

[短 報]

市販輸送培地における *Neisseria meningitidis* 生菌数の経時的変動

小林亜由香¹⁾・中島 淳¹⁾・大塚 武²⁾・飯草正実³⁾
酒井雄一郎⁴⁾・佐多 章⁵⁾・大城健哉⁶⁾・菊地孝司⁷⁾
菊池 俊⁸⁾・松本裕子⁹⁾・宮原聖奈¹⁰⁾・宮平勝人¹¹⁾
神谷 元¹²⁾・高橋英之¹³⁾・東田修二¹⁾・齋藤良一¹⁴⁾

¹⁾ 東京医科歯科大学医学部附属病院検査部

²⁾ 千葉市立海浜病院臨床検査科

³⁾ 獨協医科大学埼玉医療センター感染制御部

⁴⁾ 横浜市立みなと赤十字病院検査部

⁵⁾ 宮崎県立宮崎病院臨床検査科

⁶⁾ 那覇市立病院医療技術部検査室

⁷⁾ さいたま市健康科学研究センター保健科学課臨床微生物係

⁸⁾ 千葉県衛生研究所細菌研究室

⁹⁾ 横浜市衛生研究所検査研究課細菌担当

¹⁰⁾ 宮崎県衛生環境研究所微生物部

¹¹⁾ 沖縄県八重山保健所生活環境班

¹²⁾ 国立感染症研究所感染症疫学センター

¹³⁾ 国立感染症研究所細菌第一部

¹⁴⁾ 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科分子病原体検査学分野

(令和2年7月13日受付, 令和2年12月3日受理)

輸送培地2種(キャリブレア培地と活性炭含有アミーズ培地)における *Neisseria meningitidis* の生育の関係を解析した。*N. meningitidis* ATCC 13077 および臨床分離株の菌液の一定量をスワブに接種後、4℃または25℃で静置した。1, 3および7日経過後、スワブをチョコレート(CA)寒天培地に直接塗抹する方法(直接法)、およびスワブを滅菌生理食塩水に浮遊後、その一定量をCA寒天培地に塗抹する方法(定量法)により、経時的な生菌数を測定した。直接法と定量法において、ATCC13077株をアミーズ培地で4℃保存した生菌数は、25℃で保存した場合と比して、時間依存的な減少は穏やかであることを見出した。これらの傾向はキャリブレア培地でも確認された。しかし、これらの結果は菌株の性質で異なる可能性も示唆された。以上より、4℃条件下で本菌をアミーズ培地とキャリブレア培地で保存することは菌の死滅を最小限に抑える方法であることが明らかとなった。

Key words: 侵襲性髄膜炎菌感染症, *Neisseria meningitidis*, 輸送培地

序 文

侵襲性髄膜炎菌感染症(Invasive meningococcal disease, IMD)は重症度が高く、海外では集団感染事例も多いため、常に公衆衛生的上注視されている¹⁾²⁾。一方、わが国では年間20-40例ほどの希少感染症であるが³⁾、過去に集団感染事例も発生しているため⁴⁾、決して軽視できる疾病ではない。さらに、わが国で国際的なイベント開催等により、IMDが流行した場合は、それらの情報をいち早く国内外で共有する必要があるため、迅速な病原体診断や積極的疫学調査等のIMDに対する行政検査体制の構築が求められている。

IMDの起炎菌である *Neisseria meningitidis* は、“fastidious organism”として知られ、特に低温や高いpH、乾燥に影響を受けやすい⁵⁾。したがって、本菌の精査や疫学調査などの行政検査等に応じて菌株を輸送する場合は、その特性を考慮した菌の生育能力を保持できる条件下で輸送する必要がある。しかし、これまで様々な輸送培地が臨床検体の輸送で使用されているが、依然として、輸送培地の *N. meningitidis* 生育に及ぼす影響を解析した研究は国内外で極めて少ない⁶⁾⁷⁾。

