

2020 年度富山県病原体等検査の精度管理調査 －チフス菌，パラチフス A 菌の同定－

木全 恵子 磯部 順子 前西 絵美 内田 薫
金谷 潤一 綿引 正則 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture (2020) －Identification of *Salmonella* Typhi and *Salmonella* Paratyphi A－

Keiko KIMATA, Junko ISOBE, Emi MAENISHI, Kaoru UCHIDA,
Jun-ichi KANATANI, Masanori WATAHIKI, 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，向上を目的とした精度管理調査を平成 28 年度より実施している．令和 2 年度の調査は，三類感染症であるチフス，パラチフスの起因菌であるチフス菌，パラチフス A 菌の同定を検査項目とした．

検査試料は，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：県内 5 機関を対象とし，令和 3 年 2 月 16 日～3 月 19 日に実施した．

検査項目はチフス菌・パラチフス A 菌を疑う菌を同定することとした．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．

検査法は各機関の検査実施標準作業書（SOP）に準拠して行い，検査終了後は，検体は SOP に従い，滅菌廃棄した．

結果：各機関の成績は表 2 に示した．全ての機関が，試料 A，B，C について正しく回答した．以下に，提出された記録から結果の詳細を解析した（表 3－5）．

(1) 平板上の集落の観察：調査試料として配布した菌株（以下供試菌）が純培養菌であるか確認する．この確認作業では非選択培地と選択培地の両方に培養して発育菌を観察することが重要となる．非選択培地上では，発育した集落が単一性状（湿潤，辺縁，厚みなど）であるか確認する．選択分離培地では発育した集落がチフス菌，あるいはパラチフス A 菌の特徴を示し，すべての集落が単一性状であるか確認する．これらの平板での観察から供試菌が純培養菌か否かを判定する．純培養菌であることが確認された場合，平板上の集落 5 個以上を一次鑑別培地（TSI，LIM）等に接種し，生化学性状を確認する．

選択分離培地は，記載のない 1 機関を除き，

表 1．配付資料と接種菌名

試料名	接種菌名
A	<i>Salmonella</i> Plymouth
B	<i>Salmonella</i> Typhi
C	<i>Salmonella</i> Paratyphi A

表 2．精度管理調査結果

機関名	検体 A		検体 B		検体 C	
	チフス菌	パラチフス菌	チフス菌	パラチフス菌	チフス菌	パラチフス菌
1	否定	否定	陽性	否定	否定	陽性
2	否定	否定	陽性	否定	否定	陽性
3	否定	否定	陽性	否定	否定	陽性
4	否定	否定	陽性	否定	否定	陽性
5	否定	否定	陽性	否定	否定	陽性

表 3. 検体 A (Salmonella Plymouth) の解析結果

機関名	培地名	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	TSI	LIM	ズルシット	アジノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	V P	ONPG	トリニダート	02	09	Vi	Hd	Ha
1	TSA	白	SS	中心黒	DHL	中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , +	+ , - , +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	nt	-	-
2	TSA	白	SS	中心黒	DHL	中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , +	+ , - , +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
3	血液寒天	灰白	SS	半透明 中心黒	DHL	半透明 中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , w , +	+ , - , +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
4	TSA	白	SS	無色半透明 中心黒	DHL	無色半透明 中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , +	+ , - , +	+	+	+	+	-	+	nt	-	nt	-	+	-	-	nt
5				中心黒	DHL	中心黒			- , 黒 , + , +	+ , - , +	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-

nt: not test

表 4. 検体 B (Salmonella Typhi) の解析結果

機関名	培地名	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	TSI	LIM	ズルシット	アジノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	V P	ONPG	トリニダート	02	09	Vi	Hd	Ha
1	TSA	白	SS	白	DHL	白	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , - , +	+ , - , + , w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
2	TSA	白	SS	透明	DHL	透明	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , - , + , w	+ , - , +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
3	血液寒天	灰白	SS	半透明	DHL	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色 (H)	- , + , - , + , w	+ , - , + , w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
4	TSA	白	SS	無色 半透明	DHL	無色 半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , - , +	+ , - , -	-	-	-	-	-	-	nt	-	nt	-	+	+	+	nt
5				無色 透明	DHL	無色 透明			- , + , + , + , w	+ , - , +	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-

