

環境水からの *Acinetobacter* 属菌の分離と分離菌株の性状

Isolation of *Acinetobacter* Species from Environmental Waters and Microbiological Properties of Isolates

長谷川伸作

Shinsaku Hasegawa

序 文

Acinetobacter 属菌は、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌 (NFB) であり^{1~4)}、通常土壤や水系環境に広く分布している。また臨床材料からも検出され、NFB のうちで緑膿菌に次いで検出される^{5~7)}。人に肺感染症、尿路感染症、敗血症などを引き起こす日和見感染菌であり^{4,7~12)}、β-溶血、スマイム産生を示す菌株も存在し、その病原性が示唆されている¹³⁾。さらに、本属菌はペニシリソ系およびセフェム系抗生物質に耐性であり¹⁴⁾、これら薬剤による菌交代現象を引き起こしている例が認められている。さらに、本属菌は、生化学的にも遺伝子学的にも種々様々な性状を示すものが存在するにもかかわらず、菌名の承認リスト¹⁵⁾において 2 菌種 (*Acinetobacter calcoaceticus* と *A. lwoffii*) に、また Bergey's Manual of Systematic Bacteriology³⁾では僅か 1 菌種 (*Acinetobacter calcoaceticus*) にしか分別されておらず、その取り扱い上、不都合が生じている。

本属菌は、貧栄養の環境下でも生育が可能であり^{1,16)}、自然環境に広く存在している^{1~3)}、環境水系での本属菌分布はかなり広範にわたっていると考えられ、何らかの原因で感染防御機能が低下した患者への本属菌の伝播が懸念される。環境水系からの本属菌の検索・分離について、また分離菌株の性状について詳細な調査が望まれている。

今回、先に改良した *Acinetobacter* 選択分離培地^{17,18)}と疎水性格子膜フィルター (HGMF, QA Labo., Canada)¹⁹⁾を組合せた方法により、種々環境水から本属菌の分離を試み、選択分離の特性が高いことを認めた。さらに、分離菌株の生理学的性状から、分離菌株を 4 種の生物型^{17,18,21)}に分離したので、これらの結果を報告する。

実験材料および方法

1. 使用菌株

次に示す基準菌株ならびに当研究所保存株を比較検討の

ために用いた。

Acinetobacter calcoaceticus ATCC 23055¹¹ (基準菌株、生物型 I), *A. calcoaceticus* ATCC 17906 (生物型 II), 喀啖由来の *A. lwoffii* No. 4 (生物型 III) および *A. lwoffii* ATCC 5866 (生物型 IV) である。

2. 試料の採取

東京都および札幌市内の河川の川央部(15か所)、池の中央部(10か所)、貯水槽(5か所)、家庭汚水用下水道管(3か所)ならびに動物飼育水槽(6か所)の計39か所から、各々水1,000mlを滅菌したガラスビンに採取した。採取した試料は保冷、運搬し、5°C暗所に保存して24時間以内に試験に用いた。

3. *Acinetobacter* 選択分離培地

Acinetobacter 属菌の分離は、本属菌選択分離培地^{17,18)}を用いた。

本培地は次のように作成した。イオン交換水1,000mlに tryptose, 2.5g; proteosepeptone, 2.5g; mannitol, 10.0g; sucrose, 10.0g; lactose, 10.0g; yeast extract, 1.0g; NaCl, 3.0g; KCl, 2.0g; MgSO₄·7H₂O, 0.2g; FeCl₂·6H₂O, 0.1g; bromothymol blue, 0.04gを加えて融解し、5N NaOHでpH8.5に調整後、15.0gの寒天を加え121°C、15分間加熱滅菌した。これを50°Cに冷却し、50mgの sodium deoxycholateを加えて混合の後、直径9.0cmの滅菌シャーレに分注した。本培地は5°Cの暗所に保存し、1か月以内に使用した。

4. *Acinetobacter* の分離

Acinetobacter 属菌の分離は、Fig. 1に示す方法に従って行った。

試料1,000mlを0.45μの疎水性格子膜フィルター (HGMF, QA Labo., Canada)¹⁹⁾で濾別した。このフィルターを本属菌分離培地に静置し、30°C、24~48時間培養後、生じた集落のうち、直径が約2mm以上、青~緑、不透明、平滑、円形、凸状を示すものについて、チトクローム・オ