今回我々は、わが国におけるIMDの行政検査に関わる *N. meningitidis* の輸送条件を確立することを目指し、広く臨床応用される主要な輸送培地2種を用いた保存条件と *N. meningitidis* の生育の関係を解析した。

材料と方法

1. 使用菌株と輸送培地

菌株は、マイクロバンク(イワキ)にて実験直前まで-80℃

著者連絡先：(〒113-8510) 東京都文京区湯島1-5-45
東京医科歯科大学医学部附属病院検査部
小林亜由香
TEL: 03-5803-5621(内線5621)
E-mail: ayuklmlab@tmd.ac.jp

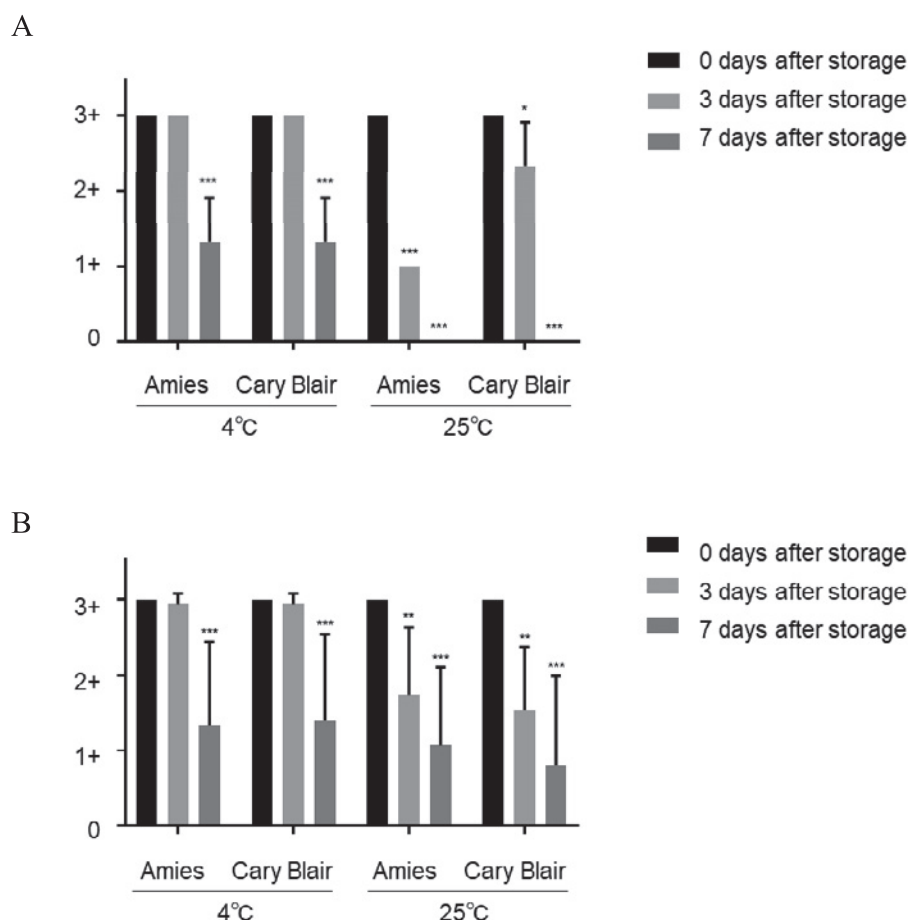


Fig. 1. Reduction of colony count using the direct method. Colony count (0, 1+, 2+, and 3+) at 4°C and 25°C in Amies with charcoal and Cary Blair transport systems was compared among *N. meningitidis* ATCC 13077 (A) and clinical isolates (n=5) (B). Data are means±standard deviation of biological triplicate experiments. Statistical significance was determined by Dunnett's multiple-comparison test compared to the 0 days after storage. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