nt: not test

表 5. 検体 C (Salmonella ParatyphiA) の解析結果

機関名	培地名	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	TSI	LIM	ズルシット	アジノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	V P	ONPG	トリニダート	02	09	Vi	Hd	Ha
1	TSA	白	SS	白	DHL	白	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , -	- , - , +	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	nt	-	+
2	TSA	白	SS	透明	DHL	透明	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , -	- , - , +	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
3	血液寒天	灰白	SS	半透明	DHL	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , -	- , - , +	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
4	TSA	白	SS	無色 半透明	DHL	無色 半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色	- , + , + , -	- , - , +	+	+	-	-	-	+	nt	-	-	nt	+	-	-	+
5				無色透明	DHL	無色透明			- , + , + , -	- , - , +	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+

nt: not test

SS 寒天培地, DHL 寒天培地, クロモアガーサルモネラを複数種類併用していた。これらの選択分離培地はサルモネラ属菌の硫化水素の産生性やサルモネラ属菌に特有な酵素基質を利用した選択分離培地である。上記のサルモネラ属菌の選択性の原理が異なる培地を複数組み合わせることにより、より精度の高いサルモネラ属菌の分離が可能となる。チフス菌はわずかに硫化水素を産生し、パラチフス A 菌は全く硫化水素を代謝しない特徴がある。このため、チフス菌、パラチフス A 菌は SS 寒天培地, DHL 寒天培地では無色透明な集落を形成する(チフス菌は DHL 寒天培地上で中心部のみ黒色の半透明な集落を呈することがある)。一方、クロモアガーサルモネラ培地では、一般的なサルモネラ属菌と同様、チフス菌、パラチフス A 菌も藤色となる。これらの集落の特徴を観察し、チフス菌、パラチフス A 菌疑い株を分離する。しかし、近年、硫化水素の産生性が低いサルモネラ属菌もあり、これらの選択分離培地でチフス菌が疑われる場合があるため、注意を要する。

(2) O 群血清凝集試験：チフス菌、パラチフス A 菌同定にはそれぞれ Vi 血清・O9 群血清・H-d 血清による血清凝集試験, O2 群血清・H-a 血清による血清凝集試験が必要である。

O 群血清凝集試験は供試する菌量と抗血清の量の変動により、しばしば偽陰性となることがある。このため、検査担当者は日常の検査で、血清凝集試験に最適な供試菌量と抗血清の量の最適比を確認しておくことが重要である。

チフス菌は莢膜抗原の Vi 抗原を保有する V 型菌と、Vi 抗原が脱落した W 型菌が存在する。Vi 抗原は、チフス菌、パラチフス C 菌と一部の *Salmonella* Dublin のみが保有するとされ、とりわけチフス菌については、人からの新鮮分離株で検出される。しかし、人工培地で継代された菌では Vi ファージの脱落によりその凝集性は失われることが多い。このため、生菌を用いた血清凝集試験では、V 型菌は Vi 血清に凝集し、O9 群血清には弱く凝集するかもしれない。一方、W 型菌の血清凝集試験では Vi 血清に凝集せず、O9 群血清のみ凝集する。このため、生菌で Vi 血清凝集が観察された場合は、加熱処理により Vi 抗原を菌体から遊離させた抗原液に用いて O9 群血清の血清凝集試験を行わなければならない。今回の精度管理ではいずれの機関も検体 B (チフス菌) について、Vi 血清および O9 群血清凝集試験を行い、Vi、O9 群血清に双方に凝集す

ることを確認していた(なお 1 機関は Vi 凝集試験結果を生菌の場合と加熱菌を用いた場合で取り違えて記録していた)。一方、検体 C (パラチフス A 菌) ではすべての機関が O2 群血清凝集試験で O2 群血清に凝集することを確認していた。検体 A (*Salmonella* Plymouth) の抗原構造は O9,46:d:z6 であり、O9 群血清および O9,46 群血清に凝集する。生化学性状試験の結果を考慮するとチフス菌である可能性は低いが、市販されている他の血清との凝集性を確認することが望ましい。