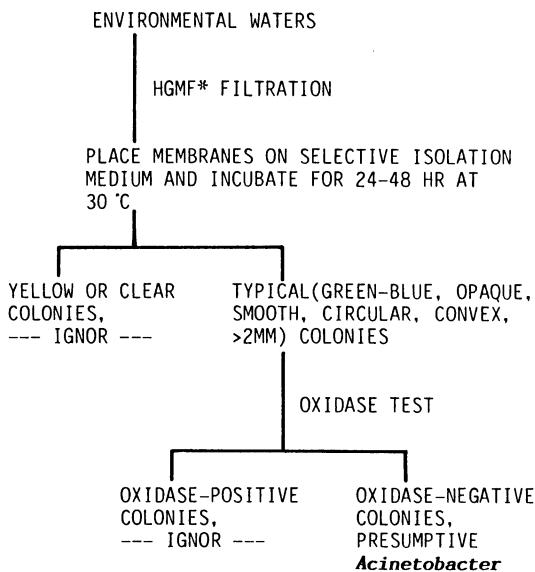


Fig. 1 Flow diagram of the isolation for *Acinetobacter* species

*HGMF: Hydrophobic grid-membrane filter
(0.45μ, QA Laboratories Ltd., Canada)

キシターゼテストを行い、陰性を示したものを推定 *Acinetobacter* 属菌とした。普通寒天培地に移植して保存するとともに後の同定試験に用いた。

5. *Acinetobacter* 属菌の同定

推定 *Acinetobacter* 属菌のうち、次に示す形態および生理的性状を示すものを *Acinetobacter* 属菌とした。好気性、グラム陰性球桿菌または短桿菌で通常対をなし、べん毛を持たず非運動性、無芽胞、チトクローム・オキシター

ゼテスト陰性を示し、1%ブドウ糖加O/F培地(Difco)において、30°C、2-5日間培養で酵酇性を示さず、さらにTSI寒天において、色の変化およびガスの発生を与えないものを本属菌とした¹⁻⁴⁾。

分離菌株の細菌学的性状に関する試験は、主として Laboratory Methods in Microbiology²⁰⁾に記載の方法に準拠して行った。分離菌株の生物型別は、Gilardi の方法²¹⁾に準じ、先に著者らが臨床材料分離菌株について行った方法^{17,18)}と同様に行なった。その識別表を Table 1 に示した。すなわち、SS 寒天培地での生育は同寒天 (Difco) 上で、30°C、2 日間培養し、集落形成の有無をもって判定した。ゼラチンの液化試験は、常法で行なった。β-溶血性は、ヒツジ血液寒天培地(栄研化学)に植菌し、30°C、2 日間培養後、生じた集落の周縁に β-溶血ゾーンを伴つたものを陽性とした。O/F ブドウ糖テストは、1%ブドウ糖加O/F培地において、30°C、2 日間培養し、糖を酸化的に分解するか、非分解性かを判定した。乳糖の利用性は、10%乳糖加O/F培地において、上記と同様に判定した。

Table 1 Characters used to discriminate between biotypes of *Acinetobacter* species

Characteristics	Biotype			
	I	II	III	IV
SS growth	- or +*	+	+	- or +
Gelatinase	- or +	+	+	- or +
β-hemolysis	-	+	+	-
O/F glucose	O	O	N	N
10% lactose	+	+	-	-

* + : positive reaction, - : Negative reaction, O : Oxidative, N : nonsaccharolytic

Table 2 Specificity of selective isolation medium for *Acinetobacter* species

Type of source	Number of source isolated <i>Acinetobacter</i>	Typical colonies		Other colonies	
		Total	False positive*	Total	False negative**
River	6	25	0	115	4****
Pond	5	125	2	91	10****
Storage tank	3	18	0	5	0
Sewer pipe	1	31	0	125	0
Animal-breading pond	3	10	5***	13	0
Total	18	209	7	349	14
%		100.0	3.3	100.0	4.0

