

## 肺炎桿菌の保存菌を培養して形成された夾膜の耐熱性について

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/10.15017/42>

---

出版情報：九州大学医学部保健学科紀要. 1, pp.111-116, 2003-03. 九州大学医学部保健学科  
バージョン：  
権利関係：

# 肺炎桿菌の保存菌を培養して形成された 夾膜の耐熱性について

山田巖

九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻

## Studies on Heat-dependent Resistance of Capsule Formed in the Stock Culture of *Klebsiella pneumoniae*

Iwao Yamada

### Summary

The purpose of this study is to examine heat-dependent resistance of capsule formed in the stock culture of *Klebsiella pneumoniae*.

As the result, the following findings were obtained.

- 1) The incidence of formation of capsule measured by Hiss method was 46.7%.
- 2) The coating with dilution serum and staining at 50°C are effective for the observation of capsule formed in the stock culture.
- 3) The heat-dependent resistance of capsule formed in the stock culture is different from that of capsule formed in the isolation culture.

key words: *Klebsiella pneumoniae*, capsule, heat-dependent resistance, Hiss method.

### I はじめに

本学の微生物学実習においては、開学以来、保存菌による細菌の各種特殊染色法を実施している。その1つに、Hissの夾膜染色法（Hiss法）を行っているが、数年前までは保存菌の肺炎桿菌をマウスの腹腔内に接種して夾膜の形成をさせてきたが、その後はヒトやヒツジの保存血液による液体培地に培養する方法に変更した。実習に供する前にHiss法で夾膜形成を確認している（図1）が、学生に染色させてみると、マウスに菌を接種していたときには経験しなかった、夾膜の存在が確認できないことにしばしば遭遇してきた。

その原因として、Hiss法による染色操作のうち、染色に不慣れの学生が不適切な操作として陥りや

すいと思われる、火炎固定と加温染色にともなう加熱温度の影響が考えられた。併せて、夾膜染色に適したスライドグラスへの菌の塗抹方法と、夾膜形成用液体培地について、保存菌と、検査材料より分離された初代分離菌（分離菌）を用いて比較検討したので報告する。

