

肺結核患者の気管内細菌叢の研究 (第1報)

千葉大学腐敗研究部 (主任 相磯教授)

鶴 田 哲 二
TETSUJI TSURUTA

(昭和32年11月14日受付)

緒 言

気管支分泌液内の細菌に就いては、肺感染症との関連に於て古くから関心が持たれてきた。特に肺結核症、或は肺炎球菌による感染症についての研究は多くの学者によつて試みられている。

最近抗生物質による化学療法の進歩に平行して気管内病巣に於ける *Mycobacterium*、或は随伴細菌の抗生物質に耐する抵抗性についても多くの研究がなされ、更に肺結核の外科的療法の際の2次感染の予防対策として汚染細菌抑制の必要がましてきたので、気管内細菌叢に関する知識が必要となるにいたつた。

Taplin (1948) は、気管内の一般好気性細菌の研究を行なつたが、1952年小川⁽⁴⁾らは肺切除を行つた結核患者の切除肺について、術後直ちに気管断端部附近の細菌学的検索を行つている。

普通寒天、血液寒天、肝水ブイヨンなどを用いて *Staphylococcus*、Gram 陽性双球菌、嫌気性桿菌などを検出している。

1953年より1954年にかけて石田⁽²⁾らは、術後肺合併症の研究をなし、上腹部手術患者の術前気管支分泌液を採取し細菌学的検索と、且つペニシリンに対する耐性検査を行つている。

1955年河盛⁽⁵⁾は肺結核の混合感染について研究をなし、気管支鏡により採取した気管分泌液内の随伴菌について述べている。随伴菌では肺炎球菌が一番多く検出されたと述べているが、これは混合感染の場合である。

同じく1955年小野、五十嵐⁽¹⁾らは、外来患者より気管支鏡を用いて採取した分泌液より一般細菌の検出を行つている。

その結果疾患の種類、抗生物質使用有無にかかわらず全般的に *Diplococcus*、*Staphylococcus*、*Streptococcus*、を多く検出している。培養基には血液寒天、肉水ブイヨンを使用し、更に *Staphylococcus* を非撰択的に選び、種々の抗生物質に対する感受性を測定した。

1955年伊藤らは、切除肺の気管内より随伴菌の検索をなしたがこの際は、検出菌の抗生物質に対する抵抗性検査は行っていない。

一般的に肺結核患者の気管分泌液内の随伴菌については、*Candida* の検出は広く行われている。併し他の随伴菌の検出はあまり行われず且つ随伴菌の抗生物質に対する抵抗性検査も同様に行われていない様である。

著者は、三春堂病院に於て35例の肺結核患者の気管内分泌液の、細菌学的検索と、Streptomycin, Terramycin, に対する抵抗性検査を行つた。本研究はなお続行中であるが、今日までに得られた成績について第1報として報告する。

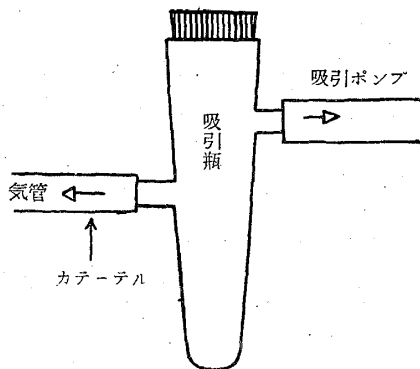
結核患者の気管分泌液内の細菌の分離蒐集

1. 蒐集材料

肺結核患者で外科的手術の適応を決定するため、気管支鏡による検査を行う際に分離材料を採取した。

喉頭内及び気管内を5% コカイン又はブチルカインで麻酔、その後喉頭鏡を使用して滅菌したネラトシカテーテルを挿入、注射器にて5 cc の滅菌蒸溜水を注入し図の如き吸引瓶に無菌的に採取した。

第1図 吸引瓶略図



気管内洗滌液は約2乃至3 cc 吸引する事が出来た。この洗滌液を原液として適当に稀釈して用いた。35例について材料を採取したが、分離培養の失敗が9例あつたので26例についての成績が得られた。

2. 分離培養法

培養基にはこれまで種々なものが用いられている。血液寒天、普通寒天、肝マブイオン、肉水ブイオン、チョコレート寒天、ヒス血清水などであるが、著者は手軽に入手出来る乾燥血漿を50 cc の蒸溜水に溶解し、此れを5% の割に1% Glucose agar の中に加えて使用した。

