

原 著

抗酸菌に対する NaOH の殺菌作用

1. 生理食塩水中での抗酸菌の生残率

丸 茂 健 治・青 木 良 雄

昭和大学藤が丘病院臨床病理科

受付 昭和 58 年 6 月 1 日

STUDIES ON BACTERICIDAL EFFECTS OF NaOH ON MYCOBACTERIA

1. Survival Rates of Mycobacteria in Saline after Treatment with NaOH

Kenji MARUMO* and Yoshio AOKI

(Received for publication June 1, 1983)

Bactericidal effects of 4% and 1% NaOH solution on a variety of mycobacteria (reference strains) suspended in saline were examined at various intervals (1, 5, 10 and 30 minutes) after the suspension. The bactericidal effect was evaluated by the survival rate (Mean±S.E.) in comparison with the control.

The results obtained were as follows. After the pretreatment for 5 minutes with 4% and 1% NaOH solution, the survival rates of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (IID 591) were 63±8% and 74±4%, respectively. Those of *M. kansasii* (p1) were 35±12% and 43±8%, of *M. scrofulaceum* (ATCC 19881) were 29±10% and 32±10%, of *M. intracellulare* (ATCC 15984) were 16±4% and 12±6%, and of *M. fortuitum* (ATCC 6841) were 1% and 17±4%, respectively. After the pretreatment for 30 minutes with 4% and 1% NaOH solution, the survival rates of *M. tuberculosis* H37Rv were 45±3% and 55±8%, of *M. kansasii* were 18±6% and 7±4%, of *M. scrofulaceum* were 16±6% and 10±6%, of *M. intracellulare* were 11±3% and 8±6%, and of *M. fortuitum* were 0% and 4±2%, respectively.

The longer the pretreatment time with both concentrations of NaOH, the lower the survival rates of all mycobacteria. Moreover, there were marked differences in the resistance to NaOH among the species of atypical mycobacteria and it was demonstrated that *M. fortuitum* was damaged most markedly by the treatment with NaOH solution. In this experiment, *M. fortuitum* could not grow on Ogawa egg media after the treatment with 4% NaOH for 10 minutes.

Keywords: Bactericidal effect, Mycobacteria, Pretreatment, Survival rate, Mean±S.E. (Standard error)

キーワード: 抗酸菌, NaOH の発育に及ぼす影響 (殺菌作用), NaOH の前処理, 生残率, Mean±S.E. (Standard error)

要 旨

種々の抗酸菌 (参考株) を生理食塩水に浮遊させ、

それらに対する NaOH の発育に及ぼす影響を調べ、以下の成績が得られた。4% および 1% NaOH による 5 分間処理では、*Mycobacterium tuberculosis* H37Rv

* From the Department of Clinical Pathology, Showa University Fujigaoka Hospital, Showa University School of Medicine, 1-30 Fujigaoka, Midori-ku, Yokohama 227 Japan.

(IID 591) は平均生残率 (Mean \pm S. E.) がそれぞれ $63 \pm 8\%$, $74 \pm 4\%$ となり, *M. kansasii* P1 は $35 \pm 12\%$, $43 \pm 8\%$, *M. scrofulaceum* (ATCC 19881) は $29 \pm 10\%$, $32 \pm 10\%$, *M. intracellulare* (ATCC 15984) は $16 \pm 4\%$, $12 \pm 6\%$, *M. fortuitum* (ATCC 6841) は 1% , $17 \pm 4\%$ であった。また, NaOH 30分間処理では, *M. tuberculosis* H37Rv はそれぞれ $45 \pm 3\%$, $55 \pm 8\%$, *M. kansasii* は $18 \pm 6\%$, $7 \pm 4\%$, *M. scrofulaceum* は $16 \pm 6\%$, $10 \pm 6\%$, *M. intracellulare* は $11 \pm 3\%$, $8 \pm 6\%$, *M. fortuitum* は 0% , $4 \pm 2\%$ であった。実験に用いたすべての抗酸菌は, NaOH による処理時間の増加とともに生残率の低下がみられた。また, 非定型抗酸菌は一般に結核菌より NaOH に対する抵抗力が弱く, また, 非定型抗酸菌でも抵抗力に著しい差がみられた。特に, *M. fortuitum* は最も強く NaOH で傷害され, 4% NaOH 10分間処理では発育不能となった。

