性であれば1%小川培地で純培養し同定に移る。

同定には極東の抗酸菌同定キットおよびDDHマイコバクテリアを使用した。

III 結果および考察

1. 年度別分離状況

表2に実施件数および塗抹培養陽性数を示す。

表2 平成3年度から5年度における抗酸菌分離状況

年 度	3	4	5	計
件 数	473	336	215	1,024
塗 抹 陽 性	5(1.1)	1(0.3)	3(1.4)	9(0.9)
培 養 陽 性	20(4.2)	14(4.2)	7(3.3)	41(4.0)
内 訳 (MT)	3(0.6)	1(0.3)	1(0.5)	5(0.5)
(AM)	17(3.6)	13(3.9)	6(2.8)	36(3.5)
S P C N	2(0.4)	1(0.3)	2(0.9)	5(0.5)

() : 検出率 MT : 結核菌 AM : 非定型抗酸菌

塗抹陽性率は0.9%平均、培養陽性率は4.0%平均、SPCN(塗抹陽性、培養陰性)は0.5%平均であった。

5年度のSPCNは2件あったが同一人の再検査である。

培養陽性は4%前後であるが、分離された抗酸菌の内、*M. tuberculosis*によるものは、3年度3件(5%)、4年度1件(7.1%)、5年度1件(14.3%)で非定型抗酸菌の検出率が高かった。

我が国の非定型抗酸菌症の罹患率は、図1にも示したように次第に増加の傾向にあり、現在抗酸菌感染症の10~15%を占める。

*M. avium complex*が70%前後、*M. kansasii*が30%弱で残りは*M. fortuitum*、*M. chelonae*、*M. scrofulaceum*、*M. szulgai*などによると言われている。²⁾

過去3年間に当所で検出された抗酸菌の内訳を表3に示す。

陽性41件中*M. avium complex*が17件、41.5%と一番高い検出率を示した。

次いで*M. fortuitum*17.1%、*M. tuberculosis*12.2%で*M. kansasii*は検出されていない。

これらの非定型抗酸菌は自然環境に広く分布する菌なので、菌の分離が非定型抗酸菌症の診断に直結しない。²⁾

繰り返しの分離と臨床病状、検査所見の総合評価が必要となる。

平成4年度、5年度に分離された抗酸菌の性状を表4に示す。

M. fortuitum、*M. chelonae subsp. abscessus*等の迅速発育菌は、培養から発育を認めるまでに1~2週間を要した。

*M. tuberculosis*は約3週間、*M. gordonae*は2週間、*M. nonchromogenicum complex*は3週間で菌の発育を認めた。

*M. avium complex*は約4週目で発育を認めるものと、6週を過ぎないと発育を認めなかったものと2つに分れた。

表3 過去3年間で検出された抗酸菌

	3年度	4	5	計	1,024件中	陽性41件中
<i>M. tuberculosis</i>	3	1	1	5	0.5	12.2
<i>M. avium complex</i>	8	5	4	17	1.7	41.5
<i>M. nonchromogenicum complex</i>	3	0	1	4	0.4	9.8
<i>M. gordonae</i>	3	1	0	4	0.4	9.8
<i>M. chelonae subsp. abscessus</i>	1	1	0	2	0.2	4.8
<i>M. fortuitum</i>	2	4	1	7	0.7	17.1
Other Group IV	0	2	0	2	0.2	4.8

