

令和 6 年度富山県病原体等検査の精度管理調査(2024 年度)
－ 赤痢菌の検出・同定 －

木全 恵子 大島 萌愛 清水 ひな 金谷 潤一
齋藤 和輝 池田 佳歩 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture in 2024
－ Detection and identification of *Shigella* －

Keiko KIMATA, Moe OSHIMA, Hina SHIMIZU, Jun-ichi KANATANI,
Kazuki SAITO, Kaho IKEDA, 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 6 年度の調査は、赤痢菌を対象項目とした。検査用試料は、衛生研究所で培地に接種し、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 6 機関を対象とし、令和 6 年 12 月 3 日～令和 7 年 1 月 31 日に実施した。

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）等に準拠して行い、検査終了後は、検体は SOP に従い、滅菌廃棄した。

結果：各施設の成績は表 2 に示す。全ての機関が、試料 C を赤痢菌陽性と判定し、試料 A、試料 B を赤痢菌否定とした。また、5 機関が、試料 C については種・血清型を *Shigella flexneri* 6（型）と回答し、1 機関が種名のみ（*Shigella flexneri*）と回答した。しかし、検査過程の記録では 6 機関すべてが試料 C について血清型別を行い *Shigella flexneri* 6 と同定していた。

以下の通り、提出された記録から詳細を解析した結果を示す。

配布試料（菌）の培養：配布試料（菌）を培養し、単一培養菌であることを確認するために、5 機関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、1 機関はドリガルスキー（BTB）を使用していた。選択培地としては、DHL 寒天、SSB 寒天、SS 寒天、SS-SB 寒天を使用していた。一部の機関では試料 A および B について DHL 寒天上の集落の生育が悪かったと報告があった。配布試料（菌）によっては、胆汁酸塩に弱く、選択性培地では発育が悪いものがある。このため、非選択培地やほかの選択性の弱い培地

表 1 配布試料と接種病原体

試料名	接種病原体等
A	大腸菌 O124:HNM
B	<i>Escherichia albertii</i>
C	赤痢菌 (<i>Shigella flexneri</i> 6)

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	
	同定結果	菌種・血清型	同定結果	菌種・血清型	同定結果	菌種・血清型
a	赤痢菌否定		赤痢菌否定		赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6
b	赤痢菌否定		赤痢菌否定		赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6
c	赤痢菌否定		赤痢菌否定		赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6
d	赤痢菌否定		赤痢菌否定		赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6型
e	赤痢菌否定		赤痢菌否定		赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i>
f	赤痢菌否定		赤痢菌否定		赤痢菌陽性	<i>S. flexneri</i> 6

を併用することが望まれる。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2~9個の集落が用いられた。

性状確認試験：性状確認試験の結果は表3、4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。1機関（機関e）はAPI20E（バイオメリュウ）による生化学性状による同定試験を行った。また、5機関がメラー培地、API20Eなどを使用し、アミノ酸脱炭酸試験を実施した。このうち、4機関ではリジンのほかアルギニン、オルニチンについても代謝の確認を行った。メラー培地を用いる場合には、菌の増殖に伴う培地の色調変化を偽陽性と誤判定することがある。このため、菌を接種したのちメラー培地にミネラルオイルを重層する（またはふたを固く締める）ほか、アミノ酸非添加培地による対照試験を行い、培地の色調変化を確認する必要がある。今回の精度管理ではミネラルオイル重層もしくは対照試験について各1機関が検査記録に記載していた。MR試験は2機関、 β -ガラクトシダーゼ（ONPG）試験は3機関で実施された。また、1機関が陽性コントロールの赤痢菌を鑑別培地に接種し、培地の参照とした。頻繁に行わない生化学性状試験や培地の性能を確認するうえで、対照実験を行うことは重要である。陽性コントロールを用いた試験では、試験検体と交差汚染をさせないように十分注意して実施する。

