

2) 髄液からの分離

髄液を3,000rpmで20分遠心し、滅菌パスツールピペットで1滴程度の沈渣をチョコレート寒天培地と血液寒天培地に接種する。ただし髄液量が1ml以下であれば遠心せずにそのまま接種する。

検体を接種した平板を5~10%CO₂環境下(あるいはロウソク培養)、35~37℃で18~24時間培養し、集落を観察されれば継代して同定を行う。集落を観察されなければ3日目まで培養し、毎日観察する。

可能であれば、予備的に寒天平板による分離と併用して、髄液の一部をトリプトソイブロスあるいはブレインハートインフュージョンブロス(+発育促進剤)等の液体培地に接種して35~37℃で培養し、7日目まで菌の発育を毎日確認する。

髄液は採取直後に培地に接種することが望ましいが、そうでなければ極力1時間以内に接種する。その場合、髄液の入ったチューブの栓をゆるめて5%CO₂存在下、35~37℃で保管する。

5%CO₂の環境が得られなければ密栓して4~5℃あるいは室温(22℃前後)で保管するのが望ましい。髄液のpHが急激に上昇して髄膜炎菌等の病原菌の生存性に影響を与えたとの報告⁷⁾があるため、決して大気中に(あるいは密栓したまま)30℃以上で放置してはならない。

また1時間を過ぎる場合は4~5℃あるいは室温で保管するが、できるだけ早く培地に接種する。輸送などにより採取後1時間以内に寒天培地に接種することができないことが髄液採取当初から分かっている場合は、T-I mediumに接種することが勧められている²⁾。

髄液以外の、通常は無菌である検体(関節腔液等)は髄液と同様に扱う。

3) 血液からの分離

髄膜炎菌性髄膜炎を含む細菌性髄膜炎では、血液は採取直後に血液培養用液体培地に接種する。接種する血液量は、培地容量に対して1:5から1:10となるように、5~10mlを50mlの培地に接種する。幼小児では1:10~20程度になるように、1~2mlの血液を20mlの培地に接種する。

培地は通気性を保ち、3~10%CO₂環境下、35~37℃で培養し、7日後まで毎日観察する。菌の増殖が観察されたら培地の一部を無菌的に血液寒天培地とチョコレート寒天培地に接種する。菌の増殖が観察されなくても18~24時間後、48時間後および7日後に血液寒天培地とチョコレート寒天培地に接種して菌の増殖の有無を確認する。

市販の血液培養用キット(Isolator等)を利用することもできる。

血液から淋菌を検出する場合には、二層培地の使用が推奨される。

4) 髄液、血液以外の検体からの分離

喀痰や鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物等のように混在菌の多い検体は、MTM培地等の選択培地に接種し、5~10%CO₂環境下(あるいはロウソク培養)、35~37℃で培養すると、24~48時間で集落は観察されるが、観察されない場合3日目まで培養する。淋菌のAHU型は3日を要する。

病原性*Neisseria*属菌にはバンコマイシン感受性株があるため、選択培地に発育しない株も検出できるようにチョコレート寒天培地といった非選択培地を併用する。平板は3日目まで毎日観察し、集落が見られれば非選択培地に継代する。

3. 鑑別・同定

髄膜炎菌の平板上の集落は、正円形、直径1～2mm、灰白色、半透明で、表面平滑で光沢がある。淋菌の集落は正円形、直径0.5～1mm、灰白色から白色、不透明の光沢ある隆起した集落である。分離直後は小型の集落（T1、T2）が多いが、長時間または継代により大型、扁平、やや透明の集落（T3、T4）となる。推定試験としてオキシダーゼ試験とグラム染色を行い、さらに糖からの酸産生性、硝酸・亜硝酸還元性、食塩無添加普通寒天培地における発育、シュークロースからの多糖体産生性、DNA分解酵素産生能等の性状を調べる。検査の流れを図1に、*Neisseria*属菌および近縁種の集落の特徴を表1に、生化学的性状を表2に示した^{8,9)}。

日常的には、平板上の集落の形態、オキシダーゼ試験、グラム染色、糖からの酸産生性および硝酸・亜硝酸還元性でほぼ鑑別することができる。これらの性状と検体採取部位を考慮し、必要に応じて各種培地での発育、シュークロースからの多糖体産生性、酵素プロファイル等を調べる。

*Neisseria*属菌の中には髄膜炎菌と同様にグルコースとマルトースから酸を産生する菌種がある。また髄膜炎菌をはじめとする*Neisseria*属菌には、稀に糖からの酸産生性が非典型的な株があり、鑑別を誤ることがある。鼻咽頭粘液等の雑菌の多い検体からの分離を非選択培地を用いて行った場合は非病原性*Neisseria*属菌を拾う可能性があるため、生化学的性状を十分検討した上で鑑別を行うことが重要である。特に*N. meningitidis*と*N. polysaccharea*、*N. gonorrhoeae*とマルトース非分解*N. meningitidis*、*N. meningitidis*と*N. subflava*の鑑別には注意を要する。

1) オキシダーゼ試験およびグラム染色

分離培地上の疑わしい集落を、オキシダーゼ試験用試薬を用いて調べる。新鮮集落に直接試薬を滴下するか、試薬を滴下したろ紙に新鮮菌を塗抹する。陽性であれば数秒で青紫色に発色する。*Neisseria*属菌はオキシダーゼ陽性である。

Huckerの変法を用いてグラム染色を行い、顕微鏡下でグラム陰性双球菌であることを確認する。

2) カタラーゼ試験およびスーパーオクソール試験

Kellogg培地で培養した集落に直接、あるいはシャーレに取った菌に試薬をかけて発泡の状態を観察する。発泡があれば陽性、なければ陰性とする。

血液寒天培地にはカタラーゼが含まれているため、試験に用いてはならない。

3) 糖からの酸産生性

試験には16～18時間程度培養した平板上の大量の菌体を必要とする。培養時間が長いと自己融解が始まり、掻き取りやCTA培地中での均一化が難しくなるので、18時間以内とする。特にチョコレート寒天平板では融解が早い。