始めの17例に対してこれを使用したか、溶血性連鎖球菌などの検出は溶血が見られないために困難を来したので後の9例に於ては、脱線維血液を5% の割に加えたものを使用した。此の結果多数の溶血性連鎖球菌並びに、Nocardia, などを検出する事が出来た。

更に各々2例づつ食塩寒天、SS 培地、遠藤の培地を使用して菌検出を試みた。蒐集材料は滅菌食塩

水にて2倍に薄め、その1白金耳を取つて分離培養を行つた。

培養温度及び培養時間は、37°C で48時間とした。コロニーの形成の非常に少ないものは除外し、その他のものは悉くこれを釣菌した。保存には Staphylococcus, Micrococcus など特別な培地を必要としないものは、1% Glucose agar の高層に培養し、他のものは血液寒天、血漿寒天を使用した。

検出菌の種類

A. Gram 陽性球菌

1. Staphylococcus: 純培養について形態学的検査によつて同定した。1部食塩培地も使用して見た。各材料からの検出率は極めて高く、26例中本菌を分離し得たもの19例であつた。1材料から2株以上の異つた Staphylococcus を分離したもの10例あつた。分離細菌中に於ける本菌の数量的の比率については後述する。

2. 赤包集落を造る Micrococcus: 桃色乃至赤色の集落を造る Micrococcus が高率に分離された。26例中16例に認められた。これらの分離株について調べた性状検査の結果は、第1表の如くで Micrococcus cinnabareus, Micrococcus rhodochrous と同定された。本菌は数量的には優勢なものではない。

3. 黄色集落を造る Micrococcus: Staphylococcus を除いた Micrococcus の中で黄色の集落を呈する菌種が分離された例は11例あつた。これらについての詳細な菌種同定は目下継続中である。

4. Streptococcus: 血漿寒天を用いた場合は溶血が見られないし、著者が用いた乾燥血漿寒天は Streptococcus の発育が良好でなく検出率が低かつたので、人の脱線維血液を用いた所 Streptococcus が優勢に分離される様になつた。9例中7例に検出されたが例数が少いので更に分離を重ねる予定である。

5. Diplococcus: 6例に検出されたが菌種の同定は目下継続中である。

6. Tetrages- 及び Sarcina: 8例に検出された。

第1表 赤色色素産生球菌の性状検査

Strain	SE1※	MA 2	NI 7	T 19
Characters				
Pigment	Brick red	Carmin red	Cinabar red	Cinabar red
Motility	—	—	—	—
Gelatin	—	—	—	—
Litmus milk	Alkaline	Alkaline	Alkaline	Alkaline
Glucose	—	—	±	±
Lactose	—	—	—	—
Mannitol	—	—	—	—
Glycerol	—	—	—	—

※ SE1, MA 2 は *M. rhodochrous*. NI 17, T 19 は *M. cinnabareus*

B. Nocardia

血液寒天に可成り優勢に *Nocardia* が分離された。これらについては更に分離を重ねた上同定する予定である。

C. Yeast

Candida 様の菌は著者の場合はあまり分離されなかつた。更に培地をかえて検討の予定である。

D. Gram 陽性桿菌

好気性芽胞菌は屢々分離されたが2次汚染と思われる場合が多く、気管細菌として採用出来なかつたので一部の菌以外は全部除外した。

E. Gram 陰性桿菌

陰性桿菌は意外に少なく SS 寒天、遠藤培地からも稀に分離された。*Proteus vulgaris* が分離された例があつた。

以上の成績を一括して第2表に掲げた。又症例別の分離菌の一覧表を第3表に示した。これらの結果から見て矢張り *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* の順であり、赤色の *Micrococcus*, *Nocardia* 等の検出率の高い点は、従来の報告に少い所である。

第2表 各細菌の検出率(例数)

Organisms	陽 性	陰 性
<i>Staphylococcus</i>	19	7
<i>Micrococcus</i> (red)	16	10
<i>Micrococcus</i> (Yellow)	11	15
<i>Diplococcus</i>	6	20
<i>Tetragenes Sarcina</i>	9	17
<i>Streptococcus</i>	7	2
<i>Nocardia</i>	4	5
Yeast	3	23

第3表 症例別分離細菌(数字は菌種数)

菌名 症例	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
※ No. 1	1				1					
2	1								1	
3	2									
4	1		1		1					
5		1						1		
6	1	1			1					
7	1	1		1			1			
8		1		1	1					
9	1									
10					1					1
11	2	1	1		1				1	
12					2					
13		1						1		
14	2	1	1							
15	1	1	4							
16		1	3							
17			1							
18	1	3				1	4			
19	2	1	1			4	2			
20	1	1	1	2						
21	2	1		1		2	2			1
22	2	1				3	1			
23	2	2	1			1				
24	2			2						
25	2	1	1			3		1	1	
26	2		1	1	1	4			1	

A: *Staphylococcus* B: *Micrococcus* (red).
C: *Micrococcus* (Yellow). D: *Diplococcus*.
E: *Tetragenes & Sarcina*. F: *Streptococcus*
G: *Nocardia*. H: Yeast. I: Gram positive rod. J: Gram negative rod.

