九州大学学術情報リポジトリ
Kyushu University Institutional Repository

米ぬか液により大腸菌と肺炎桿菌に出現した変異について

山田, 巌
九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻

https://doi.org/10.15017/50

出版情報：九州大学医学部保健学科紀要. 2, pp.73-78, 2003-09. 九州大学医学部保健学科
バージョン：
権利関係：

九州大学医学部保健学科紀要，2003，第２号，73－78
Memoirs Kyushu U. Sch. Health Sci., 2003, vol.2, 73－78

米ぬか液により大腸菌と肺炎桿菌に出現した変異について

山田巖
九州大学医学部保健学科検査技術科学専攻

Studies of Variation Which Appeared in Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae by Rice Bran

Iwao Yamada

Abstract

The purpose of this study is to examine variation which appeared in the stock culture by Rice Bran.

As the result, biochemical property of Escherichia coli differed clearly from property of isolation culture, but agreed in the case of Klebsiella pneumoniae.

The stock culture could confirm formation of a capsule, but it differed from temporaly variation.

key words：Rice Bran, variation, capsule, biochemical property

Ⅰ　はじめに

長年、学生実習用あるいは研究用に保存している菌に、それまで認められていた生化学的性状の一部が失われていることに、これまでときどき遭遇してきた。とくに、継代培養が繰り返されるとその傾向が大きくなるようである。

今回、腸内細菌の学生実習用に保存していた大腸菌と肺炎桿菌を実習に供したところ、大腸菌では腸内細菌用分離培地であるBTB乳糖加寒天培地に塗抹して培養してみると、本来、乳糖を分解するはずのものが認められず、肺炎桿菌では腸内細菌用分離培地であるSS寒天培地上で孤立した集落が形成されず、ピンク色の菌が旺盛に発育増殖していた。いずれも、これまで経験のない発育性状を示し、細菌に変異の発現が疑われた。

この変異の発現をもたらした原因として、その使用履歴から米ぬか液にヒトから分離される一般細菌の増殖性について検討したときに用いたことが考えられた。

そこで、変異の発現が疑われた大腸菌と肺炎桿菌（保存菌）と、患者材料から分離された大腸菌と肺炎桿菌（分離菌）とを対比して種々比較検討を試みたので報告する。同時に、細菌に変異の発現をもたらしたと考えられた、米ぬかについて少しふれることにする。

Ⅱ　実験材料と方法

１．実験材料

分離培地上で細菌の変異が疑われた保存菌と、対照として、患者材料より分離された大腸菌３株と肺炎桿菌４株は、分離培地上の集落の性状および確認培地（TSI寒天培地、クリグラー確認培地、SIM培地、シモンズのクエン酸塩培地、ブドウ糖リン酸ペプトン水）での生化学的性状、腸内細菌同定用試薬API20Eのプロファイル・インデックスは同一であったことから、その１株ずつを分離

菌として用いた。

2．実験方法

1）米ぬか液の作製方法とその使用方法
表１に示した方法により米ぬか液を得た。なお、この液の使用濃度は種々検討の結果、液体基礎培地に最終濃度が20％の割合になるように加えて用いた。

2）腸内細菌同定用試薬API20E（日本ビオメリュー・バイテック）によるプロファイル・インデックスによる同定

3）分離培地のSS寒天培地とBTB乳糖加寒天培地に発育した集落の性状

4）確認培地による生化学的性状

5）保存菌と分離菌の薬剤感受性試験

6）グラム染色性と形態およびHiss法による莢膜形成の確認[1－2]

7）継代培養による莢膜形成の消失時期

Ⅲ　結　　果

1）保存菌と分離菌の腸内細菌同定用試薬API20Eのプロファイル・インデックス

API20E試薬は説明書の通り実施して同定した。表２に示したように、大腸菌のプロファイル・インデックスは保存菌では５ 144 552（同定確率98.1％）、分離菌では５ 144 512（同定確率99.9％）で、MEL（D-メルビオース）の分解性が相違していた。

