

塗抹陽性肺結核における安静呼気エアゾル中の結核菌について

川田 博 山里 将也 篠沢 陽子 鈴木喜久雄
大谷すみれ 根本 逸夫 宮入 守

要旨:〔目的〕肺結核の感染源は、咳嗽時のエアゾルが大気中で瞬時に乾燥した飛沫核と考えられている。一方、健常者の安静呼気中にもエアゾルは存在する。しかしながら、肺結核患者の安静換気時の呼気中に、結核菌を含むエアゾルが含まれているか否かを検討した報告はみられていない。今回塗抹陽性肺結核の安静呼気エアゾル中の結核菌について検討した。〔方法〕事前に基礎的検討を行い、蒸留水の結核菌浮遊液は、生理食塩水の結核菌浮遊液よりも遠心操作後の集菌効率が優れていることを確認した。そこで肺結核患者の安静呼気を30分間蒸留水にくぐらせ“呼気洗浄液”を作成し、遠心後の底部を検体とした。さらに10分間安静呼気を呼気凝縮器に通し、安静呼気凝縮液を採取した。24例の塗抹陽性肺結核患者を対象に、呼気洗浄液20検体および呼気凝縮液24検体の結核菌を検討した。〔結果と考察〕いずれの検体においても、塗抹、培養、結核菌同定DNAはすべて陰性であった。肺結核患者の呼吸運動に由来する安静呼気エアゾルが感染源となる可能性は低いと考えられた。
キーワード:疾患の伝染、空気感染と微生物学、感染性、伝染性疾患の制御、肺結核

はじめに

肺結核の感染は、吸入感染が原因であることは疑いのない事実である。吸入感染は、塵埃感染、飛沫感染、飛沫核感染(空気感染)の3種の感染様式が考えられるが、現在肺結核は飛沫核感染によると考えられている¹⁾。飛沫は、咳嗽時に空気中に放出されるエアゾルのことであるが、瞬時に乾燥し、より小さな飛沫核となり空気中を漂う。5 μ m以上の大きな飛沫核は、鼻咽頭や中枢気道に付着する割合が高く、1~5 μ m程度の小さな飛沫核は、末梢気管支に沈着する²⁾。結核菌は長さ1~4 μ m、径0.2~0.5 μ mの大きさであり、1~数個の結核菌を含んだ飛沫核が、呼吸細気管支や肺胞管へ到達後、感染が成立し、菌の増殖がおこると病巣が形成され発病に至る。

近年肺結核患者の咳嗽時に出現するエアゾルを集め、エアゾル中の結核菌を検討した報告がみられている³⁾。一方エアゾルは、咳嗽時に出現するだけでなく、通常

の換気運動の呼気中にも含まれていることが知られている^{3)~8)}。しかしながら肺結核患者の安静呼気時のエアゾル内に結核菌が含まれているか否かを検討した報告はみられていない。これらの結果を明らかにすることは、活動性肺結核症例の隔離基準、退院基準が必ずしも一定していない現状では⁹⁾、重要なことと考えられる。今回われわれは、安静換気下、呼気凝縮器を用い作成した呼気凝縮液および呼気を滅菌蒸留水に通し作成した“呼気洗浄液”中の結核菌の有無を検討したので報告する。

対 象

2006年4月より2007年3月までに、当院結核病棟に入院した塗抹陽性の活動性肺結核24例で、男性20例、女性4例、19歳~77歳、平均57.8歳である。これらの症例に対しては、事前に本研究の意義、目的、方法を説明し、承諾を得ている。

方 法

(1) 結核菌浮遊液の遠心操作に関する基礎的検討

結核菌標準菌株 (ATCC: 27294) あるいは結核菌臨床分離株を液体培地 Mycobroth に接種し, McFarland No.1 まで増菌し検討試料とした。McFarland No.1 は, 菌数 10^7 CFU (colony forming unit) /ml であり, 吸光度で調整し 0.2 に相当する¹⁰⁾。ついで滅菌蒸留水あるいは生理食塩水を用い, 試験管内で 10^6 CFU/ml から 10 CFU/ml までの 6 通りの濃度の結核菌浮遊液を作成し, 遠心後どの濃度まで底部に結核菌が検出されるかを検討した。具体的には, 結核菌浮遊液を 3,000 g で 20 分遠心し, 上清 9 ml を吸引, 底部 1 ml を混和後 MGIT 培地へ 0.5 ml 接種, 6 週間培養, 塗抹検査は 50 μ l で標本を作製し蛍光法で観察した。塗抹の表記は, 近年使用されている簡便