保存した *N. meningitidis* ATCC 13077 および臨床分離株 (5株) を使用した。輸送培地は、キャリブレア培地含有シードスワブ γ1 号 ‘栄研’ (以下、キャリブレア培地、栄研化学)、および活性炭入りアミーズ培地含有シードスワブ γ3 号 ‘栄研’ (以下、アミーズ培地、栄研化学) を使用した。

2. 各種輸送培地と保存温度における生菌数の測定法

①直接法：チョコレート寒天培地 (以下 CA 培地、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) で 35°C、24 時間炭酸ガス培養 (CO₂濃度：5%) した使用菌株について、輸送培地専用スワブで 100 コロニーを掻き取った後、輸送培地に戻し、4°C または 25°C で 3 日および 7 日間静置した。その後、スワブを取出し、CA 培地のシャーレ外壁 12 時付近に取出したスワブを直接塗抹し、白金耳にて一定方向で 6 時付近まで塗り広げた。菌を接種した CA 培地は、35°C で 24 時間炭酸ガス培養後、目視にて発育コロニー (生菌数) を測定した。結果は、CA 培地の 1/3 の面積をコロニーが占める場合は 1+, 1/3~2/3 の面積を占める場合は 2+, それ以上の面積を占める場合は 3+ とした。なお対照は、各条件下で静置後、速やかに上記の工程を行った成績とした。

②定量法：直接法と同様に前培養した使用菌株に対して、

滅菌生理食塩水にて McFarland no. 4 の濁度に調整後、約 10⁶ CFU/mL の菌液をマイクロピペットにて輸送培地専用スワブに 100 μL 接種した。菌液を添加したスワブは各輸送培地に戻し、4°C または 25°C で一定期間 (1~7 日) 静置した。その後、取出したスワブを滅菌生理食塩水 1 mL に入れ、しっかりと菌を浮遊させた。その菌浮遊液を段階希釈後、それぞれ 100 μL を CA 培地に接種した。菌を接種した CA 培地は、35°C で 24 時間炭酸ガス培養後、生菌数を測定した。結果は、対照の生菌数 (各条件下で静置後、速やかに上記の工程を行った成績) を 100% とし、相対的な割合で示した。

3. 統計学的解析

直接法と定量法による *N. meningitidis* 生菌数の測定は、それぞれ 3 重測定 (biological triplicate) を行い平均値±SD で表した。統計学的処理は GraphPad Prism version 7.0 を用いて Dunnett 法による多重比較検定を行った。p<0.05 を統計学的有意水準とした。

