

[原 著]

百日咳菌分離培養のための市販搬送容器内における生菌数の変動

岡田潤平・小松 方・田中裕人・加藤貴代子・村上貴美佳

藤原恵夢・松岡宏治・前出卓也

ファルコバイオシステムズ総合研究所検査三課

(平成 22 年 11 月 7 日受付, 平成 23 年 1 月 26 日受理)

Bordetella pertussis の検体搬送時に使用する輸送容器内での生菌数の保存性について検討を行った。以下 5 種類の搬送綿棒, ①シードスワブ 1 号 (栄研化学), ②シードスワブ 3 号 (栄研化学), ③カルチャースワブ プラス シングル (フィルム/フィルム, BD), ④カルチャースワブ EZ(BD), ⑤メンティップ病院用綿棒 1P1504 (日本綿棒) を選択した。 *B. pertussis* ATCC9797 を生理食塩水で McFarland No. 1 の 1/2 に調整。これに綿棒を浸し搬送容器に収納, 室温で保存した。ボルデテラ CFDN 培地 (日研生物) で時間ごとに生菌数をカウントした。 *B. pertussis* ATCC9797 の菌液調整直後の生理食塩水中の生菌数濃度を 100% としたとき, 綿棒を菌液に浸した直後の各種綿棒への 1 ml あたりの生菌数の回収率は 3.2~13.5% といずれもわずかであった。すべての綿棒は保存とともに生菌数の減少を認めたが, 室温保存 24 時間時点の生菌数 (%) は, それぞれ①65.0%, ②55.0%, ③25.0%, ④70.3, および⑤0% であり, 特に減少率が著しかったのは③および⑤であった。以上のことから, 綿棒を使用した方法は生菌数の回収率が悪く, かつ綿棒の種類の違いによって保存による影響に差を認めることが明らかとなった。

Key words: 輸送培地, 百日咳, *Bordetella pertussis*, 分離培養

序 文

2008 年は感染症法が施行されてから過去最大の百日咳の流行が見られた。本感染症の診断は血清学的検査法, 分離培養法および PCR を用いた方法がある。血清学的検査法は抗体価上昇まで時間を要するためすぐさま確定診断には用いられないし, 野生株を用いた直接細菌凝集法のため非特異的反応が回避できない。PCR は感度, 特異度も高く迅速性も優れているため有用性が高いが, コストの問題や特殊な機器が必要であることから限られた施設のみでの実施となっている。一方, 分離培養法は古くから実施されており, 培養時間に数日の時間を必要とするが手技は簡便であることから, 今もなお多くの検査室で実施されている方

法である。American Society for Microbiology (ASM) の微生物検査ガイドライン¹⁾には, *Bordetella pertussis* 分離培養における検体採取は急性期に鼻咽頭洗浄や鼻咽頭吸引による採取法が推奨されている。しかし, サンプルング方法の簡便性から市販搬送用綿棒による直接採取法で検査を実施する施設も少なくない。現在わが国に流通している市販搬送用綿棒は輸送培地としてアミーズ培地やキャリーブリア培地を含有しており, 栄養要求の厳しい菌についても生菌数の安定性は高いことが知られている^{2~4)}。一方で, 綿棒の材質によってはこれに含まれる脂肪酸が *B. pertussis* に対して有害に作用する事が知られている^{5,6)}。ASM ガイドライン¹⁾は本菌分離のために使用する綿棒についてレーヨン製やダクロン製綿棒の使用を控えるよう勧告している。今回われわれは, 各種綿棒における *B. pertussis* の生菌数の保持性, および綿棒内の脂肪酸含有量について分析を行い, 分離培養時における市販綿棒使用の妥当性について考察を行ったので報告する。

著者連絡先: (〒613-0036) 京都府久世郡久御山町田井西
荒見 17-1
ファルコバイオシステムズ総合研究所検査
三課
岡田潤平
TEL: 0774-46-1073
FAX: 0774-46-0097
E-mail: j-okada@mail.falco.co.jp

材料と方法

5種類の市販綿棒を選抜した。すなわち、シードスワブ1号(栄研化学, キャリーブレア培地入り, レーヨン製綿棒), シードスワブ3号(栄研化学, アミーズ培地および活性炭入り, レーヨン製綿棒), カルチャースワブプラスシングル(フィルム/フィルム, BD, アミーズ培地入り, レーヨン製綿棒), カルチャースワブEZ(BD, 添加物なし, ポリウレタン製綿棒), メンティップ病院用綿棒1P1504(日本綿棒, 滅菌スピッツで保管, 綿とレーヨンの混合物)を対象とした。*B. pertussis* 分離用培地としてボルデテラCFDN培地(日研生物, Lot. No. VP8E021H)を使用し, 平板分離培養を用いて生菌数のカウントを行った。