な記載法とした。± はガフキー 1 号, 1+ はガフキー 2 号, 2+ はガフキー 3 ~ 6 号, 3+ はガフキー 7 号以上に相当する (Table 1, 2)。

(2) 安静呼気洗浄液

50 ml アーガイル吸引キット (日本シャーウッド(株)) に 10 ml の滅菌蒸留水をいれ, 活動性肺結核患者の安静呼気を, 30 分間滅菌蒸留水にくぐらせ呼気洗浄液を作成, 3,000 g で 20 分遠心後, 下部 1 ml を残し上清を吸引した。当初 12 例は, NALC 処理を行い呼気凝縮液と同様の検査を行った。8 例 (Table 2, 症例 17 ~ 24) は, NALC 処理を省略した。検体は抗結核薬開始前あるいは投与後 1 週間以内に採取した。

(3) 安静呼気凝縮液

RTube kit (Respiratory Research Co, VA USA) を用い 10 分間安静呼気を吹き込み, 1 ~ 2 ml の呼気凝縮液を採

Table 1 Collection efficiency of *Mycobacterium tuberculosis* suspended in normal saline or distilled water after centrifugation

| <i>M. tuberculosis</i> (CFU/ml) | 10^6 | | 10^5 | | 10^4 | | 10^3 | | 10^2 | | 10 | | - | |
|------------------------------------|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|--------|----|----|----|----|----|
| | NS | DW | NS | DW | NS | DW | NS | DW | NS | DW | NS | DW | NS | DW |
| Smear | 3+ | 3+ | 3+ | 3+ | 2+ | 2+ | 1+ | 2+ | 0 | 1+ | 0 | 0 | 0 | 0 |
| Culture | | | | | + | + | + | + | - | + | - | + | - | - |
| Running days on culture | | | | | 6 | 6 | 12 | 7 | | 11 | | 11 | | |

CFU=colony forming unit ; NS=normal saline ; DW=distilled water

Table 2 Summary of microbiology data

| Subject | Sputum | | | Exhaled breath condensate | | | Water bubbled with exhaled breath | | |
|---------|--------|---------|--------|---------------------------|---------|--------|-----------------------------------|---------|--------|
| | Smear | Culture | PCR-TB | Smear | Culture | PCR-TB | Smear | Culture | PCR-TB |
| 1 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | NA | NA | NA |
| 3* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 4 | 2+ | 1W+ | + | - | - | - | NA | NA | NA |
| 5 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 6 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 7* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | NA | NA | NA |
| 8 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 9* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 10* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 11* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 12 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 13 | 1+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 14* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | NA | NA | NA |
| 15* | 1+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 16* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 17 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 18* | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 19 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 20 | 3+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 21* | 2+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 22* | 2+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 23 | 2+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |
| 24* | 2+ | 1W+ | + | - | - | - | - | - | - |

*Subjects whose samples were obtained before the initiation of tuberculosis therapy.
NA=not available ; W=week

取した。当初16例は、結核菌培養検査時に、雑菌除去目的に通常使用されるN-acetyl-L-cysteine (NALC) / NaOHで処置後、3,000 gで20分遠心、下部1 mlを検体とし、塗抹検査、MGIT培地による培養検査、結核菌同定-DNA (polymerase chain reaction TB=PCR-TB)を検査した。途上で雑菌処理の必要性がないことが判明し、8例 (Table 2, 症例17~24) は、NALC処理を省略し、凝集液そのものを用い同様の検査を行った。検体は抗結核薬開始前あるいは投与後1週間以内に採取した。

結 果

(1) 遠心操作に関する基礎的検討

結核菌標準菌株を用い遠心操作を行った結果、蒸留水浮遊液では10 CFU/mlの最終希釈濃度でも塗抹が陽性であり、培養も11日目で陽性であった。生理食塩水では 10^3 CFU/mlで塗抹が陽性であり、培養も12日目で陽性であった。しかし 10^2 CFU/ml以下の濃度では、塗抹、培養いずれも陰性であった (Table 1)。結核菌臨床分離株を用いた検討でも同様の結果を得た。以上より、呼気洗浄液は滅菌蒸留水を用い作成した。

