

2021年度富山県病原体等検査の精度管理調査 －赤痢菌の検出・同定－

磯部 順子 前西 絵美 金谷 潤一 綿引 正則
木全 恵子 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture (2021) － Detection and Identification of *Shigella* spp. －

Junko ISOBE, Emi MAENISHI, Jun-ichi KANATANI, Masanori WATAHIKI,
Keiko KIMATA, and Kazunori OISHI

目的：本県では、富山県病原体等検査業務管理要綱に基づき、県内の病原体等検査施設に対する検査水準の維持、向上を目的として精度管理調査を2016年度より実施している。2021度の調査は、三類感染症に位置づけられている赤痢の診断根拠となる「赤痢菌の検出と同定」とした。

検査用試料は、衛生研究所で培地に菌を接種し、各検査施設に配布した。結果は、各々の報告書から集計・解析した。

材料と方法：新川厚生センター、中部厚生センター、高岡厚生センター、砺波厚生センターおよび衛生研究所の5機関を対象とし、2022年1月25日～2月25日に実施した。

検査項目は赤痢菌疑い菌を同定することである。市販のカジトン培地（栄研化学）に表1の菌を接種して配布した。

表1. 配布試料と接種菌名

試料名	接種菌名
検体 A	赤痢菌 (<i>Shigella flexneri</i> 6)
検体 B	大腸菌 O124:HNM
検体 C	<i>Escherichia albertii</i>

配布した菌の性状等は配布前に衛生研究所で確認した。検査法は各機関の検査実施標準作業書(SOP)に準拠して行うこととした。

結果：各機関の成績は表2に示した。全ての機関が、試料Aを赤痢菌と同定し、試料B、試料Cを赤痢菌否定と回答した。また、試料Aについては種・血清型を*Shigella flexneri* 6(型)と決定した。

① 配付試料(菌)の培養

配付試料(菌)を培養し、単一培養菌であることを確認するために、多くは非選択培地としてトリプチケースソイアガー(TSA)を使用していた。1機関はドリガルスキー(BTB)を併用していた。選択培地としては、マッコンキー寒天、DHL寒天、SSB寒天、SS寒天を使用していた。試料Aの赤痢菌は胆汁酸塩に弱く感受性を示したため、選択性培地では発育が悪く、発育しても数個の集落しか認められず、機関によっては全く発育しなかった。このような場合、選択性のないTSAやBTBを併用しておく、検査が滞ることなく進められる。平板に発育した菌はいずれも単一性状と確認され、性状確認試験及び血清学的試験に3～6個の集落が用いられた。

② 性状確認試験

性状確認試験の結果は表2、3に示した。試験には、すべての機関がTSI、LIM、SIM、VP、シモンズのクエン酸塩培地、酢酸ナトリウム培地を用いた。また、4機関でメラー培地によるリジン脱炭酸試験を実施し、2機関ではアルギニン、オルニチンについても代謝の確認を行った。MR試験、 β -ガラクトシダーゼ(ONPG)試験は1機関で実施された。TSIでは3種類の糖(ブドウ糖、白糖、乳糖)の代謝とブドウ糖の代謝によるガスの産生性を確認できるが、TSIでのガス産生性は時に弱く、確認するのが難しいため、赤痢菌の検査ではグラム管を用いたガス産生性確認培地を併用することが望まれる。今回、TSIではガス産生性は認めなかったとした2機関が、グラム管を使用した培地でガス産生性を認めたと回答した。ほとんどの赤痢菌はガス産生性を有しないが、本調査で配布した*S. flexneri* 6については、およそ

20%がブドウ糖からガスを産生するとされ、赤痢菌のなかでも稀な性状を示すことが知られている。この血清型の菌をガス産生性により赤痢菌否定としないことが同定のポイントである。