緒 言

現在, 我国における抗酸菌の分離培養法は検体を NaOH で処理し, 小川培地に培養する方法が画一的に行なわれている¹⁾。この際の NaOH 処理は, 抗酸菌が耐アルカリ性であることを利用して検体中の雑菌を殺し, 抗酸菌だけを分離培養する目的に用いられている。また, 喀痰などの粘稠性のある検体を均等化するにも適した方法であり, 小川が1949年に発表²⁾して以来, 約35年の歴史がある。しかし, この方法でも抗酸菌は NaOH によりかなりの傷害を受けることが知られている³⁾⁻⁷⁾。これがいわゆる塗抹陽性培養陰性 (以下「塗陽培養陰」と略す) の一因であることも指摘されていることから, 抗酸菌に対し, より傷害の少ない他の分離培養法についての検討も行なわれてきた⁸⁾⁻¹⁰⁾。

近年, 結核は抗結核剤の発達により大部分は治癒し, その罹患率も非常に減少している。一方, 非定型抗酸菌 (以下 AM と略す) 症は日和見感染的であり, 例数もそれほど多くなく, まだ臨床的にも不明な点があり, その検査法についても十分な知見が得られていない。しかし, 漸次増加の傾向にあり, 検討を要するところに来ている。

今回, 我々は細菌検査室の立場から, 抗酸菌, 特に AM の分離培養法に関する検討を企て, まず病原として意義のある抗酸菌 (参考株) を用い, それらに対する NaOH 前処理の影響について定量的に検討を行ない, 若干の知見を得たので報告する。

実験方法

1) 使用菌種

使用した抗酸菌は, 以下に示すごとく, 病原的に意義のあるとされている菌種の参考株である。

Mycobacterium tuberculosis H37Rv (IID 591),

M. kansasii (P1), *M. scrofulaceum* (ATCC 19881), *M. intracellulare* (ATCC 15984), *M. fortuitum* (ATCC 6841)

2) 菌液

菌浮遊液の調製は, R型集落では水晶玉法を用い, S型集落ではそのまま菌浮遊液とした。まず, 1 mg/ml 生理食塩水菌浮遊液をつくり, 30~60分間静置後, 上層部を採取した。これを小川培地上で集落を数値として把握するために, 更に 10^{-2} ~ 10^{-5} 希釈した。小川培地上での集落数は, 5~278個であった。

3) 前処理および培養

これらの菌浮遊液に 4% または 1% NaOH を5倍量加え, 攪拌直後 (1分), 5分, 10分, 30分後に常法通り¹⁾, それぞれを2本ずつの 3% または 1% 小川培地に 0.1 ml ずつ接種し, 37°C で, 迅速発育菌は1週間, 遅発育菌は2~3週間, ヒト型菌は4週間培養した。対照としては, 同じ菌浮遊液に生理食塩水を5倍量加えたものの 0.1 ml を, 上記同様に培養した。

4) 成績の推計学的表現

抗酸菌は一般細菌と比較して均等な菌浮遊液になり難く, これがデータのばらつきを招くので, 繰り返し実験 (5~14回) を行ない, 各回の実験で算出された生残率の平均値, 標準誤差および t 検定 ($P < 0.05$) により NaOH の傷害作用の評価を行なった。

成 績

1) 4% NaOH の傷害作用

各抗酸菌を 4% NaOH により, さきに述べた時間で前処理し, 培養後, 発育した菌数を対照に対する生残率の平均値, 標準誤差, およびこれらを t 検定 ($P < 0.05$) したものを図1および表1に示した。各抗酸菌は 4% NaOH の処理時間が増加するにつれて, 生残率がかなり減少しており, その減少率は菌種により著しい差が認められた。即ち, 4% NaOH に対して最も傷害作用の少ない *M. tuberculosis* H37Rv では, 処理時間1分, 5分, 10分, 30分で, 生残率はそれぞれ $76 \pm 9\%$, $63 \pm 8\%$, $56 \pm 6\%$, $45 \pm 3\%$ となった。また, 4% NaOH により最も強い傷害作用を受けたのは *M. fortuitum* であり, 各処理時間で, 生残率はそれぞれ $1 \pm 1\%$, 1% , 0% , 0% となり, 10分以後は発育不能となった。その次に生残率の低い AM は *M. intracellulare* であり, 各処理時間で生残率はそれぞれ $20 \pm 6\%$, $16 \pm 4\%$, $12 \pm 3\%$, $11 \pm 3\%$ となった。*M. kansasii* では, それぞれ 68 ± 18 (対照に対し有意差なし, $p < 0.05$), $35 \pm 12\%$, $24 \pm 12\%$, $18 \pm 6\%$ となった。*M. scrofulaceum* では, それぞれ $47 \pm 6\%$, $29 \pm 10\%$, $23 \pm 7\%$, $16 \pm 6\%$ となった。*M. kansasii* と *M. scrofulaceum* も *M. tuberculosis* H37Rv と比較すると, 各 NaOH 処理時間における生残率は, かなりの低値を示していた (有意差あり, $P < 0.05$)。