(2) 安静呼気洗浄液

安静呼気洗浄液20検体の塗抹、培養、PCR-TBはいずれも陰性であった (Table 2)。

(3) 安静呼気凝縮液

安静呼気凝縮液24検体の塗抹、培養、PCR-TBはいずれも陰性であった (Table 2)。

考 察

結核菌の蒸留水浮遊液は、生理食塩水浮遊液にくらべ、遠心操作後の回収効率が優れていることが判明した。この理由として生理食塩水の比重は1.006であり、水と生理食塩水の比重の差のほかに、結核菌は、生理食塩水や緩衝液では、自然凝集することが原因であると考えられた。

RTubeによる呼気エアゾル採取法は、介在する器具を経由することなく、直接安静呼気を冷却筒に導き、霧状となったものをそのまま水滴として集める方法である。この方法は、安静呼気エアゾルを採取する方法として多くの文献に登場していることから、確立されている方法と考えられる。一方、安静呼気洗浄は確立された方法ではないが、今回の検討で示したごとく蒸留水による結核菌浮遊液の遠心操作による検出限界は10 CFU/mlであり、喀痰の結核菌培養陽性検出限度~100個/mlよりもすぐれていると考えられた。

Fennelly等は、Anderson粒子集積装置を用い、16例の肺結核患者を対象に、1例は自発咳嗽、15例は高張食塩水吸入による咳誘発を行い、咳嗽呼気エアゾル中の結核

菌を検討している⁹⁾。16例中4例に結核菌が培養陽性を示し、これら4例中3例は未治療例で、他の1例は耐性結核菌の症例であること、これら4例は、感受性のある抗結核薬開始後2~3週経過すると、咳嗽時出現するエアゾル中に結核菌は検出されなくなることで、残りの12例は治療途上例で、痰の塗抹あるいは培養が未だ陽性の時点でも、咳嗽時のエアゾル中に結核菌は検出されないことを報告している。

RTubeは、一方向の気流を確保する必要上、回路内にスリットが設けられている。そのため、咳嗽呼気を送り込む際抵抗が生じ、咳嗽呼気エアゾルを採取するのは困難であった。呼気洗浄では瞬時に咳嗽呼気が通り抜けてしまう問題が生じる。従って今回の方法では咳嗽呼気エアゾルを検討することは困難であった。

近年安静呼気由来の凝縮液を採取することが可能となり、COPDや気管支喘息、ARDS喫煙者等の呼気凝縮液のアラキドン酸代謝物、サイトカイン、ペプチド、アミン、過酸化物質、抗酸化物質、凝固線溶に関わる因子などのバイオマーカーが測定され、疾患との関連が検討されている¹⁰⁾。従って呼気エアゾル粒子は、単に空気中の水蒸気が粒子となったものではなく、その中には気道被覆液由来の溶解物質が含まれていると考えられる。

安静呼気エアゾルに関する報告によると、口呼吸は鼻呼吸や会話に比較し多くのエアゾルを含んでおり、咳嗽時と同程度の場合もあることが報告されている⁸⁾。そこで今回われわれは、活動性肺結核患者の口呼吸による安静呼気エアゾルを、呼気洗浄液および呼気凝縮液として集め、その中の結核菌を検討した。その結果いずれにおいても結核菌は証明されなかった。安静呼気エアゾルの起源が気道内の貯留痰であれば、結核菌が検出される症例があると推定される。今回結核菌が同定されなかった理由は、①安静換気下では気流速度が遅いため、気流の乱流発生が弱く、本来粘稠度が高い痰をエアゾル化するには不十分である可能性、②気道の乱流が生じやすい気管支分岐部にある気道被覆液が、乱流によりエアゾル化した可能性¹²⁾、③末梢気道の閉閉に伴う気流により、末梢気道被覆液がエアゾル化した可能性¹²⁾、④気道被覆液の結核菌数が、気道内痰に比較し少ない可能性、⑤エアゾルの径が1個の結核菌を包み込む程度の大きさがなく、多くが $1\mu\text{m}$ 以下である可能性、が考えられた。

以上塗抹陽性肺結核24例を対象に、安静呼気エアゾルを、呼気洗浄法および呼気凝縮法を用い採取した。いずれの検体においても塗抹、培養、結核菌同定DNAは陰性であり、肺結核患者の安静呼気エアゾルが、感染源となる可能性は低いと考えられた。

