

令和元年度富山県病原体等検査の精度管理調査 －チフス菌の同定－

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

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture (2019) － Identification of *Salmonella* Typhi －

Junko ISOBE, Emi MAENISHI, Kaoru UCHIDA, Jun-ichi KANATANI,
Keiko KIMATA, Masanori WATAHIKI, Etsuko YUNOKI, 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平成28年度より実施している。令和元年度の調査は、三類感染症に位置づけられているチフスの診断根拠となる「チフス菌の同定」を項目とした。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、令和2年1月28日～2月21日に実施した。

検査項目はチフス菌・パラチフス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。

表1. 配布試料と接種菌名

試料名	接種菌名
A	<i>Salmonella</i> Enteritidis
B	<i>Salmonella</i> Infantis
C	<i>Salmonella</i> Dublin

チフス菌、パラチフス菌は国立感染症研究所で規定するバイオセーフティレベル3 (BSL3) であることから、P3レベルの実験室で取り扱うことが定められている。そのため、本調査では、チフス菌、パラチフス菌ではなく、生化学性状等が似ているため、誤同定する可能性があるサルモネラを検体とした。配布した菌の性状等は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。すべての機関で、検体A, B, Cのいずれもチフス菌、パラチフス菌を否定し、正しく回答した。結果の詳細を次に示す（表3－5）。

① 供試菌の選択

配布したチフス疑い菌株（以下供試菌）を始めに純培養菌にする工程で、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。非選択培地上で確認するポイントは、発育した集落が単一性状（湿潤、辺縁、厚みなど）を示しているかという点である。集落の大きさは平板上の発育密度によって変わるので観察には注意が必要である。一方、選択分離培地での確認ポイントは、集落がチフス菌、あるいはパラチフス菌の特徴を示す、すべてが単一の特徴を示すという点である。この観察でいずれの培地においてもチフス菌様の単一性状の集落が観察された場合、純培養菌と推定され、次の工程に進むことができる。この段階で、菌の混在が疑われた場合は、選択分離培地上のチフス菌の特徴を示す単独集落の上部から培地に触れないように釣菌し、非選択培地および性状確認用の培地（TSI, LIM）等に接種して、同定を進めることになる。したがって、供試菌を寒天平板に培養する段階で、単独集落が得られるような塗抹手技が重要となる。実際の検査では、寒天平板培養菌が搬入されることもあるが、その検査方法はここに示した手順と同様となる。選択分離培地は、1機関を除き、SS寒天培地、DHL寒天培地、クロモアガーサルモネラを併用していた。硫化水素の産生性を指標とする培地としてSS, DHL寒天培地を使用したと思われる。

硫化水素はチフス菌がわずかに産生，パラチフス A 菌は全く産生しないという特徴があるため，その点を観察できる培地は有用である。しかしながら，硫化水素の産生性が低いサルモネラもあり，チフス菌が疑われるケースも散見されるので，注意を要する。クロモアガーサルモネラ培地では，一般的なサルモネラと同様，チフス菌，パラチフス菌も藤色となる。硫化水素産生性は確認できないが，培地の pH に影響されることなく，集落の色調を指標とすることができる点は極めて有用である。サルモネラで藤色になる機序は明らかではない。

② 血清凝集試験

血清凝集試験の結果は，いずれの機関も検体 A と C でサルモネラ免疫血清 O9 に凝集を認め，検体 B では O9，O2 どちらにも凝集を認めず，正しく回答されていた。血清凝集試験はチフス菌に限らず，様々な細菌検査で実施される手技である。原理は抗原抗体反応で，手技は容易であるが，供試する菌の濃度，量，滴下する抗血清の量などの最適比を日頃から習得しておくことが大事である。初心者において菌濃度や血清の添加量により偽陰性となる場合がしばしば認められる。

一方，チフス菌の特徴である Vi 抗原と抗血清との凝集性について，すべての機関が凝集を認めなかったと回答した。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には認められるが，人工培地で継代された菌では Vi フェージの脱落によりその凝集性は失われることが多い。一方，新鮮分離されたチフス菌において，しばしば Vi 血清のみに凝集し，O9 抗血清との凝集反応が阻害される場合があり，注意が必要である。このような結果が得られた場合には 100℃での加熱により Vi 抗原を遊離させて，O 抗原との凝集試験を行う必要がある。

H 抗原については，検体 A，C は免疫血清 O9 と凝集しているのでチフス菌を疑い，サルモネラ免疫血清 H-d との凝集性を確認しなければならない。1 機関は性状検査でチフス菌を否定したことから H-d との凝集試験は未実施であった。他の 4 機関はすべてで H-d との凝集性は陰性と回答した。チフス菌では，他のサルモネラに比べて運動性が弱いことが知られており，H 免疫血清との凝集性の判定には注意が必要である。H-d，あるいは H-a

と凝集しないことだけでチフス菌を否定はできない。できれば，H-d や H-a だけでなく，市販されている他の血清との凝集性を確認するのが望ましい。チフスが強く疑われる菌で H-d や H-a に凝集しない場合，SOP にあるように運動性を高める培養 (25℃培養，クレイギー管の使用等) を行うのが望ましい。H 免疫血清との凝集反応は，50℃の恒温水槽で実施するが，その温度，使用した機器名など記載されていない機関が多かった。凝集が認められない場合に温度条件を確認する必要があるため，記録を残すべきである。