Table 1. Bactericidal Effects of 4% NaOH Solution on the Survivals of Mycobacteria

Strains	N	Control*	% Survivals			
			1 min	5 min	10 min	30 min
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	5	104±34**	76±9	63±8	56±6	45±3
<i>M. kansasii</i>	5	47±27	68±18	35±12	24±12	18±6
<i>M. scrofulaceum</i>	5	69±44	47±6	29±10	23±7	16±6
<i>M. intracellulare</i>	8	113±55	20±6	16±4	12±3	11±3
<i>M. fortuitum</i>	13	75±24	1±1	1	0	0

Control* : Colony counts of mycobacteria (before 4% NaOH treatment)

** : Mean±S.E.

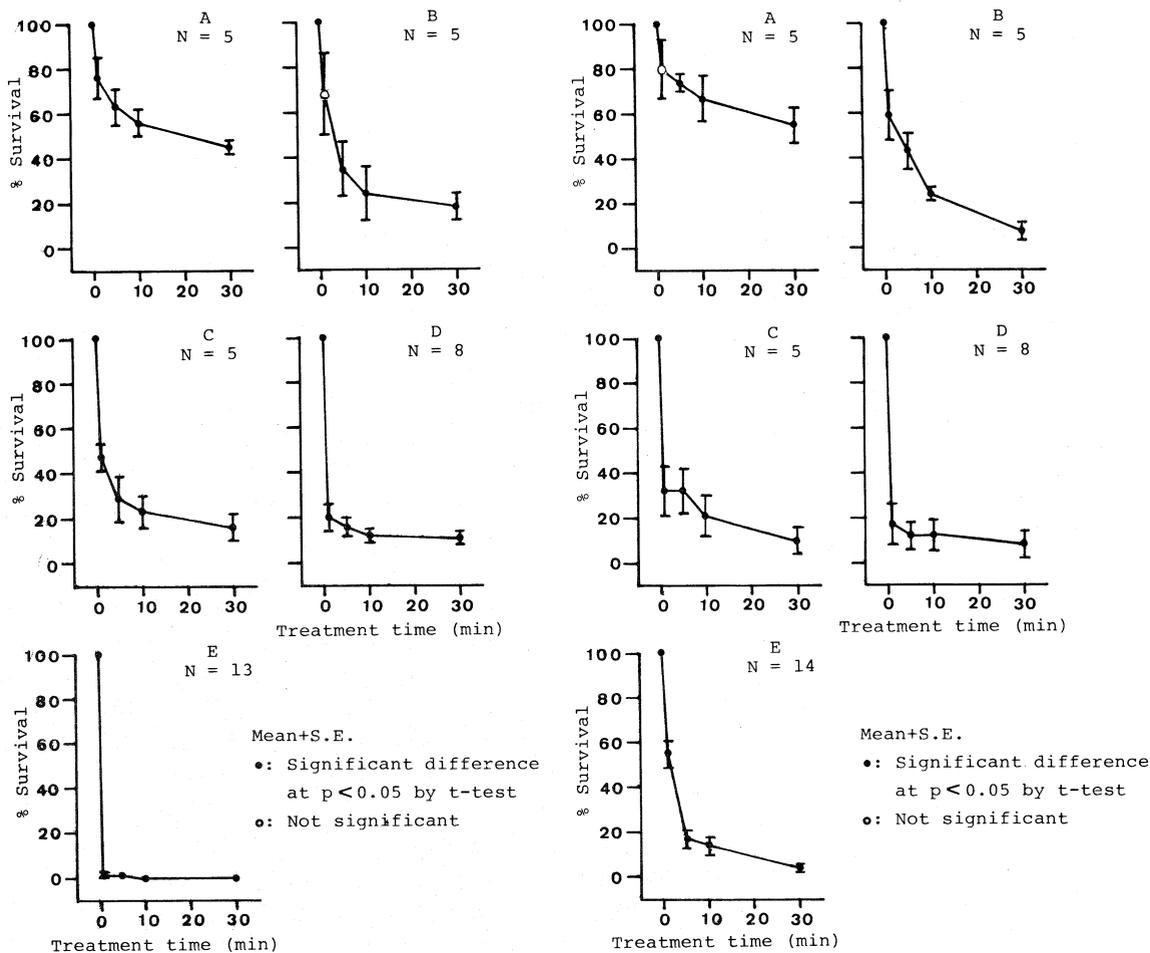


Fig. 1. Bactericidal effects of 4% NaOH solution on the survivals of mycobacteria. A: *M. tuberculosis* H37Rv, B: *M. kansasii* (I) C: *M. scrofulaceum* (II) D: *M. intracellulare* (III) E: *M. fortuitum* (IV), () : Runyon Group.

Fig. 2. Bactericidal effects of 1% NaOH solution on the survivals of mycobacteria. A: *M. tuberculosis* H37Rv, B: *M. kansasii* (I) C: *M. scrofulaceum* (II) D: *M. intracellulare* (III) E: *M. fortuitum* (IV), () : Runyon Group

Table 2. Bactericidal Effects of 1% NaOH Solution on the Survivals of Mycobacteria

Strains	N	Control*	% Survivals			
			1 min	5 min	10 min	30 min
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	5	91 ± 32**	80 ± 13	74 ± 4	67 ± 10	55 ± 8