Kellogg培地等の平板1～2枚全体に菌を発育させ、1チューブ当たり2白金耳程度の菌体をかき取る。培地表面から0.5～1cm程度までに菌を接種し、培地とよく混和して接種部を白濁させた後に管底まで穿刺する（図2参照）。35～37℃で24時間静置後にCTA培地の変化を観察する。

グルコース、マルトース、シュークロース、フラクトース、ラクトースを1%に添加した各CTA培地に菌を接種し、培地の上部が黄変したチューブを陽性、赤変したチューブを陰性とする。

培地に変化のないチューブは接種量が不足しているためやり直す。また、穿刺部位や培地全体に菌の増殖が認められるチューブは他の菌種による汚染として、やり直す。

4) 硝酸塩・亜硝酸塩還元性

Kellogg培地等で16～18時間培養した菌をそれぞれの培地に多めに（1白金耳程度）接種し、大気中に35～37℃で24～48時間培養する。

培養後、0.8%スルファニル酸と0.5% *N,N*-ジメチル-1-ナフチルアミンまたは*N*-(1-ナフチル)エチレンジアミン-2塩酸塩を等量に混ぜ、2滴ずつ滴下する。

硝酸カリウムを加えた培地が赤変すれば硝酸塩還元陽性、赤変せず亜鉛末を加えて赤変すれば陰性、赤変しなければ陽性とする。亜硝酸カリウムを加えた培地が赤変すれば亜硝酸塩還元陰性、赤変しなければ陽性と判定する。ダーラム管中のガスの有無を観察する。

5) 各種培地での発育

35~37℃における病原性*Neisseria*属菌用選択培地（分離時に選択培地を用いなかった場合）や食塩無添加普通寒天培地、あるいは22℃におけるチョコレート寒天培地あるいはKellogg培地での発育性を調べる。発育試験には新鮮培養菌から 10^{6-7} CFU/ml程度の菌液を作製し、これを各培地に接種して選択培地では5~10%CO₂環境下、食塩無添加普通寒天培地および22℃における発育では大気中、35~37℃で48時間観察する。

これらの性状は*Neisseria*属菌の鑑別に補助的に用いられる。

6) シュークローズからの多糖体産生性

試験用培地に菌を濃厚に接種し、大気中に35~37℃で24~48時間培養する。集落にLugol液（グラム染色用ヨード液を1:4に希釈した溶液）を滴下し、暗赤紫色から濃青色を示した株を陽性とする。淋菌はこの培地で発育しにくい。市販のグラム染色用ヨード液では反応が正しく現れない場合があるので注意する⁹⁾。

*N. meningitidis*と*N. polysaccharea*の鑑別に有用である。

7) DNA分解酵素産生性

DNA分解酵素産生性試験用培地に菌を濃厚に接種し、5%CO₂環境下、35~37℃で24時間培養する。1N塩酸を培地全面に注ぎ、集落の周辺が透明となれば陽性とする。

8) 酵素プロファイルによる鑑別・同定

病原性*Neisseria*属菌および*M.(B.) catarrhalis*等の鑑別には、β-ガラクトシダーゼ、ハイドロキシプロリルアミノペプチダーゼおよびγ-グルタミルアミノペプチダーゼの3酵素の保有の有無を用いることができる（表3）。迅速な鑑別や生化学的性状が典型的でない株の鑑別に有用である。

ここで調べる酵素は*Neisseria*属菌が固有に保有するものではないため、キットの対象とする菌はMTM培地等の選択培地で発育したオキシダーゼ陽性のグラム陰性双球菌に限られている。したがって、チョコレート寒天培地や血液寒天培地といった非選択培地から分離した菌を鑑別する際には注意しなければならない。

9) ペニシリン分解酵素産生性試験

ニトロセフィン溶液を直接16~18時間培養した集落に滴下するか、ろ紙にニトロセフィン溶液を滴下し、これに菌を塗抹して、赤紫色に発色した菌を陽性とする。

試験紙には発色性基質をしみ込ませて乾燥させてあり、滅菌精製水を滴下し、新鮮菌を塗抹して赤紫色に発色すれば陽性とする。

ペニシリンや第一世代セフェム系薬剤が治療に盛んに用いられていた時期には、ペニシリン分解酵素産生性を調べることは非常に重要であった。しかし、現在わが国では淋菌感染症の治療にはこれらの薬剤はほとんど用いられておらず、したがってペニシリン分解酵素を保有していても治療にはほとんど影響を及ぼさなくなった。

4. 髄膜炎菌の髄液からのPCR法による検出

髄液から髄膜炎菌が分離されなくても、PCR法による検出が可能である⁵⁾。髄膜炎菌、インフルエンザ菌および*Streptococcus*属菌を同時に検出するシステムも報告されている⁶⁾。

血清型を決定する抗原とそれに関与する遺伝子が解析されており、近い将来、PCR法による血清型別が可能となることが期待される。したがって、何らかの理由により髄膜炎菌の分離が不能であった髄液等の検体を疫学的解析のために冷凍保存（-80℃）することが推奨される。

