

淋菌 *Neisseria gonorrhoeae*

検査マニュアル

目 次

1. 淋菌感染症の概説	2
2. 淋菌感染検査マニュアル	2
2-1. 直接塗抹検鏡法	2
2-2. 分離培養法	3
1) 使用培地	3
2) 培養法	3
3) 集落形態	3
2-3. 同定法	3
3. 簡易同定キット	4
4. 迅速同定キット	4
5. 菌株の保存方法	4
6. その他の診断法	4
7. 薬剤感受性試験	5
図 検査の進め方	6

使用する培地、基本的な検査手順は髄膜炎菌と同一であり、詳細は本マニュアルの髄膜炎菌 *N. meningitidis* 検査マニュアル（一部 淋菌 *N. gonorrhoeae* を含む）を参照してください。

1. 淋菌感染症の概説

淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*) 感染症は、男性では主に尿道炎を引き起こし、治療せずに経過すると精巣上体炎へと進み、不妊の原因になることがある。女性での主な疾病は子宮頸管炎であり、自覚症状がない場合が多い。放置すると上行性に広がり子宮内膜炎、骨盤内感染に至り、不妊や子宮外妊娠の原因となりうる。更に、腹膜炎、肝周囲炎などの疾病を起こす。また、男女ともに稀に関節炎、播種性淋菌感染症 (DGI : disseminated gonococcal infection) が起きることがある。出産時に新生児の眼部に淋菌が付着して淋菌性眼炎となることもある。

淋菌の感染様式は接触感染で、性行為によって伝播する。性行動の多様化に伴い、咽頭炎や扁桃炎、肛門炎や直腸炎などの原因にもなる。近年では淋菌が咽頭から検出される例が増加している。咽頭に存在する淋菌は自覚症状を欠くことが多く、口腔性交を介した隠れた感染源となる。従って、近年咽頭検体を用いた検査の重要性が増してきている。

検査としては、淋菌の核酸を標的とした検査が培養法よりも高感度であるため、各種の核酸検査キットが導入されている。しかしながら、薬剤耐性淋菌が世界的に蔓延しており菌株の分離同定を行い、薬剤感受性試験を実施する体制も重要である。

2. 淋菌感染検査マニュアル

淋菌が検出される材料としては、急性尿道炎の膿尿、および分泌液、慢性患者では前立腺分泌物、前立腺マッサージ後の排泄尿、膣分泌液などで、DGI の疑いでは血液（特に皮疹からの採取）、膝関節液、咽頭粘液、直腸粘液からも分離検出されることもあり、本菌の感染を念頭に置いて検査を進める。また淋菌は非常に死滅しやすい菌であるため、検出率は検体採取から分離培養までの保存法によって大きく左右される。出来るだけ速やかに分離培養を実施することと、保存する場合には専用の採取用スワブ〔輸送培地：チャコール加 Amies 培地および Stuart 培地を基礎としたトランスワブ（イワキ社）、カルチャー スワブ プラス（BD 社）、シードスワブ γ2 号（栄研）〕を用い室温で保存し、5～12 時間以内に培地に接種する。

2-1. 直接塗抹検鏡法

感染局所の分泌物または初尿沈渣標本では、多数の好中球炎症反応と共に好中球細胞質内に貪食されたグラム陰性の双球菌が認められた場合、本菌の感染を強く推定できる。髄膜炎菌性の尿道炎も稀ではあるが存在することも念頭に置きつつ、同定検査を進めていく必要がある。子宮頸管炎などの頸管粘液および膣分泌液では雑菌が多くグラム染色所見だけでは診断は困難である。DGI 症例での皮疹穿刺で得た血液成分のグラム染色所見は、極めて診断的価値が高い。

なお、グラム染色の後染色にピオフィェル液を使用することを推奨する。またレフレルのメチレンブルー単染色法でも容易に診断できるが、尿道炎のうちの非淋菌性、非クラミジア性のもは全体の約 1/3