LIM, SIM ではいずれもインドールの産生性を確認するが、機関①では試料 B のインドールの結果が他の機関と異なっていた。この菌株は赤痢菌との鑑別が難しく、インドール反応の結果は赤痢菌を否定するために重要な鑑別点となっている。試料 A, C 共にインドール産生陰性株であったことに加え、試薬作製日や期限などの情報が記載されていないため、この機関のインドール試験が正しく判定できたかは不明である。性状確認試験で用いる試薬類は、使用期限が明確な市販品を用いて結果を担保する（偽陰性を回避する）必要がある。今回、インドール試薬の使用期限あるいは製品管理番号を記載していたのは2機関であった。1機関は市販品を期限内で使用していた。1機関は自家調製試薬を使用期限1年として管理し、報告書には作製日が明記されていた。一方、SIM 培地で確認できる IPA 反応について、2機関がいずれの菌についても陰性であったと報告した。IPA は赤痢菌と誤同定されることが多い *Morganella morganii* を鑑別するのに有用であることから、確認し、記録することが望ましい。

糖の代謝を含め、生化学性状については、同じ赤痢菌種であっても血清型等により結果が異なるため注意を要する。菌種と血清型が決定したら、必ず成書でその性状を確認する。これにより根拠に必要と思われる性状試験を追加する必要性が生じることもあり得る。本調査の試料 B はいずれの機関も赤痢菌を否定できたが、志賀赤痢菌 3 型の抗血清に凝集したため、判定は容易ではなかったことが推定される。1機関ではワークシートに一般的な赤痢菌の性状に加え、志賀赤痢菌 3 型の性状を記載することで否定の根拠を明らかにしていた。この方法により判定が容易になると思われた。

③ 遺伝子検査

結果を表3に示した。機関①では遺伝子検査は実施されなかった。他の4機関では、試料 A については *ipaH*, *invE* のいずれも陽性、試料 B については *ipaH* のみ陽性と回答した。一方、試料 C については3機関はいずれの遺伝子も陰性と回答したが、機関④では遺伝子検査を実施しなかった。生化学性状、血清学的試験の結果で赤痢菌を否定したことによると考える。これらの遺伝子検査は赤痢菌を同定するための必須条件とはなっていない

いが、同定の結果を担保する重要な検査の一つであるので、可能な限り実施することが推奨される。とりわけ、染色体上に存在する *ipaH* 遺伝子は脱落することがほとんどなく、赤痢菌の重要な性状である侵入性を確認できる。これに対し、*invE* 遺伝子はプラスミド上に存在するため、比較的容易に脱落することが知られており、結果の取り扱いには注意が必要である。すなわち、*invE* 遺伝子が陰性であっても赤痢菌を否定する証拠とはならない。加えて、これらの遺伝子は侵入性大腸菌も保有することが知られているため、これらの遺伝子検査の結果が陽性となった場合でも、定められた性状確認検査を確実に実施しなければならない。

④ 血清型別試験

全ての機関が、試料 A についてはフレキシネル赤痢菌 B 多価およびフレキシネル赤痢菌 VI に、試料 B については志賀赤痢菌 A 多価、志賀赤痢菌 3 型に凝集し、また、試料 C については赤痢菌抗血清のいずれにも凝集しなかったと回答した。4機関では、試料 B について大腸菌 O124 にも凝集することを確認していた。

赤痢菌の同定検査では、陽性を示す性状検査が少ないなか、抗血清との凝集性を確認する血清学的試験はきわめて重要である。基本的には、市販されている抗血清で赤痢菌 4 菌種 1~18 血清型を決めることができる。赤痢菌は大腸菌とは K 抗原の種類が異なるため、加熱抗原を用いた凝集試験は必要としないとされている。血清学的試験は *S. sonnei* を除き、大腸菌との共通抗原が存在し、とりわけ、侵入性大腸菌との共通抗原が多いため、その結果は必須条件であるが十分条件とならない点に注意が必要である。

考察：本調査で各機関は赤痢菌を正しく同定し、誤同定が懸念される侵入性大腸菌やアルベルティイ菌を正しく否定することができた。ワークシートには最終結果を確認するための表があり、同定の根拠が明確になることから活用してほしい。