1) 各種搬送綿棒別の生菌数の変動に関する検討

Thompsonらの方法⁷⁾を参考に, それぞれの採取容器について保存時間別の生菌数を調査した。*B. pertussis* ATCC9797を滅菌生理食塩水にMcFarland濁度基準液No.1の1/2の濁度になるよう調整し, 各種の綿棒を10秒間浸し, 直後にそれぞれの搬送容器に綿棒を収納し, 室温にて保存した。以降, 保存直後,

6時間, 11時間, 24時間, 34時間および49時間の生菌数をカウントした。カウント方法は綿棒を容器から引き抜き, 滅菌生理食塩水1mlによく浮遊させた後, 浮遊液を10ⁿの段階希釈をし, 段階濃度液をそれぞれ25 μ lずつボルデテラCFDN培地(日研生物医学研究所, 京都)に接種した。35 $^{\circ}$ C湿潤環境下で7日培養後, 生菌数をカウントした後, 菌を浮遊させた滅菌生理食塩水1ml当たりの生菌数として算出し, 単回測定で行った。

成績の評価は, *B. pertussis* ATCC9797を滅菌生理食塩水に0.5 \times McFarlandに調整した菌液の生菌数をカウントしこれを100%とし(以下, ベースラインと定義), それぞれの綿棒にどれぐらいの割合で生菌数が吸収されたかを滅菌生理食塩水1ml中の生菌数として表し, ベースラインと比較して何%吸収されたかを算出した。(以下, 生菌回収率と定義)。次に綿棒を菌液に浸した直後の生菌回収率を100%としたときの, 時間的な生菌数の減少率を計算した(以下, 時間的減少率と定義)。

Table 1. Reduction of inoculum sizes in five commercial swabs for *Bordetella pertussis* transport.

Swab (transport media)	Company		Storage time (h)					
			0	6	11	24	34	49
Seed swab γ I 'Eiken' (Cary-Blair)	Eiken	Colony count (log ₁₀ CFU/ml) ^{a)}	5.9	5.9	5.9	5.7	5.6	4.6
		Recovery (%) from inoculum ^{b)}	3.2	3.1	3.1	2.1	1.8	0.2
		Count (%) relative to 0 h ^{c)}	100	95.0	95.0	65.0	55.0	5.0
Seed swab γ III 'Eiken' (Amies with charcoal)	Eiken	Colony count (log ₁₀ CFU/ml) ^{a)}	5.9	5.7	5.7	5.6	5.2	5.1
		Recovery (%) from inoculum ^{b)}	3.2	2.1	1.9	1.8	0.6	0.5
		Count (%) relative to 0 h ^{c)}	100	65.0	60.0	55.0	20.0	15.0
BD BBL CultureSwab Plus Single (Amies)	BD	Colony count (log ₁₀ CFU/ml) ^{a)}	6.0	5.8	5.8	5.4	5.3	4.9
		Recovery (%) from inoculum ^{b)}	3.9	2.6	2.6	1.0	0.8	0.3
		Count (%) relative to 0 h ^{c)}	100	66.7	66.7	25.0	20.8	8.3
BD BBL CultureSwab EZ (no media)	BD	Colony count (log ₁₀ CFU/ml) ^{a)}	6.2	6.0	6.0	6.0	5.7	5.1
		Recovery (%) from inoculum ^{b)}	6.0	4.5	4.4	4.2	1.9	0.5
		Count (%) relative to 0 h ^{c)}	100	75.7	73.0	70.3	32.4	8.1
Men-tip (no media)	JCB	Colony count (log ₁₀ CFU/ml) ^{a)}	6.5	4.5	2.6	— ^{d)}	—	—
		Recovery (%) from inoculum ^{b)}	13.5	0.1	—	—	—	—
		Count (%) relative to 0 h ^{c)}	100	1.0	—	—	—	—

Eiken, Eiken Chemical Co., Ltd.; BD, Nippon Becton Dickinson Company, Ltd.; JCB, JCB Industry Ltd.

^{a)} Colony count: The base 10 logarithm of *Bordetella pertussis* ATCC9797 inocula per milliliter loaded in each swab.