表4 分離された抗酸菌の性状

	塗抹検査	培養検査	発育(3日)	ナイアシンテスト	PNB培地	暗発色	光発色	硝酸塩還元	ツイン80水解	E B培地	ピクリン酸培地	PAS培地	H A培地	集落性状	発育を認めた週	判定終了週	固 定
H4-32	-	+	+	-	+	-	-	+	±	+	+	+	+	SR	2	4	<i>M. fortuitum</i>
55	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	SR	2	3.7	<i>M. fortuitum</i>
68	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	S	4	8.1	<i>M. avium complex</i>
88	-	+	+	-	+	-	-	+	±	+	+	+	+	SR	1.6	4.9	<i>M. fortuitum</i>
101	-	+	-	-	+w	-	-	-	-	+w	-	-	+w	S	3.9	10.4	<i>M. avium complex</i> の疑い
104	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	S	6.9	11.7	<i>M. avium complex</i>
107	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	S	6	11.5	<i>M. avium complex</i>
156	-	+	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	+	S	2.1	5.9	<i>M. gordonae</i>
157	-	+	+	-	+	-	-	-	±	+	+w	+	+	SR	1	4.9	<i>M. chelonae subsp abscessus</i>
174	-	+	+	-	+	-	-	+	±	+	+	+	+	SR	1	2.7	<i>M. fortuitum</i>
219	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+w	S	6.4	10.6	<i>M. avium complex</i>
220	-	+	+		+	+		-	+	-	+	-	-	R	1.7	5.7	other Group IV
236	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	R	2.9	7.6	<i>M. tuberculosis</i>
239	-	+	+		+	+		-	±	+	-	-	+	S	3.7	7.6	other Group IV
H5-33	-	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	+	SR	2	4.7	<i>M. fortuitum</i>
44	-	+	-	+	-	-	-	+w	-	-	-	-	-	R	3.4	7.4	<i>M. tuberculosis</i>
48	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+w	S	4.3	8.1	<i>M. avium complex</i>
50	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	SR	3	7.1	<i>M. nonchromogenicum complex</i>
54	-	+	-		+	-	-	-	-	+	-	-	+	S	5	10.7	<i>M. avium complex</i>
119	G2	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+	S	1.9	6.6	<i>M. avium complex</i>
157	-	+	-		+	-	-	-	-	+	-	-	+w	S	4.4	9.4	<i>M. avium complex</i>

発育が遅かったものは、培養検査において1%小川培地に発育せず、ツィーン卵培地より分離した菌である。

M. avium complex の多くが1%小川培地で純培養すると、膜状に発育し釣菌しにくかった。

また、発育の悪い菌が多くみられた。

H 4-101 株は劣性発育菌で、判定に十分な菌量が得られず、極東の抗酸菌同定キットでは、*M. avium complex* の疑いと報告したが、後日DDHマイコバクテリア極東で、*M. avium* と同定された。

2. 前処理について

平成4年度は、2% NaOH 30分処理で接種した。

1%小川培地、ツィーン卵培地のいずれかに細菌の発育を見たものは、336件中118件35%だった。

そのうち、雑菌汚染は104件31%で、2本共が培地溶解したものが3件、1本のみ溶解したものが1件で高い汚染率を示した。

検体が採取されてから、当所へ持ち込まれるまでに、すでに日数が経過していることが多いことも汚染の一因と思われる。

平成5年度は2% NaOHに、20倍希釈した塩化ベンザルコニウムを1割加えた処理液で均等化し、37°Cで30分放置後接種した。

その結果、何らかの菌の発育を認めたものは、215件中33件15.3%、そのうち雑菌によるものは26件12.1%であった。

培地溶解は、2本共が1件、1本のみが1件で、同一検体での比較検討ではないが、2% NaOHのみの処理よりは塩化ベンザルコニウムを加えた方が、雑菌汚染には効果があると思われる。

また、濃厚な喀痰も塩化ベンザルコニウムを添加した方が、均等化しやすかった。

化学療法剤の影響や、非定型抗酸菌の増加に伴い、SPCNも増加してきているが、SPCNの出現頻度は、塗抹陽性例の約10~15%と言われている。

SPCNの原因としては、

- ① 塗抹染色の誤り
- ② 培養の不手際
- ③ 発育不良菌
- ④ 死菌

等が考えられる³⁾

当所では、平成3年度2件、4年度1件、5年度2件で1,024件中5件がSPCNだった。

塗抹染色ではいずれも、ガフキー1~2号だったが、5年度の2件は同一人で、初回、ガフキー2号だったが培養では菌の発育が認められなかった。

再検査では、アルカリ処理によるダメージを考え、従

来通りの塩化ベンザルコニウム添加2% NaOH処理後30分において接種したものと、処理直後に接種したものを培養したが、処理直後接種したものは、雑菌の発育は30分処理後接種のものより当然多くみられたが、抗酸菌の発育は今回も認められなかった。