<i>M. kansasii</i>	5	46 ± 22	59 ± 11	43 ± 8	24 ± 3	7 ± 4
<i>M. scrofulaceum</i>	5	71 ± 29	32 ± 11	32 ± 10	21 ± 9	10 ± 6
<i>M. intracellulare</i>	8	55 ± 22	17 ± 9	12 ± 6	12 ± 7	8 ± 6
<i>M. fortuitum</i>	14	77 ± 21	55 ± 6	17 ± 4	14 ± 4	4 ± 2

Control*: Colony counts of mycobacteria (before 1% NaOH treatment)

** : Mean ± S. E.

2) 1% NaOH の傷害作用

各抗酸菌を 1% NaOH で処理し、培養後集計したものを図2および表2に示した。各抗酸菌は、4% NaOH 処理のときと同様に、1% NaOH の処理時間の増加とともに生残率の減少がみられた。1% NaOH 処理に対して最も傷害の少ない抗酸菌は、4% NaOH と同様に、*M. tuberculosis* H37Rv であり、処理時間1分、5分、10分、30分で、生残率はそれぞれ80 ± 13% (対照に対して有意差なし)、74 ± 4%、67 ± 10%、55 ± 8% となった。*M. fortuitum* は4% NaOH ほどではないが、各処理時間で生残率は、それぞれ55 ± 6%、17 ± 4%、14 ± 4%、4 ± 2% となり、かなりの低値を示していた。*M. intracellulare* は、各処理時間で生残率はそれぞれ17 ± 9%、12 ± 6%、12 ± 7%、8 ± 6% となり、1% NaOH 処理を4% NaOH 処理と比較すると、有意差 (P < 0.05) はなかったが、ともに強い傷害作用を受けていた。また、*M. kansasii* は各処理時間で、生残率はそれぞれ59 ± 11%、43 ± 8%、24 ± 3%、7 ± 4% となった。*M. scrofulaceum* では、各処理時で生残率はそれぞれ32 ± 11%、32 ± 10%、21 ± 9%、10 ± 6% となった。*M. kansasii* と *M. scrofulaceum* も、1% NaOH と4% NaOH 処理を比較すると、それぞれ有意差はなく、同程度の生残率を示していた。

考 察

前述のごとく、我国における抗酸菌の分離培養法は、検体を NaOH 処理し、小川培地に接種する方法が広く普及している。この方法は、迅速、簡便、陽性率、雑菌汚染の少ないことなどの点で他法よりもすぐれた方法と言えるが¹⁶⁾、この方法でも抗酸菌は相当な傷害を受けることが知られている^{3)~6)}。また、これらの報告で、菌種により NaOH に対する抵抗性に差のあることも指摘されているが、定性的な実験が多く、しかも大量菌を用いているため、明確な抵抗性の菌種間差はでてい