### II 実験材料と方法

#### 1) 実験材料

夾膜形成菌として代表的な肺炎桿菌の保存菌（保存期間4年から10年）3株と、検査材料よりの分離菌4株を用いた。

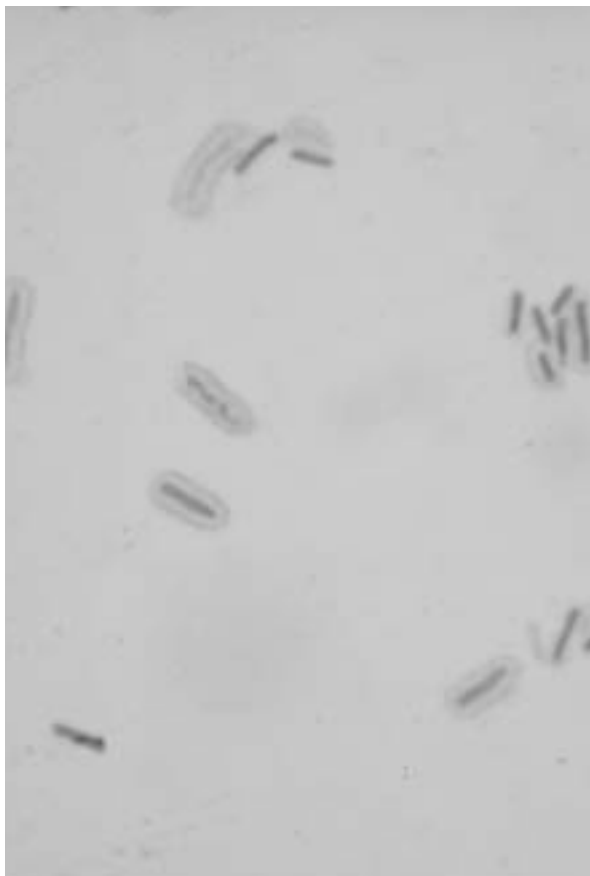


図1. 保存菌に形成された夾膜

## 2) 実験方法

夾膜形成用液体培地（液体培地）：ヒト、ウマ、ヒツジの保存血液とHaemophilus属菌用のFildes Enrichment (DIFCO)（発育増強液）をそれぞれ滅菌試験管に1 mlずつ入れ、さらに生理食塩水を2 ml加えて混合したものを液体培地として用いた。同時に、クックドミート培地、トッドヒューウィット培地2 mlに保存血液1 mlを加えた液体培地についても検討した。これらの培地にハートインフュージョン寒天培地に18～24時間培養した菌を1白金耳接種後、37℃で培養した。

スライドグラスへの菌の塗抹方法：菌を蒸留水、生理食塩水、血清（ウシ、ヒト）と混ぜて塗抹する方法と、培地より白金耳で菌をとってそのまま塗り広げる方法について検討した。

Hiss法：学生使用の微生物学/臨床微生物学（医歯薬出版）の教科書記載の方法により実施した<sup>1)</sup>。実験の進展により、火炎固定をしなかったり、染色液を恒温槽で50℃、60℃、80℃に温めた

ものを用いて染色した。なお、液体培地から菌を採取するときは赤血球の混入を避けるため、赤血球と上清の境界を用いた。また、今回は夾膜が染色されることより、夾膜形成の確認に重点をおいた。

## Ⅲ 結果

### 1) 各種液体培地による夾膜の形成性について

保存菌の場合、いずれの液体培地でも夾膜の形成は確認された。但し、一回の染色で確認できないときは、もう一度染色すると確認できた。また、ウマ血液の液体培地では夾膜を形成している菌が、他の液体培地の場合に比べて少なかった。一方、分離菌の場合、いずれの液体培地でも夾膜形成は良好で、一回の染色で確認できた。

### 2) スライドグラスへの菌の塗抹方法について

液体培地より1白金耳とりそのまま塗抹する方法では、観察時バックグラウンドが汚くて見にくかったが、血清や蒸留水、生理食塩水と混ぜて塗抹すると、観察時の汚れは緩和された。

血清で塗抹標本を作り鏡検してみると、ヒト、ウシ血清のいずれでも均等に塗抹されず、菌が数カ所に偏ってみられることが多かった。そこで、蒸留水で2～4倍に希釈した血清で塗抹したところ、蒸留水や生理食塩水で塗抹したときと同じように均等に分布していた。

保存菌を液体培地で培養した菌について、繰り返しHiss法を行い夾膜形成の確認頻度を求めたところ、表1に示したように、火炎固定と軽い加温染色による染色法では生理食塩水、蒸留水、希釈血清のいずれで塗抹しても50%前後の確認頻度で、しかも、同一の液体で塗抹標本を作り同じ染色方法で染色しても、多数の菌に夾膜が認められたり、一部の菌に限られて認められたり、夾膜を確認できなかったりとバラツキがみられた。一方、火炎固定をせずに温めた染色液で染色してみると、50℃ではいずれも80%以上の確認頻度で、とくに希釈血清で塗抹した場合は86.7%の高頻度であった。染色液の温度が上昇するにともない確認頻度は低下していた。

つぎに、分離菌について夾膜形成の確認頻度を求めた。表2に示したように、検査材料を培養した分離培地上の菌は、火炎固定をして軽い加温染色した場合、希釈血清で塗抹したとき100%に夾膜形成が確認された。さらに分離菌を液体培地に培養した菌では、蒸留水で塗抹したときにはいずれの方法でも100%に確認され、生理食塩水では火炎固定と加温染色する方法で100%に確認された。4倍希釈血清の場合には火炎固定をせずに80℃に温めた染色液で染色すると100%に、2倍希釈血清ではいずれの温度の染色液を用いても100%に確認された。