* Not confirmed as *Acinetobacter* strains

** Identification as *Acinetobacter* strains

*** Cytochrom oxidase negative *Pseudomonas* Strains

**** Iwoffi group *Acinetobacter* strains (nonsaccharolytic strains)

結 果

1. *Acinetobacter* 選択分離培地の選択性の検討

Acinetobacter 選択分離培地における本属菌選択の特性を、環境水系39試料のうち本属菌が検出された18試料（河川水、6試料；池水、5試料；貯水槽の水、3試料；家庭排水用下水道管の水、1試料；動物飼育水槽の水、3試料）について試験し、その結果をTable 2に示した。

Acinetobacter 属菌は本選択分離培地に静置したHGMF上、30°C、24-48時間培養で、直径 ≥ 2 mm、青-緑、不透明、平滑、円形、凸状を示した。これに対して、*Escherichia coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*など白糖を資化する細菌は黄色を示した。また、*Bordetella bronchiseptica*, *Alcaligenes faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*などの生育が観察されたが、*Acinetobacter* 属菌以外のNFBに属する菌株では、集落の直径が1 mm以下であったり、または直径が大きく、不規則、拡散、平坦で透明もしくは半透明を呈し、*Acinetobacter* 属菌とは容易に判別が可能であった。さらに、本属菌がチトクローム・オキシターゼテスト陰性^{1,3)}であることから、数多くのNFBは陽性株として排除された。

本培地上の集落で、209集落が推定*Acinetobacter* 属菌とされた。このうち、後の同定試験においても本属菌と確認されたものは202集落（96.7%）であり、本属菌以外の菌として確認された「false positive」は7集落（3.3%）であった。これに対して、本属菌以外として分離された菌は349集落であり、このうち、後に本属菌と同定された「false nega-

tive」、すなわち見逃された本菌集落は、14集落（4.0%）であった。なお、「false positive」の7集落のうち5集落が、動物飼育水槽の水1試料から分離されたチトクローム・オキシターゼテスト陰性の*Pseudomonas* 属菌であった。また、「false negative」の14集落すべてが、河川水および池水のおのおの1検体から分離された糖非分解性の*Acinetobacter* 属菌株であった。

2. *Acinetobacter* 属菌の分離

Acinetobacter 選択分離培地およびHGMFを用い、環境水系39試料のうち18試料（46.2%）から21株の本属菌を分離した。その結果をTable 3に示した。試料別に示すと、河川水15試料のうち6試料から6株（生物型I、1株；IV、5株）、池水10試料のうち5試料から7株（I、4株；III、1株；IV、2株）、貯水槽の水5試料のうち3試料から3株（IV、3株）、家庭排水用下水道管の水3試料から1株（I、1株）、動物飼育水槽の水6試料のうち3試料から4株（I、3株；III、1株）であった。なお、池水および動物飼育水槽の水のおのおの1試料から性状（次項に示す生物型）の異なる複数の本属菌が検出された。今回の試料から、生物型IIは検出されなかった。

3. 分離 *Acinetobacter* 属菌株の性状

今回環境水系から分離した本属菌21株について、生物型に分別し、その結果をTable 3に示した。また、生物型別ごとに細菌学的性状をTable 4に示した。

生物型I（O/Fブドウ糖：酸化性、 β -溶血：-）9株（42.9%）、III（非分解性、+）2株（9.5%）、IV（非分解性、-）10株（47.6%）に分別された。II（酸化性、+）型

Table 3 Distribution of *Acinetobacter* species in environmental waters

Type	Source of water Number	Number of source isolated <i>Acinetobacter</i>	<i>Acinetobacter</i>			
			Number of isolates	I	III	IV
River	15	6	6	1	0	5
Pond	10	5	7**	4	1	2
Storage tank	5	3	3	0	0	3
Sewer pipe	3	1	1	1	0	0
Animal-breeding pond	6	3	4***	3	1	0
Total	39	18	21	9	2	10

* Biotype, (O/F glucose, β -hemolysis): I, (oxidative, -); II, (oxidative, +); III, (nonsaccharolytic, +); IV, (nonsaccharolytic, -)