ない。また、実際に行なわれている検体の前処理時間内で詳細に追求した報告は少ない⁵⁾⁶⁾。

我々は、まず、病原性の知られている菌種の参考株を選び、その培養菌を用いて NaOH の傷害作用を検討した。このときの実験条件としては、ルーチンに用いられている前処理法になるべく準じた。即ち、NaOH の濃度は結核菌検査指針¹⁾にもあるように、4% および1% とし、処理時間は30分を限度とした。臨床抗酸菌談話会の調査結果¹⁷⁾でも30分を超えるものはなく、これ以上の処理時間の観察は、臨床検査上、必要性に乏しいと考えられる。

次に使用菌量についてみると、分離培養に際し、菌種の NaOH に対する抵抗力の強弱は大量排菌ではあまり問題にならず、微量排菌のときに問題がある⁷⁾。また、菌種間の抵抗性の強弱およびその程度を知るには少量の菌を用い、数を実数で把握することが重要であると考へ、菌液を希釈し、対照が集落として数えうる範囲で NaOH 処理実験を行なった。実験に際し、抗酸菌は一般に均等浮遊液になりにくいので、菌液をつくり、30~60分間放置し、大菌塊はなるべく除去し、上清を用いた。しかし、これら上清の塗抹標本をつくり、染色してみると、なお相当大きな菌塊(約100個)が混じていたことがあった。このような菌塊内部の菌は NaOH を作用させても接触が悪く、殺菌されず、1個の集落として発育してくることが考えられる。また、NaOH で菌塊がほぐれ、それぞれが発育し、集落数を増加させることもある。このような菌液の不均一性が NaOH の殺菌力に影響を及ぼし、集落数を変動させ、データのばらつきの原因になったと考えられる。即ち、4% NaOH 処理よりも1% NaOH 処理の方が生残率が低く表現された例があったり、NaOH と接触直後で、対照より集落数が多い成績が得られたりした。このように抗酸菌の実験では明確な成績は得がたいので、数回反復実験を行ない、抵抗性の強弱を推計的に表現した。

次に、本実験で使用した菌株は継代株であり、*in vivo*

での抗酸菌とは菌体成分、特に脂質などの含有量にも違いがあると言われている¹⁸⁾。この脂質の含有量は、抗酸菌のNaOHに対する抵抗性に関係していることが知られている。したがって、この系における抗酸菌の抵抗性が、直ちに排菌直後の菌の抵抗性とは一致しがたいが、本実験が菌種によるNaOH抵抗性の強弱に関し、一つの情報を与えたものと考えている。

これらの点を考慮においた上で、抗酸菌の各成績をみると、ヒト型結核菌はNaOHに対して最も抵抗力が強かった。ヒト型結核菌とAMとをNaOH処理時間に対し、生残率をt検定で比較すると、有意差($p < 0.05$)があった。AMがヒト型結核菌よりもNaOHの傷害を受けやすいことは、他報告とも一致していた⁶⁾⁷⁾。また、AMは4%および1%NaOHによる5分間処理で、既に集落数が半数以下に減少していた(対照に対し有意差あり、 $p < 0.05$)。更に、30分間処理になると、各抗酸菌は一層生残率が低下していた。4%NaOHと1%NaOHの濃度差による同一菌種の生残率の差については、*M. fortuitum*に有意差($p < 0.05$)があったが、それ以外は差がなかった。

*M. intracellulare*はAM中最も臨床的に意義があるとされており、特にこの菌は日本のAM症の中で罹患率が一番高いこともあるので、この菌が生残率にして低値を示していたことは、分離培養に際しては、特に細心の注意を払う必要があると思われる。

この実験で、抗酸菌中、NaOHにより最も強く傷害を受けたAMは、迅速発育菌に属している*M. fortuitum*であった。この菌は4%NaOHとの10分以上の接触で発育不能となった(生残率0.4%以下)。迅速発育菌は一般的にNaOHの影響を受けやすいことが示されており³⁶⁾、我々の成績も一致していた。*M. fortuitum*症は日本において症例は極めて少なく、その臨床的意義については研究の緒についたばかりである¹⁹⁾²⁰⁾。この菌による感染症は、文献的にみて有効な化学療法剤が見当たらない状況である²¹⁾。この菌がNaOHの傷害を強く受けていることは、分離培養に際し、陽性を陰性と判定を誤る危険が多いことを意味する。