髄液の量が少なく染色や培地への接種に全て使用されてしまった場合、髄液が接種された液体培地が残っていれば、これを遠心してPCR法の材料とすることも可能である。

5. 淋菌の分子遺伝学的手法による検出

膣・子宮頸管分泌物はそのまま各キットの検査材料とすることができる。尿は遠心して得られる沈渣を検査対象とする。

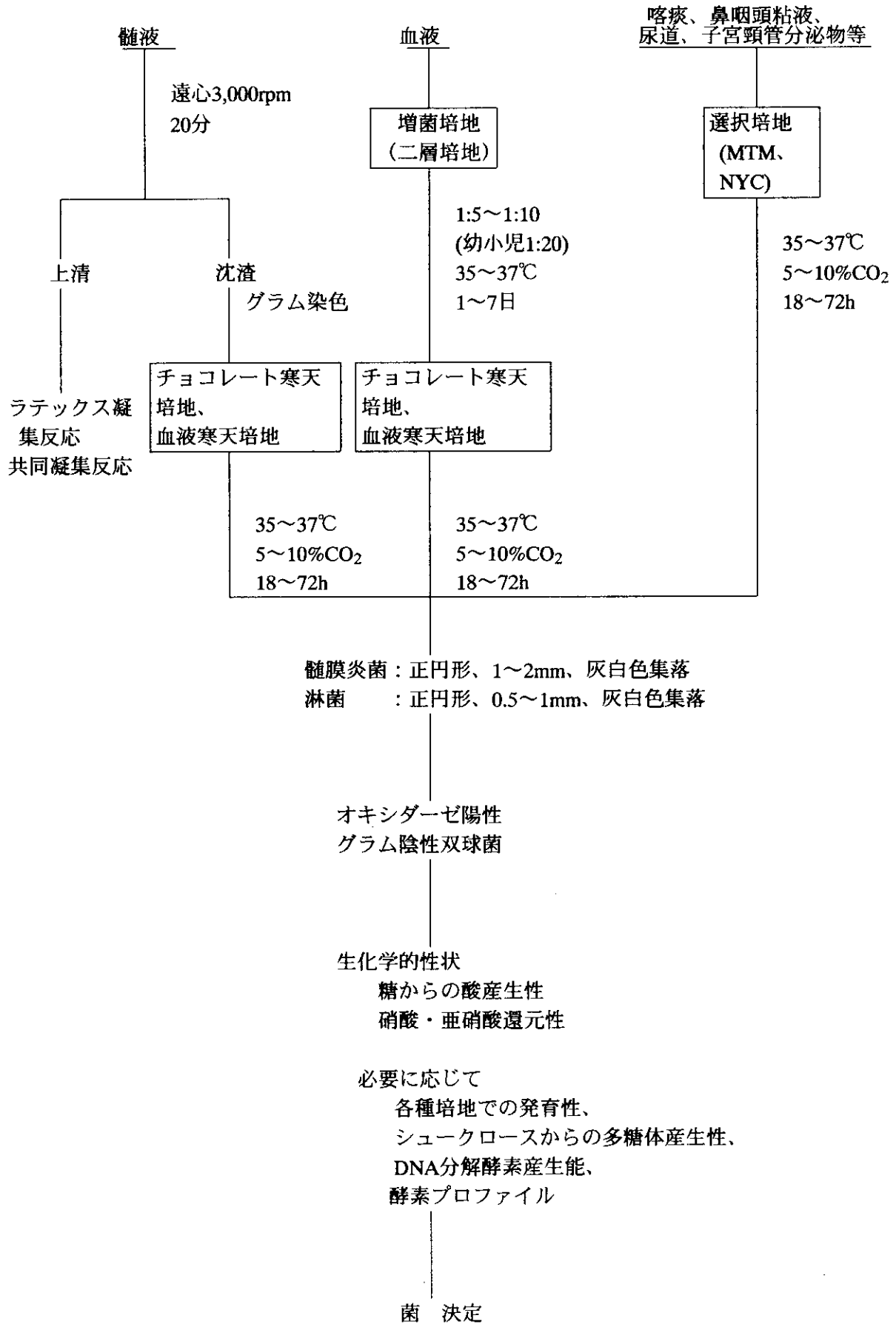


図1 病原性Neisseria属菌の検査の流れ

表1 *Neisseria*属菌の集落の特徴

菌種	集落の特徴
<i>N. gonorrhoeae</i>	直径0.5~1mm、不透明から半透明の光沢ある隆起した正円形集落。4タイプの集落の変異あり。T1、T2：分離当初は優勢。小型、不透明、光沢があり、隆起し、灰白色から白色。T3、T4：大きく、やや扁平、光沢はない、やや透明感。
<i>N. meningitidis</i>	直径1~2mmで、淋菌よりも大型。灰白色、半透明、光沢あるやや隆起した正円形集落。ムコイド状のこともある。
<i>N. lactamica</i>	髄膜炎菌に似るが、やや黄色みを帯びることがあり、湿潤性に欠ける。
<i>N. sicca</i>	髄膜炎菌よりも大型。しわのある、粗造で乾燥した集落。培地に固着。
<i>N. mucosa</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色、透明から不透明の円形集落。しばしば培地に固着。
<i>N. subflava</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色を帯びることあり。ムコイド状。培地に固着。
<i>N. flavescens</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色、不透明な正円形集落。
<i>M.(B.) catarrhalis</i>	髄膜炎菌よりも大型。灰白色、不透明、光沢のある正円形集落。