** One source with three biotypes of *Acinetobacter* species.

*** One source with two biotypes of *Acinetobacter* species.

Table 4 Phenotypic characteristics that differentiate *Acinetobacter* biotypes

Characteristic	Biotype I (9 strains)	Biotype III (2 strains)	Biotype IV (10 strains)
Morphology of cells	cocoid to short rods	cocoid to short rods	cocoid to short rods
Arrangement	pairs	pairs	pairs
Flagella	- **	-	-
Gram stain	-	-	-
Colonies on bouillon agar	white-buff medium-large	white-buff medium-large	white-buff medium-large
Anaerobic culture	-	-	-
Catalase test	+	+	+
Oxidase test	-	-	-
Growth on			
SS agar	-	+	-
MacConkey agar	89	+	90
Desoxycolate agar	89	+	70
O/F glucose oxidized	+	-	-
10% lactose oxidized	+	-	-
Hydrolysis of gelatin	-	+	-
β -hemolysis	-	+	-
Hydrolysis of casein	-	-	-
Hydrolysis of arginine	-	-	-
Hydrolysis of urea	11	-	-
Utilization of citrate	+	+	-
Production of indole	-	-	-
Production of H ₂ S	-	-	-
Reduction of nitrate			
in bouillon broth	-	-	-
in succinate broth	+	+	60
Denitrification	-	+	-
Voges-prospauer	-	-	-
Penicillin sensitivity	+	+	70
resistant (5IU)			

* Biotype, (O/F glucose, β -hemolysis): I, (oxidative, -); III, (nonsaccharolytic, +); IV, (nonsaccharolytic, -)

** +, All strains positive; -, all strains negative; the numbers are percentages of positive strains.

は検出されなかった。なお、ブドウ糖を酸化的に分解するかまたは非分解かによって分別した場合、糖酸化性菌株は9株(42.9%)、糖非分解性菌株は12株(57.1%)であった。また、 β -溶血株は2株で、分離した本菌21株の9.5%であった。なお、池水の1検体から、生物型I、IIIおよびIVの3種類の、また動物飼育水槽の1検体から、生物型IおよびIIIの2種類の異なる本属菌が検出された。

分離菌株の細菌学的性状を、生物型別でまとめた場合、それぞれの生物型別ごとに、ほとんど同様の性状や反応を示した。しかし、生物型Iにおいて、培地上の生育と尿素の分解で、また、生物型IVにおいて、培地上の生育、硝酸塩の環元およびベニシリン感受性で異なる性状を示す菌株が存在した。なお、*Acinetobacter* 属菌株の基準株である。*A. calcoaceticus* ATCC 23055はTable 4に示す生物型I

の、*A. lwoffii* ATCC 5866は生物型IVのそれぞれ大半の菌株が占める性状を、臨床分離の*A. lwoffii* No. 4は、生物型IIIの菌株と同様と性状を示した。

考 察

土壤、水系などの自然環境からの*Acinetobacter* 属菌の分離法については、Baumann²⁾、などの研究があるが、対象とした検査試料数が少なく、また、分離菌株の性状ならびに生物型について詳しく調査した報告も見当らない。今回、環境水系における本属菌の分布ならびに分離菌株の生物型別を明らかにすることを目的に、選択分離培地^{17,18)}およびHGMF¹⁹⁾を組合せた方法を用いて本属菌の分離を試みた。

本培地上の集落の所見て、推定*Acinetobacter* 属菌集落の、96.7%が本属菌であり、本属菌は高い確率で選択的に分離された。一方、推定集落でないとされたもののうち本属菌は4.0%であった。本属菌は分離培地の特性により陽内細菌科の細菌や*Acinetobacter* 属菌以外の他のNFBと容易に判別され、効率的に分離された。また、HGMFの使用により、集落どうしが接触することなく独立して生育するため、種々集落の判別ならびに釣菌を容易に行うことができた。先に著者らが臨床材料を用いて行った試験^{17,18)}と同程度の成績が得られ、本方法は環境水系から*Acinetobacter* 属菌を分離する際に有効であると考える。なお、チトクローム・オキシターゼ陰性の*Pseudomonas* 属菌株の混入および糖非分解性の*Acinetobacter* 属菌株の見逃しに対し、前者については*Pseudomonas* 属菌株がべん毛をもち運動性を有することで排除でき、また、後者は「false negative」集落において、色による識別で疑わしいものについて、チトクローム・オキシターゼ陰性集落によって回収できると考えられた。