本年度の調査では、検査を始めるにあたり、試料 A が選択培地に十分発育しなかった。非選択培地には十分発育したことから、胆汁酸に感受性を示す性状へと変化したものと想定された。そもそも赤痢菌は大腸菌に比べ、胆汁酸に対する感受性が高いといわれ、SS 寒天や DHL 寒天での発育も大腸菌に比べると遅く、集落もかなり小さい。基本的には非選択培地と選択培地の両方に試料を塗抹し培養する。マッコンキー寒天は、滅菌して

使用することから非選択培地に位置付けたいとなるが、SS 寒天やSSB 寒天に比べ胆汁酸塩の含有量が少ないが、クリスタルバイオレットも含まれているため、選択性は弱いグラム陽性菌を抑制する。これに対し、BTBは胆汁酸塩を含まず、非選択性分離培地として使用することに問題はないものとする。検査を遂行するにあたり、非選択培地で十分量の菌を発育させることは重要なポイントである。

赤痢菌の同定検査において、しばしば*ipaH*や*invE*などの侵入性に関する遺伝子配列を標的としたPCR検査が実施される。上述したとおり、*invE*については脱落する場合も少なくないため、*ipaH*を標的とした遺伝子検査が優先されるべきである。この遺伝子検査をすべての機関が生化学性状や血清学的試験の後、ほぼ赤痢菌と同定できた段階で実施していた。赤痢菌を早く否定するという観点から、早い段階で遺伝子検査をするべきではないだろうか。しかしながら、試料Bは*ipaH*遺伝子を保有する侵入性大腸菌で、遺伝子以外の性状も赤痢菌と大きくは変わらないため、赤痢菌を否定するために複数の根拠が必要であった。インドール陽性、アルギニン陽性、キシロース陽性、ズルシット陽性に加え、 β -ガラクトシダーゼ(ONPG)陽性などの性状で志賀赤痢菌3型を否定できる。赤痢菌を同定する場合に必要なとなった

性状については、順次SOPに加えるようにすべきである。一方、いくつかの性状で他とは異なる結果を示した機関があったので、その原因について確認し、次の検査に備えていただきたい。

2022年2月発行の病原体微生物検出情報(IASR)によると、わが国で2021年に届け出のあった赤痢はわずかに7例で、うち3例は無症状病原体保有者であった。富山県では2019年に赤痢が発生しているが、この2年間に届け出はない。赤痢の減少は新型コロナウイルス感染症により、海外からの渡航者、海外への旅行者が激減したことによると考えられているが、新型コロナウイルス感染症発生前から減少傾向を示していた。富山県においては検査に携わる機会はかなり減少しているが、再び海外からの入国者が増加した場合は、地方であっても赤痢検査に携わる可能性があることから、検査技術を維持しなければならない。

アンケートについてまとめると、複数の厚生センターから赤痢検査の困難な状況について意見があった。赤痢菌抗血清および遺伝子検査試薬は高価であるが、使用期限が短く、廃棄する状況が続いていること、これまでの遺伝子検査法で使用する機器は経年期間が長いこと保守点検が難しく、リアルタイムPCR機器を用いた検査に移行すべきなどの意見であった。

表 2. 試料(赤痢菌を疑う菌)の同定結果

機関名	試料A		試料B	試料C
	菌種・血清型			
①	赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6	赤痢菌否定	赤痢菌否定
②	赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> VI型	赤痢菌否定	赤痢菌否定
③	赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6型	赤痢菌否定	赤痢菌否定
④	赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6	赤痢菌否定	赤痢菌否定
⑤	赤痢菌陽性	<i>Shigella flexneri</i> 6型	赤痢菌否定	赤痢菌否定

表 3. 遺伝子検査の結果

機関名	試料A		試料B		試料C	
	<i>ipaH</i>	<i>invE</i>	<i>ipaH</i>	<i>invE</i>	<i>ipaH</i>	<i>invE</i>
①						
②	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性
③	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性
④	陽性	陽性	陽性	陰性		
⑤	陽性	陽性	陽性	陰性	陰性	陰性

表 4. 分離菌の血清凝集試験および生化学性状(1)