### 3) Hiss法における火炎固定と加温染色にともなう加熱温度の夾膜への影響

学生の教科書に記載の方法すなわち、火炎固定をして軽く加温染色する方法と、火炎固定をして50℃、60℃、80℃に温めた染色液で染色する方法、さらに火炎固定をせずに3種の温めた染色液で染

色する方法について、繰り返し染色を行い検討した。なお、保存菌の場合3株、分離菌の場合4株を用いて検討したが、いずれの場合も株間で差異は認められなかった。

保存菌の場合、火炎固定をして軽く加温染色すると46.7%の頻度で夾膜が認められ、火炎固定をして50℃に温めた染色液で染色すると53.3%に、60℃では46.7%の確認頻度であったが、80℃では26.7%に低下していた。一方、火炎固定をせずに温めた染色液で染色してみると、50℃では80%に、60℃では73.3%に、80℃では53.3%の頻度で確認され、温度の上昇にともない低下傾向がみられた。

つぎに、検査材料を培養した分離培地上の菌の夾膜形成確認頻度を表4に示した。火炎固定と軽い加温染色する方法で染色すると100%に確認され、火炎固定をせずに温めた染色液で染色した場合もいずれの温度でも100%に確認された。

分離菌を液体培地に培養した菌では表5に示したように、火炎固定をして軽い加温染色した場合は100%に、火炎固定せずに温めた染色液での夾膜形成確認頻度は、50℃と60℃では81.2%、

表1. 菌の塗抹方法

| 保存菌を培養した菌 (染色回数15回) |              |           |           |           |
|---------------------|--------------|-----------|-----------|-----------|
| 染色方法                | 夾膜形成確認頻度 (%) |           |           |           |
|                     | 蒸留水          | 生食水       | 2倍希釈血清    | 4倍希釈血清    |
| 火炎固定をして軽い加温染色       | 8 (53.3)     | 7 (46.7)  | 8 (53.3)  | 8 (53.3)  |
| 火炎固定せず温めた染色液        | 50℃          | 12 (80.0) | 12 (80.0) | 13 (86.7) |
|                     | 60℃          | 11 (73.3) | 10 (66.7) | 11 (73.3) |
|                     | 80℃          | 8 (53.3)  | 7 (46.7)  | 8 (53.3)  |

表2. 菌の塗抹方法

| 分離培地上の菌 (染色回数6回)   |              |          |          |          |
|--------------------|--------------|----------|----------|----------|
| 染色方法               | 夾膜形成確認頻度 (%) |          |          |          |
|                    | 蒸留水          | 生食水      | 2倍希釈血清   | 4倍希釈血清   |
| 火炎固定をして軽い加温染色      | 0            | 1 (16.7) | 6 (100)  | 6 (100)  |
| 火炎固定せず温めた染色液       | 50℃          | 0        | 1 (16.7) | 5 (83.3) |
|                    | 60℃          | 0        | 1 (16.7) | 5 (83.3) |
|                    | 80℃          | 0        | 1 (16.7) | 6 (100)  |
| 分離菌を培養した菌 (染色回数6回) |              |          |          |          |
| 染色方法               | 夾膜形成確認頻度 (%) |          |          |          |
|                    | 蒸留水          | 生食水      | 2倍希釈血清   | 4倍希釈血清   |
| 火炎固定をして軽い加温染色      | 6 (100)      | 6 (100)  | 1 (16.7) | 0        |
| 火炎固定せず温めた染色液       | 50℃          | 6 (100)  | 4 (66.7) | 6 (100)  |
|                    | 60℃          | 6 (100)  | 4 (66.7) | 4 (66.7) |
|                    | 80℃          | 6 (100)  | 4 (66.7) | 6 (100)  |

表3. 保存菌を培養した菌の夾膜形成確認頻度

| 染色回数15回        |              |           |
|----------------|--------------|-----------|
| 染色方法           | 夾膜形成確認頻度 (%) |           |
|                | 有            | 無         |
| 火炎固定をして軽い加温染色  | 7 (46.7)     | 8 (53.3)  |
| 火炎固定をして温めた染色液  | 50℃          | 8 (53.3)  |
|                | 60℃          | 7 (46.7)  |
|                | 80℃          | 4 (26.7)  |
| 火炎固定をせずに温めた染色液 | 50℃          | 12 (80.0) |
|                | 60℃          | 11 (73.3) |
|                | 80℃          | 8 (53.3)  |