8週間経過後も観察を続けたが12週間を経ても発育は認められなかった。

そこで当所で実施している前処理が、抗酸菌に与える影響を調べてみた。

1) 供試菌株

M. tuberculosis, *M. avium complex*, *M. fortuitum*, *M. nonchromogenicum complex*, *M. chelonae subsp. abscessus* の5株を用いた。

2) 検討方法

試料調整は、生食1mlに1/2~1白金耳の菌で菌液を作成し、当量の塩化ベンザルコニウム添加2% NaOHを加え、均等化したものを用いた。

混和直後(0分)、10分、20分、30分、60分後に1%小川培地およびツィーン卵培地に各0.1mlずつ接種し、発育を検討した。

なお、*M. tuberculosis* については、均一な菌液とならないので、生食浮遊液の上清をとり当量のNaOHを加え菌液とした。

図2に各種抗酸菌に対するNaOHの影響を示す。

今回の検討では、*M. avium complex* は2% NaOHの影響はほとんど受けなかった。

M. tuberculosis については接種菌量が少なかったため他の抗酸菌と比較できないが、10分後に接種したのもでも直後に比べると菌発育が減少した。

迅速発育菌はNaOHの影響を受けやすいと言われているが、今回は減少はみられたものの *M. fortuitum* は思ったほど菌発育に影響を受けなかった。

M. chelonae subsp. abscessus は10分後接種でも、NaOHの影響を強く受けて菌発育の減少が顕著にみられた。

M. nonchromogenicum complex は処理時間が経過するに従い、菌の減少がみられた。

アルカリとの接触時間を短縮すれば、抗酸菌への影響はかなり押えられるが、実際の培養では共存する雑菌の汚染防止も考慮する必要がある。

(財)化学及血清療法研究所の正木氏らは、NaOH、硫酸、シュウ酸、塩化セチルピリジニウムを用いた前処理が、各種抗酸菌に与える影響について検討している。⁴⁾ *M. tuberculosis* についてはNaOH処理で若干の減少がみられる等同様の結果が報告されているが、*M. fortuitum* ではNaOH処理で顕著に菌の減少が認められている。こ