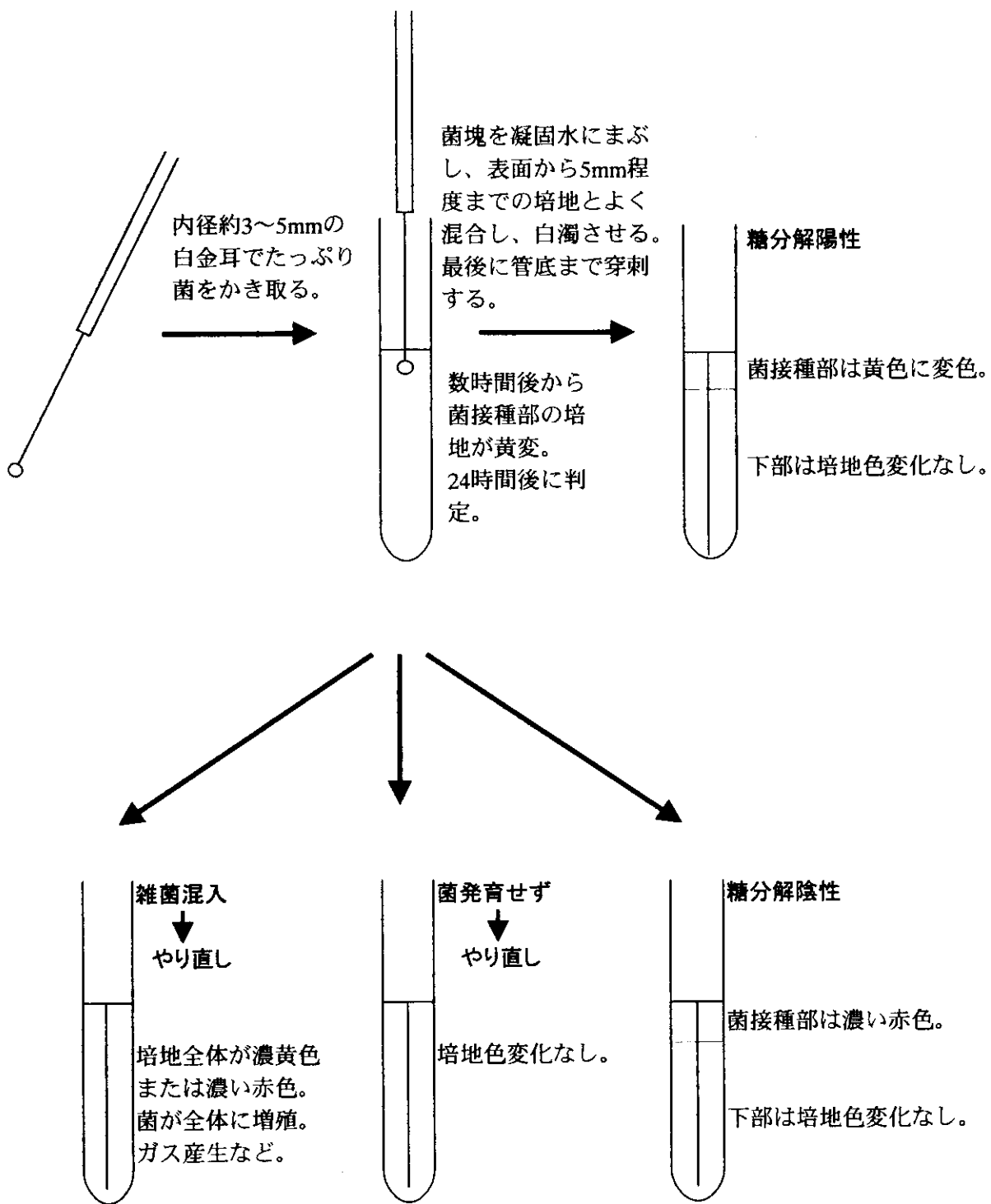


図2 *Neisseria*属菌のCTA培地への接種法と判定

表2 *Neisseria*属菌および近縁種の生化学的性状

	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. lactamica</i>	<i>N. polysaccharea</i>	<i>N. cinerea</i>	<i>N. flavescens</i>	<i>N. mucosa</i>	<i>N. subflava</i>	<i>N. sicca</i>	<i>N. elongata</i>	<i>M.(B.) catarrhalis</i>	<i>K. denitrificans</i>
菌形態	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
スパ-オキシール	4+	+4+	+3+	+3+	2+	2+	2+	2+	2+	-	+4+	-
酸産生性												
グルコース	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+
マルトース	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
シュークロース	-	-	-	-	-	-	+	v ^a	+	-	-	-
フラクトース	-	-	-	-	-	-	+	v ^b	+	-	-	-
ラクトース(ONPG)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
還元性												
硝酸塩	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
亜硝酸塩	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ガス産生	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
発育性												
MTM, NYC	+	+	+	v	v	-	-	v	-	-	v	+
22℃	-	-	v	v	v	+	+	v	v	+	+	?
普通寒天	-	-	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+
多糖体産生性	-	-	-	+	-	+	+	v ^c	+	-	-	-
DNase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
色素	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-

S : 球菌。 R : 桿菌。 v : 株により陽性と陰性がある。 MTM : modified Thayer-Martin medium
 NYC : New York City 培地。

a : *N. subflava* biovar *subflava*(-), *N. subflava* biovar *flava*(-), *N. subflava* biovar *perflava*(+)。

b : *N. subflava* biovar *subflava*(-), *N. subflava* biovar *flava*(+), *N. subflava* biovar *perflava*(+)。

c : *N. subflava* biovar *subflava*(-), *N. subflava* biovar *flava*(-), *N. subflava* biovar *perflava*(+)。

表3 髄膜炎菌の鑑別に用いる酵素プロファイル

	γ -glutamyl aminopeptidase	Hydroxyprolyl aminopeptidase	β -galactosidase
<i>N. meningitidis</i>	+	/	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	+	-
<i>N. polysaccharea</i>	-	+	-
<i>N. lactamica</i>	-	/	+
<i>M.(B.) catarrhalis</i>	-	-	-

/ : 鑑別には用いない。

6. 血清型別

1) 血清群

髄膜炎菌の血清群は夾膜多糖体を抗原としている。A、B、C、29E (Z')、H、I、K、L、W135、X、Y、Zがある。海外ではAとCが流行株として注目され散発例はBが多いが、B群株による流行もある。国内の症例ではこれまでBとYが多数を占めている。

2) typingおよびsubtyping

髄膜炎菌の外膜タンパクを抗原として、モノクローナル抗体によるtypingおよびsubtypingが行われる。型別はレファレンス機関に依頼する。

7. Multilocus enzyme electrophoresis(MLEE)およびMultilocus sequence typing(MLST)

複数の特定の酵素の、電気泳動による移動度の違いを組み合わせた酵素型 (enzyme type: ET) が髄膜炎菌の疫学マーカーとして利用されている¹⁰⁾。酵素に関連する遺伝子のDNA配列による型別が sequence type (ST) で、ETとSTはほぼ同等とされている。STはインターネット上でデータベース化されている^{11,12)}。

8. 栄養要求型

淋菌の株の、アミノ酸、ビタミン類等に対する要求性の違いを利用した型別法である。35型が知られている。多くは Proto型、Pro- 型に属する。AHU型は播種性淋菌感染症 (DGI) から高頻度に分離される。

V. 検体の輸送方法

髄膜炎菌および淋菌を輸送・保存する条件に関する様々な報告がなされているが、標準的方法は確立されていない。特に髄液等の検体の輸送・保存に関しては、検体の状態や株の性状により適した条件が異なることが予想され、温度条件さえも定まっていない。一般的に検体は室温から37℃に保つようにされているが、35～37℃では短時間で死滅することもある。低温でも死滅しやすいとされているが、髄液を冷蔵して数日間生存することもあり、またStuart培地では4℃で良好な成績が得られている。これらの状況を踏まえ、最も妥当と思われる方法を記す。