謝 辞

本研究の施行にあたり、多大な協力をしていただきました当院細菌検査室 安部桂子氏（現独立行政法人国立病院機構神奈川病院）に篤く深謝いたします。

文 献

- 1) Riley RL, Mills CC, Nyka W, et al.: Aerial dissemination of pulmonary tuberculosis: a two year study of contagion in a tuberculosis ward. *Am J Hyg.* 1959; 70: 185-196.
- 2) Riley RL, Mills CC, O'Grady F, et al.: Infectiousness of air from a tuberculosis ward. Ultraviolet irradiation of infected air: comparative infectiousness of different patients. *Am Rev Respir Dis.* 1962; 85: 511-525.
- 3) West JB: Deposition of aerosols in the lung. In: *Pulmonary Pathophysiology*, West JB, ed., The Williams & Wilkins, Baltimore, 1977; 136-140.
- 4) Fennelly KP, Martyny JW, Fulton KE, et al.: Cough-generated aerosols of *Mycobacterium tuberculosis*: a new method to study infectiousness. *Am J Respir Crit Care Med.* 2004; 169: 604-609.
- 5) Roy CJ, Milton DK: Airborne transmission of communicable infection: the elusive pathway. *N Engl J Med.* 2004; 350: 1710-1712.
- 6) Fairchild CI, Stampfer JF: Summary report: particle concentration in exhaled breath. *Am Ind Hyg Assoc J.* 1987; 48: 948-949.
- 7) Edwards DA, Man JC, Brand P, et al.: Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols. *PNAS.* 2004; 101: 17383-17388.
- 8) Papineni RS, Rosenthal FS: The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J Aerosol Med.* 1997; 10: 105-116.
- 9) 伊藤邦彦, 豊田恵美子: 欧米における結核患者の入退院基準および本邦との比較. *結核.* 2006; 81: 721-730.
- 10) 鈴木克洋, 網谷良一: 薬剤感受性検査と同定の迅速化. 「結核菌検査法の現況」. 斉藤 肇編. 日本ベクトン・ディッキンソン(株). 1997, 30-54.
- 11) Mutlu GM, Garey KW, Robbins RA, et al.: Collection and analysis of exhaled breath condensate in humans. *Am J Respir Crit Care Med.* 2001; 164: 731-737.
- 12) 川山智隆, 相澤久道: 呼気凝縮液. *呼と循.* 2006; 54: 599-606.

Original Article

EXHALED BREATH-GENERATED AEROSOLS OF *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* IN PATIENTS WITH ACTIVE PULMONARY TUBERCULOSIS DURING NORMAL BREATHING

Hiroshi KAWADA, Masaya YAMAZATO, Yoko SHINOZAWA, Kikuo SUZUKI, Sumire OTANI, Itsuo NEMOTO, and Mamoru MIYAIRI

Abstract [Objective] It has been understood that cough-generated aerosols act as an important vector for the spread of pulmonary tuberculosis. Humans commonly exhale aerosols during the normal respiration process that contain small droplets of the airway lining fluid. We aimed to determine whether aerosols exhaled by active pulmonary tuberculosis (AP-TB) patients may contain droplets with *Mycobacterium tuberculosis* (M-TB) during normal breathing.

[Methods] Preliminarily, the collection efficiency of M-TB that was suspended in normal saline or distilled water was examined after subjecting the suspension to centrifugation at 3,000 g for 20 minutes. Better collection efficiency was observed in case of M-TB suspended in distilled water than that suspended in normal saline after centrifugation. Therefore, we selected distilled water instead of normal saline to prepare the fluid that was bubbled with exhaled breath. AP-TB patients with smear positive pulmonary tuberculosis who were being treated with anti-TB drugs for less than 7 days or those before the initiation of therapy expired into a 50-ml tube containing 10 ml distilled water for 30 minutes. We also prepared an exhaled breath condensate by cooling exhaled air through the tubing apparatus.

[Results] In case of 20 AP-TB patients, the distilled water bubbled with the exhaled breath were negative for M-TB on smear, culture, and PCR (polymerase chain reaction) detection methods. The exhaled breath condensates were also negative in 24 AP-TB patients.

[Conclusion] These results suggest that exhaled breath-generated aerosols from AP-TB patients during normal breathing do not act as a vector for the spread of pulmonary tuberculosis.

Key words: Disease transmission, Air microbiology, Infectivity, Communicable disease control, Pulmonary tuberculosis

Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization South-Yokohama National Hospital

Correspondence to: Hiroshi Kawada, Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization South-Yokohama National Hospital, 2-6-1, Serigaya, Konan-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 233-8503 Japan.

(E-mail: hk79108@yahoo.co.jp)