肺炎桿菌のプロファイル・インデックスは保存菌、分離菌とも５ 215 773で一致していた。

2）分離培地のSS寒天培地とBTB乳糖加寒天培地上の集落の性状

表３に示したように、大腸菌のSS寒天培地上の所見は、保存菌では白濁した集落が、分離菌では乳糖を分解して赤変した集落が塗抹の最初の部分に少しだけ発育していた。BTB乳糖加寒天培地上の保存菌は、培地のほとんど全面が菌の発育によりアルカリ化して青色を呈し、分離菌では乳糖を分解して産生された酸により黄色に変化していた。

肺炎桿菌のSS寒天培地上の所見は、保存菌では塗抹したところにピンク色を呈した菌が孤立した集落を形成することなく、太い線を引いたように

表１　米ぬか液の作製方法

1）米ぬか25gをリン酸緩衝食塩液（pH7.2）50mlに浮遊させる

2）スターラーで60分間攪拌後、10,000回転で30分間遠心する

3）上清を二重に重ねたお茶パックで濾過

4）濾液を濾紙（185mm）で濾過

5）さらに濾液を0.4μmのシリンジフィルターで２回濾過滅菌後、４℃に保存

表２　API20Ｅのプロファイル・インデックス

テスト項目	大腸菌		肺炎桿菌	
	保存菌	分離菌	保存菌	分離菌
ONPG	＋	＋	＋	＋
ADH	－	－	－	－
LDC	＋	＋	＋	＋
ODC	＋	＋	－	－
CIT	－	－	＋	＋
H_2S	－	－	－	－
URE	－	－	＋	＋
TDA	－	－	－	－
IND	＋	＋	－	－
VP	－	－	＋	＋
GEL	－	－	－	－
GLU	＋	＋	＋	＋
MAN	＋	＋	＋	＋
INO	－	－	＋	＋
SOR	＋	＋	＋	＋
RHA	＋	＋	＋	＋
SAC	－	－	＋	＋
MEL	－	＋	＋	＋
AMY	－	－	＋	＋
ARA	＋	＋	＋	＋
OXI	－	－	－	－

表３　分離培地上の性状

大　腸　菌

培　　地	保　　存　　菌	分　　離　　菌
SS 寒 天 培 地	乳糖非分解で白濁の集落が塗抹の最初の部分のみに発育	乳糖分解で赤色の集落が塗抹の最初の部分のみに発育
BTB 乳 糖 加 寒 天 培 地	乳糖非分解で培地の全面がアルカリ化して青色	乳糖分解による酸の産生で培地全面が黄色

肺 炎 桿 菌

培　　地	保　　存　　菌	分　　離　　菌
SS 寒 天 培 地	乳糖分解により塗抹部分に桃色の菌が旺盛に発育	乳糖分解により赤色の集落が塗抹の最初の部分にのみ発育
BTB 乳 糖 加 寒 天 培 地	乳糖分解による酸の産生により黄色の集落が発育 集落は平坦で、粘性を欠いて乾燥状態	乳糖分解による酸の産生により黄色の集落が発育 集落の盛り上がりや湿潤さ、粘性度は大

旺盛な発育をしていたが、分離菌では乳糖を分解して赤色の孤立した集落 が認められた。BTB乳糖加寒天培地における性状は、一見して保存菌、分離菌とも同様の黄色色調と集落の大きさであったが、保存菌での光沢と集落の盛り上がりは、分離菌のそれよりも明らかに弱く平坦であった。しかも、白金耳でふれた感じは、保存菌の場合、肺炎桿菌の特徴である湿潤さと粘性が少なく、分離菌のそれとは明らかに相違していた。