※ No. は症例数

石田、小野、五十嵐らの研究報告によると石田は *Streptococcus* が最も多く、その外多数のヘモフィルス、ナイセリアを検出している。小野、五十嵐らは *Diplococcus*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* の順である。又伊藤らの報告によれば糸状菌を一番多く検出している。

各細菌の数量的分布

2名の患者の材料について、平板表面に培養された集落から各細菌の数量的の関係を算定して見た。血液寒天では集落の鑑別がやり難い欠点があるので、山羊の血液より血清を分離し、これを5%の割合に用いた。その結果は血液寒天と同様に集落を形成したのでこれによつた。得られた成績は第4表の如くである。第1例は2300の集落について、第2例は2400の集落について算定した。

第4表 血液寒天平板上の細菌別集落数

Bacteria	症 例 1	症 例 2
<i>Streptococcus</i>	1,000(43)	1,200(50)
<i>Staphylococcus</i>	600(26)	600(25)
<i>Micrococcus</i> (Yellow)	200(8)	300(12)
<i>Micrococcus</i> (red)	0	100(4)
<i>Diplococcus</i>	400(17)	0
<i>Tetragenes</i>	100(4)	0
<i>Yeast</i>	0	200(8)
計	2,300	2,400

() 内は %

Streptococcus が最も多く、次いで *Staphylococcus*, *Micrococcus* が多かった。今回は *Nocardia* の検出は出来なかつた。

各分離細菌の抗生物質に対する抵抗性

分離された菌株が抗生物質に対してどのような耐性分布を示すかを見るために、*Streptomycin*, (以下 SM と略す), *Terramycin*, (OTC と略す) を使用してその耐性を検査した。*Micrococcus*, *Staphylococcus* などの如く、特殊の培地を必要としないものは1% *Glucose agar*, その他の菌は血液寒天、血清寒天を使用した。検査方法は *Streak agar method* により 37°C で 48 時間培養後判定した。此の表の数字は、各稀釈段階に於て発育せる菌株の数を表わしたもので、例えば、*Staphylococcus* 34 株のうち 12 株が 100 γ /cc で発育した事を意味する。稀釈培数は、SM では、0.1, 0.5, 1.0, 10, 100, 1000 γ /cc, OTC では、0.1, 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 10,

100 γ /cc として実験した。その結果は第5表、第6表の如くである。

第5表 分離細菌の SM に対する感受性分布
(37°C, 48 時間培養)

Organisms	mcg/ml	0	0.1	0.5	1.0	10	100	1000
<i>Staphylococcus</i>		34	34	34	29	24	12	12
<i>Micrococcus</i> (red)		20	20	20	19	19	19	10
<i>Micrococcus</i> (Yellow)		16	16	16	15	15	7	3
<i>Diplococcus</i>		8	8	8	8	7	5	0
<i>Streptococcus</i>		18	18	18	12	7	0	
<i>Nocardia</i>		10	10	10	6	3	1	0
<i>Sarcina</i> & <i>Tetragenes</i>		9	9	9	9	7	5	4
Total		115	115	115	98	82	49	19

数字は各濃度に於ける発育菌株数

第6表 分離細菌の OTC に対する感受性分布
(37°C, 48 時間培養)

Organisms	mcg/ml	0	0.1	0.5	1.0	2.5	5.0	10	50
<i>Staphylococcus</i>		34	32	13	8	8	4	2	0
<i>Micrococcus</i> (red)		20	20	13	8	4	2	1	0
<i>Micrococcus</i> (Yellow)		16	16	11	8	5	3	2	0
<i>Diplococcus</i>		8	6	2	1	0			
<i>Streptococcus</i>		18	18	2	0				
<i>Nocardia</i>		10	9	2	0				
<i>Sarcina</i> & <i>Tetragenes</i>		9	9	9	9	8	4	2	0
Total		115	110	52	34	25	13	7	0