(3) H 血清凝集試験：H 血清凝集試験においては、他のサルモネラに比べて運動性が弱いチフス菌、パラチフス A 菌の場合、H 免疫血清との凝集性の判定には注意が必要である。抗原である鞭毛が血清凝集試験に十分な量発現していない場合があるため、チフス菌、パラチフス A 菌が強く疑われる菌で H-d や H-a 血清に凝集しない場合、運動性を高める培養(25℃培養、クレイギー管の使用等)を行うことが望ましい。また、凝集が認められない場合や上述の運動性を高める培養を行った場合などは、抗原液の調製(菌液の培養温度等)や血清凝集試験の温度条件等を確認する必要があるため、記録を残すべきである。前年度のチフス菌精度管理においては、これらの記録を記載していない機関が多かったが、今年度の精度管理では 4 機関で記載されていた。検体 B (チフス菌) ではクレイギー管入り 0.3% 寒天加半流動培地を用いて 25℃で 1 回培養または 36℃で 2 回継代培養による運動性強化を 2 機関が行っていた。5 機関すべてが検体 B (チフス菌) では H-d 血清に、検体 C (パラチフス A 菌) では H-a 血清に凝集することを確認していた。検体 A (*Salmonella* Plymouth, 抗原構造 O9,46:d:z6) では I 相が H-d 血清に、II 相が市販の H-z6 血清または H-1 血清に凝集する。このように抗原の一部がチフス菌と同じ血清に凝集するサルモネラ属菌も存在することから、H-d や H-a 以外の市販されている他の血清との凝集性を確認することが望ましい。

(4) 生化学性状試験：チフス菌、パラチフス A 菌の主要な生化学性状は、硫化水素産生性、ガス産生性、リジンデカルボキシラーゼ産生性、運動性であり、TSI と LIM 培地ではほぼ判別できる。一般的なサルモネラ属菌は硫化水素が強産生性であり TSI 高層で黒色を呈する。しかし、チフス菌、パラチフス A 菌の硫化水素の産生性はないもしくは極めて弱く、TSI 高層での硫化水素産生

による黒変はごく微小か観察されないことが多い。また、生化学性状の確認試験として1機関がSIMによる運動性と硫化水素産生を確認していた。SIMはLIMにくらべ、運動性を確認しやすく、運動性が弱い菌の確認試験には有効な培地である。

今回1機関においてアラビノース代謝試験の結果が陰性であり、他の機関の結果と異なっていた(表2, 表4 機関5)。当該機関に確認したところ、使用したアラビノースはD体であった。細菌学的試験ではL-アラビノースを使用し、通常光学異性体であるD-アラビノースは使用しない。当該機関でのL-アラビノースによる再試験を行ったところ、アラビノース代謝試験の結果は陽性であった。代謝試験に用いる糖について試薬購入時または使用時にいずれの光学異性型の糖を試験に用いるのか確認が必要である。

(5) 陽性コントロール: 今回、3機関が培地の性能確認のために陽性コントロール菌株を用いて選択培地の精度、生化学性状のための培地や試薬の性能を確認していた。用いた陽性コントロール菌株は *Salmonella* Enteritidis が2機関、*Salmonella* Infantis が1機関であった。

Salmonella Enteritidis は O9 群血清に凝集陽性であるため、血清の精度なども確認できる。また、これらの陽性コントロールを置くことで、上述のアラビノース代謝試験においても培地確認が容易になると考えられた。

考察: チフス、パラチフスは本県では3-5年に1例程度の報告があるのみの希少感染症であるが、国内では年間20-30例の推移で患者が発生しており、時に国内では集団感染事例(IASR Vol. 36 p. 162-163: 2015年8月号)が報告されている。また、チフスとパラチフスは三類感染症であり、診断の根拠となる起因菌の同定は迅速かつ正確でなければならない。このため、これらの検査体制の維持は重要である。チフス、パラチフスの同定は生化学性状検査および血清学的検査の両方の結果から判定する。今年度の精度管理では同定の最終結果は全ての機関で正解であったが、一部の機関に培地調整の誤りや結果の誤記載が認められた。今後、各検査機関においては、結果報告の確認体制および培地調整に関するOJT等を今後再確認する必要があると考える。