結 果

1. 直接法による各輸送培地・保存温度の生菌数

ATCC 13077 株が接種されたアミーズ培地における生菌

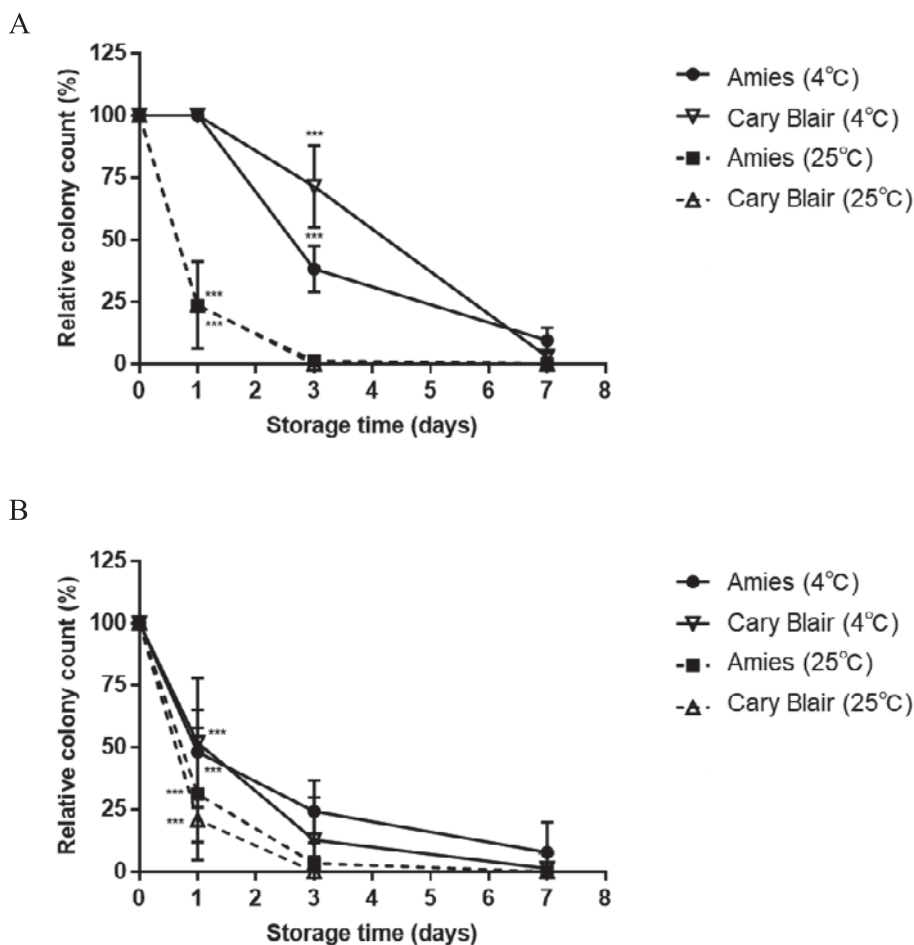


Fig. 2. Reduction of colony count using the quantitative method. Relative colony count (%) at 4°C and 25°C in Amies with charcoal (A) and Cary Blair (B) transport systems was compared among *N. meningitidis* ATCC 13077 (A) and clinical isolates (n=5) (B). Data are means \pm standard deviation of biological triplicate experiments. Statistical significance was determined by Dunnett's multiple-comparison test compared to the 0 days after storage. *** $p < 0.001$.

数は、4°C 静置後7日目でも生菌数を認めただのに対し (Fig. 1A), 25°C 静置では7日目でも検出感度以下を示した。これらの結果は、キャリブレア培地でも同様の傾向を示した。

一方、臨床分離株5株を用いた解析では、双方の輸送培地に菌を接種し4°Cで静置後、3日目から生菌数が減少し、7日目ですら低下した (Fig. 1B)。これらの結果は菌株間で差が認められた。また、双方の輸送培地を25°Cで静置した場合、その生菌数も4°Cの結果と同様の傾向を示したが、その値は4°Cのものより迅速に低下した。

2. 定量法による各輸送培地・保存温度の生菌数

直接法によりアミーズ培地とキャリブレア培地の双方において、4°Cで静置後、7日目まで生菌が確認されたため、より詳細な変動を確認する目的で定量法を実施した。ATCC 13077株が接種されたアミーズ培地およびキャリブレア培地では、4°Cで静置後、ともに生菌数は3日目で減少したが、7日目でもそれぞれ10%および3%の生菌が確認された (Fig. 2A)。しかし、25°Cで静置した場合は、双方の輸送培地とも1日目で対照の25%程度まで生菌数が減少し、3日目以降は生菌が1%以下に低下した。

一方、臨床分離株 (5株) をそれぞれアミーズ培地とキャ

リブレア培地に接種し4°Cで静置した場合の生菌数は、1日目で50%程度まで減少し、7日目では10%以下を示した (Fig. 2B)。しかし、この7日目の結果は、双方の輸送培地で菌株間の差が認められ、検出感度以下を示す株も確認された。また、双方の輸送培地を25°Cで静置した場合の生菌数は、4°Cで静置した場合と比べて速やかに減少し、7日目では全ての株が検出感度以下を示した。定量法の結果は、直接法の結果を支持するものであった。

考 察

臨床検体中に含まれる起炎菌の生育が悪い場合は、培養同等の検査成績に影響を及ぼすことが知られる⁸⁾。そのため、病原体の性質に応じた輸送条件の検討は極めて重要である。