1. 髄液および血液等の輸送方法

1) 髄液の輸送方法

髄液をそのまま冷蔵または室温で搬送することはできるが、検出率が低下する可能性がある。確実に菌を分離するには、医療機関においてチョコレート寒天培地（搬送するまでに数日を要する場合はT-I medium）に接種し、3～5%CO₂環境下で25～37℃に保ちながら、あるいは培養後で既に集落を観察されれば冷蔵で送付・搬送することが奨められる。5%CO₂環境を保つことができるキットも市販されている。

2) 血液の輸送方法

血液は液体培地（あるいは二層培地）に接種し、あるいはIsolatorを用いて22～37℃に保ちながら送付・搬送する。Isolatorでは、22℃あるいは34℃で15時間静置後も分離率が変わらなかったとの報告がある¹³⁾。培地中に菌の増殖が認められる場合は冷蔵で送付・搬送する。

3) その他の臨床検体の輸送方法

選択培地に接種し、3～5%CO₂環境下で25～37℃に保ちながら、あるいは培養後で既に集落を観察されれば冷蔵で送付・搬送する。市販の輸送培地（Transgrow培地等）と輸送用キット（JEMBEC）を使用することもできる。鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物はStuart培地（変法）等に接種して冷蔵で搬送する。

2. 菌株の送付方法

1) 培養菌

チョコレート寒天培地に接種し、35～37℃で18時間程度培養した培養菌を培養直後に発送し、翌日到着するのであれば、冷蔵で送付することができる。24時間以上培養した菌は死滅する可能性が高いので送付してはならない。

T-I mediumに接種して密栓した状態では室温で1～2週間程度生存するので、その間に送付することができる。

綿棒で新鮮培養菌を多くかき取り、スクリューキャップ付滅菌試験管等の滅菌容器に入れておけば3～7日程度は室温で生存するので、培養菌の送付に利用できる。

2) 保存菌株

後述の綿棒保存、ゼラチン・ディスク法あるいは凍結乾燥法で保存された菌株は冷蔵（3～7日程度であれば室温も可）で搬送あるいは送付することができる。冷凍で送付するのが理想だが、送付中に温度変化が激しいと菌数は急激に減少するため、むしろ冷蔵の方が安全である。

VI. 菌株の保存方法

髄膜炎菌や淋菌は長時間培養すると自己融解が始まるため、保存するには16～18時間培養菌を用いる。チョコレート寒天培地あるいは血液寒天培地のように血液成分が加えられて栄養分の豊富な培地では自己融解が早いので、培養時間を短くするか、Kellogg培地を使用するほうが扱いが楽である。

1. 一時的保存

寒天平板で培養した18時間培養菌は、培養後冷蔵庫で保存すれば1～2日は生存する。それ以後の生存性は株により異なるので、3日以上は保存は避ける。

2. 短期保存

1) 綿棒保存

滅菌綿棒で寒天平板上の18時間培養菌を平板からできるだけ多く掻き取り、滅菌スクリーキャップ付チューブに入れて-20～-80℃で冷凍保存すると、数カ月生存する。冷蔵保存でも1週間程度は生存する。室温では3～7日をめどにする。保存容器に滅菌したシリカゲルを入れておくと菌体の乾燥が確実になり、菌が死滅しにくい。

綿棒で掻き取る菌体の量が少ないと早期に死滅してしまうので、寒天平板上に画線で菌苔状に培養し、できるだけ多く菌体を掻き取る方が保存は確実である。

2) 簡易保存法³⁾

ゼラチン・ディスク法用溶液 (A、B、C 5:1:5混合液) を滅菌スクリーキャップ付チューブに0.5ml ずつ分注し、菌苔状の18時間培養菌の平板半分程度を浮遊させる。これを-20～-80℃で冷凍保存すると数年間保存することができる。

3. 長期保存

1) ゼラチン・ディスク法³⁾

あらかじめ凍結することなく、菌保存液の水分を真空または常圧下で蒸発させ、ディスク状に乾燥させる方法である。継代培養による性状の変異なしに長期間保存でき利用価値が高く、常時一定の条件のまま菌株が保存できる。

Neisseria 属菌、*Haemophilus* 属菌等の保存が難しい菌株の保存に欠かすことができない方法であるので、ここで詳述する。作製方法等については、*Neisseria* 属菌に限定せず一般的な方法とする。

(1) ゼラチン・ディスク法用試薬

A液

グルコース	5 g
スキムミルク	3 g
活性炭末	0.6 g
精製水	100 ml

グルコースとスキムミルクを加温溶解し、炭末を加えてよく混合してスクリーキャップ付チューブに適量分注する。110℃、10分間高圧滅菌後、直ちに流水で冷却し、密栓の上冷蔵保存する。通常の121℃ 15分間ではスキムミルクと炭末が凝固するので、温度と圧力に注意する。

B液

L-アスコルビン酸ナトリウム	5 g
精製水	100 ml

ろ過滅菌して少量ずつスクリーキャップ付チューブに分注し、-20℃以下で凍結保存する。

C液

ゼラチン	20 g
精製水	100 ml

加熱溶解後、スクリーキャップ付チューブに適量ずつ分注し、121℃、15分間高圧滅菌する。密栓して室温保存する。

(2) 必要な器材

①デシケーター

吸引コック付きの真空用デシケーターで、真空ゲージがついていれば使い易い。

②五酸化リン

菌保存液をディスク状に乾燥するために、潮解性を利用する。多量の水があると強く反応するので、取り扱いに注意する。炎症を起こすので、皮膚や粘膜につけないこと。一度に処理する株数が少なければシリカゲルで代用することも可能である。

③パラフィン濾紙

病理標本用固形パラフィンを溶解し、140～145℃に保つ。これに直径7cmの円形濾紙を1枚ずつ入れて1分間程度放置する。ピンセットで1枚ずつ取り出し、余分なパラフィンを除き、ガラス製滅菌シャーレ中で固化させる。

パラフィン濾紙の代用として、市販のクッキングペーパー（オープン料理用）を使用することができる。クッキングペーパーをガラス製シャーレのサイズに切り、オートクレーブで121℃、15分滅菌後乾燥する。この1枚ずつをガラス製滅菌シャーレに入れる。シャーレに入れる際に、クッキングペーパーの裏表に注意する。