^{b)} Recovery (%) from inoculum: Recovery rate of inocula from swabs when the initial inoculum was absorbed into each swab.

^{c)} Count (%) relative to 0: Relative reduction rate of inocula when the size of *Bordetella pertussis* ATCC 9797 inocula loaded into each swab at 0 h was defined as 100%.

^{d)} The hyphen is less than sensitivity.

2) 保存温度の違いによる生菌数の変動に関する検討

滅菌生理食塩水に McFarland No. 1 の 1/2 の濁度に調整した *B. pertussis* ATCC9797 を室温 (25°C) 保存および冷蔵 (5°C) の両温度環境下における保存温度による生菌数の変動を観察した。

3) 市販綿棒中に含まれる脂肪酸量の測定

市販綿棒を蒸留水 1 ml に浸し、綿棒内の脂肪酸を抽出した後、血清中遊離脂肪酸測定用ネスコート NEFA-V2 (アルフレッサファーマ) を用いて、アシル-CoA-ペルオキシダーゼ法による比色分析により脂肪酸の測定を行った。

結 果

1. 各種搬送容器 (綿棒) 別の生菌数の変動について

Table 1 に 5 種類の綿棒別における生菌数の変動、および Fig. 1 に時間的減少率を示した。各種綿棒への生菌回収率は接種直後で 3.2~13.5% に分布した。シードスワブ 1 号、シードスワブ 3 号およびカルチャースワブ プラスシングルは 3.2~3.9% とほぼ同等の菌数を回収した。カルチャースワブ EZ は 6.0% であり、先の 3 種類の綿棒のほぼ 2 倍程度の菌数を回収した。次に、保存時間別の菌数の変動について、すべての綿棒は時間とともに生菌数の減少を認めた。各種綿棒の 24 時間時点での時間的減少率の解析について、時間的減少率が低い順に、カルチャースワブ EZ で 70.3%, シードスワブ 1 号で 65.0%, シードスワブ 3 号で 55.0%, カルチャースワブ プラスシングルで

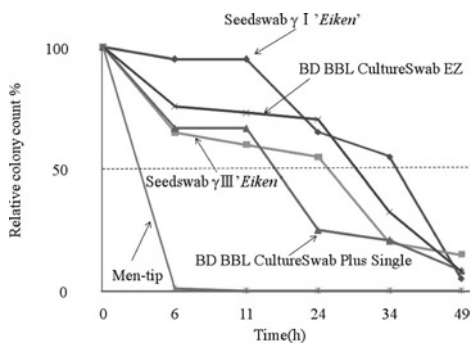


Fig. 1. Reduction of inoculums of *Bordetella pertussis* ATCC9797 in each commercial transport swabs
When we defined with 100% inoculums which loaded *Bordetella pertussis* ATCC 9797 in a swab, count (%) relative to 0 h was calculated

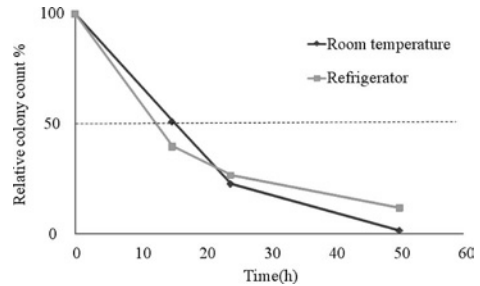


Fig. 2. Comparison of inoculums of *Bordetella pertussis* ATCC9797 in each storage method of ambient temperature (25°C) and refrigerator (5°C)

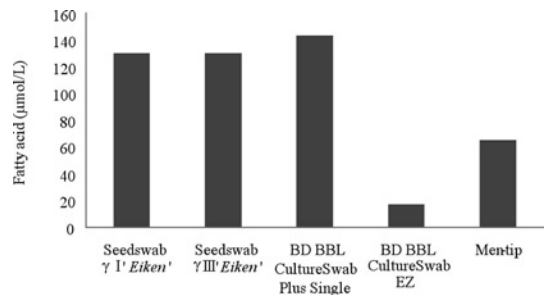


Fig. 3. Comparison of concentration of fatty acid in each commercial transporting swab

25.0%であった。なお、メンティップ病院用綿は 11 時間時点で検出感度以下となった。

2. 保存温度に関する検討

Fig. 2 に生理食塩水中における室温および冷蔵による保存方法別の生菌数の変動を示した。24 時間時点では両者とも生菌数は 20% 台まで減少したが、両者に明らかな差は認められなかった。一方、48 時間時点では両者とも生菌数は 10% 台にまで低下し、さらに室温のほうが冷蔵と比較しておよそ 10 倍の生菌数減少を認めた。