数字は各濃度における発育菌株数

SM に対する抵抗性を見ると、桃色又は赤色の *Micrococcus* が相当高度の抵抗性を示し、その50%は1000 γ で、その90%が100 γ でも発育を阻止する事が出来なかつた。次いで *Diplococcus*, *Sarcina*, *Tetragenes*, などで一般的に球菌は高度の耐性を示した。但し *Streptococcus* は比較的抵抗性が弱く100 γ で完全に発育が阻止されている。

全被検菌株 115 株中 49 株が 100 γ 以上の耐性株で 1.0 γ 以下の感受性株が 33 株しかないのは、自然耐性株が多く含まれているにしても、SM 投与の影響を思わせるものである。

OTC に対する抵抗性について検討して見ると、50 γ で発育する株はなく、7 株が 10 γ で発育しているのみである。1.0 γ 耐性株は *Sarcina*, *Tetragenes* に多く見られた。1.0 γ 以下の感受性株は 76 株もあり、耐性の上昇は殆んど認められなかつた。

又同じ患者より分離した *Staphylococcus* の中でも夫々 SM 及び OTC に対する抵抗性が違う事が判つた。

抵抗性と抗生物質使用との関係

気管内分泌液採取までの患者の、SM 使用量は明確であるが、OTC は使用量は勿論、使用の有無も判然としないので、OTC 投与との関係は検討出来なかつた。第7表に症例別に分離細菌の薬剤耐性を結核菌の耐性度と一緒に示した。

第7表 SM 使用と気管内細菌耐性との関係

患者	分離菌	最少阻止濃度	SM 使用量
鈴○実	ブドー球菌	10 γ /cc	50 g
	結核菌	10	
山○実	ブドー球菌	10	100
	結核菌	10	
金○博	グラム陽性桿菌	>1,000	30
	四連球菌	>1,000	
	グラム陰性桿菌	>1,000	
	結核菌	10	
羽○有	ブドー球菌	100	100
	プロテウス菌	1,000	
	マイクロコッカス	>1,000	
	結核菌	>100	
田○義	マイクロコッカス	>1,000	150
	ブドー球菌	1,009	
	レンサ球菌	100	
	結核菌	>100	

本表によつて SM の使用量と耐性の関係について述べて見ると、非常に複雑である。鈴○実氏は SM 50 gr 使用している。その結核菌の耐性は 1 γ で陽性 10 γ で陰性であり、検出菌の *Staphylococcus* も 10 γ で同様に阻止されている。山○実氏では使用した SM は 100 gr の多量であるに拘らず、結核菌では 10 γ 、検出菌 *Staphylococcus* も同様に 10 γ で阻止されている。又他方金○博氏は、SM 30 gr しか使用しないが、結核菌 10 γ で阻止される感受性菌であるのに、検出菌は 1000 γ 以上の耐性菌であつた。

羽○有二、田○義高両氏の場合は、共に SM を 100 gr 以上使用し、その結核菌も検出菌も高度の耐性を示している。即ち両者共に耐性菌であつた。以上より見ると前2者では、全く抗性剤の影響がない

様に思われる。金○博氏の場合は、結核菌が感受性を示すのに分離菌が耐性を示し、その解釈が全くむづかしい。後の2者について見ると、多量に SM を使用し、且結核菌にも検出菌にも同様な耐性が見られた事は、抗生剤使用が相当強く影響している様に見られる。尤も結核菌の耐性獲得と、抗生剤の使用との関連については、喀痰について耐性検査が行われる限りに於て、すでに多くの人によつて指摘されている様に論議の余地が多い。結核患者の病巣の性状、例えば、巨大空洞を持つたものと、乾酪性病巣を持つたものでは、同様に SM を使用しても前者の方が、遙かに耐性を獲得し安いという事、SM と併用する抗結核菌剤の種類、などによつて影響されるからである。

更に検出菌のうち球菌類は一般的に SM に対しては抵抗性が強い事より、菌本来の抵抗性であるか、或は抗生物質投与による耐性の獲得であるか判然としない。これに対しては、健康人の気管内分泌液を採取し、同一菌株を分離し、それを対照にして実験したデータと比較しなければならない。何等かの機会に材料を得て実験した上で、改めて報告する予定である。

考 按

気管内細菌叢が、*Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Diplococcus* 等の球菌類を主体として構成され、*Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Streptomyces*, *Nocardia*, *Yeast* 等がこれに参加していることは、先人の報告を総合することによつて理解される。研究は総ての場合、肺感染症に関連して行われているので、気管内細菌叢の姿は常に、その疾患の検査時の状況の下に於けるものであることを注意しなければならない。

