インフルエンザ菌の臨床細菌学

——抗生物質感受性試験と Spheroplast 化——

荒井澄夫・松本慶蔵・横山紘一
西岡きよ・中村　隆
東北大医学部第一内科

(昭和 46 年 2 月 12 日受付)

我々は慢性呼吸器感染におけるインフルエンザ菌の病原性をエコロヂカルな面から考察し，その臨床症状とインフルエンザ菌の消長とは密接な関連性があることを報告した[1]。

いつぽう，LAPINSKI 等[2] はインフルエンザ菌が *in vivo* で spheroplast に移行することを報告しているが，この現象が化学療法による一時的なインフルエンザ菌の消退と関係する1因子と考えられ，これを究明することは慢性呼吸器感染症の化学療法を確立する上でも極めて重要であると言わねばならない。

本論文ではその基礎的研究として従来から広く使用されているチョコレート培地を再検討し，家兎消化血液を基礎培地に加えることにより透明培地を得，その増殖，菌株の保存についても良好な結果を得ると共に分離株の抗生物質感受性試験でも 2，3 の興味ある現象を認めたので報告する。

材料および方法

1) 血液およびチョコレート平板

すべて家兎血液を使用し，チョコレート平板は 90℃ で調整した。

2) 消化血液作製法

数頭の家兎心穿刺により採血しガラス玉で脱線維処理した家兎血液 50 ml にあらかじめ濃塩酸を加え pH 1.5 に調整した 0.85% 食塩水 150 ml を加えた後，さらにペプシン（和光純薬）1.5 g を加え 55℃ 24 時間消化させた。消化後 5 *N*-NaOH で pH 7.6 に調整後 10,000 rpm 30 分遠心しその上清を陽圧ザイツ滅菌した。なお，消化血液は 20 ml に分注し使用まで −20℃ に保存した。

3) 消化血液培地

5.2% brain heart infusion agar または broth を基礎培地とし，これに 5% の割合で消化血液を加えた。

4) *Hemophylus* の分離同定

血液平板上のコロニーを heart infusion agar および消化血液平板上に接種しコロニー増殖の有無により確認した。

5) X, V 因子の作製および *parainfluenzae* の同定

V 因子は 25 g ニッテンドライ・イースト（日本甜菜糖株式会社）を 10 分間煮沸した後，上清を pH 7.2 に調整しザイツ滅菌した。X 因子は消化血液を 120℃ 15 分間湿熱菌したものを使用した。

Parainfluenzae の同定には X, V 因子の要求性および *Staphylococcus aureus* に対する satelleit 現象により確認した。

6) MIC 測定は日本化学療法学会法に準じ平板希釈法を採用した。

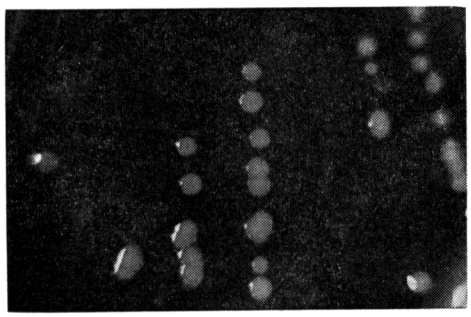
結　　果

1) 平板上での *Hemophylus* の生育

第1図に新鮮分離株の血液，チョコレート，消化血液平板上のコロニーの生育状況を示した。消化血液平板で

Fig. 1. Photograph of *H. influenzae* colonies on blood and digest blood agar.

on blood agar



on digest blood agar

は明らかに1コのコロニーが大きく，その継代も非常に安定であり且つ培地が透明なため*Hemophylus* の特色である光択のあるコロニーが明瞭に認められ顕微鏡下でも微小なコロニーの観察が可能となつた。