本菌選択分離法を用いて種々環境水系材料39試料のうち18試料から、*Acinetobacter* 属菌を21株分離した。供試検体数が少なくて、分離状況について述べることは難しいが、本試験で調査した環境水系全体では、河川水(6/15)、下水(1/3)など流水に比べて、池水(5/10)、貯水槽の水(3/5)、動物飼育槽の水(3/6)で高い検出率が示された。

分離菌株は生物型別ごとに、ほとんど同様の細菌学的性状や反応を示した。また、生物型の比較のために供試した基準菌株をはじめとする*Acinetobacter* 属菌株も、それぞれの生物型の性状に一致し、分別は正確になされたと考えられた。

本属菌の生物型別の性状としては Gilardi²¹⁾らはSS-寒天での生育とゼラチン液化、β-溶血性、O/F ブドウ糖テスト、10%乳糖の利用を掲げている。しかし、今回、本属菌

の分離においても、著者らの先の臨床材料の報告^{17,18)}と同様にO/F ブドウ糖テストおよびβ-溶液の2性状による分別が可能と考えられ、4生物型に分別することとした。生物型別の結果、生物型IVが最も多く47.6%の検出率で、続いて生物型Iが42.9%，IIIが9.5%の順であった。ブドウ糖非分解性のもの（生物型IIIおよびIV、57.1%）が酸化性もの（生物型I、42.9%）を上回った。なお、池水の1試料から、生物型I、IIIおよびIVの3種類の、また動物飼育水槽の水の1試料からも、生物型IおよびIIIの2種類の生物型の異なる本属菌が分離され、同一試料において複数の生物型を異にする菌株の存在が確認された。

今回、河川水など環境水系における本属菌の分布状況について調査したが、他に詳細な報告は見当らず、比較検討することはできなかった。生物型については、臨床材料からの分離例があり、Pedersen ら²²⁾の報告の生物型IおよびII、54.2%；IIIおよびIV、45.8%に近い割合を示した。しかし、先の著者らの報告^{17,18)}、Inclan らの報告²³⁾では前者が70%以上を占めたのとは、その割合を異にした。今回、β-溶血を示す生物型菌株は2株検出され、分離した本属菌21株の9.5%を占め、先の著者らの臨床材料からの検出(9%)^{17,18)}と同様の傾向を示した。Gerner-Smidt の報告(3.4%)²⁴⁾に比べて、高い検出率であった。なお、検査試料数が少なかったため、試料別の生物型分布状況について評価することはできなかった。

要 約

Acinetobacter 選択分離培地および疎水性格子膜フィルター(0.45μ, HGMF, QA Labo., Canada)を組合せた選択分離法を用いて、河川水、池水、貯水槽の水、家庭汚水用下水道管の水ならびに動物飼育水槽の水などの環境水系材料から、*Acinetobacter* 属菌を検索した。本方法において、本属菌の推定集落のうち、本属菌は96.7%であり、本属菌は高い確率で選択的に分離された。推定集落は以外とされたうち本属菌は4.0%であった。なお、チトクローム・オキシターゼ陰性の*Pseudomonas* 属菌株の混入および糖分解性の*Acinetobacter* 属菌の見逃しが認められた。

各種環境水系材料から*Acinetobacter* 属菌検索の結果、39試料のうち18試料(46.2%)から、本属菌21株を分離した。

分離菌株の細菌学的性状を明らかにし、また、O/F ブドウ糖テストおよびβ-溶血性により、生物型I(O/F ブドウ糖：酸化、β-溶血性：-) 9株(42.9%)、III(非分解、+) 2株(9.5%)、IV(非分解、-) 10株(47.6%)に分別した。生物型II(酸化、+)は検出されなかった。ブドウ糖酸化性のもの(生物型IおよびII) 9株(42.9%)、非分解のもの