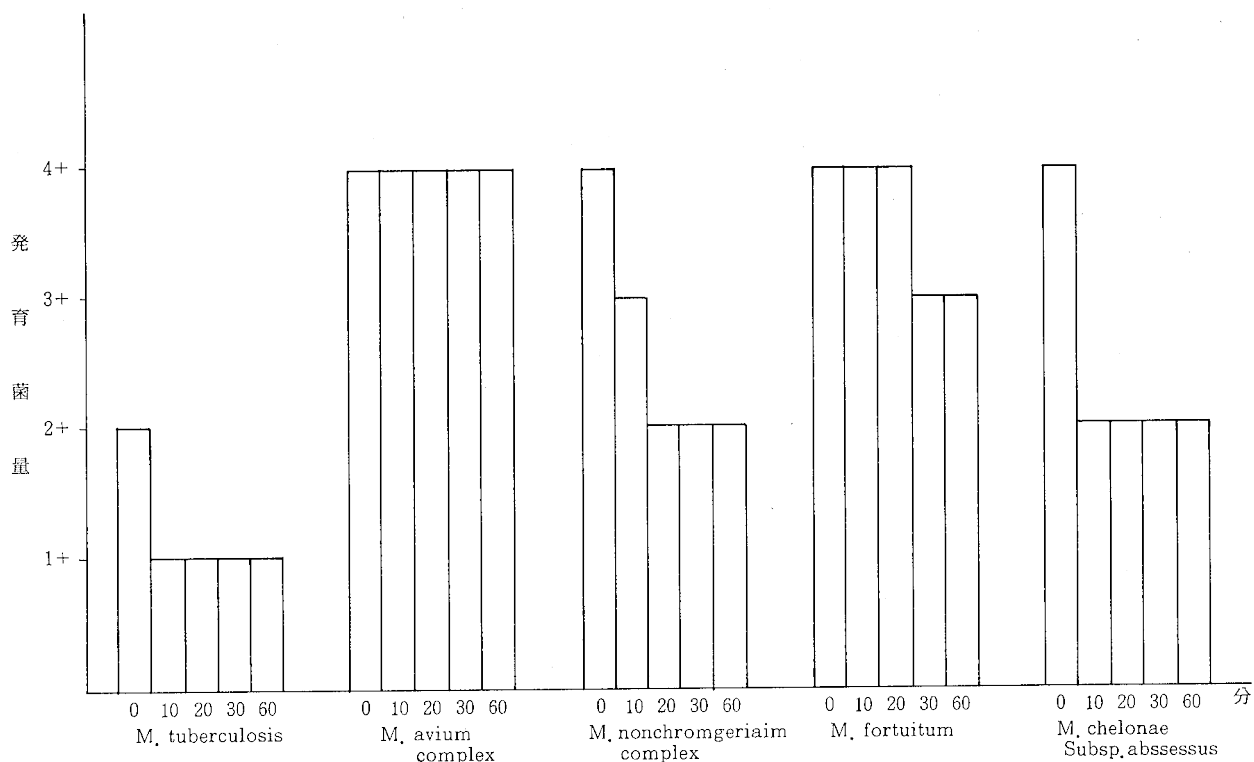


図2 抗酸菌に対するNaOHの影響

れは、使用しているNaOHの濃度の差と、当所のスタート時の菌量が少し多かったことに起因していると思われる。

各菌種を通して、塩化セチルピリジニウムを用いた処理法が菌の発育に影響が少ないと報告されている。

SPCNを少なくする為にも今後前処理について、検討してみたい。

IV 結 論

過去3年間に検出された抗酸菌について検討した結果

1. 当所で検査した喀痰の塗抹および培養の陽性率は、各々0.9%、4.0%と低い値を示した。
分離された抗酸菌のうち、*M. tuberculosis*によるものは41件中5件で、非定型抗酸菌の検出率が高かった。
内訳として *M. avium complex* が41.5%、ついで *M. fortuitum* の17.1%だった。
近年我が国では、*M. kansasii* が増加の傾向にあるが、今回の検査では検出されなかった。
2. 発育を認めるのに要した日数は、迅速発育菌の *M. fortuitum* で1.6~2週間、*M. chelonae subsp. abscessus* で1週間、*M. tuberculosis* では2.9~3.4週間、*M. avium complex* で1.9~6.9週間、その後同定を終了するまでに、同順で、2.7~4.9週間、4週間、7.4~7.6週間、6.6~11.7週間に要している。

適確な診断と治療のためにも、検査の迅速化が望ま

れる。

新しい検査法としてBACTEC 460 TBシステムや、MBチェック法があるが、前者は小川法に比し約10日、後者は2~3日早く判定できる⁵⁾

BACTECシステムは検出率の向上と判定日数の大幅な短縮が可能であるが、RIを使用するためRI検査室が必要となる。

その他にも、DNAプローブ法、PCR法による診断も進んでおり、同定キットも市販され、特異性もあり短時間で同定できる。

3. 前処理に用いるNaOHで、*M. avium complex*を除き、いずれも多少の影響を受け、発育菌量が減少している。

SPCNを少しでも少なくする一助として、前処理液について今後検討していきたい。

文 献

- 1) 厚生省保健医療局エイズ結核感染症課：結核の統計、1993
- 2) 網谷良一他：非定型抗酸菌症、臨床と微生物、vol. 20 No 6、43~60、1993
- 3) 黒田俊吉：抗酸菌の検査法、80、(株)菜根出版社
- 4) 正木孝幸他：抗酸菌検査に関する検討、医学検査、41巻1号、35~39、(1992)
- 5) 猪狩 淳：抗酸菌感染症、モダンメディア、5 Vol. 40、36~41、(1994)