ダーラム管を用いたブドウ糖からのガス産生確認試験は5機関が実施した。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、菌株によってはTSIでのガス産生性が弱く、確認するのが難しい。このため、赤痢菌の検査ではダーラム管を用いたブドウ糖からのガス産生性確認培地を併用することが望まれる。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重要である。

LIM、SIMでは菌の運動性とインドール反応を確認する。本調査で配布した試料A、BおよびCはいずれも運動性陰性であり、全ての機関が運動性陰性と回答していた。しかし、日常の検査で赤

痢菌と誤同定されることが多い*Morganella morganii*や*Pleisiomonas shigelloides*は運動性陽性である。このため、これらの菌種との鑑別にはSIM等で運動性やIPA反応を確認し、記載しておくことが重要である。

インドール反応は赤痢菌の鑑別点のひとつである。試料Aのインドール反応について、1機関の結果が他の機関と異なっていた（表3）。試料Aは運動性のない菌株であるため、LIM、SIMの高層培地に本菌を穿刺するのみでは、培地表面に十分な菌量を生育することが難しい場合がある。従って、培地表面に穿刺後の残りの菌を塗抹するなどの工夫が必要である。また、インドール試薬をはじめとす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ること、もしくは作成日と使用期限を管理した自家調製試薬を使用することが望ましい。今回、記載のなかった1機関を除き、4機関は自家調製したインドール試薬（試薬作成日を記載）を、1機関は市販のインドール試薬（Lotと使用期限を記載）を使用していた。

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。また、複数の機関がシモンズクエン酸培地や酢酸ナトリウム培地による培養を3日~5日まで継続し、観察していた。その一方で、糖代謝培地は1日のみ培養した機関も散見された。糖代謝試験では遅分解性の糖代謝を示す菌もあるため、48時間まで培養し観察することが望ましい。

試料Aに接種した病原体は腸管侵入性大腸菌であった。試料Aの血清型別試験では下記の血清型別試験の項に後述のとおり志賀赤痢菌3型の抗血清に凝集した。しかし、マンニット代謝陽性のほか、インドール反応陽性、ズルシットおよびキシロース代謝陽性の性状が志賀赤痢菌の性状と一致しなかった。5機関は、赤痢菌を否定する根拠として、これらの生化学性状を挙げた。また、1機関はAPI20Eの生化学性状試験による同定結果（*Escherichia coli* 1 同定率 96.3%）から赤痢菌を否定した。

試料Bに接種した病原体は*Escherichia albertii*であった。試料Bはインドール反応陽性、リジン脱炭酸試験陽性、酢酸ナトリウム陽性、ブドウ糖の代謝によるガスの産生性陽性の性状であり、赤痢菌の性状と一致しなかった。これらを根拠として、全ての機関が赤痢菌を否定した。

表 3 各機関で実施した試験結果一覧 (1)

