

米ぬかによるインフルエンザ菌の発育増殖性と莢膜の形成性について

山田, 巖
九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻

<https://doi.org/10.15017/3240>

出版情報：九州大学医学部保健学科紀要. 4, pp.67-71, 2004-09. 九州大学医学部保健学科
バージョン：
権利関係：

米ぬかによるインフルエンザ菌の発育増殖性と 莢膜の形成性について

山田 巖¹⁾

Studies on Growth and Formation of Capsule of *Haemophilus influenzae* by Rice Bran

Iwao Yamada

Abstract

The growth of *Haemophilus influenzae* could not be confirmed by Rice Bran agar, but could be confirmed by Rice Bran broth, blood one, and the mixing of the both in after 24 hours of cultivation.

As for the capsule formation, it could not be confirmed by Rice Bran broth, but could be confirmed by blood broth, and the mixing one of Rice Bran and blood in after 48 hours of cultivation.

Key Words : *Haemophilus influenzae* インフルエンザ菌, Rice Bran 米ぬか, capsule 莢膜,
growth 発育増殖性

I はじめに

さきにヒトから高頻度に分離される細菌の米ぬか培地での発育増殖性と、保存により失われた莢膜形成菌の莢膜の形成性について報告した¹⁾

今回は、グラム陰性の通性嫌気性桿菌で、直径が0.5～1mmと小さいことからテキストには短桿菌、球桿菌あるいは小桿菌などと表示されているインフルエンザ菌 (*Haemophilus influenzae*) に注目した。本菌は、とくに呼吸器系をはじめ小児科、耳鼻科などの臨床材料から分離される頻度が20～50%と高く、しかも、臨床的に成人では慢性下気道感染症、小児では髄膜炎や肺炎、中耳炎などの急性疾患の重要な原因菌として取り沙汰されており、さらに治療に際してアンピシリン耐性菌の出現が問題となっている²⁾細菌について、米ぬか培地や血液液体培地、米ぬかと血液の混合培地での発育増殖性と莢膜の形成性について検討

を試みた。

インフルエンザ菌は、さきに報告した¹⁾グラム陰性の通性嫌気性桿菌で高頻度に分離される大腸菌、肺炎桿菌などの腸内細菌とは明らかに異なっている。つまり培地上での発育増殖性と同定上重要な性状について表1に示したが、大きな相違点がみられ、とりわけインフルエンザ菌にはX因子、V因子といった独自の厳しい栄養要求性が認められるので、これに相応した環境づくりをしなければ発育増殖できない細菌である。

II 実験材料と方法

1. 実験材料

使用した細菌：インフルエンザ菌は、臨床材料より分離された後、冷凍保存中の2株を用いた。なお、2株とも莢膜多糖体抗原による血清型はb型であった。

1) 九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻

表1 発育増殖性と菌の同定上重要な性状

項目	腸内細菌	インフルエンザ菌
普通寒天培地での発育増殖性	発育増殖可能	発育増殖不可能
チョコレート寒天培地での発育増殖性	発育増殖可能	発育増殖可能
同定上重要な性状	ブドウ糖や乳糖などの分解性とガスや硫化水素産生能、インドール反応、VP反応、クエン酸塩の利用能、運動性など多数の生化学的性状により同定	V因子やX因子の要求性、ウサギ血液寒天培地による発育性、溶血性などによる同定と莢膜多糖体抗原による血清学的型別 現在、生化学的性状による同定法へ移行中

2. 実験方法

- 1) 米ぬか液の作製方法：さきに報告した方法により作製し³⁾、使用に供した。
- 2) 米ぬか寒天培地、米ぬか液体培地、血液液体培地、さらに米ぬか液と血液の混合培地（米ぬか血液混合培地）はさきに報告した方法によりそれぞれ作製して用いた¹⁾。なお、血液はウマ脱線維血液を用いた。
- 3) 普通寒天培地：市販の粉末培地を用いて作製した。
- 4) チョコレート寒天培地：今回は市販の生培地バイタルメディアチョコレート寒天培地（極東製薬）を用いた。
- 5) 莢膜染色法（Hiss 変法）：Hiss 法を基本とした方法で、スライドガラス上にヒト血清を蒸留水で2倍希釈した血清に菌を混ぜて塗抹後、自然乾燥させ、火炎固定はせずに、50℃に温めた染色液で1分間染色後、硫酸銅液で洗う方法により実施した⁴⁾。