④真空ポンプ

20～30mm/Hg以下の減圧度が得られるものがよい。

(3) ディスクの調製法

①保存菌株の準備

培養は、保存菌に適した平板培地を1株あたり1～数枚を使い、適切な温度と方法で行う。発育阻止剤などの入った選択培地は使用しない。腸内細菌などのように良く発育する菌は、トリブ

トソイ寒天培地、ハートインフュージョン寒天培地でよいが、栄養要求性が高く発育の悪い菌には血液寒天培地やチョコレート寒天培地等を用いる。

平板の枚数は菌の発育度により異なるので、発育が良ければ1~2枚、悪ければ3~4枚あるいはそれ以上必要とする。保存には対数増殖期の新鮮培養菌を用い、長時間培養したものは不適である。

②ディスクの作製

試薬A液はミキサーでよく混合し、B液、C液をそれぞれ液状にしておく。B液の解凍した残りは捨てる。滅菌試験管に分注したA液1容に保存菌を浮遊させたのち、B液1/5容、C液1容を加えてよく混合し、注意深く均等な浮遊液とする。滅菌試験管に分注する量は、作製するディスクの枚数による。通常はA液、B液およびC液合わせて1mlが適量である。

新鮮培養菌を掻き取り、ABC混合液に浮遊する。浮遊液の菌濃度はディスク乾燥時に菌数が減少するので、浮遊時に菌量が $10^9 \sim 10^{10}/\text{ml}$ 以上得られるように十分に濃厚でなければならない。しかし、必要以上に大量の菌を浮遊させることは、ゼラチン強度の低下を招きディスクがもろく壊れ易くなる。

菌浮遊液を毛細管ピペットで、気泡が入らないようにガラス製滅菌シャーレ中のパラフィン濾紙上に適当な間隔で0.025~0.03mlずつ滴下する。1mlの浮遊液でおよそ30滴滴下できる。

ディスクの作製と同時に、掻き取った残りの平板を冷蔵したり、菌種によっては簡易保存法あるいは綿棒保存法により株を保存する。作製したディスクの菌数が少ない場合や雑菌の混入がある場合にこれから株を再び起こす。

③乾燥

デシケーターの中に、シャーレ数枚に入れた十分量（表面積が広いほど乾燥能率がよい）の五酸化リンを置き、浮遊液を滴下したパラフィン濾紙の入ったガラス製滅菌シャーレを置く。乾燥しやすいように滅菌ガラス棒をシャーレの蓋の間に入れ、デシケーターの蓋を閉じて真空ポンプで約20mm/Hgまで減圧する。4~5時間経過すると、五酸化リンは吸湿して表面が潮解し、滴下した菌浮遊液はディスク状に平坦になっている。この時点で一度常圧に戻し、五酸化リンの潮解部を取り除き、必要があればさらに五酸化リンを追加して、今度は強く減圧する。

なお、潮解した五酸化リンは強酸性なので、中和処理を施したのち廃棄する。

④ディスクの保存

乾燥したディスクは、火炎滅菌した先の細かいピンセットでパラフィン濾紙から剥す。濾紙を軽く湾曲させると自然に剥がれ落ちる。これを滅菌したシリカゲル入りの小瓶（あるいは小容器）に集め、密栓して -20°C 以下の冷凍庫で保存する。

また、保存と同時に、菌の生存と雑菌の混入の確認培養のため、1枚のディスクを溶解し、平板に塗抹して培養する。生菌数が十分あることと雑菌の混入が無いことを確かめる。菌数が不十分であるか、雑菌の混入があれば、ディスクを作り直す。

(4) ディスクの溶解

菌を使用するときは、ディスク1枚を取り出し滅菌小試験管に入れる。適当な液体培地を0.1~0.2ml加えて $35 \sim 37^{\circ}\text{C}$ で約5分間ときどき攪拌しながら溶解し、その1滴を平板培地に塗抹し培養する。

(5) 保存期間

腸内細菌、*Pseudomonas*、*Streptococcus*、*Haemophilus*、*Neisseria*、*Branhamella*、*Bacteroides*等の限定された菌での保存実験では、いずれの菌も3年以上生存し、生菌数の減少も1オーダーにすぎなかった。しかし、コレラ菌では乾燥直後には生存していたが、凍結保存1週間で死滅した。

標準株や薬剤感受性用対象株、分離株などを $-40\sim-80^{\circ}\text{C}$ で保存することが可能である。淋菌をはじめとする*Neisseria*属菌、*Streptococcus*で25年、*Campylobacter*で17年を経過しても比較的良好に保存されている。生化学的性状や集落型、病原性、薬剤感受性などに保存中の変異は全く認められていない。

2) 凍結保存法⁴⁾

凍結保存にはヒツジ、ウマあるいはウサギ脱線維素血液、15～20%グリセリン加TSBあるいはGreaves液を用いることができる。保存液を滅菌スクリーキャップ付チューブに1 ml分注し、これに菌苔状の18時間培養菌の平板1枚分を浮遊させ、 $-40\sim-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存する。菌を浮遊させた保存液をドライアイス・エタノールで急激に凍結させると生存性が増す。

