

原 著

抗酸菌に対する NaOH の殺菌作用

2. 人工的抗酸菌含有喀痰中の生残率

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60年8月20日

STUDIES ON BACTERICIDAL EFFECTS OF NaOH ON MYCOBACTERIA

2. Survival Rates of Mycobacteria in Sputum and in Saline
after Pretreatment with NaOH Solution

Kenji MARUMO * and Yoshio AOKI

(Received for publication August 20, 1985)

In experiments using 4% NaOH solution, it was found that with longer pretreatment time, there was a significant decrease in the survival rates of mycobacteria (*M. tuberculosis* H37Rv IID 591, *M. kansasii* P-1, *M. scrofulaceum* ATCC 19881, *M. intracellulare* ATCC 15984, *M. fortuitum* ATCC 6841) ($p < 0.05$, t-test). *M. tuberculosis* was the most resistant strain to 4% NaOH solution, and *M. fortuitum* (Runyon group IV) was the most sensitive. The survival rates of them following pretreatment with 1% NaOH solution were higher than the values obtained with 4% NaOH solution. It was considered that pretreatment with 1% NaOH solution for 30 min at 37°C was not only bactericidal to contaminating bacteria but also significantly to mycobacteria, and not so good as for 5 min treatment at room temperature with 4% NaOH solution.

It was clear in this experiment that mycobacteria in sputa were also significantly damaged by pretreatment with 4 and 1% NaOH solutions. It was considered that pretreatment with NaOH solution would be one of the causes of the "smear-positive and culture-negative" phenomenon, so that consequently a misdiagnosis of mycobacteriosis might be made. Therefore, new methods to replace the pretreatment with NaOH solutions should be investigated.

Key words : Bactericidal effect, Pretreatment with NaOH solution, Mycobacteria, Survival rate, "Smear-positive and culture-negative"

キーワード : 殺菌作用, NaOH 前処理, 抗酸菌, 生残率, 「塗抹陽性培養陰性」

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

緒言

前報¹⁾で生理食塩水に浮遊させた抗酸菌に対し、NaOHの影響を検討した結果、抗酸菌もかなりの傷害を受け、特にそれは菌種により差があり、非定型抗酸菌(AMと略す)はヒト型結核菌より抵抗性が弱く、このうちRunyon group IVに属する*M. fortuitum*が最も強い傷害を受け、4% NaOH 5分処理で99%近くが死滅することを明らかにした。

AMは本来病原性の弱い菌であり、AM症の頻度は結核症と比較して少ない(新規AM症患者/新規肺結核症患者×100=3.3%)²⁾が、有効な化学療法剤に乏しく、治療しがたいことから、この菌の早期検出、感染の有無、化学療法などについての研究が望まれている³⁾。臨床検査室の側では抗酸菌をチール・ネルゼン染色により検出するとともに、可及的速やかに病原抗酸菌を分離し、同定することが責務であろう。これには分離培養にさいし、抗酸菌には傷害が可及的に少なく雑菌のみを死滅させ、抗酸菌の検出率を上げることが重要である。今回の実験は実際に行なわれている分離培養法に近づけるために、喀痰に抗酸菌を混入させて人工的に抗酸菌含有喀痰をつくり、それをNaOHで処理し、検体中の抗酸菌がどの程度NaOHにより傷害を受けるかを生理食塩水菌浮遊液における傷害と比較した。なお、抗酸菌、特にR型菌は菌塊を形成していることが多いため、一般細菌と異なり菌液の均等化が困難なことから⁴⁾、実験成績がばらつき、評価が困難である。また、実際に大量排菌の場合よりも少量排菌の方が診断上問題になる⁶⁾。前報でも生残率のばらつきが大きくみられており¹⁾、今回も成績の解釈は繰り返し実験を行なったあと推計学的処理により抗酸菌の生残率を調べた。

方法

1) 菌種

前報¹⁾と同様、以下の菌種を使用した。これらは病原的に意義があるとされている菌種の参考株である。

Mycobacterium tuberculosis H37Rv IID 591, *M. kansasii* P-1, *M. scrofulaceum* ATCC 19881, *M. intracellulare* ATCC 15984, *M. fortuitum* ATCC 6841。