試料A	結果	血清型	遺伝子検査		TSI	LIM	VP	MR	SC	SIM	IPA	酢酸Na
			<i>ipaH</i>	<i>invE</i>								
a	否定	志賀A多価 3型 病原性大腸菌O124	+	-	-/A--	-,-,-	-		-	-,-,-	-	-
									(5日間)			(5日間)
b	否定	志賀A多価 3型 病原性大腸菌O124	+	-	-/A--	-,+,-	-	+	-	-,+w,-	-	-
									(5日間)			(5日間)
c	否定	志賀A多価 3型 病原性大腸菌O124	+	-	-/A--	-,+,-	-		-	-,+,-	-	-
									(3日間)			(5日間)
d	否定	志賀A多価 3型 病原性大腸菌O124	+	-	"/A	-,+,-	-		-	-,+,-	-	-
									(3日間)			(3日間)
e	否定	志賀A多価 3型 病原性大腸菌O124	+		-/A-	-,+w,-	-	+	-	-,+,-		-
f	否定	志賀A多価 3型 病原性大腸菌O124	+	-	-/A--	-,+,-	-		-	-,+,-		-
									(3日間)			(3日間)
試料B	結果	血清型	遺伝子検査		TSI	LIM	VP	MR	SC	SIM	IPA	酢酸Na
			<i>ipaH</i>	<i>invE</i>								
a	否定				-/AG-	+,+,-	-		-	-,+w,-	-	+
									(5日間)			(5日間)
b	否定	赤痢菌多価血清全て陰性	-	-	-/AG-	+,+,-	-	+	-	-,+,-	-	+
									(2日間)			(2日間)
c	否定		-	-	-/AG-	+,+,-	-		-	-,+,-	-	+
									(3日間)			(5日間)
d	否定	赤痢菌多価血清全て陰性	-	-	-/AG	+,+,-	-		-	-,+,-	-	+
									(3日間)			(3日間)
e	否定	赤痢菌多価血清全て陰性	-		-/AG-	+,+,-	-	+	-	-,+,-		+
f	否定	赤痢菌多価血清全て陰性	-	-	-/AG-	+,+,-	-		-	-,+,-		+
									(3日間)			(3日間)
試料C	結果	血清型	遺伝子検査		TSI	LIM	VP	MR	SC	SIM	IPA	酢酸Na
			<i>ipaH</i>	<i>invE</i>								
a	陽性	<i>S. flexneri</i> 6	+	+	-/AG-	-,-,-	-		-	-,-,-	-	-
									(5日間)			(5日間)
b	陽性	<i>S. flexneri</i> 6	+	+	-/AG w -	-,-,-	-	+	-	-,-,-	-	-
									(5日間)			(5日間)
c	陽性	<i>S. flexneri</i> 6*	+	+	-/AG-	-,-,-	-		-	-,-,-	-	-
									(3日間)			(5日間)
d	陽性	<i>S. flexneri</i> 6型*	+	+	-/AG w	-,-,-	-		-	-,-,-	-	-
									(3日間)			(3日間)
e	陽性	<i>S. flexneri</i> 6型*	+		-/AG w	-,-,-	-	+	-	-,-,-		-
f	陽性	<i>S. flexneri</i> 6	+	+	-/AG-	-,-,-	-		-	-,-,-		-
									(3日間)			(3日間)

() : 培養時間が2日以上の場合。記載がない場合は培養時間1日以下。

*釣菌したコロニーの一部が*S. sonnei* II相に凝集することも報告した

表 4 各機関で実施した試験結果一覧 (2)

試料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	アドニト	サリシ	ズルシット	キシロース	ラフィノース	イノシット	アラビノース	オキシダーゼ	カタラーゼ	β-ガラクトシダーゼ	L	A	O
a	+			+	-	-	+	+	-	-					-	-	-
b	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-				+	-	-	-
c	+			+	-	-	+	+	-	-				+	-		-
d	+			+	-	-	+	+	-	-					-	+	-
e	+		-	+						-	+	-	+	+	-	-	-
f	+			+	-			+	-	-							
	(-)			(3日間)	(3日間)			(3日間)	(3日間)	(3日間)					(2日間)	(2日間)	(2日間)

試料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	アドニト	サリシ	ズルシット	キシロース	ラフィノース	イノシット	アラビノース	オキシダーゼ	カタラーゼ	β-ガラクトシダーゼ	L	A	O
a	+			+	-	-	-	-	-	-					+	-	+
b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-				+	+	-	+
c	+														+		
d	+			+	-	-	-	-	-	-					+	-	+
e	+		-	+						-	-	-	+	+	+	-	+
f	+			+	-			-	-	-							
	(+)			(3日間)	(3日間)			(3日間)	(3日間)	(3日間)							

試料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	アドニト	サリシ	ズルシット	キシロース	ラフィノース	イノシット	アラビノース	オキシダーゼ	カタラーゼ	β-ガラクトシダーゼ	L	A	O
a	+			+	-	-	-	-	-	-					-	-	-
b	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-				-	-	-	-
c	+			+	-	-	-	-	-	-				-	-		-
d	+			+	-	-	-	-	-	-					-	-	-
e	+		-	+						-	+	-	+	-	-	-	-
f	+			+	-			-	-	-							
	(+)			(3日間)	(3日間)			(3日間)	(3日間)	(3日間)					(2日間)	(2日間)	(2日間)