3) 凍結乾燥法

通常 of 凍結乾燥法により菌株を保存する。

ゼラチン・ディスク法のディスクの乾燥を凍結乾燥機で行うと高い生存性が得られ、保存菌株の扱いも容易である。

VII. 文献

- 1) 細菌学実習提要 東京 丸善.
- 2) G.W.Ajello *et al*: Trans-Isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:55-58.
- 3) 浅井良夫、山井志朗：死滅しやすい細菌の保存法 -ゼラチン・ディスクの作製方法- 日本臨床微生物学雑誌 19996;6:44-48.
- 4) Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control and Prevention. http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/meningitd_manual.pdf 1998.
- 5) D.A.Caugant, E.A.Hoiby, L.O.Froholm and P.Brandtzeg :Polymerase chain reaction for case ascertainment of meningococcal meningitis :application to the cerebrospinal fluids collected in the course of the Norwegian meningococcal serogroup B protection trial. Scand. J. Infect. Dis. 1996; 28:149-153.
- 6) P. Radstrom *et al*: Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and Streptococci using a seminested PCR strategy. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:2738-2744.
- 7) J.G.Cunniff, S.Whitby-Stevens and M.H.Wilcox: Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results. J.Clin.Pathol. 1996;49:249-253.
- 8) 微生物検査必携 細菌真菌検査 第3版 東京 日本公衆衛生協会.
- 9) Identification of *Neisseria* and related species. *Neisseria meningitidis*. Centers for Disease Control and Prevention. <http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/NeIdent/Nmen.html> 1998.
- 1 0) R.K.Selander *et al*: Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl.Environ.Microbiol. 1986;51:873-884.
- 1 1) M.C.J.Maiden *et al*: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998;95:3140-3145.
- 1 2) Multilocus Sequence Typing. The Wellcome Trust. University of Oxford. <http://mlst.zoo.ox.ac.uk/default.htm>
- 1 3) J.S.Cashman, R.Boshard and J.M.Matsen: Viability of organisms held in the Isolator blood culture system for 15 h and their rapid detection by acridine orange staining. J.Clin.Microbiol. 1983;18:709-712.