2) ***H. influenzae* の保存**

第1表に 5% 消化血液培地の stability を示した。一定期間毎に培地から1エーゼ採取しこれを平板培地に接種しコロニー形成能を調べた。室温（15～20℃）での保存では 2～3 週間でコロニー形成能が消失するのに対し，凍結乾燥状態では6カ月以上安定であつたが 60 バイアル中7バイアルに雑菌混入が認められた。18 時間培養後直ちに −20℃ で凍結したものでは1カ月間は安定であり雑菌混入も認められず，また b type 標準株の夾膜の消失も認められなかつた。

3) **抗生物質感受性成績**

主として慢性呼吸器疾患の喀痰中から分離されたインフルエンザ菌について平板希釈法による抗生物質感受性試験を行なつた。被験株はすべて消化血液液体培地で 18 時間培養したものを使用し菌数は 10^8/ml であつた。なお本報告では *H. parainfluenzae* および *H. haemolyticus* は除外した。

a) MIC(minimum inhibitory concentration)。第2表に抗生物質の MIC の結果を示した。広域 Penicillin に属する AB-PC, CB-PC, SB-PC が最もその成績がすぐれ，次いで，CP, CL, TC の順であり macrolide 系では RFP がすぐれ，PE-PC, DMP-PC, CER, SM, KM, EM 等ではその成績は低かつた。

b) 抗生物質の菌形態への影響。MAC, MIC が明瞭に区別できる例について，ギムザ染色によりその菌形を比較した。図2に明らかなように，MAC, MIC 間の抗生物質濃度ではインフルエンザ菌は spheroplast の形を示し一部は ghost 化が認められた。また一部には強染

Table 1. Stabilities of *H. influenzae* in various conditions

	1W	2W	3W	1M	2M	6M
Room temp. on slant	+++++	+++++	+++++	−−−−−	−−−−−	NT
Room temp. in liquid	+++++	+++++	−−−−−	−−−−−	−−−−−	NT
Freezing at 20℃ in liquid	+++++	+++++	+++++	+++++	−−−−−	NT
Lyophylization	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++	+++++

NT : not tested

Table 2. Sensitivity of *H. influenzae* for antibiotics

Antibiotics	No. of strains	MIC (mcg/ml)										
		0.2≧	0.39	0.78	1.56	3.13	6.25	12.5	25	50	100	>100
PC-G	46	1	3	19	1	9	3	4	2	1	2	1
AB-PC	46	10	12	7	6		1		1	2	5	1
CB-PC	33	5	19		2		1	1		5		
SB-PC	33		11	9	1	1		5	1	2	1	2
PE-PC	46					1	7	19	4	6	5	4
DMP-PC	46				1	14	16	8	2	2	2	1
CER	45					4	9	1	16	14	1	
SM	45				1	22	17	5				
KM	45				2	31	10	2				
GM	45			6		29	9	1				
CP	46		15	28	3							
TC	43		8	16	4	13	2					
EM	43			1	14	19	9					
LM	43					1	4	6	17	9	5	1
LCM	43						5	15	16	3	4	
RFP	33	1	18	8	3			1	2			
CL	42	8	7	24	3							
ND	45			4	7	13	9	9	3			

Fig. 2. Photograph of spheroplast and filament form of *H. influenzae* by Giemsa stain (×800)

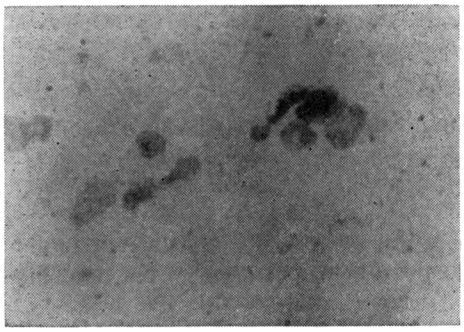


Table 3. MIC/MAC Distribution of *H. influenzae* strains with various antibiotics