2) 抗酸菌含有喀痰調製法

被検菌の1mg/ml生理食塩水菌浮遊液をつくり、小川培地での集落を実数で把握するために、滅菌生理食塩水で 10^{-2} ~ 10^{-5} 希釈した。但し、菌浮遊液の調製は、S型集落ではそのままエーゼで懸濁して菌液とし、R型集落では水晶玉を用いて常法⁵⁾に従い作製し、30~60分間静置後上層部を採取した。抗酸菌含有喀痰は抗酸菌や*Pseudomonas*属を含まない膿性喀痰を臨床材料か

ら集め、ミキサーで混和し、これに希釈菌液を1/10量加え、駒込ピペットでpumpingし、充分混和し調製した。

3) NaOH前処理

この抗酸菌含有喀痰およびこれと同一濃度の生理食塩水菌浮遊液に4%または1% NaOHを5倍量加えた。攪拌均等化1.5分、5分、10分、30分後にそれぞれ3%または1%小川培地に0.1mlずつ接種し、迅速発育菌は1週間、遅発育菌は2~3週間、ヒト型結核菌は4週間37°Cで培養した。

4) 加温処理法

前述の抗酸菌含有喀痰および同一濃度の生理食塩水菌浮遊液に5倍量の1% NaOHを加え、これを恒温水槽で37°C、30分処理し、その0.1mlを前記同様に培養した。

5) 成績の推計学的評価

生残率は検体を前処理して培養したときの集落数をそれぞれの対照(NaOH処理前)の集落数で割り、算出した。各実験で小川培地は2本ずつ用い、この実験を各抗酸菌に対して5~7回行ない、その平均値、標準誤差およびt検定($p < 0.05$)から成績の評価を行なった。

成績

1) 喀痰中および生理食塩水中の抗酸菌に対する4% NaOHの影響

喀痰中および生理食塩水中の抗酸菌を4% NaOHにより前処理し、培養後、発育した集落数から生残率の平均値、標準誤差、更にこれらの値をt検定($p < 0.05$)したものを図1に示した。また、各処理時間における平均集落数を表1に示した。両者における各抗酸菌はNaOHの処理時間が長くな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差が認められた。また、このときの各抗酸菌の生残率を比較すると、*M. tuberculosis*は喀痰中の方が生理食塩水中よりも集落数が多く、これは推計学的にも有意差が認められた。一方、AMでは両者の間に集落数には差があったが、推計学的にみて有意差が認められなかった。本実験で使用した抗酸菌中、NaOHにより最も強く傷害を受けた菌は*M. fortuitum*であり、4% NaOH 5分処理による生残率は両条件下でそれぞれ $1.1 \pm 0.5\%$ と $0.5 \pm 0.2\%$ であった。その次に生残率の低いAMは*M. intracellulare*であり、 $21.2 \pm 9.4\%$ と $15.0 \pm 7.0\%$ であった。*M. kansasii*では $39.4 \pm 9.7\%$ と $11.3 \pm 3.2\%$ であり、*M. scrofulaceum*では $63.3 \pm 12.6\%$ と $43.7 \pm 17.2\%$ であった。5分処理以外の他の時間(10分、30分)でも同様の傾向が得られた。以上のことから、AMは*M. tuberculosis*と比較して喀痰中でも4% NaOHによる傷害を強く受けていた。