B. 実技編

1. 検査の流れ

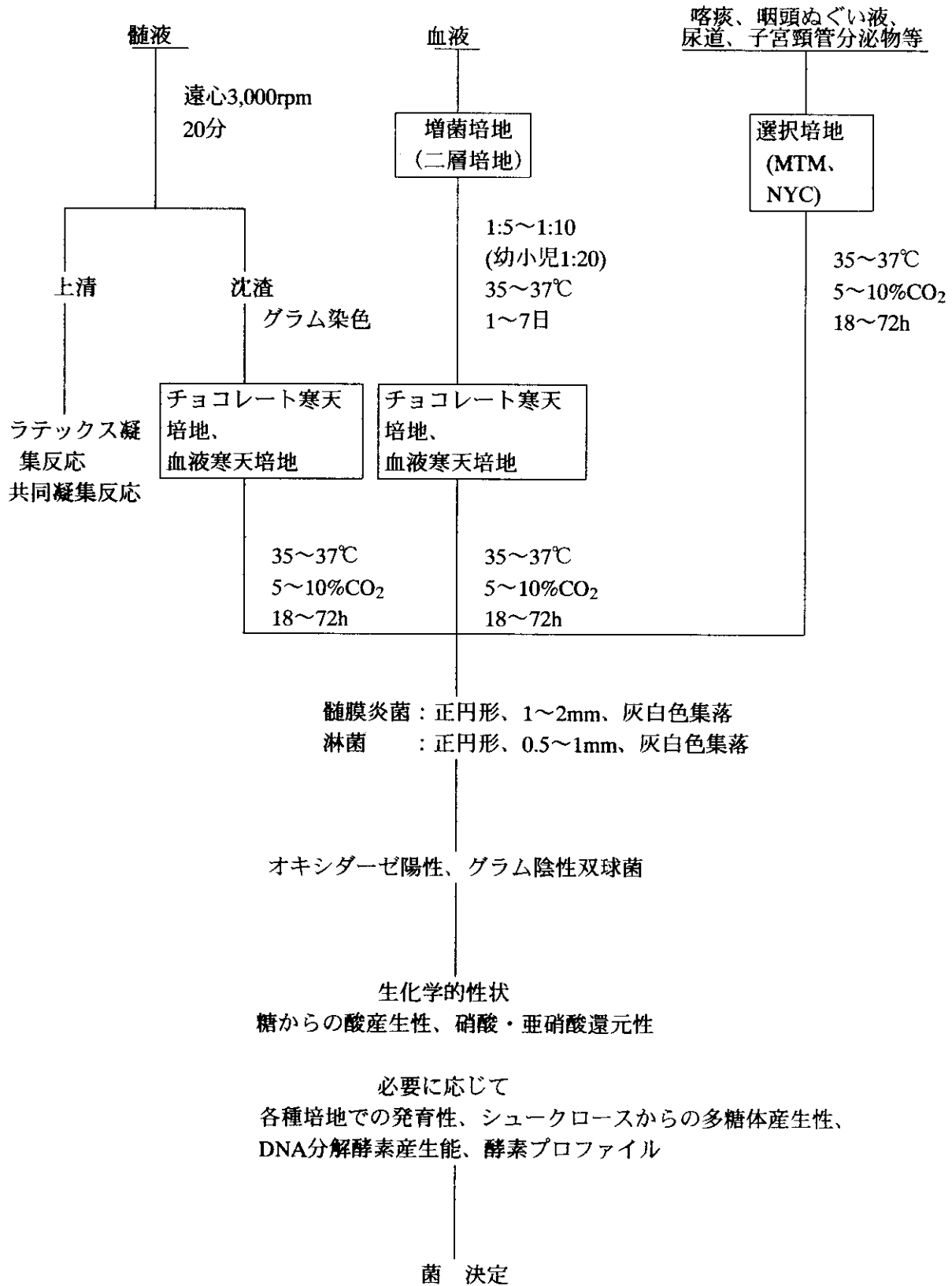


図1 病原性*Neisseria*属菌の検査の流れ

II. 検体の採取、検査手技

1. 髄液、皮膚穿刺液、関節腔液

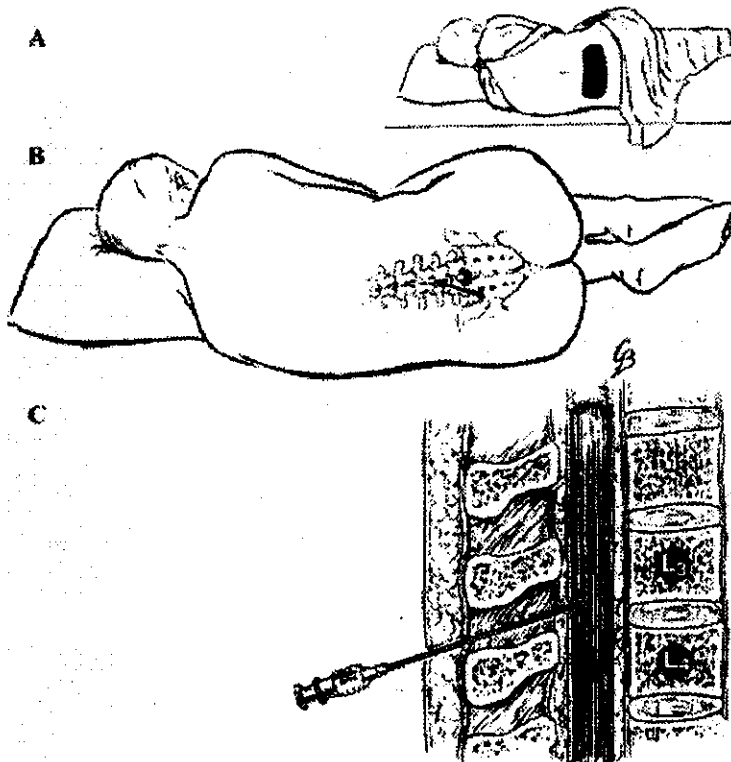
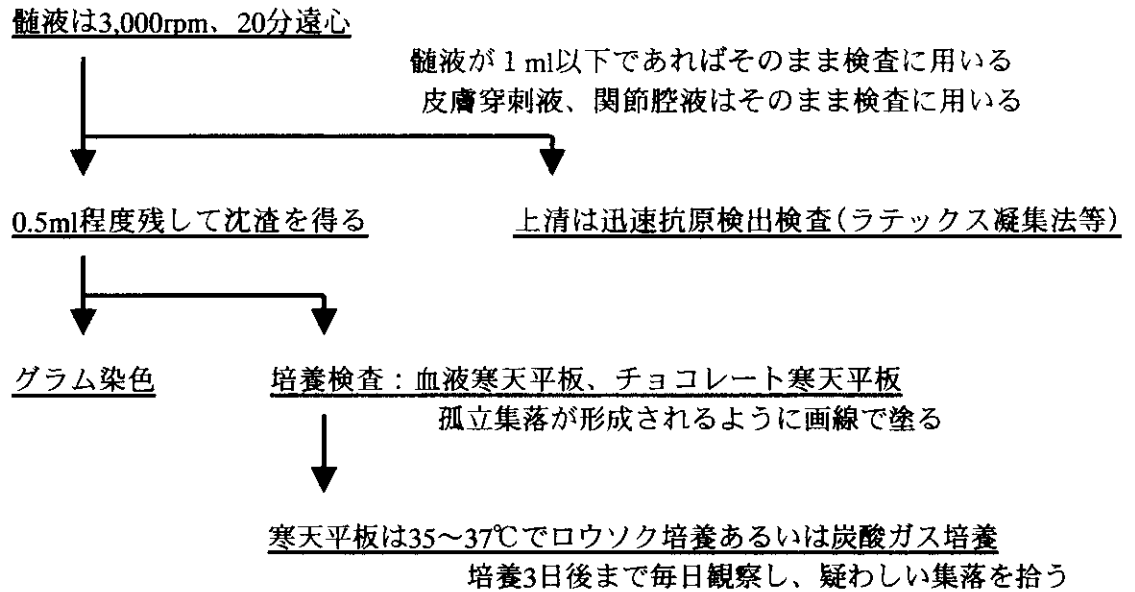


図2 腰椎穿刺術

A：患者の穿刺を実施する周囲を消毒する。

B：患者の穿刺部位を示す。

C：穿刺針が脊髄腔に達するように注意深く刺す。

出典：Diagnostic Microbiology, Elmer W. et al, J. B. Lippincott, 1992.

4. (鼻) 咽頭粘液

滅菌綿棒で鼻咽頭粘液、咽頭後壁から扁桃の表面の粘液をぬぐい取る (図参照)



採取後直ちにMTM培地等の選択培地の全面に塗抹

培地への接種不可ならばStuart培地での
保存・輸送可 (冷蔵)



35~37℃でロウソク培養あるいは炭酸ガス培養 (5~10%)

培養3日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う

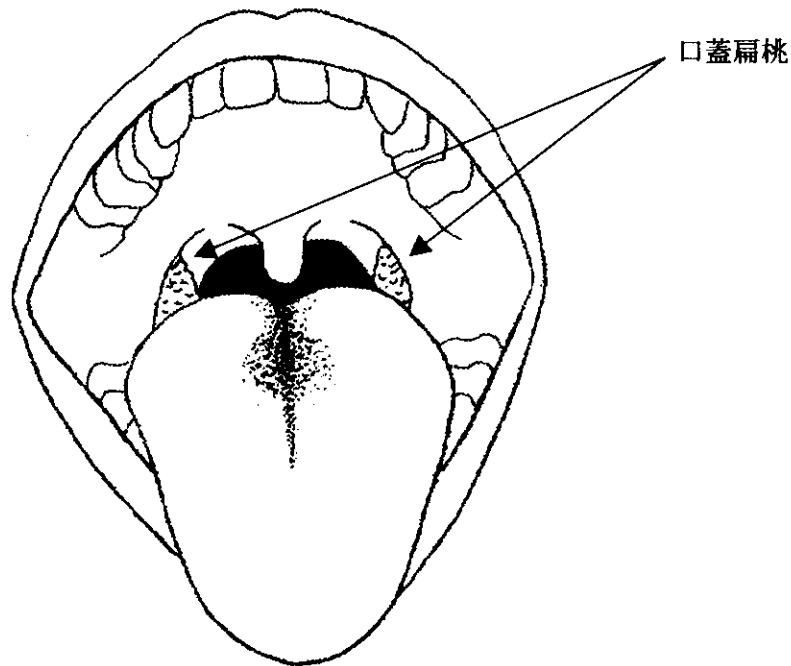


図4 口腔内の各部位 左右両側の口蓋扁桃の表面を滅菌綿棒でぬぐい取る。

5. 膣・子宮頸管分泌物

滅菌綿棒2本で膣、子宮頸管分泌物を採取



1本をスライドガラスに塗抹



グラム染色

1本は採取後直ちにMTM培地等の選択培地の全面に塗抹

培地への接種不可ならばStuart培地での
保存・輸送可 (冷蔵)



35~37℃でロウソク培養あるいは炭酸ガス培養 (5~10%)

培養3日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う