Antibiotics	MID/MAC ratio								
	2^0	2^1	2^2	2^3	2^4	2^5	2^6	2^7	2^8
PC-G	22	9	4	4		4	1	1	1
AB-PC	27	7	3		1		1	1	6
SB-PC	16	4	2			4	2	2	3
CB-PC	19	5	2			1	1		5
PE-PC	26	13	1	2	4				
DMP-PC	30	11	2	1		1		1	
CER	22	16	3	4					
SM	27	16	2						
KM	32	9	4						
GM	28	16	1						
CP	42	4							
TC	32	10	1						
EM	28	15							
LM	26	14	1	2					
LCM	26	14	3						
RFP	26	6	1						
CL	16	16	8	2					
ND	31	11	1	2					

色性を示し内部に粒子の集合が認められるもの，フィラメント形に変形しているものも認められた。

c) Spheroplast 化に対する抗生物質の影響。インフルエンザ菌の spheroplast 化を促進する抗生物質を検討するために各被検株について MIC/MAC を算出しその結果を表3に示した。細胞壁合成阻害剤である PC 系抗生物質では MIC/MAC 価の大きい株が多く，特に PC-G ではその傾向が著しかつた。MIC/MAC 価が8倍以上のものに注目すると PC-G では 11/46(24%) がこのような株であり，以下 AB-PC 9/46 19.5, SB-PC 13/35, CB-PC 6/35, PE-PC 6/46 (13%) であつた。また CER 4/45(8.8%), CL, ND にも各々 4/41(4.8%), 2/44(4.7%) の割合で存在した。Aminoglycoside 系および TC, CP 等では MIC/MAC 価は低値を示し macrolide 系では LM で 2/42(4.7%) が認められたが，EM, RFP 等では認められなかつた。

d) 株別による MIC, MAC の検討。インフルエンザ菌の株別による spheroplast 化の難易を検討するために表4に PC 系抗生物質で MIC/MAC 価が8倍以上を示した株(+)と8以下の株(−)の2群に分けその各々について他の抗生物質で8倍以上の価を示した株数を記した。PC 系(+)で CER(+) なのは4株，CL(+) 2株，ND(+) 1 株であつた。また，macrolide 系の LM で(+)を示したのは2株でこれらの株は PC 系抗生物質，CL, ND に対しては(−)であつた。

考　　察

インフルエンザ菌が慢性呼吸器感染症の最も重要な菌であることはもちろんであるが，その菌のもつ特異性により分離同定に難があり本邦での検討はこの点で極めて少なく，小栗等[4]の報告をみるのみであるが，我々は新しい培地を FILDES の変法として作り且つそのすぐれた保存法を確立し多数の菌の MIC 測定も可能とした。このことは本邦に於けるインフルエンザ菌の研究のため大いに役立つものと考えられる。

Table 4. Relationship of no. of *H. influenzae* strains into spheroplast transformation between PC group and other antibiotics

MIC/MAC ratio in PC group	No. of strains showed over 8 times in MIC/MAC ratio in PC and other antibiotics						
	CER	CP	TC	Amino-glico.	Macro.	CL	ND
over 8 times 23	4	0	0	0	0	2	1
under 8 times 23	0	0	0	0	2	0	1

In vitro での spheroplast の誘導には細胞壁合成阻害とその stabilizer として hypertonic の条件が必要とされているが[5]，インフルエンザ菌では必ずしも後者の要素は必要ないとされている[2,6]。本実験でも多数の PC 系抗生物質で spheroplast が誘導されたことは慢性呼吸器感染症でも適当な抗生物質の濃度ではインフルエンザ菌が容易に spheroplast 化することを示唆するものである。

SMITH[7] 等は *Staphylococcus aureus* に於いて，また VON BOVEN[8] は *Streptococcus* group A の L-form 誘導の際，株によりその transformation に難易の差が存在することを報告しているが，我々のインフルエンザ菌の実験成績でも CER 等で MIC/MAC 価が高いものはすべて PC 系抗生物質でも高値を示したことは株による transformation の難易性を示すものであり，将来 *in vitro* での spheroplast および L-form を追求する上で重要なポイントとなるであろう。また，GODZENSKI 等[9]は TC, EM でも L-form, spheroplast の誘導は可能であることを報告しているが，本実験で LM のみで MIC/MAC ratio が8倍以上のものが2株に認められたことは L-form の成因を追求する上で興味ある知見である。