Ⅲ 結 果

1) 普通寒天培地、米ぬか寒天培地、チョコレート寒天培地によるインフルエンザ菌の発育増殖性について

インフルエンザ菌の2株をそれぞれの寒天培地に塗抹後37℃で培養して、発育増殖性および孤立集落の形成性について検討した。その結果、表2に示したように、普通寒天培地と米ぬか寒天培地にはまったく発育増殖が確認されなかったが、

チョコレート寒天培地ではインフルエンザ菌特有の臭気と露滴状の湿潤で小さな集落が認められた。しかし、培養後96時間経過した菌を新しい培地に植えついででも発育してこなかった。

2) 米ぬか液体培地、血液液体培地、米ぬか血液混合培地によるインフルエンザ菌の発育増殖性について

それぞれの液体培地にインフルエンザ菌を接種して37℃で培養後、24時間後から毎日これらの液体培地から1白金耳ずつチョコレート寒天培地に植えついで菌の発育増殖が認められるか否かを確認して、それぞれの液体培地での発育増殖性の有無を判定した。その結果、表2に示したように、24時間後にはいずれの液体培地からも菌の発育増殖が認められたが、96時間後の米ぬか液体培地からは菌の発育がみられなかった。

血液液体培地と米ぬか血液混合培地では、菌を接種後前者では室温で5日間、後者では7日間菌の生存が確認された。

3) 米ぬか液体培地による莢膜の形成性について

菌を接種して24時間培養後、48時間培養後、72時間培養後の菌について、Hiss 変法による莢膜形成の確認はできなかった。

4) 血液液体培地と米ぬか血液混合培地による莢膜の形成性について

図1に示したように、いずれの培地からも48

表2 インフルエンザ菌の発育増殖性

培 地	培 養 時 間							
	24	48	72	96	120	144	168	192
普通寒天培地	—	—	—					
米ぬか寒天培地	—	—	—					
チョコレート寒天培地	+	+	+	—				
米ぬか液体培地	+	+	+	—				
血液液体培地	+	+	+	+	+	—		
米ぬか血液混合培地	+	+	+	+	+	+	+	—

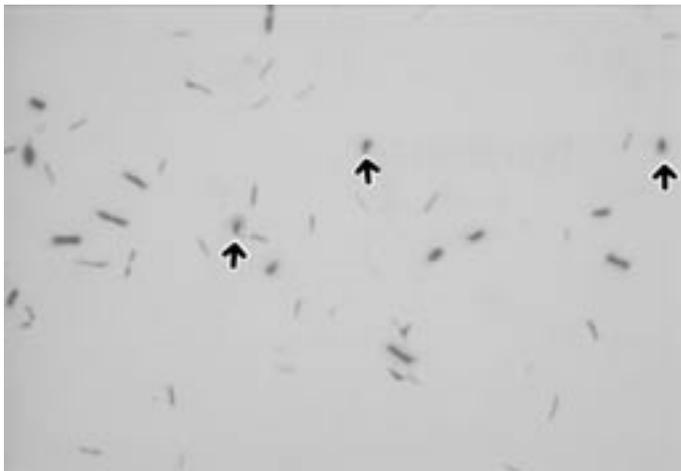


図1. 血液液体培地からの莢膜染色

時間培養したときの菌に大腸菌や肺炎桿菌の莢膜ほど明瞭では¹⁾なかったものの、莢膜の形成が確認された。

Ⅳ 考 察

インフルエンザ菌の同定法について、歴史的にみると独特の栄養要求性すなわち、X 因子はヘモグロビン中の haemin に代表される耐熱性物質と、V 因子は 120℃ 数分で破壊される易熱性物質の NAD (nicotinamide adenine dinucleotide) の要求性テスト (XV マルチディスクが栄研化学より発売) に加えて、ウマあるいはウサギ血液寒天培地での発育性と溶血性、さらに莢膜多糖体の抗原性による血清型別などが行われてきた^{5, 6)}。ただ、X 因子要求性テストについては、川上ら⁵⁾が指摘しているような問題点があり、今日では糖分解性やインドール反応をはじめとした生化学的性状による同定法に変わりつつある。現に同定キットが市販されている。