又研究者が、ある細菌を主たる目的として検索することもあり、用いた培養基が或る特定の菌が除外される様な性質のものであることもあるであろう。

従つて気管内細菌叢は、腸内細菌叢の如くには明確になつていないとは思えない。著者は、血漿寒天、血液寒天を用い、好気性菌のみを対象とし且つ所謂雑菌と思われる菌群に、特に重点を置く立場で検索をすすめた。その結果、*Micrococcus rhodochrous*, *Micrococcus cinnabareus*, の様な赤い色素を産生する球菌が常に分離されることを知つた。又人の血液を用いた場合、*Nocardia* が優勢に分離される様な症例が少なくない事を知ることが出来た。

Streptococcus, *Staphylococcus* 等が、優勢を

占めることについては諸家の成績と一致しており、特に論議の余地はない。Sarcina, Tetrageses などが気管内から分離されることについても、記載が多いので当然のことと思われる。

Yeast, 特に Candida については、著者の分離法では充分でないで、極めて少数のものしか認められなかつた。Garam 陰性桿菌類についても注意して分離したが、ごく少数しか捕えられなかつた。慢性結核患者の気管内細菌の様相が、健康人のそれとどの様に異っているかについては、改めて検討したい。

抗生物質特に Streptomycin の長期投与を受けた患者の、気管内細菌が、結核菌を含めてどの程度、薬剤の影響下で耐性を獲得しているかの点は興味のある所で、すでに諸家によつて検討され又されつつある。只多くの場合、の対象となる細菌は、Mycobacterium, Streptococcus, Staphylococcus であつて全菌叢について行われた報告は少い。

著者の成績は、まだ部分的であつて検討を要する問題が少なくないが、Streptomycin の影響でどの程度耐性に変化を来しているかについては、その判定も慎重にしなければならないと思つている。

総 括

著者は、肺結核患者 26 例について、その気管内分泌液を採取し、細菌学的検索を行うと同時に、抗生物質に対する抵抗性を研究した。此の成績を総括するとおおむね次の如くである。

1. 分離培地としては、血漿寒天、血液寒天を使用した。血漿寒天では Streptococcus の検出が不便であつたので、後には、血液寒天を主として使用した。その外食塩寒天、SS 培地、遠藤培地も使用して見た。

2. 検出菌はその検出率の高い順に列挙すると、Staphylococcus, Micrococcus, Streptococcus であり、外に Sarcina, Tetrageses, Nocardia, Yeast などであつた。Micrococcus の中で、赤い色素を産生する *M. rhodochrous*, *M. cinnabareus* などが高い検出率を示した。又人の血液を用いた培地で、Nocardia が優勢に分離されたことも屢々あつた。

3. 山羊血清寒天平板上に発育した集落の内、数量的比率は、Streptococcus 43～50%, Staphylococcus 25～26%, 黄色の Micrococcus 8～12%, 赤色の Micrococcus 4%, Tetrageses 4%, その他となつている。

4. 分離細菌の抗生剤耐性

Streptomycin に対する耐性分布を見ると、赤色の Micrococcus, Diplococcus, Sarcina, Tetrageses などは、一般に抵抗性が強く、耐性菌が認められた。Streptococcus は割に感受性が強い様な成績であつた。全般的に見て被検菌株 115 株中、1000 γ /cc 耐性株は 19 株、100 γ /cc 耐性株は 49 株あり、1.0 γ /cc 以下の感受性株は 33 株であつた。

Terramycin に対しては、一般的に感受性が高く、耐性株は認められなかつたが、Sarcina, Tetrageses は抵抗性が強かつた。

5. 抗生物質投与の影響

Streptomycin 投与が、分離細菌の耐性化に影響があつたか、否かについては、著者の成績は複雑であつて、結論を得るに至らなかつた。今後更に検討を加えて考察したい。

稿を終るにのぞみ、終始御懇篤なる御指導並びに御校閲の労を賜つた恩師相磯教授に深謝すると共に種々研究の便宜をはかつていただいた三春堂病院長藤崎浩文氏、並びに事務長小橋凡子氏に謝意を表し、又研究所各位の御厚情を感謝する。

文 献

- 1) 小野讓・五十嵐真: 日気管食道会報, **6**, (1) 48 (1955)
 - 2) 石田正統: 日外誌, 54回 713 (1953)
 - 3) 伊藤忠雄: 日臨結核, **14**, (7), 612 (1955)
 - 4) 小川敏雄: 最新医学, **7**, (7) (1952)
 - 5) 河盛勇造: 日臨結核, **14**, (2), 132 (1955)
 - 6) 赤塚正平: 腐研報, **4**, 58 (1951)
 - 7) **Bergey**: Manual of bacteriology (1949)
-