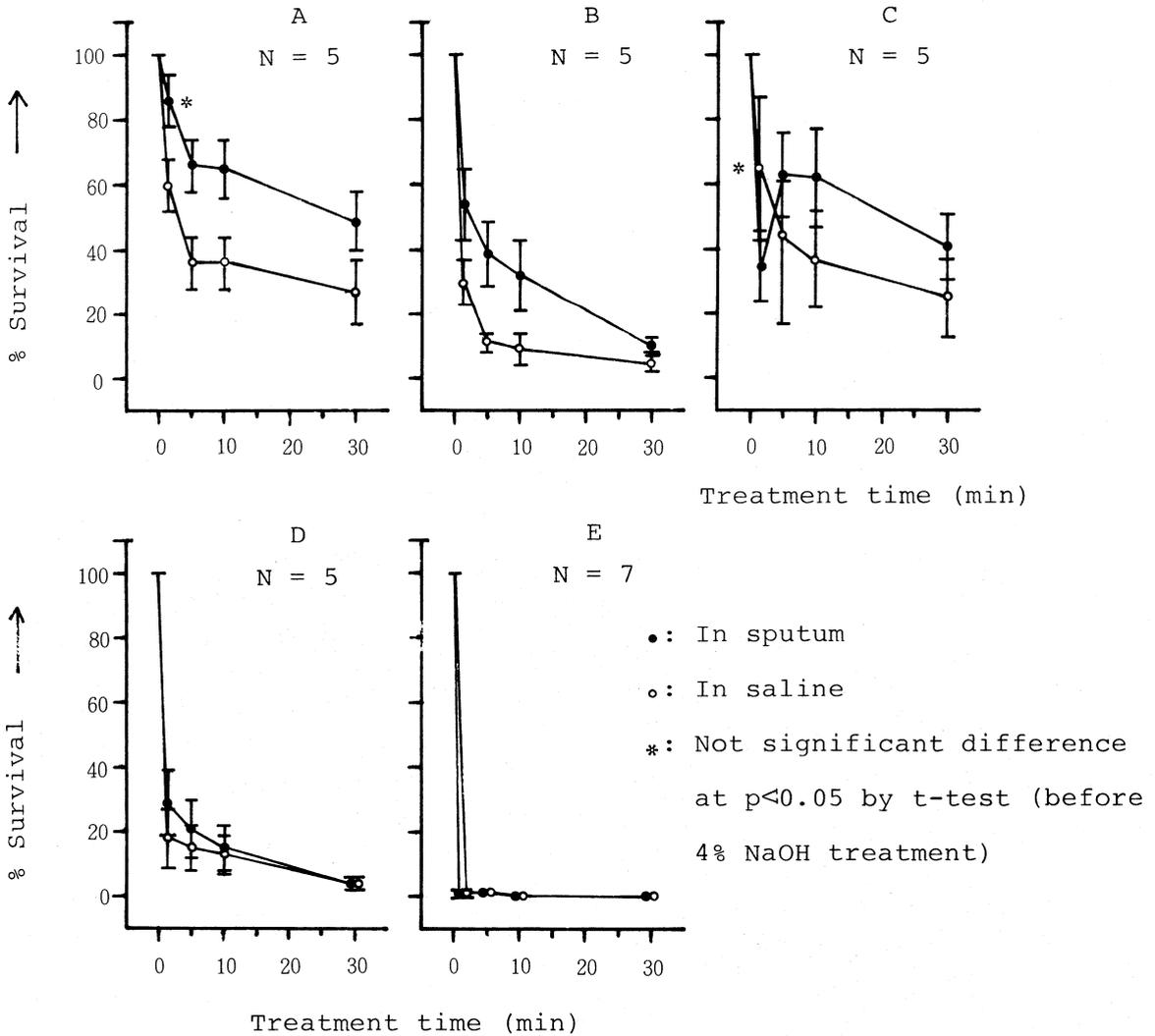


Fig. 1 Bactericidal effects of 4% NaOH solution on the survivals of mycobacteria. A: *M. tuberculosis* H37 Rv, B: *M. kansasii* (I), C: *M. scrofulaceum* (II), D: *M. intracellulare* (III), E: *M. fortuitum* (IV), (): Runyon group.