実際に臨床材料よりインフルエンザ菌を分離するには、X 因子や V 因子が含まれた培地が必要である。今日ではチョコレート寒天培地の生培地が厳しい管理下で作製されたものが数社から市販されているが、代表的なメーカーの培地の組成成分を表3に示した。組成成分がメーカーごとに異なっていることから発育増殖した集落の性状に相違点が生ずるおそれがあるので、実際に使用する場合は同じメーカーの生培地を使用すべきであろう。

インフルエンザ菌の分離を目的とした臨床材料をチョコレート寒天培地に接種した後、37℃の5%炭酸ガス環境下、つまり炭酸ガス培養器中で発育増殖を促進させて、18～24時間培養後に培地のふたを開けたときの特有の臭い(魚が腐ったような、マウスのような)も同定の一助になるので注意が必要である。

また、臨床材料を X 因子、V 因子が含まれていない寒天培地に接種して培養したときに、材料

表3 主な市販生培地の組成 (培地1L中)

バイタルメディア チョコレート寒天培地No.2		ニッスイプレート 馬チョコレート寒天培地		ポアメディア チョコレート寒天培地	
ペプトン	20.0g	ペプトン	15.0g	ウシ心臓浸出液	500g
消化肝臓末	3.0g	肉エキス	4.0g	ペプトン	10g
酵母エキス	5.0g	酵母エキス	2.0g	塩化ナトリウム	5g
塩化ナトリウム	5.0g	溶性デンプン	1.0g	寒天末	15g
デンプン	2.0g	塩化ナトリウム	5.0g	ウマ脱線維素血液	50mL
ブドウ糖	2.5g	リン酸一水素カリウム	4.7g		pH7.4
寒天末	15.0g	リン酸二水素カリウム	0.4g		
馬脱線維血液	50mL	発育素	1.2g		
	pH7.3±0.2	寒天末	15.0g		
		馬脱線維血液	50mL		
			pH7.2		

の中に黄色ブドウ球菌が混在しているとインフルエンザ菌は黄色ブドウ球菌の周りに発育増殖できる、いわゆる衛星現象が認められるが、これも本菌の同定上参考になる。

このように、分離培地上で発育増殖するために特有の栄養要求性を示すインフルエンザ菌を普通寒天培地、米ぬか寒天培地、チョコレート寒天培地、米ぬか液体培地、血液液体培地と米ぬか血液混合培地に接種して発育増殖の有無を検討したところ、普通寒天培地と米ぬか寒天培地を除き発育増殖が認められ、菌を接種後室温で米ぬか液体培地では3日間、血液液体培地では5日間、米ぬか血液混合培地では7日間の生存が確認された。

液体培地は一般的に増菌を目的として使用されるのに対して、寒天培地は臨床材料中に含まれている複数の細菌の中から目的の菌を分離するための培地である。インフルエンザ菌は外界では死滅しやすく、そのうえ乾燥にも弱い⁷⁾こともあり、とちらかといえ寒天培地表面では液体培地中よりも早期に死滅しやすいことが考えられる。

インフルエンザ菌は呼吸器感染症、化膿性髄膜炎などの主要な原因菌の1つである。とくに小児の化膿性髄膜炎の50%以上は莢膜を保有したインフルエンザ菌で⁸⁾、その血清学的抗原型はb型である。この場合、莢膜を欠いた菌によるものは5.5~6%と報告されており^{9, 10)}、莢膜の有無はvirulenceの強さと関係していることが考えられる。