を占め、その中に少数ながら表皮ブドウ球菌性の場合が存在するため、可能な限りグラム染色を行う。

2-2. 分離培養法

1) 使用培地

淋菌は他の一般細菌と比較して抵抗力が弱く、かつ増殖力も弱いため、検体採取後直ちに分離培養を行う。分離培地には非選択培地としてチョコレート寒天培地〔ヘモグロビン、アイソバイタルエックス (BD社、オキシド) 添加〕、ゴノコッカス寒天培地 (GC)、選択培地として変法サイアー・マーチン寒天培地 (MTM)、ニューヨークシティー寒天培地 (NYC) などがあるが *N. gonorrhoeae* (淋菌) の一部には選択培地で発育抑制される菌種があるので、必ずチョコレート寒天培地を併用する。MTM 培地は、選択剤としてバンコマイシン、コリスチン、ナスタチンさらにトリメトプリムを添加、*Proteus* のスウォーミング (遊走) を抑制し臨床材料からの検出を有意に向上させることが出来る。また、極東ナイセリア培地は、選択剤としてバンコマイシン、コリスチン、リンコマイシン、アムホテリシン B トリメトプリムが添加されており、*N. gonorrhoeae*、*N. meningitidis*、*N. lactamica* 以外の菌の発育を強く抑制することが出来る。更にこの培地は炭酸ガス培養を必要とせず、単にふ卵器 (36℃前後) に入れることにより本菌の簡易培養を可能にしている。淋菌は取り扱いが難しく採取から培養実施まで注意して取り扱うこと。

2) 培養法

培養法にはロウソク培養、炭酸ガス培養器、ガスパックジャー・システムがあるが、通常は炭酸ガス培養器を使用されており、培養条件は5～10%の炭酸ガス環境下で35～36℃、24～48時間培養を行う。施設によって炭酸ガス培養器を用いないコンパクトなガスパックジャー・システム(アネロパック・CO₂)もしくは少量の場合は、密封式ビニール袋とCO₂ generator (BD Bio-Bag TypeC)を併用した方法が便利である。ロウソク培養法は他法に比べ発育支持力が落ちる。至適培養温度は35～36℃で、37.5℃以上になると淋菌の増殖は抑制されるため注意する。

2-3. 同定法

分離培養後18～24時間後に必ず観察する。単独集落の形成を認めたら、グラム染色およびオキシダーゼ試験陽性を確認後チョコレート寒天培地もしくはGC寒天培地に純培養する。培養時間が長くなると集落が変化し、死滅する場合がある。

分離増菌された淋菌の同定は主に生化学的性状により行われ、グラム陰性双球菌、MTM培地発育およびオキシダーゼ反応陽性を確認した後、糖分解試験により行う。淋菌はグルコースのみを分解することで他のナイセリアと鑑別が可能である (表)。

オキシダーゼ反応試験は新鮮な 1.0% dimethyl-p-phenylenediamine hydrochloride 水溶液 (tetramethyl 誘導体でも良い) を少量疑わしい集落に滴下、陽性菌では数分以内に桃色を呈し、さらに時間がたつと黒色となる。集落が黒色になると菌が死滅するので類似集落または桃色のうちに釣菌、純培養を行う。

糖分解試験は Cystine Trypticase 半流動培地 (CTA 培地 : BBL、日水) に各糖類を 0.5～1.0%にな

るよう無菌的に添加、これに被検菌を多めに穿刺接種、判定は大気中で35℃、24～48時間後に行う。淋菌はブドウ糖のみを酸化的分解し、酸の産生により培地表面から下方に約1 cm位まで黄変する。培地全体に黄変する場合は汚染を疑い、純培養の確認を行う。

3. 簡易同定キット

① BBL CRYSTAL N/H 同定キット (BD) :

Neisseria spp.、*Haemophilus* spp.、*Moraxella* spp.などの同定が可能で、新鮮培養菌のMcFarland No.3に調整した菌液をキットに接種、35～37℃、4時間培養後、判定する。菌種名の同定は各性状を数値化されコンピューター・コード番号で検索が出来る。

② IDテスト・HN-20ラピッド (日水) :

McFarland No.4に調整した菌液を使用し、35～37℃で1～1.5時間培養後、試薬を添加し、性状判定コード番号により *Neisseria* spp.、*Haemophilus* spp.、*Moraxella* spp.の同定が可能である。

③ アピNH (シスメックス・ビオメリュー) :

McFarland No.4に調整した菌液を使用し、34～38℃、2～2¼時間培養後、試薬を添加し、プロファイル番号により *Neisseria* spp.、*Haemophilus* spp.、*Moraxella* spp.の同定が可能である。

4. 迅速同定キット

ゴノチェッカーIIキット (コスモバイオ)

本キットは、病原性ナイセリア属の有する酵素活性パターンの差を発色性基質の色の違いとして発現させることにより、菌種の鑑別を行う。*N. gonorrhoeae*のほか *N. meningitidis*、*N. lactamica*、*M. catarrhalis* の同定が可能で、グラム陰性球菌、オキシダーゼ陽性、MTMに発育が確認された純培養菌を使用する。