米国微生物学会の臨床微生物学マニュアルにおいて、*N. meningitidis*の保菌が疑われる咽頭スワブ検体は、栄養要求の厳しい細菌の輸送に適したアミーズ培地で保存する方法が示されている⁹⁾。今回我々もアミーズ培地を用いて検証した結果、直接法と定量法によりATCC 13077株を4°C保存した場合の生菌数は、25°Cで保存した場合と比べて、時間依存的な減少は穏やかであることを見出した。これらの傾

向はキャリブレア培地でも確認されたことから、25℃ 保存と比して4℃ 保存では菌体内の様々な代謝が低下したことで自己融解が抑制され、生菌数の穏やかな減少を引き起こした可能性が考えられた。したがって、4℃ による一週間の保存であれば、双方の輸送培地で *N. meningitidis* の生育能力を維持できることが示唆された。

一方、Wasasらは⁶⁾、*N. meningitidis* の保存に活性炭含有の変法アミーズ培地を使用し、室温保存1日目で速やかに生菌数が減少することを報告している。この報告では使用菌液量など方法の詳細な記載が無いため、我々の定量法と異なる可能性は否定できないが、ATCC 13077株と臨床分離株5株を使用した我々の結果も同様の傾向が認められた。しかし、今回、臨床分離株における生菌数の結果から、同一の保存温度であればアミーズ培地とキャリブレア培地ではほぼ同様の減少傾向を示すことが明らかになったが、菌株の性質によりその減少率が異なることが示唆された。また、今回の定量法は微量な菌液を用いた方法であったが、臨床分離株の直接法で見られた結果から、スワブへの接種菌量を増加させることで、25℃ 保存後7日目で自己融解が進み一部が死滅したとしても生菌を得られる可能性が示唆された。

結 語

N. meningitidis をアミーズ培地やキャリブレア培地で4℃ 保存する方法は、時間依存的に生菌数は減少するが、25℃ 保存の方法と比して本菌の死滅を最小限に抑えるため、本菌の行政検査等を目的とした輸送に有用であると考えられる。しかし、スワブへの接種菌量を増加することで、双方の輸送培地で25℃ 保存する方法も本菌の輸送方法として期待される。

謝辞：本研究は、AMEDの課題番号JP20fk0108071の支援を受けた。

利益相反：申告すべき利益相反なし。

文 献

- 1) Campbell, H, V Saliba, R Borrow, et al. 2015. Targeted vaccination of teenagers following continued rapid endemic expansion of a single meningococcal group W clone (sequence type 11 clonal complex), United Kingdom 2015. *Euro Surveill* 20: 21188.
- 2) Lujan, E, K Winter, J Rovaris, et al. 2017. Serum Bactericidal Antibody Responses of Students Immunized With a Meningococcal Serogroup B Vaccine in Response to an Outbreak on a University Campus. *Clin Infect Dis* 65: 1112-1119.
- 3) 高橋英之, 大西 真, 蜂巢友嗣, 他. 2018. 2013~2017年までの侵襲性髄膜炎菌感染症の国内症例の起炎菌の血清学および分子疫学的解析. *国立感染症研究所 病原微生物検出情報 IASR* 39: 3-4.
- 4) 関谷紀貴, 藤 由香, 田原寛之, 他. 2011. 宮崎県における髄膜炎菌感染症集団発生事例. *国立感染症研究所 病原微生物検出情報 IASR* 32: 298-299.
- 5) Apicella, M. 2020. Microbiology and pathobiology of *Neisseria meningitidis*. Up To Date. <https://www.uptodate.com/contents/microbiology-and-pathobiology-of-neisseria-meningitidis> 2020年6月30日現在.
- 6) Wasas, AD, RE Huebner, KP Klugman. 1999. Use of dorset egg medium for maintenance and transport of *Neisseria meningitidis* and *Haemophilus influenzae* type b. *J Clin Microbiol* 37: 2045-2046.
- 7) Ajello, GW, JC Feeley, PS Hayes, et al. 1984. Trans-isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 20: 55-58.
- 8) DeMarco, AL, LK Rabe, MN Austin, et al. 2017. Survival of vaginal microorganisms in three commercially available transport systems. *Anaerobe* 45: 44-49.
- 9) Stevens, DL, AE Bryant, A Berger, et al. 2011. Clostridium. p. 834-857. In: *Manual of Clinical Microbiology*, 10th Edition. ASM Press, Washington, DC.