今回の実験に供したインフルエンザ菌は、臨床材料から分離された後冷凍保存されていたもので、溶解後チョコレート寒天培地で起こし、発育増殖して菌についてHiss変法により莢膜形成の有無を確認したところ、認められなかった。そこで米ぬか液体培地、血液液体培地、米ぬか血液混合培地に接種後24時間培養後から毎日Hiss変法により莢膜形成の確認を行ったところ、米ぬか液体培地の菌には認められなかったが、血液液体培地と米ぬか血液混合培地の48時間培養後の菌で認められた。しかし、さきに報告した大腸菌や肺炎桿菌の場合¹⁾に比べ、莢膜とバックグラウンドとの境界の明瞭性が欠けていた。

一時、インフルエンザ菌の莢膜について、生体内では保有しているが、分離後の継代で失われるという意見¹¹⁾と、髄膜炎由来の莢膜抗原がb型の菌は、呼吸器由来の菌とは遺伝的にみても異なっており、莢膜をもたない菌はもともとは莢膜を保有していたという意見に同意できない¹²⁾と主張されていた。今回の実験から分離菌の継代、保存で失われた莢膜の形成が確認され、前者の意見を支持する結果が得られた。

今後は、思いもよらない能力を発揮した米ぬかの構成成分の分析と、いずれの成分がインフルエンザ菌の発育増殖を促進させ、同時に莢膜の形成性に関与しているのか追求していきたい。

V 結 語

インフルエンザ菌の普通寒天培地、米ぬか寒天培地、米ぬか液体培地、血液液体培地、米ぬか血液混合培地での発育増殖性と莢膜の形成性について検討し、つぎのような成績を得た。

- 1) 普通寒天培地と米ぬか寒天培地では発育増殖が認められなかったが、米ぬか液体培地、血液液体培地、米ぬか血液混合培地では24時間培養後に発育増殖が確認された。
- 2) 莢膜の形成性は、米ぬか液体培地では認められなかったが、血液液体培地と米ぬか血液混合培地では、接種後48時間培養の菌に莢膜の形成が確認された。

文 献

- 1) 山田巖：米ぬかによる細菌の発育増殖性と莢膜の形成性について —高頻度に分離される細菌の場合—。九州大学医学部保健学科紀要 第3号：47-50, 2004
- 2) 渡辺彰：アンピシリン耐性インフルエンザ菌。臨床検査 45：821-826, 2001
- 3) 山田巖：米ぬかにより大腸菌と肺炎桿菌に出現した変異について。九州大学医学部保健学科紀要 第2号：73-78, 2003
- 4) 山田巖：肺炎桿菌の保存菌を培養して形成された莢膜の耐熱性について。九州大学医学部保健学科紀要 第1号：111-116, 2003
- 5) 川上由行, 中村幸枝, 堀内直子, 金井正光：*Haemophilus* 属菌の同定における従来法の問題点。臨床と細菌 10：323-325, 1983
- 6) 川上由行：主要病原菌の疫学マーカー —生物型別 *Haemophilus influenzae*。臨床と微生物 23：738 - 741, 1996
- 7) 岡田淳, 設楽政次, 伊藤武, 長沢光章, 渡邊邦友 他：臨床検査学講座 微生物/臨床微生物学, 医歯薬出版, 東京, 2001, pp158-160
- 8) 小林裕, 砂川慶介, 藤田晃三, 西條政幸, 室野晃一 他：本邦27施設における1981年以降14年間の小児化膿性髄膜炎の起因菌の動向。感染症学雑誌 71：1017-1024, 1997
- 9) 中村明, 石川信泰, 黒木春郎, 山崎勉, 鈴木宏 他：本邦における髄膜炎を主とする全身性感染症由来インフルエンザ菌株の性状について。日児誌 93：890-897, 1989
- 10) Falla TJ, Dobson SRM, Crook DWM, Kraak WAG, Nichols WW, et al：Population-based study of non-typable *Haemophilus influenzae* invasive disease in children and neonates. Lancet 341：851-854, 1993
- 11) Catlin BW：*Haemophilus influenzae* in culture of cerebrospinal fluid. Noncapsulated variants typable by immunofluorescence. Am. J. Dis. Child. 120：203-210, 1970
- 12) Killian M & Thomsen B：Antigenic heterogeneity of Immunoglobulin A1 proteases from encapsulated and nonencapsulated *Haemophilus influenzae*. Infect. Immun. 42：126-132, 1983