③ 生化学性状試験

チフス菌，パラチフス菌は，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，運動性などのおもな性状を TSI と LIM 培地ではほぼ判別できる。チフス菌，パラチフス菌の生化学性状でもっとも特徴的なのは，硫化水素の産生性が一般的なサルモネラに比べ，極めて弱いか，産生しないという点にある。したがって，TSI での発育状況の観察は重要となる。今回の供試菌の中に含まれていたサルモネラのように，硫化水素を産生しない株も存在すること，赤痢菌もよく似た性状となることから，とりわけパラチフス菌での性状観察は重要である。

TSI については，腸内細菌の硫化水素産生性の判定に欠くことのできない培地である。元来，腸内細菌はそのほとんどが硫化水素産生性であるが，その産生性は強，中等，弱産生に分けられる。これらのうちの強産生性菌のみが黒変するように開発されたのが TSI 培地である。それゆえ，硫化水素の産生性の結果は，TSI 培地での性状であることを記載するのが望ましい。

④ 陽性コントロール

細菌分離を行う際，培地の精度を確認するために陽性コントロールを同時に検査するのが基本である。しかしながら，チフス菌とパラチフス菌の場合，バイオセーフティレベル 3 (BSL3) であるため，P3 実験室で検査を行わなければならない。したがって，P3 施設のない機関ではチフス菌疑い株の検査に陽性コントロールを置くことは不可能である。1 機関では，一般的なサルモネラの株 (O9) をコントロールとして検査を実施していた。これにより，選択培地の精度，生化学性状のための培地や試薬，免疫血清の精度なども確認できるため，有用な手技であると思われた。残念ながら，

パラチフス菌のO抗原と同じ「O2」のサルモネラは入手困難であるので、免疫血清の精度を確認するのは難しいかもしれない。

考察：富山県ではチフス、パラチフスは3～5年に1例程度の報告があるのみの希少感染症となっている。しかしながら、海外からの観光客や技能訓練生などが増加している現状では、検査体制を

整えておく必要がある。また、感染症法において、チフスとパラチフスは3類感染症に位置付けられているため、そ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。陽性コントロールでも述べたが、BSL 3と決められている菌種で困難である。今回の供試菌のような性状を示す菌株を用いて、日頃からチフス菌を同定する手順、技術を習得しておくことが必要である。

表 2. 精度管理報告書のまとめ

A		B		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	否定	否定	否定	否定
2 否定	否定	否定	否定	否定	否定
3 否定	否定	否定	否定	否定	否定
4 否定	否定	否定	否定	否定	否定
(サルモネラ属菌09群)		(サルモネラ属菌07群)		(サルモネラ09群)	
5 否定	否定	否定	否定	否定	否定

表 3. 検体 A の結果

機関名	Typhi	ParaA	培地名	色調	使用培地	色調	使用培地	色調	使用培地	色調
1	否定	否定	羊血寒	灰色	SS	中心黒	DHL	中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
2	否定	否定	TSA	灰色	SS	半透	DHL	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色
3	否定	否定	羊血寒	無色 半透明	SS	無色 半透明 中心部黒	DHL	無色 半透明 中心部黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
4	否定	否定	血液寒天	白色	SS	透明・中心部 わずかに黒	DHL	透明・中心部 わずかに黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
5	否定	否定	TSA	白色			未使用		クロモアガーサルモネラ	藤色

TSI	LIM	スリット	アラビノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	VP	ONPG	オキシダーゼ	O2	O9	Vi	Hd	Ha
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	NT
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	NT
-,+,-,+w	+, -, +	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	NT

表 4. 検体 B の結果

機関名	Typhi	ParaA	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調
1	否定	否定	TSA	白	S S	白	D H L	白	クロモアガーサルモネラ	藤色
2	否定	否定	TSA	灰白	S S	半透	D H L	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色ラフ
3	否定	否定	羊血寒	白色半透明	S S	無色半透明 中心部黒色	D H L	無色半透明 中心部黒色	クロモアガーサルモネラ	藤色
4	否定	否定	血液寒天	白	S S	無色透明	D H L	無色透明	クロモアガーサルモネラ	藤色
5	否定	否定	TSA	白			未使用		クロモアガーサルモネラ	藤色

TSI	LIM	スルシット	アラビノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	V P	ONPG	オキシドール	02	09	Vi	Hd	Ha
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07
- , + , + , + , - , +	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	07

表 5. 検体 C の結果

機関名	Typhi	ParaA	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調	培地名	色調
1	否定	否定	TSA	灰色	S S	中心黒	D H L	中心黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
2	否定	否定	TSA	灰色	S S	半透明	D H L	半透明	クロモアガーサルモネラ	藤色ラフ
3	否定	否定	羊血寒	白色半透明	S S	無色半透明 中心部黒色	D H L	透明 中心部黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
4	否定	否定	血液寒天	白色	S S	透明無色	D H L	透明 中心部黒	クロモアガーサルモネラ	藤色
5	否定	否定	TSA	白			未使用		クロモアガーサルモネラ	藤色

TSI	LIM	スルシット	アラビノース	キシロース	クエン酸	マロン酸	オルニチン	V P	ONPG	オキシドール	02	09	Vi	Hd	Ha
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
- , + , + , + , - , +	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-