Assessment of different storage conditions for *Neisseria meningitidis* survival

Ayuka Kobayashi¹⁾, Jun Nakajima¹⁾, Takeshi Otsuka²⁾, Masami Iigusa³⁾, Yuichiro Sakai⁴⁾, Akira Sata⁵⁾,
Takeya Ohshiro⁶⁾, Koji Kikuchi⁷⁾, Shun Kikuchi⁸⁾, Yuko Matsumoto⁹⁾, Seina Miyahara¹⁰⁾, Masato Miyahira¹¹⁾,
Hajime Kamiya¹²⁾, Hideyuki Takahashi¹³⁾, Shuji Tohda¹⁾, Ryoichi Saito¹⁴⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Tokyo Medical and Dental University, Medical Hospital

²⁾Department of Clinical Laboratory, Chiba Kaihin Municipal Hospital

³⁾Department of Infection Control and Prevention, Dokkyo Medical University Saitama Medical Center

⁴⁾Department of Clinical Laboratory, Yokohama City Minato Red Cross Hospital

⁵⁾Department of Clinical Laboratory, Miyazaki Prefectural Miyazaki Hospital

⁶⁾Department of Clinical Laboratory, Faculty of Medical Technology, Naha City Hospital

⁷⁾Clinical Microbiology Section, Division of Health Science, Saitama City Institute of Health Science and Research

⁸⁾Clinical Microbiology Section, Chiba Prefectural Institute of Public Health

⁹⁾Clinical Microbiology Section, Division of Inspection Research, Yokohama City Institute of Health

¹⁰⁾Clinical Microbiology Section, Miyazaki Prefectural Institute for Public Health and Environment

¹¹⁾Okinawa Prefecture Yaeyama Regional Public Health Center Public Environment Group

¹²⁾Infectious Disease Surveillance Center, National Institute of Infectious Diseases

¹³⁾Department of Bacteriology 1, National Institute of Infectious Diseases

¹⁴⁾Department of Molecular Microbiology Graduate School of Medical and Dental Sciences, Tokyo Medical and Dental University

Appropriate preservation of fastidious bacteria is required during transport because bacteria examination depends on the viability of bacteria in clinical specimens, which can be affected by conditions such as storage, shipment temperature and transport media. However, limited data are available on the storage conditions for keeping the survival of *Neisseria meningitidis*. In this study, we aimed to evaluate the ability of different transport media in maintaining the viability of *N. meningitidis*. Swabs inoculated with bacterial suspension of either *N. meningitidis* ATCC 13077 or clinical isolates (n=5) were stored in two transport media, Amies with charcoal and Cary Blair for 7 days at 4°C and 25°C. Both direct and quantitative methods were used to assess the number of viable cells. With the direct method, swabs were directly plated on chocolate agar followed by colony count. While with the quantitative method, swabs were first floated in sterile saline, a portion of the bacterial suspensions was then plated on chocolate agar, and colonies were counted. In both methods, the viability of ATCC 13077 kept in Amies with charcoal showed a milder time-dependent decrease at 4°C, compared to those stored at 25°C. Similar result was also obtained when Cary Blair was used; however, it was possible to be strain-dependent. Our findings indicated that the viability of *N. meningitidis* was maintained in both Amies with charcoal and Cary Blair and it will contribute to further understanding on the right condition for the shipment of *N. meningitidis*.