2) 喀痰中および生理食塩水中の抗酸菌に対する1% NaOHの影響

1% NaOH処理による成績を上記と同様に集計し、図2、表2に示した。この場合も処理時間が長くなるにつれて生残率の減少がみられた。更に、このときの両者の生残率を比較すると、*M. tuberculosis* (5分処理を除く)と*M. fortuitum* (10分処理を除く)では有意差が認められた ($p < 0.05$) が、*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare* では有意差が認められなかった ($P < 0.05$)。 *M. fortuitum* は1% NaOH

処理では5分処理において、それぞれ $66.5 \pm 15.7\%$ と $17.3 \pm 5.3\%$ の生残率であり、これらの間には有意差が認められた。本実験でNaOHにより最も強く傷害を受けた菌は4% NaOH処理では*M. fortuitum*であったのに対し、1% NaOH処理では*M. kansasii*, *M. scrofulaceum*, *M. intracellulare*であり、その程度はほぼ同じくらいであった。喀痰中の*M. tuberculosis*は5分処理までは有意差が認められなかったが、10分処理以後は有意差が認められた。AMとの比較ではNaOHに対する抵抗性がより強かった。各抗酸菌は喀痰中また

Table 1 Means of Colony Counts of Mycobacteria after 4% NaOH Treatment

Strains	n	* Control	4% NaOH treatment time				
			1.5	5	10	30 min	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	5	SP	135.5	116.1	89.6	88.1	65.7
		NSP		81.2	49.2	48.2	36.4
<i>M. kansasii</i>	5	SP	95.4	51.6	37.6	30.1	9.2
		NSP		26.7	10.8	8.7	4.0
<i>M. scrofulaceum</i>	5	SP	141.8	48.9	89.8	88.5	57.7
		NSP		91.9	62.0	52.0	35.7
<i>M. intracellulare</i>	5	SP	214.3	61.3	45.4	32.4	8.1
		NSP		38.4	32.1	26.8	7.5
<i>M. fortuitum</i>	7	SP	90.9	1.2	1.0	0.3	0.1
		NSP		1.1	0.5	0.0	0.0

* Control: means of colony counts of mycobacteria before 4% NaOH treatment
SP: in sputum NSP: in saline

は生理食塩水中を問わず、当然のことながら1% NaOH 処理の方が4% NaOH 処理よりも傷害が少なくなる傾向があった。

3) 喀痰中の加温処理と4% NaOH 5分処理による生残率の比較

加温処理(1% NaOH, 37°C, 30分)と4% NaOH 5分処理における各抗酸菌の生残率を表3に示した。*M. kansasii*と*M. scrofulaceum*は4% NaOH 5分処理の方が有意に生残率が高かったが、*M. fortuitum*は加温処理の方が有意に生残率が高かった。*M. tuberculosis*は生残率がそれぞれ46.9±7.1%と66.1±7.6%になったが、危険率5%では有意差が認められなかった(危険率10%では有意差が認められた)。*M. intracellulare*はともに20%代の低い生残率を示しており、両方法ともに強い傷害を与えていた。

また、加温処理に関してはすべての抗酸菌は対照(NaOH処理前)に対し、生残率の低下が有意に認められたが、喀痰中と生理食塩水中との間で有意差は認められなかった。

考 察

実際の喀痰中の抗酸菌はNaOHの殺菌作用に対し、生理食塩水中よりも保護されていることが考えられるので、この実験を行なった。我々の人工的抗酸菌含有喀痰は喀痰に抗酸菌を混入させたもので、患者喀痰に含まれる抗酸菌の状態と同じであるとは考えがたい。さらに、使用した抗酸菌は膿性が中等度のものであったが、それでも喀痰の状態はさまざまであり、同一条件下の喀痰ではない。即ち、我々の実験設定はあくまでも培養菌を用いたモデル実験であるが、実際の分離培養において抗酸菌もNaOHにより相当強い傷害を受けることは確実に