３）確認培地の生化学的性状

表４に示したように、大腸菌の分離菌は乳糖分解性で、運動性があり、ガス産生能を有していた。一方、保存菌の性状はこの実験に供する前にすでに運動性は欠いていたが、他の性状は分離菌と同じであったので、乳糖分解性とガス産生能は今回の実験で消失していた。

肺炎桿菌では保存菌と分離菌の生化学的性状は一致していた。

４）保存菌と分離菌の薬剤感受性試験

試験に使った薬剤のうち、阻止円が認められた薬剤の阻止円の直径は最高で２mmの違いがみられたが、感受性に差異は認められず、薬剤に対する抵抗性の発現はみられなかった。

５）グラム染色性と形態およびHiss法による莢膜形成の確認（表５）

SS寒天培地とBTB乳糖加寒天培地上の保存菌と分離菌についてグラム染色を行ったところ、いずれもグラム陰性の桿菌であった。ただ、保存菌には菌体の周囲に莢膜の存在を思わせるような非染色の部分が認められたが、分離菌にはみられなかった。そこで、保存菌について、Hiss法により莢膜染色を行ったところ、莢膜の形成が確認された。しかも、ハートインフュージョン寒天培地に保存中の菌にも莢膜が認められた。

６）継代培養による莢膜形成の消失時期

患者材料を分離培地に塗抹して培養後、分離された初代分離菌を、ハートインフュージョン寒天培地に継代培養を繰り返してみたところ、肺炎桿菌では４代目まではほとんどの菌に莢膜の形成が確認されたが、それ以降は莢膜形成菌が次第に減少し、莢膜もうすくなり、７代目以降は認められなくなった。

大腸菌では２代目までは莢膜の存在が確認できたが、その後は莢膜形成菌と莢膜の厚さが極端に減少し、うすくなっていた。

表 4　確認培地の性状

大　腸　菌

性　　状	保存菌	分離菌	培　　地
	有　無	有　無	
乳糖分解性	(−)	(＋)	①②
ブドウ糖分解性	(＋)	(＋)	①②③
インドール反応	(＋)	(＋)	③
運動性	(−)	(＋)	③
ガス産生能	(−)	(＋)	①②
硫化水素産生能	(−)	(−)	①②③
クエン酸塩利用	(−)	(−)	④
MR テスト	(＋)	(＋)	⑤
VP テスト	(−)	(−)	⑤

肺 炎 桿 菌

性　　状	保存菌	分離菌	培　　地
	有　無	有　無	
乳糖分解性	(＋)	(＋)	①②
ブドウ糖分解性	(＋)	(＋)	①②③
インドール反応	(−)	(−)	③
運動性	(−)	(−)	③
ガス産生能	(＋)	(＋)	①②
硫化水素産生能	(−)	(−)	①②③
クエン酸塩利用	(＋)	(＋)	④
MR テスト	(−)	(−)	⑤
VP テスト	(＋)	(＋)	⑤

＊培地：①TSI寒天培地　②クリグラー確認培地　③SIM培地
④シモンズのクエン酸塩培地　⑤ブドウ糖リン酸ペプトン水

表 5　グラム染色性と莢膜形成確認

性　　質	大　腸　菌		肺 炎 桿 菌	
	保存菌	分離菌	保存菌	分離菌
グラム染色性	陰性	陰性	陰性	陰性
形　　態	桿菌	桿菌	桿菌	桿菌
莢膜形成確認	有	無	有	無

Ⅳ　考　　察

今回、研究用あるいは学生実習用の保存菌を、学生実習用に供して分離培地に塗抹して培養したところ、分離菌と明らかに異なった集落の性状が観察され、さらに、大腸菌では確認培地による生化学的性状の一部に相違点が認められた。そのうえ、分離培地上の保存菌には莢膜の形成が確認され、培地に継代保存中の菌にも認められた。これは、これまでに経験した生化学的性状の一部が欠落したことも含め細菌の変異が考えられたので、