表4. 分離培地上の菌の夾膜形成確認頻度

| 染色回数5回         |              |         |
|----------------|--------------|---------|
| 染色方法           | 夾膜形成確認頻度 (%) |         |
|                | 有            | 無       |
| 火炎固定をして軽い加温染色  | 5 (100)      | 0       |
| 火炎固定をせずに温めた染色液 | 50℃          | 5 (100) |
|                | 60℃          | 5 (100) |
|                | 80℃          | 5 (100) |

表 5. 分離菌を培養した菌の夾膜形成確認頻度

| 染色方法              | 染色回数16回      |           |          |
|-------------------|--------------|-----------|----------|
|                   | 夾膜形成確認頻度 (%) |           |          |
|                   |              | 有         | 無        |
| 火炎固定をして<br>軽い加温染色 |              | 16 (100)  | 0        |
| 火炎固定をせず<br>温めた染色液 | 50℃          | 13 (81.2) | 3 (18.8) |
|                   | 60℃          | 14 (87.5) | 2 (12.5) |
|                   | 80℃          | 16 (100)  | 0        |

87.5%であったが、80℃では100%であった。

#### IV 考察

学生実習の夾膜染色に用いる菌は、数年前からヒトやヒツジの保存血液による液体培地に肺炎桿菌の保存菌を培養し、実習に供する前にHiss法で夾膜形成を確認しているが、学生が染色してみるとマウスに菌を接種しているときにはみられなかった、夾膜の存在が認められないことにしばしば遭遇した。その原因として、染色操作の火炎固定と加温染色にともなう加熱温度の影響が考えられた。併せて、夾膜形成用液体培地による夾膜の形成性とスライドグラスへの菌の塗抹方法について、保存菌と分離菌を用いて比較検討した。

保存菌の液体培地による夾膜形成はいずれの液体培地でも確認された。ただ、1回の染色で夾膜の確認ができないことがあったが、2枚目の塗抹標本による観察で確認された。また、ウマ保存血液による液体培地では、夾膜形成菌が他の液体培地に比べて少なく、発育増強液による液体培地では、観察時バックグラウンドの汚れが目立ち観察しにくかった。クックドミート培地やトッドヒューウィット培地では、ヒトやヒツジ保存血液による液体培地とほぼ同様であり、今回の実験には手軽さや経済性を考慮して、ヒトとヒツジの保存血液による液体培地を用いた。

つぎに、スライドグラスへの菌の塗抹方法について成書ではあまり触れられていないが、ウマ、ウシ、ウサギ、ヒトなどの血清あるいは生理食塩水や蒸留水と混ぜて塗抹する方法の記述があり、検査材料は蒸留水で、培養菌は血清または生理食塩水と混ぜて塗抹するとの使い分けが示されている<sup>2-4)</sup>。今回の成績では、保存菌を培養した菌の

場合、希釈血清で塗抹して火炎固定せずに50℃に温めた染色液で染色したときに夾膜形成の確認頻度は最も高率であった。一方、分離菌を液体培地に培養した場合、蒸留水で塗抹し火炎固定と軽い加温染色、火炎固定をせずに50℃、60℃、80℃に温めた染色液で染色したときに、2倍希釈血清で塗抹したときは火炎固定せずに温めた染色液で染色したときに、4倍希釈血清で塗抹したときは火炎固定をせずに80℃に温めた染色液で染色したときに、生理食塩水で塗抹したときは火炎固定をして軽い加温染色で染色したときに100%の確認頻度であった。検査材料を培養した分離培地上の菌は希釈血清で塗抹し火炎固定をして軽い加温染色したときと、火炎固定をせずに80℃に温めた染色液で染色したとき100%の確認頻度であった。