()：培養時間が2日以上の場合。記載がない場合は培養時間1日以下。

機関eについてはAPI20Eの結果を掲載

赤痢菌病原因子の遺伝子検査：結果を表5に示した。5機関（機関a, b, c, dおよびf）が*ipaH*, *invE*のコンベンショナルPCRを、1機関（機関e）が*ipaH*のリアルタイムPCRを実施した。コンベンショナルPCRを実施した5機関は、試料Aについては*ipaH*陽性かつ*invE*陰性、試料Cについては*ipaH*, *invE*のいずれも陽性と回答した。リアルタイムPCRを実施した1機関は試料Aおよび試料Cについて*ipaH*陽性と回答した。一方、試料Bについては、コンベンショナルPCRを実施した4機関（機関b, c, dおよびf）はいずれの遺伝子も陰性、リアルタイムPCRを実施した1機関（機関e）は*ipaH*陰性と回答したが、機関aでは遺伝子検査を実施しなかった。これは機関aでは試料Bについて生化学性状試験の結果から赤痢菌を否定したことによると考える。なお、実際の検査では生化学性状試験は数日要するため、遺伝子検査と生化学性状試験は同時に実施することが望ましい。

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いる。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、*ipaH*, *invE*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。また、機関eは試料Aが志賀赤痢菌抗血清3型に凝集することから志賀毒素遺伝子（VT）の遺伝子検査（LAMP）を行い、志賀毒素遺伝子が陰性であることを確認していた。志賀毒素を保有するのは志賀赤痢菌の一部（*S. dysenteriae* 1）であり、志賀赤痢菌全ての血清型が志賀毒素を保有しているの

ではないこと、志賀毒素の有無が志賀赤痢菌同定の必須条件ではないことに注意が必要である。

血清型別試験：各機関の血清型別試験の結果を表3に示した。試料Aについては全ての機関が、志賀赤痢菌A多価免疫血清、志賀赤痢菌3型免疫血清に凝集すること、また、大腸菌O124免疫血清にも凝集することも回答した。しかし、5機関は、志賀赤痢菌の性状と一致しなかった生化学性状を根拠として、赤痢菌を否定した。また、1機関はAPI20Eの生化学性状試験による同定から赤痢菌を否定した。

試料Bについては、4機関が赤痢菌免疫血清のいずれにも凝集しなかったと回答し、2機関（機関aおよびc）が血清型別を実施しなかったと回答した。この2機関は、上述したとおり、試料Bが、インドール反応陽性、リジン脱炭酸試験陽性、酢酸ナトリウム陽性、ブドウ糖の代謝によるガスの産生性陽性であること、および遺伝子検査の結果を根拠として、赤痢菌を否定したことによると考える。

試料Cについては全ての機関がフレキシネル赤痢菌B多価免疫血清およびフレキシネル赤痢菌VI免疫血清に凝集することを報告した。また、3機関が、釣菌したコロニーの一部がソネ赤痢菌D多価免疫血清、ソネ赤痢菌II相免疫血清に凝集したと報告した。ソネ赤痢菌II相免疫血清に凝集したコロニーを検出した3機関は①フレキシネル赤痢菌VI免疫血清に凝集するコロニーとソネ赤痢菌II相免疫血清に凝集したコロニーの生化学性状が全て一致していること、②コロニーの生

表6 *S. flexneri* 6と*S. sonnei*の生化学性状の比較

生化学性状	<i>S. flexneri</i> 6	<i>S. sonnei</i>
TSI		
斜面	—	—
高層	+	+
ガス産生	+	—
H ₂ S産生	—	—
LIM		
リジンデカルボキシラーゼ	—	—
インドール	d	—
運動性	—	—
β-ガラクトシダーゼ	—	+
オルニチンデカルボキシラーゼ	—	+
ブドウ糖からのガス産生	d	—