3. 綿棒中に含まれる脂肪酸の測定

綿棒中に含まれる脂肪酸含有量の分析結果を Fig. 3 に示した。カルチャースワブ EZ 以外の綿棒はすべて 60 μmol/L 以上の脂肪酸の含有が確認された。これはヒト正常血清遊離脂肪酸濃度⁸⁾ (およそ 100~800 μmol/L) に匹敵する含有量であった。一方、カルチャースワブ EZ は 17 μmol/L と他の綿棒のおよそ 10 分の 1 の濃度を示した。

考 察

ASM ガイドライン¹⁾における *B. pertussis* 分離培養法における検体の種別は鼻咽頭材料 (nasopharyngeal specimen) と記載があり、その採取方法は鼻腔洗浄、鼻腔吸引法および鼻咽頭スワブと記載されている。その理由は、*B. pertussis* は線毛上皮細胞に結合親和性を有し、鼻咽頭がこれらの細胞で覆われているためである。なおかつ喀痰や咽頭粘液のように分離培養実施時に大量に混入する常在菌の影響を受けないことから、分離培養検査における鼻咽頭部位の採取は *B. pertussis* の分離により適しているものと考えられている。今回の実験は、採取方法として鼻腔洗浄、鼻腔吸引法より簡便に採取可能な市販スワブを使用した採取および搬送について生菌数がどれくらい変動するかについて検討を行った。

市販綿棒を用いた生菌数回収率について、最初に滅菌生理食塩水に浮遊させた生菌数を 100% としたときの綿棒への生菌回収率は 3.1~13.5% にまで減少、特にメンティップ病院用綿棒およびカルチャースワブ EZ を除く市販綿棒では 3% 程度の回収率であり、予想以上に低いことが明らかとなった。例えば、最も生菌回収率の低かったシードスワブ 1 号あるいは 3 号 (いずれも生菌回収率 3.2%) を鼻咽頭粘液の採取に使用した場合、感染部位に 100 個の菌が存在したと仮定すると、その患部をぬぐったときに吸収される綿棒への生菌数は 3 個程度としかならない計算となる。さらに、綿棒の保存による生菌数の減少の要因を考慮した場合、24 時間の保存では 1 個の生菌のみしか得ることができない理論上の計算となる。他の市販綿棒でも同じ論理が成立するものと考えられ、百日咳の診断に綿棒採取による分離培養法が真に適切かどうか疑問視される成績となった。これを裏づける報告として、Hallander ら⁹⁾は、鼻腔洗浄あるいは鼻腔吸引法によるサンプリングの妥当性について、綿棒による採取法と比べ、前者のほうが 11% 高い陽性率を得たと報告している。

次に保存による時間的生菌数の推移は、すべての綿棒で生菌数は減少した。特に著しかったのが、カルチャースワブ プラスシングルおよびメンティップ病院用綿棒であった。一方、カルチャースワブ EZ、次いでシードスワブ 1 号およびシードスワブ 3 号は比較的生菌数の保持力が高く、いずれも採取直後と比較して 24 時間の保存時点で 55~70% 程度ではあるが生菌が保たれていた。生理食塩水中における *B. pertussis* の生菌数の保持性については冷蔵および室温ともにほぼ同じ推移を示した。保存時間の影響では 12 時

間以降より 50% まで生菌は減少し、24 時間時点では 20% 台まで減少した。したがって、市販綿棒による保存を行うほうが生菌の死滅は緩徐であり、有効であることが判明した。

一方、今回の実験から市販綿棒の素材の多くに使用されているレーヨン素材は、*B. pertussis* に対して有害に作用することが報告^{5,6)}されている脂肪酸を多く含んでいることも明らかとなった。この現象はチョコレート添加 (シードスワブ 3 号) および無添加 (シードスワブ 1 号、カルチャースワブ プラスシングルの比較で、24 時間時点ではカルチャースワブ プラスシングルが最も生菌数の減少率が高く、48 時間時点ではチョコレート添加綿棒が生菌数は大幅に減少したものの 15.0% と他の綿棒との比較において最も高い生菌数が確保された。すなわち、チョコレート添加が *B. pertussis* に対して有害に作用する脂肪酸の吸収に関与していることが示唆される成績となった。ASM ガイドライン¹⁾において、24 時間以内の検体保存を行う場合チョコレートを含有したアミーズ培地の使用を推奨していることから、これを裏づけられる成績であった。