結　　論

我々は従来からインフルエンザ菌に広く使用されているチョコレート培地に再検討を加え家兎消化血液培地を使用することにより次の結果を得た。

1. 消化血液培地では血液，チョコレート培地に比しインフルエンザ菌の増殖が非常に良好であり，その継代も安定であり，同時に培地が透明であるため抗生物質感受性の判定が容易かつ正確になつた。

2. インフルエンザ菌の保存には凍結保存法が最も簡便かつ安定性があつた。

3. PC 系抗生物質および CER, CL, ND 等の MAC-MIC 間の濃度ではインフルエンザ菌の spheroplast 化が著明に認められ，spheroplast への transformation は薬剤によつて異なると同時に株による差異も認められた。

文　　献

1) 松本慶蔵，荒井澄夫，横山紘一，西岡きよ：インフルエンザ菌の臨床細菌学—慢性呼吸器感染症を中心に—。内科 26, 476～479, 1979
2) LAPINSKI, H. M. & E. D. FLASK : Induction of L forms of *Haemophylus influenzae* in culture and their demonstration in human bronchial secretions. J. Bact. 93, 1438～1445, 1967
3) 小栗豊子，小酒井　望：各種臨床材料から検出された *Haemopilus* 属の分類および抗生物質感受性。Jap. J. Antibiotics 12, 299～302, 1969
4) SMITH, P. E. : Comparative physiology of pleuropneumonia-like and L-type organisms. Bacteriol. Rev. 28, 97～125, 1964
5) DIENES, L. & WEINBERGER, H. J. : The L forms of bacteria, Bacteria I (Acad. Press), 15, 245～288, 1960
6) SMITH, J. A. & WILLIS, A. T. : Some physiological characters of L forms of *Staphylococcus aureus*. J. Pathol. Bacteriol. 94, 359～365, 1967
7) VAN BOVEN, C. P. A., ENSERING, H. L. & HIZMANS, W. : Size determination by the filtration method of the reproductive elements of group A streptococcal L-forms. J. Gen. Microbiol. 403～412, 1968
8) GODZESKI, C. W., GORDON, B. & PAVEY, D. E. : L-phase growth induction as a general charactristic of antibiotic-bacterial interaction in the presence of serum. Antimicr. Agents & Chemoth. p. 843, 1962

STUDIES ON *H. INFLUENZAE* FROM CLINICAL ASPECT

Susceptibility of *Hemophilus influenzae* to Antibiotics and Spheroplast-transformation

SUMIO ARAI, KEIZO MATSUMOTO, KOICHI YOKOYAMA,
KIYO NISHIOKA and TAKASHI NAKAMURA
First Department of Internal Medicine, Tohoku University School of Medicine, Seryo-machi, Sendai, Japan

Stability of *H.influenzae* in various conditions and the effect of various antibiotics on spheroplast transformation of *H.influenzae in vitro* were investigated by using a medium containing 5% digested blood of rabbits instead of ordinary chocolate agar medium for *H. influenzae*. The results were as follows.

1) The growth of *H. influenzae* in this medium was excellent and transparency of the medium was most favourable for the microscopic examination.

2) *H. influenzae* was most stable under the condition of freezing and drying and it fairly resisted to the freezing at −20 C. Because of the readiness, however, the latter treatment was recommended for the storage of the strains.

3) Among the antibiotics tested for the inhibition of the growth of *H. influenzae* strains, only the PC group antibiotics showed higher values of MIC/MAC ratio with certain strains.

The PC group antibiotics, when the MIC/MAC ratio was over 8, frequently produced the filamentous and spheroplast forms of *H. influenzae*.

Accordingly, as for the PC group antibiotics, the MIC/MAC ratio was thought to be a good indicative of the spheroplast transformation of *H. influenzae*.