あろう。

本実験において、4%および1% NaOH 処理により抗酸菌は喀痰中でも処理時間の延長とともに傷害を強く受け、生菌数が減少する傾向がみられた。また、1% NaOH 処理では*M. tuberculosis*および*M. fortuitum*は喀痰中の菌の生残率が生理食塩水中のものと比較して有意に高かったが、4% NaOH 処理では*M. fortuitum*はその差が有意でなく、喀痰の有無にかかわらず強い傷害を受けていた。実験前、喀痰中の抗酸菌はムコ多糖体などの影響により、生理食塩水中と比較して生残率の上昇が考えられたが、この実験において4% NaOH 処理では*M. tuberculosis*のみが、1% NaOH 処理では*M. tuberculosis*と*M. fortuitum*に有意差が認められ、*M. kansasii*、*M. scrofulaceum*、*M. intracellulare*では有意差が認められなかった。これら後者の菌は小川培地上でS型集落を形成する抗酸菌であり、先の2菌種がR型菌であることから、抵抗性は菌塊形成の有無、細胞壁のWaxや脂肪酸含有量などに関連していると考えられる。

抗酸菌は喀痰中でも生理食塩水中と大差なくNaOH 処理直後から減少し続け、時間が長くなればなるほど生残率は低下していた。特にAM群は*M. tuberculosis*よりもNaOHの傷害を受けており、菌数の少ない場合には全滅し、「塗抹陽性培養陰性」(「塗陽培陰」と略す)となることも考えられる。したがって、喀痰などの雑菌を含有している検体から抗酸菌の分離培養を行なうさい、NaOHによる雑菌処理の時間はあまり長くない方がよいことが本実験でも明らかになった。