+：90%以上が陽性

-：90%以上が陰性

d：菌株によって異なる

表5 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>
a	陽性	陰性	未実施	未実施	陽性	陽性
b	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性
c	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性
d	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性
e	陽性	未実施	陰性	未実施	陽性	未実施
f	陽性	陰性	陰性	陰性	陽性	陽性

化学性状は *S. flexneri* 6 に一致しており, *S. sonnei* の生化学性状に一致していないこと (表 6) から, これらのコロニーは *S. flexneri* 6 と判定した. また, 1 機関はコロニー形状について R (ラフ) 型と S (スムーズ) 型があり, ソンネ赤痢菌 II 相免疫血清に凝集するコロニーが R 型であることを報告した.

考察: 試料 C で分離されたソンネ赤痢菌 II 相免疫血清に凝集した R 型コロニーの O 抗原遺伝子を確認したところ [1], これらのコロニーは *S. sonnei* の O 抗原合成遺伝子は保有しておらず, *S. flexneri* 6 の O 抗原合成遺伝子を保有していた. これらの結果から, ソンネ赤痢菌 II 相免疫血清に凝集したコロニーは, 試料 C の *S. flexneri* 6 の S-R 変異 (円形, 平滑な S (スムーズ) 型のコロニーから, 不規則性, 粗面, 不均質の R (ラフ) 型のコロニーに変わる変異) で生じた *S. flexneri* 6 の R 型菌であることが判明した. 本株は *S. flexneri* 6 の O 抗原が菌体表面に発現していなかったため, フレキシネル赤痢菌 VI 免疫血清に凝集しなかったと考えられた. 大腸菌や赤痢菌の菌体表面のリポ多糖 (LPS) は細胞外膜に存在するリピド A からコア多糖を介して O 抗原多糖が結合した構造をとっている. しかし R 型では O 抗原合成に関与する遺伝子の変異などで O 抗原多糖が欠損し, 菌体同士の接着 (凝集塊の形成) や培養細胞への接着性が強くなることが知られている. また, 血清学的解析や構造解析などから *S. flexneri* 6 や *S. sonnei* のコアオリゴ糖が同じ R1 タイプであることが報告されている [2]. ソンネ赤痢菌 II 相免疫血清は *S. sonnei* の R 型菌に対する抗血清である. このため, *S. sonnei* の R 型菌と同じ

R1 タイプのコア多糖を有する *S. flexneri* 6 の R 型株がソンネ赤痢菌 II 相免疫血清に交差凝集反応を示したと考えられる.

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 *Escherichia albertii* を正しく否定することができた. 赤痢菌の同定検査においては, 陽性を示す性状検査が少ないため, 抗血清との凝集性を確認する血清学的試験は重要である. しかし, 赤痢菌と大腸菌には共通抗原が存在し, 特に侵入性大腸菌との共通抗原が多いため, しばしば誤同定が生じる. また, 赤痢菌自体も S-R 変異や O 抗原遺伝子の変異で血清型が変化することが報告されている (*S. flexneri* 1-5 など [3]). このため, ある特定の赤痢菌の免疫血清に凝集したことのみでは必ずしもその血清型の赤痢菌と同定することはできない. 血清学的試験から推定される菌種について, 生化学性状の結果等と齟齬がないか確認し, 同定の根拠に必要な性状試験を追加する必要がある. また, 検査の記録についても, どの性状を同定の根拠としたか明記することは重要である. 今回の試料 C の同定試験では, 血清学的試験と生化学性状試験の結果の一貫性を確認することの重要性が再認識された.

文 献

1. Iguchi A, Nishii H, Seto K, et al. (2020). J Clin Microbiol, 58, e01493-20
2. Kubler-Kielb J, Vinogradov E, Mocca C, et al. (2010). Carbohydr Res, 345, 1600-1608
3. 坂崎利一, 田村和満 (1992) 腸内細菌 (下巻), 245-251.