Hiss法の火炎固定と加温染色について成書を調べてみると、ほとんどの成書で火炎固定をする記述があり、ある成書でのみ火炎固定はしないと述べられていた<sup>5)</sup>。加温染色とその時間については、加温染色という語句に軽くあるいは水蒸気またはわずかに湯気が出る程度といった説明があり、時間については数秒、2～3秒、30秒、1分、1～2分とバラバラで、また加温染色の記述のみでその染色時間については数秒、1分、2～3分と統一性がなく、それだけ夾膜を染色することの難しさを反映しているのかも知れない。

したがって、保存菌および分離菌と検査材料を培養した分離培地上の菌のそれぞれについて、スライドグラスへの塗抹方法、火炎固定や加温染色、温めた染色液の温度など選択する必要があると思われる。

成書によれば肺炎桿菌の夾膜多糖体抗原の耐熱性は121℃で2時間と記述されているが<sup>6-8)</sup>、保存菌の培養による夾膜は火炎固定や加温染色によってその存在が確認されないことが、繰り返し染色を行ったときその過半数に認められ、分離菌の場合と明らかに相違していた。坂崎<sup>9)</sup>は菌株や培養条件により、同一菌株でも夾膜が形成されたり、形成せずに培地中に拡散する粘液物質となったり、竹田ら<sup>10)</sup>も夾膜多糖体には結合型と遊離型があると述べている。今回、保存菌を液体培地に

培養して形成された夾膜多糖体は、培地中に遊離したり、火炎固定と加温染色による加熱により破壊されて洗い流された可能性が考えられ、粘液物質に近い状態のものであったと思われる。

以上のことから、保存菌の培養により形成された菌の夾膜染色には、スライドグラスへの塗抹は希釈血清で行い、同一サンプルから2枚の塗抹標本を作製して、火炎固定をせずに50℃程度に温めた染色液で染色すれば、夾膜形成の見逃しを抑えることができると思われる。

## V 結語

肺炎桿菌の保存菌を液体培地に培養した菌と検査材料から分離した菌の、Hiss法による夾膜の耐熱性について比較検討したところ、つぎのような成績を得た。

- 1) 保存菌を液体培地に培養した菌のHiss法による夾膜形成の確認頻度は46.7%であった。
- 2) スライドグラスへの菌の塗抹方法は、保存菌を液体培地に培養した場合には蒸留水で希釈した血清と混ぜると高頻度に、検査材料を分離培養した分離培地上の菌は希釈血清と、分離菌を液体培地に培養した菌では蒸留水と混ぜて塗抹すると夾膜形成は高頻度に確認された。
- 3) 保存菌と分離菌の夾膜には、Hiss法による耐熱性に明瞭な相違が認められた。

## 文献

- 1) 岡田淳, 中村良子, 設楽政次, 宮治誠, 伊藤武 他: 微生物学/臨床微生物学, 医歯薬出版, 東京, 2001, p351.
- 2) 東京大学医科学研究所学友会編: 微生物学実習提要, 丸善, 東京, 1990, p75.
- 3) 高橋長一郎: 夾膜染色, 検査と技術(増刊号), 17:6, 696~697, 1989.
- 4) 安達房代: 芽胞染色, 異染小体染色, 夾膜染色, 鞭毛染色, メディカルテクノロジー, 13:27~28, 1985.
- 5) 桑原章吾, 高橋昭三 編: 臨床細菌学アトラス, 文光堂, 東京, 1979, p10.

- 6) 横田健(監修), 川名林治 編: 標準微生物学, 医学書院, 東京, 1995, p237.
- 7) 畑中正一, 嶋田甚五郎 編: 微生物学, 文光堂, 東京, 2001, p251.
- 8) 吉田眞一, 柳雄介 編: 戸田新細菌学, 南山堂, 東京, 2002, p571.
- 9) 坂崎利一: 腸内細菌(IV)各論(3), 近代出版, 東京, 1979, p18~p19.
- 10) 竹田美文, 林英生 編: 細菌学, 朝倉書店, 東京, 2002, p368~p373.