しかし、*Pseudomonas*属などが患者検体中に存在していると、この菌は一般細菌よりもNaOHに強く抵抗し、死滅せずに生残しており、NaOHがKH₂PO₄

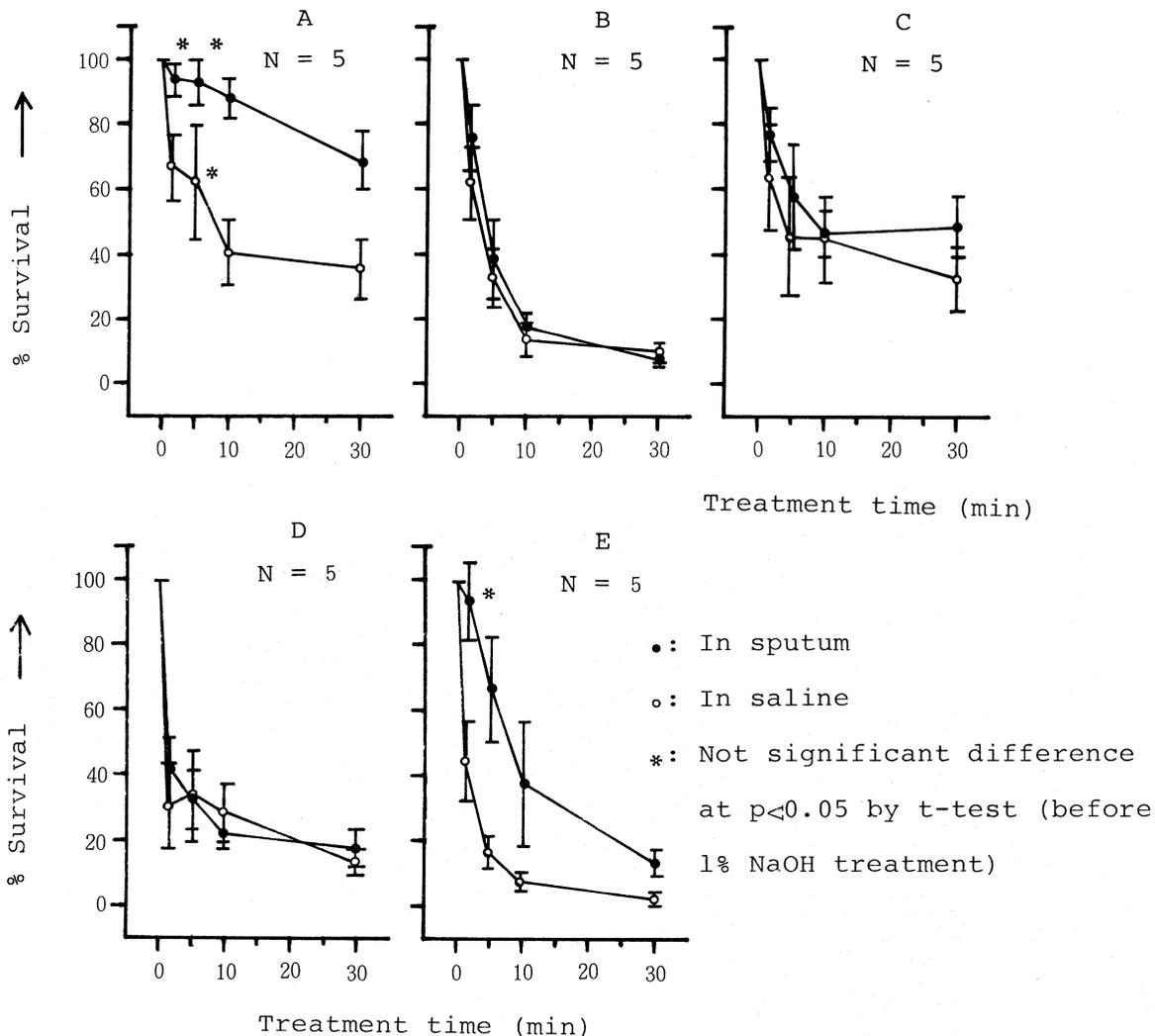


Fig. 2 Bactericidal effects of 1% NaOH solution on the survivals of mycobacteria. A: *M. tuberculosis* H37Rv, B: *M. kansasii* (I), C: *M. scrofulaceum* (II), D: *M. intracellulare* (III), E: *M. fortuitum* (IV), (): Runyon group.

や卵蛋白などで中和されると発育し、その protease の作用で培地をくずし、抗酸菌の増殖を不能にする。これを防止する方法としては尿酸処理法⁷⁾や培地に抗 *Pseudomonas* 薬剤を添加する方法など⁸⁾⁹⁾が挙げられるが、*Pseudomonas* 属が検体中に混入していることが予知できずに検体を NaOH で処理し、小川培地に接種することが日常検査では多い。1983年の1年間における本院での雑菌混入率は10.1%であり、そのうち *Pseudomonas* 属は全体の24.4% (同一患者検体を含む) 検出されており、最も多かった。検査不能の原因となった汚染菌

のうちでは、*Pseudomonas* 属が76.7% (同一患者検体を含む) を占めており、他菌と比較して圧倒的多数を占めていた。

次に加温処理について考察すると、4% NaOH 処理の場合、前処理時間は一般に5~15分くらいが多いことから¹⁰⁾、その5分処理を加温処理の場合と比較した。その結果、加温処理での抗酸菌の生残率はそれと同程度かそれ以下になった。更に、加温処理は4% NaOH 処理法と比較すると操作が煩雑であることから、我々は日常検査においてこの方法を採用することは難しい。

Table 2 Means of Colony Counts of Mycobacteria after 1% NaOH Treatment

Strains	n	* Control	1% NaOH treatment time				
			1.5	5	10	30 min	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv	5	SP	126.6	118.4	117.5	110.9	87.1
		NSP		84.7	78.7	52.4	45.4
<i>M. kansasii</i>	5	SP	113.8	86.4	44.0	20.6	8.5
		NSP		70.0	37.2	15.9	10.9
<i>M. scrofulaceum</i>	5	SP	94.4	72.9	54.8	43.9	46.4
		NSP		60.1	43.2	42.2	31.3
<i>M. intracellulare</i>	5	SP	165.9	69.3	53.9	37.3	30.5
		NSP		52.1	55.6	47.6	22.4
<i>M. fortuitum</i>	6	SP	78.1	73.3	51.9	29.7	10.6
		NSP		34.8	13.5	6.6	2.2

Notes: the same as Table 1

Table 3 Comparison of Survivals of Mycobacteria in Sputa between 1% NaOH Treatment at 37°C for 30 min and 4% NaOH Treatment at Room Temperature for 5 min