試料A	結果	血清型	遺伝子検査									
			<i>lpsH</i>	<i>lpsE</i>	TSI	UM	VP	MR	SC	SIM	IPA	酢酸Na
①	陽性	フレキシネル6型			- / A	-,-,-	-		-	-,-,-	-	-
②	陽性	フレキシネル VI型	+	+	- / AG _W	-,-,-	-	+	-	-,-,-	-	-
③	陽性	フレキシネル6型	+	+	- / AG	-,-,-	-		-	-,-,-		-
④	陽性	フレキシネル6型	+	+	- / A	-,-,-	-		-	-,-,-		-
⑤	陽性		+	+	- / A	-,-,-	-		-	-,-,-		-
試料B	結果	血清型	遺伝子検査									
			<i>lpsH</i>	<i>lpsE</i>	TSI	UM	VP	MR	SC	SIM	IPA	酢酸Na
①	否定	志賀A多価 ③型			- / A	-,-,-	-		-	-,-,-	-	-
②	否定	志賀A多価 ③型 病原性大腸菌O124	+	-	- / A	-,+,-	-	+	-	-,+,-	-	+
③	否定	志賀A多価 ③型 病原性大腸菌O124	+	-	- / A	-,+,-	-		-	-,+,-		+
④	否定	志賀A多価 ③型 病原性大腸菌O124	+	-	- / A	-,+,-	-		-	-,+,-		+
⑤	否定	志賀A多価 ③型 病原性大腸菌O124	+	-	- / A	-,+,-	-		-	-,+,-		+
試料C	結果	血清型	遺伝子検査									
			<i>lpsH</i>	<i>lpsE</i>	TSI	UM	VP	MR	SC	SIM	IPA	酢酸Na
①	否定				- / AG	+,+,-	-		-	-,+,-	-	+
②	否定		-	-	- / AG	+,+,-	-	+	-	-,+,-	-	+
③	否定		-	-	- / AG	+,+,-	-		-	-,+,-		+
④	否定				- / A	+,+,-	-		-	-,+,-		+
⑤	否定		-	-	- / A	+,+,-	-		-	-,+,-		+

表 4. 分離菌の血清凝集試験および生化学性状(2)

検体A	糖の分解											アミノ酸代謝			
	ブドウ糖 (ガス)	ラクトース	サッカロース	マンニト	アトニト	サリク	スルシット	キシロース	ラフィース	イソシット	アラビノース	β -ガラクトシ ダーゼ	L	A	D
①	+	-	-	+	-	-	-	-					-	-	-
	(-)														
②	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-		-	-	-	-
	(+)														
③	+			+	-	-	-		-	-	+				-
	(+)														
④	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-					
	(+)														
⑤	+	-		+	-	-	-	-	-	-			-		
	(+)														
検体B	糖の分解											アミノ酸代謝			
	ブドウ糖 (ガス)	ラクトース	サッカロース	マンニト	アトニト	サリク	スルシット	キシロース	ラフィース	イソシット	アラビノース	β -ガラクトシ ダーゼ	L	A	D
①	+	-	-	+	-	-	+	+					-	-	-
	(-)														
②	+	-	-	+	-	+	+	+	-	-		+	-	+	-
	(-)														
③	+	-	-	+	-	-	+		-	-					-
	(-)														
④	+	-	-	+	-		+	-	-	-					
	(-)														
⑤	+	-		+	-	-	+	+	-	-			-		
	(-)														
検体C	糖の分解											アミノ酸代謝			
	ブドウ糖 (ガス)	ラクトース	サッカロース	マンニト	アトニト	サリク	スルシット	キシロース	ラフィース	イソシット	アラビノース	β -ガラクトシ ダーゼ	L	A	D
①	+	-	-	+	-	-	-	-					+	-	+
	(+)														
②	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-		-	+	-	+
	(+)														
③	+	-	-	+	-	-	-		-	-	+				+
	(+)														
④	+	-	-	+	-		-	-	-	-					
	(+)														
⑤	+	-		+	-	-	-	-	-	-			+		
	(+)														