分離菌と対比しながら種々比較検討した。

さらに、このような細菌の変異をもたらした原因として、この保存菌の使用履歴から米ぬか液にヒトから分離される細菌の増殖性があるのか検討したときに用いたことが考えられたので、米ぬかについて少し述べることにする。

細菌の変異として[3－4]まず生化学的性状についてみてみると、大腸菌では腸内細菌同定用試薬API20EのMEL（D-メルビオース）の分解性は菌株の70％で分解されると述べられているが[5]、保存菌では非分解であったことからプロファイル・インデックスの同定確率が分離菌の99.9％より低い97.5％の確率で大腸菌と同定された。ただ、この試薬は新たに開発されたものであり、保存菌のMELが過去にどうであっか不明である。

つぎに分離培地、確認培地による生化学的性状は、保存菌ではもともと乳糖分解菌であったものが、分離培地、確認培地ともに非分解性であり、さらに確認培地でのガス産生能が陰性化しており（運動性は保存中に消失）、培地の生化学的性状により本菌を同定をする場合には、多くの赤痢菌や組織侵入性大腸菌との鑑別[6]に困難をきたすところまで、生化学的性状に変異が生じていた。

肺炎桿菌の生化学的性状は、保存菌、分離菌ともにAPI20Eのプロファイル・インデックスと分離培地、確認培地による性状はまったく一致していたが、分離培地のSS寒天培地上の保存菌には、白金耳で塗抹した部分に孤立した集落が形成されず、ピンク色の太い線を引いたように旺盛な発育を呈し、さらにBTB乳糖加寒天培地での発育よりも旺盛な発育を示し、分離菌の発育性状とは明らかに異っており、栄養要求性に変異が生じているのかも知れない。分離培地上の集落を観察したり、白金耳でふれたりして集落型の変異、すなわちS-R変異の有無をみたところ、肺炎桿菌の分離菌では湿潤で粘性があって大きく盛り上がった集落（ムコイド型集落）を形成していたが、保存菌では集落の盛り上がりが小さく、白金耳でふれても粘性を欠いており、生理食塩水に菌を浮遊させてみると顆粒状の沈殿物がみられ、典型的なS-R変異が観察された。同時に、粘性が欠けていたことからM-N変異も認められた。

大腸菌の場合、肉眼での観察あるいは白金耳でふれた感じは、肺炎桿菌のS-R変異ほど明確ではなかったが、生理食塩水に菌を浮遊させてみると顆粒状の沈殿物が認められ、S-R変異が生じていた。

薬剤感受性試験により、薬剤への抵抗性に変異が生じているのか検討したところ、保存菌と分離菌の感受性を示した薬剤の種類とその阻止円の大きさはほぼ同一であり、薬剤に対する抵抗性に変異は認められなかった。

SS寒天培地とBTB乳糖加寒天培地の分離培地上の菌について、グラム染色とHiss法により莢膜染色を行ったところ、保存菌には莢膜の形成されているのが確認され、しかも、ハートインフュジョン寒天培地に保存中の菌にも莢膜の形成が認められた。分離菌ではいずれの培地の菌にも莢膜の形成は確認されなかった。

本来、莢膜を形成する菌は、ヒトやマウスなど動物の体内を通過すると莢膜が形成されるが、患者材料から分離されて同定後、保存を目的として何代も継代が繰り返されると莢膜は失われる。因みに、患者材料から分離された莢膜形成菌を継代培養して莢膜が何代まで確認可能であるか調べたところ、肺炎桿菌では４代目までは染色標本中のほとんどの菌で確認され、７代目以降ではほとんど認められなくなった。これに対して、大腸菌では２代目までは確認されが、それ以降の確認は極端に減少していた。この両者の莢膜は前者が耐熱性で、しかも、その厚さは菌体の数倍もあり、後者の莢膜は易熱性で、その厚さは菌体と同程度であり、これらのことが継代培養による莢膜の消失時期の早さに関係しているのかも知れない。