以上のことから、今回検討した市販綿棒のうち、カルチャースワブ EZ、シードスワブ 1 号、およびシードスワブ 3 号が他の綿棒より保存による生菌数の保持性が高かったが、いずれの綿棒による採取においてもサンプリング時に十分患部をぬぐう操作をしなければ生菌数の確保が困難であり、さらにレーヨン製綿棒を使用した場合は、*B. pertussis* の発育性について綿棒中の脂肪酸の影響を受ける可能性がある。一方、*B. pertussis* 分離を目的とした材料採取法は鼻腔経由の上咽頭粘液採取が最適であり、ASM ガイドライン¹⁾でもこれを推奨している。さらに、採取直後に培養検査に供することが最良であるが、これが望めない場合はシードスワブ 1 号やカルチャー EZ など輸送時の菌死滅の少ない綿棒の利用が望ましい。

文 献

- 1) MacGowan, K. L. 2004. *Bordetella* cultures. p. 3.11.6.1-3.11.6.14. In: *Clinical Microbiology Procedures Handbook*, 2nd ed. (H. D. Isenberg, ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 2) 原田由紀, 臼井一美, 長谷川美幸, 他. 2000. BD BBL Culture Swab PlusTM の各種微生物に対する保持能力に関する基礎的検討. *臨床と微生物* 27: 109-116.
- 3) Appelbaum, P. C., S. K. Spangler, R. Crist, et al. 1988. Survival of bacteria in Difco CultureSwab and Marion Culturette II transport

- systems. J. Clin. Microbiol. 26: 136-138.
- 4) Horn, K. V., C. Toth, J. Wegienek. 1998. Viability of aerobic microorganisms in four swab systems. ASM 98th general meeting. C-436.
 - 5) Morrill, W. E., J. M. Barbaree, B. S. Fields, et al. 1988. Effects of transport temperature and medium on recovery of *Bordetella pertussis* from nasopharyngeal swabs. J. Clin. Microbiol. 26: 1814-1817.
 - 6) Hoppe, J. E., A. Weib. 1987. Recovery of *Bordetella pertussis* from four kinds of swabs. Eur. J. Clin. Microbiol. 6: 203-205.
 - 7) Thompson, J. S., D. E. Smith. 1999. Comparison of rayon and dacron swabs in amies medium for *Bordetella pertussis* transport. ASM 99th general meeting. C-31.
 - 8) 寺本民生. 2003. 遊離脂肪酸 (FFA) とその分画. p. 282-283, 臨床検査ガイド 2003~2004 (和田攻, 大久保昭行, 矢崎義雄, 他), 文光堂, 東京.
 - 9) Hallander, H. O., E. Reizenstein, B. Renemar, et al. 1993. Comparison of nasopharyngeal aspirates with swabs for culture of *Bordetella pertussis*. J. Clin. Microbiol. 31: 50-52.

Reduction of Inoculums in Commercial Transport Swabs for *Bordetella pertussis* Transport

Junpei Okada, Masaru Komatsu, Hiroto Tanaka, Kiyoko Katoh, Kimika Murakami,
Emu Fujiwara, Koji Matsuoka, Takuya Maede
Central Laboratory Technical Section 3, FALCO Biosystems Ltd.,
17-1 Tai-nishiarami Kumiyama-cho, Kuze-gun, Kyoto 613-0036, Japan

We investigated reduction of inoculums of *Bordetella pertussis* in each commercial transport swabs. Transport media were chosen as following; (1) Seed swab γ I (Eiken Chemical, Ltd., Cary-Blair media), (2) Seed swab γ III (Eiken Chemical, Ltd., Amies with charcoal), (3) BD BBL Culture Swab Plus Single (BD, Amies), (4) BD BBL Culture Swab EZ (BD, additive-free of media) and (5) Mentip (JCB Industry Ltd., the swab was kept in a sterilized spitz). There was inoculums size from 3.2 to 13.5% of *Bordetella pertussis* ATCC9797 in each commercial transport swabs. Reduce of inoculums size was from 0 to 70.3% for 24 hours of the room temperature storage. (3) and (5) in particular remarkable reduced inoculums size. We demonstrated that all of five commercial swabs were hard to take inoculums, inoculums sizes were remarkably decrease caused by storage, and it might be difficult to perform *Bordetella pertussis* culture by the swab method.