(IIIおよびIV) 12株 (57.1%) であり、また、 β -溶血性を示すもの (生物型III) 2株 (9.5%) であった。

文 献

- 1) Baumann, P., et al.: J. Bacteriol., **95**, 1520 (1968)
- 2) Baumann, P.: J. Bacteriol., **96**, 39 (1968)
- 3) Juni, E.: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol 1 (Krieg, N. M. ed), 303, Williams & Wilkins, Baltimore (1984)
- 4) Koneman, E. W., et al.: Color Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology (2nd. ed.), 125, J. B. Lippincott Company, Philadelphia (1983)
- 5) Pickett, M. J. and M. M. Pederson: Am. J. Clin. Pathol., **54**, 164 (1970)
- 6) Pickett, M. J. and M. M. Pederson: Rapid Methods. Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology (Gilardi, G. L. ed.), 155, CRC Press, West Palm Beach (1978)
- 7) Ramphal, R. and R. M. Kluge: Am. J. Med. Sci., **277**, 57 (1979)
- 8) Retalliau, H.F., et al.: J. Infect. Dis., **139**, 371 (1979)
- 9) Buxton, A. E., et al.: Am. J. Med., **65**, 507 (1978)
- 10) Glew, R. H., et al.: Medicine, **56**, 79 (1977)
- 11) Sherertz, R. J. and M. L. Sullivan: J. Infec. Dis., **151**, 1252 (1985)
- 12) Rosenthal, S. L.: Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology (Gilardi, G. L. ed.), 105, CRC Press, West Palm Beach (1978)
- 13) 尾花芳樹: 第63回日本感染症学会総会学術講演抄録, 45 (1989)
- 14) 長谷川伸作, 熊谷 満: 環境感染, **3**, 91 (1988)
- 15) Skerman, V. B. D., et al.: Int. J. Syst. Bacteriol., **30**, 225 (1980)
- 16) Henriksen, S. P.: Bacterial. Rev., **37**, 522 (1973)
- 17) Hasegawa, S. and M. Kumagai: Abstract of 1st. International Conference of the Hospital Infection Society, P4/7, London (1987)
- 18) 長谷川伸作, 熊谷 満: 北海道公衆衛生学雑誌 **1**, 81 (1988)
- 19) American Public Health Association: Standard Methods for the Examination of Water and Westwater (14th. ed.) American Public Health Association Inc., New York (1971)
- 20) Harrigan, W. F. and M. E. McCance: Laboratory Methods in Microbiology, Academic Press, London (1966)
- 21) Gilardi, G. L.: Glucose Nonfermenting Gram-Negative Bacteria in Clinical Microbiology (Gilardi, G. L. ed.), 45, CRC Press, West Palm Beach (1978)
- 22) Pedernen, M. M. et al.: Am. J. Clin. Path. **54**, 178 (1970)
- 23) Inclan, A. P. et al.: Southern Medical Journal, **58**, 1261 (1965)
- 24) Gernernr - Smidt: Acta. Path. Microbiol. Immunol., Scand Secd. Sect. B, **95**, 5 (1987)

英 文 要 約

The selective isolation method by the combination of the selective medium and a hydrophobic grid-membrane filter (HGMF, QA Labo., Canada) was developed and evaluated for the quantitative recovery of *Acinetobacter* species from some environmental waters. The confirmation rate of presumptive *Acinetobacter* species colonies was 96.7%, whereas 4.0% of the presumptively negative colonies were *Acinetobacter* species. With this method, we isolated 21 strains of *Acinetobacter* species from 39 environmental waters. Isolates were characterized according to biotypes. 9 strains of biotype I (O/F glucose, oxidative; β -hemolysis, -), 2 of biotype III(nonsaccharolytic; +), 10 of biotype IV(nonsaccharolytic; -) and no strain of biotype II(oxidative; +) were found. Oxidative strains of O/F glucose was 57.1% and nonsaccharolytic strains was 9.5%.

Key Words: *Acinetobacter*, biotypes, environmental waters, β -hemolysis