結核の化学療法が行なわれるようになってから、結核菌検査における「塗陽培養」という現象が特に注目を集め、これに関する報告がしばしばみられるようになった^{11)~14)}。しかし、この現象に関しては、化学療法以前にもいくつかの報告があった⁵⁾¹⁵⁾。即ち、「塗陽培養」の原因は薬剤の殺菌作用や薬剤による菌の活性低下によるだけでなく、検体の前処理操作も一因であることが明らかである⁵⁾¹¹⁾。

本実験は生理食塩水中の抗酸菌に対するNaOHの影響をみたものであるが、喀痰中の菌に対しても現在行なわれている方法は、かなりの傷害を与えていることが考えられる。これらの結果から、分離培養に際し、抗酸菌に対する傷害のより少ない方法を検討すること

が是非とも必要であろう。

本論文の要旨は、第55回日本結核病学会総会(大阪1980)にて発表した。

文 献

- 1) 厚生省監修：結核菌検査指針，1979.
- 2) 小川辰次他：結核菌の定量的培養法について、その1、菌浮遊液を培養する場合、結核，24：13，1949.
- 3) 山田 修：ミコバクテリウムの特異な抵抗性とそれが薬剤耐性獲得にさいして演ずる役割について、1. 硫酸および苛性ソーダに対する抵抗性，結核，34：614，1959.
- 4) 斎藤 肇：非定型抗酸菌の耐性と耐アルカリ性、この菌の分離培養法について、胸疾，6：1031，1962.
- 5) 佐藤三郎：結核菌の塗抹陽性・培養陰性に関する実験的研究(第2編)、培養前処理に用いる酸またはアルカリの影響並びに菌の培養陳旧度との関係について、神戸医大紀要，10：712，1957.
- 6) 加藤陸子：抗酸菌の分離培養における喀痰前処理法の検討、(1) 抗酸菌に及ぼすNaOHの影響：衛生検査，16：447，1967.
- 7) 工藤祐是：喀痰における抗酸菌塗抹陽性培養陰性—抗酸菌検出における諸問題に関連して、結核，56：291，1981.
- 8) Irving, Krasnaw. et al. : I. The mortality rate of tubercule bacilli in various digestion systems: Am J Clin Path, 45: 352, 1966.
- 9) H.M. Mobius, et al. : Kulturvorbehandlung von sputum mit laurylpyridinium-bromid und natriumthiosulfat, Zbl Bakt I Orig, 207: 521, 1968.
- 10) G.P. Kubica, et al. : Sputum digestion and contamination with N-acetyl-L-cystein sodium hydroxide for culture of mycobacteria, Am Rev Resp Dis, 87: 775, 1963.
- 11) 工藤祐是：塗抹陽性培養陰性菌、臨床と細菌，5：359，1978.
- 12) 国療化学療法共同研究班：Rifampinを使用した初回治療の成績、第13回国療化研初回治療研究、結核，48：235，1973.
- 13) 小川辰次：結核菌の検索上どのような変化が起こりつつあるか、日本医事新報，1590：4297，1954.
- 14) 寺山和夫：喀痰中結核菌の塗抹陽性培養陰性の現象と薬剤耐性について、結核，11：207，1956.
- 15) C.R. Smith: Comparison of direct smear, flotation-Concentration and culture in sputum examination, Am Rev Tuberc, 38: 57, 1938.
- 16) 高橋昭三：結核菌培養検査法の問題点、臨床と細菌

- 菌, 5 : 346, 1978.
- 17) 工藤祐是: 結核菌 (抗酸菌) 検出手技に関するアンケート調査報告, 第3回臨床抗酸菌談話会講演内容, 5, 1980.
 - 18) W. Segel, et al.: Biochemical differentiation of *Mycobacterium tuberculosis* grown *in vivo* and *in vitro*, *Am Rev Tubc*, 72 : 132, 1956.
 - 19) 国療非定型抗酸菌症共同研究班: *M. fortuitum* 症 (呼吸器感染例) の臨床像について, 第56回日本結核病学会抄録, 結核, 56 : 243, 1981.
 - 20) 国療非定型抗酸菌症共同研究班: 非定型抗酸菌による肺感染症に関する研究, 1979年度研究報告, 結核, 56 : 391, 1981.
 - 21) 久世文幸他: 非定型抗酸菌の諸種薬剤に対する感受性, 1. 抗結核剤に対する感受性, 結核, 49 : 151, 1974.