Strains	1% NaOH	4% NaOH	Signifi. p<0.05
	37°C 30 min	5 min	
<i>M. tuber.</i> H37Rv	46.9 ± 7.1	66.1 ± 7.6	-
<i>M. kansasii</i>	4.2 ± 3.2	39.4 ± 9.7	+
<i>M. scrofulaceum</i>	18.2 ± 4.2	63.3 ± 12.6	+
<i>M. intracellulare</i>	27.4 ± 11.8	21.2 ± 9.4	-
<i>M. fortuitum</i>	8.0 ± 2.3	1.1 ± 0.5	+

-: not significant difference at p<0.05

+: significant difference at p<0.05

unit: %

また、NaOH濃度を4%から1%に低下することで抗酸菌の生残率は増加したが、その反面、雑菌汚染も多くなった。更に、加温処理は喀痰の均等化と汚染菌に対する殺菌効果を増強したが、同時に抗酸菌の生残率の低下をも招くことになった。

次にNaOH処理による「塗陽培陰」の可能性について触れると、今回の実験で喀痰中の抗酸菌は菌種によりNaOHに対する抵抗性に差異があるが、4%でも1%でも対照(NaOH処理前)と比較して生残率が減少している。しかも、NaOHとの接触時間が長くなればなるほど傷害を強く受けている。即ち、このことが「塗陽培陰」の原因になることは明らかである。また、Rifampicinをはじめとする化学療法剤の投与中における抗酸菌と「塗陽培陰」との関連性については報告^{11)~13)}があるが、化学療法剤によって活性が低下した抗酸菌はNaOHによって更に死滅しやすくなることが考えられる。したがって、化学療法中の「塗陽培陰」は化学療法剤の殺菌効果ばかりでなく、NaOH処理も一因となり

うることは確実であろう。

喀痰、尿、糞便などの雑菌を含有している検体からの抗酸菌の分離培養には、酸、アルカリなどの前処理は必須であり、これなくしてはほとんどの抗酸菌は分離培養することができない。しかし、抗酸菌は酸、アルカリに抵抗性があるとはいうものの限度があり、現行法の4% NaOH 5分処理では、喀痰中の*M. tuberculosis*は生残率が66.1±7.6%、AM中、我国で分離頻度の多い*M. intracellulare*は生残率が21.2±9.4%、*M. fortuitum*に至っては1.1±0.5%という結果を得た。「塗陽培陰」では抗酸菌症の確定診断はできず、どうしても生菌の培養が必要である。しかも、診断基準としては集落数を考慮した上で行なわれているが、前処理の方法の違いや分離菌種によってこの基準を変える必要がある。

AM症は最近多様化の傾向にあると言われている²⁾。したがって、現行法を今一度振り返ってみる必要があると考える。

本論文の要旨は第55回日本結核病学会総会（大阪，1980）と第27回日本臨床病理学会総会（奈良，1980）で発表した。

参考文献

- 1) 丸茂健治，青木良雄：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，結核，58：515，1983.
- 2) 国療非定型抗酸菌症共同研究班：日本における非定型抗酸菌症の研究，結核，58：339，1983.
- 3) 下出久雄：第54回シンポジウム，非定型抗酸菌症の諸問題，結核，54：535，1980.
- 4) 佐藤直行：接種菌量と結核菌集落数の関係，国立予研年報，29：163，1976，
- 5) 厚生省監修：結核菌検査指針，1979.
- 6) 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.
- 7) Lennette, E.H.: Manual of Clinical Microbiology, 3rd ed., Washington D.C : American Society for Microbiology, 1980.
- 8) 丸茂健治：抗酸菌分離培地作製の試み，1．非定型抗酸菌IV群について，臨床病理，29（補冊）：276，1981.
- 9) Rothlanf, M. V. : Isolation of Mycobacteria from Undecontaminated Specimens with Selective 7H10 Medium J Clin Microbiol, 13 : 76, 1981.
- 10) 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内容，5，1980.
- 11) 国療化学療法研究班：Rifampicin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.
- 12) 東村道雄：塗抹陽性培養陰性結核菌の成因および臨床的意義に関する研究，結核，59：451，1984.
- 13) 青柳昭雄：塗抹陽性培養陰性結核菌，結核，59：531，1984.