このように、保存菌を培養した分離培地上の菌に莢膜形成が確認されるということは莢膜抗原に何らかの変異が生じていることが考えれる。莢膜は親水性で菌を乾燥から守る役目が指摘され、さらにS-R変異を起こした菌は莢膜を欠くと述べられているが[7]、保存菌では分離菌の場合よりも明らかに乾燥しており、継代培養しても莢膜は失われず、この莢膜抗原の変異は一時的な変異ではな

いと思われた。

さらに、保存菌にいくつかの変異現象が認められたが、大腸菌では生化学的性状により菌を同定する上で重要な性状に変異が認められたが、肺炎桿菌には出現しなかった。これは先に述べた莢膜の性質や厚さと関係があるのかも知れない。

これら細菌の変異をもたらした原因になったのは、保存菌の使用履歴から米ぬか液が考えられた。中山ら[8]は細菌が変異を起こすほど高濃度に変異剤が含まれていたりあるいは細菌の修復機構に異常が生じて修復されないままDNAが複製されてしまうこともあると述べており、米ぬか液の中にそのような原因となる変異剤が含まれているのかも知れない。

米ぬか液をヒトから分離される細菌に応用してみる引き金になったのは、著者自身が水稲栽培を行い、収穫したものを籾すりして、さらに精米機で白米にして得られた米ぬかによる除草のことを知ってからである。

米ぬかの利用法として、一般的によく知られているのはぬか漬けとして用いられてきたことであろう。ところが、水田や畑の除草と有機農法を目的として利用されるようになってきた[9－10]。すなわち、米ぬかのみあるいは米ぬかと魚粉や鶏糞など、他のものと混合したボカシを散布すると、土壌中の微生物が活発に活動するようになる。そして、土壌中のミネラルなどの有効利用が促進され、土壌の表層が酸欠状態になり、有機物が分解されて発生する有機酸に雑草の発生を抑制する効果があるといわれている。

その他、現在では健康食品、化粧水、肥料、石鹸、米油の原料として、医学的にはガンの予防、習慣病をはじめとする疾病の予防効果など、多方面に利用されていることがインターネット上で紹介されている[11]。

今後は、細菌の変異や莢膜形成をもたらす成分について検討を進めたい。

V 結　語

大腸菌と肺炎桿菌の保存菌に出現した変異について、分離菌と種々比較検討を試みたところ、つぎのような成績を得た。

1）大腸菌では腸内細菌同定用試薬、分離培地、確認培地による生化学的性状のうち重要な性状の一部と莢膜形成性に、分離菌と明らかな相違点が認められた。

2）肺炎桿菌では腸内細菌同定用試薬と培地による生化学的性状は、分離菌の性状と一致したが、保存菌には莢膜形成が確認された。

文　献

1）成瀬順：染色法のすべて，月刊 Medical Technology 別冊，医歯薬出版，東京，1988，pp286-288

2）山田巌：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 1:111-116, 2003

3）吉田眞一，柳雄介 編：戸田新細菌学，南山堂，東京，2002,pp124-127

4）柳原保武，多村憲 編：微生物学 －病原微生物の基礎－，南江堂，東京，1998, pp43

5）API20E Ref.20190：ビオメリュー，フランス，pp269

6）余明順：血清型別が要求される細菌の同定検査シリーズ －下痢原性大腸菌と赤痢菌の鑑別－．Medical Technology 24:1281-1288, 1996

7）平松啓一，山西弘一 編：標準微生物学，医学書院，東京，1999，pp115

8）中山宏明，光山正雄，中村喜代人，関水和久 編：微生物学，医学書院，東京，1998，pp68-69

9）http://www.ruralnet.or.jp/syutyo/1996¯7/9812.htm

10）溝上秀男：土ごと発酵とはどういうことか？．現代農業，79(11)：78-83,2000

11）http：//www1.odn.ne.jp/¯caa68640/%8c%92%8DN.html