5. 菌株の保存方法

髄膜炎菌や淋菌は長時間培養すると自己融解が始まるため、保存するには出来るだけ短い培養時間で培養した菌を用いる。大量の菌を保存する目的で培養時間を長くすると逆に生存菌の数が減る。チョコレート寒天培地あるいは血液寒天培地のように血液成分が加えられて栄養分の豊富な培地では自己融解が早いので、培養時間を短くするか、淋菌ではKellogg培地を使用することで保存が容易になる。ゼラチン・ディスク法、20%グリセリン加HIを用いた凍結保存法等があり詳細は髄膜炎菌の項を参照されたい。

6. その他の診断法

核酸レベルの診断法が開発され、迅速診断法として利用されている。核酸を対象とした検査法は少数の菌体の検出が可能で、これにより信頼性の高い診断を行うことが可能となった。現在市販の診断用キットにはハイブリダイゼーション法および核酸増幅法を用いたものがある。専用の機器を整備する必要

があり一般検査会社への依頼が必要である。

7. 薬剤感受性試験

E テスト（シスメックス・ビオメリュー）、またはディスク法（栄研、BD 社）を用いるのが簡便である。E テストでは、MIC の測定も可能である。

国立感染症研究所 担当者

大西真：細菌第一部部長 第五室長兼任

志牟田 健：細菌第一部 第五室

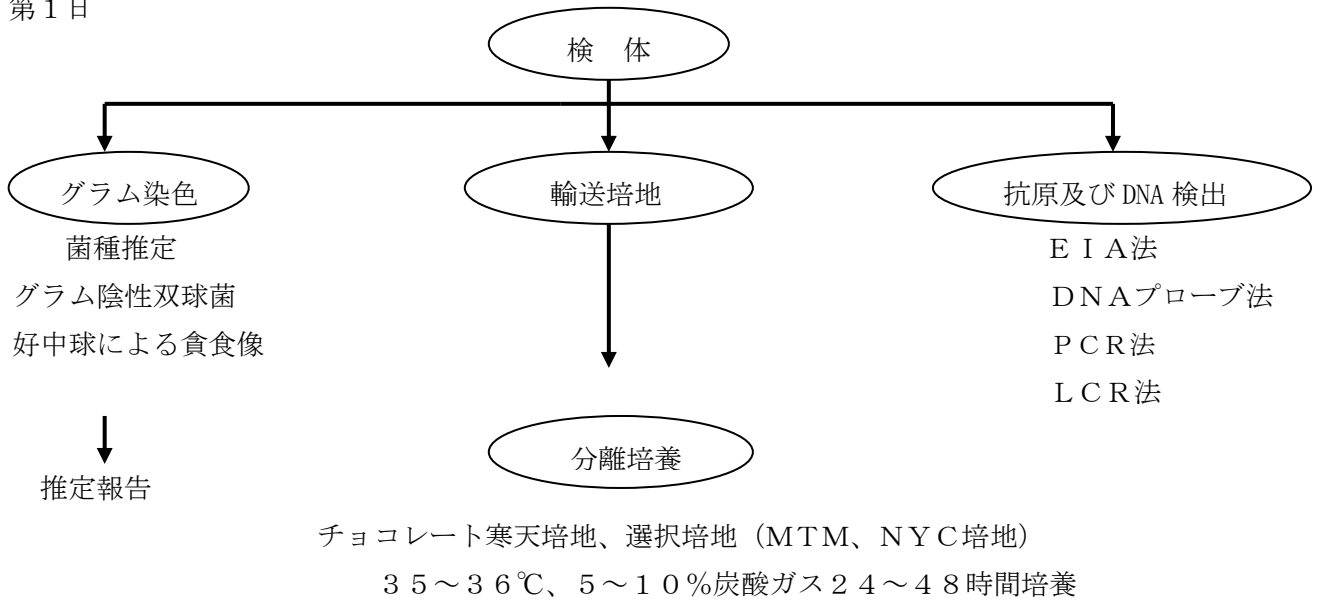
表 *N. gonorrhoeae* と類似菌の鑑別性状

性状	オキシダーゼ [°]	カタラーゼ [°]	グルコース	サッカロース	ラクトース	マルトース	硝酸塩還元	MTM 発育
<i>N. gonorrhoeae</i>	+	+	+	—	—	—	—	+
<i>N. meningitidis</i>	+	+	+	—	—	+	—	+
<i>N. lactamica</i>	+	+	+	—	+	+	—	+
<i>N. mucosa</i>	+	+	+	+	—	+	+	—
<i>N. elongata</i>	d	+	d	—	—	—	—	—

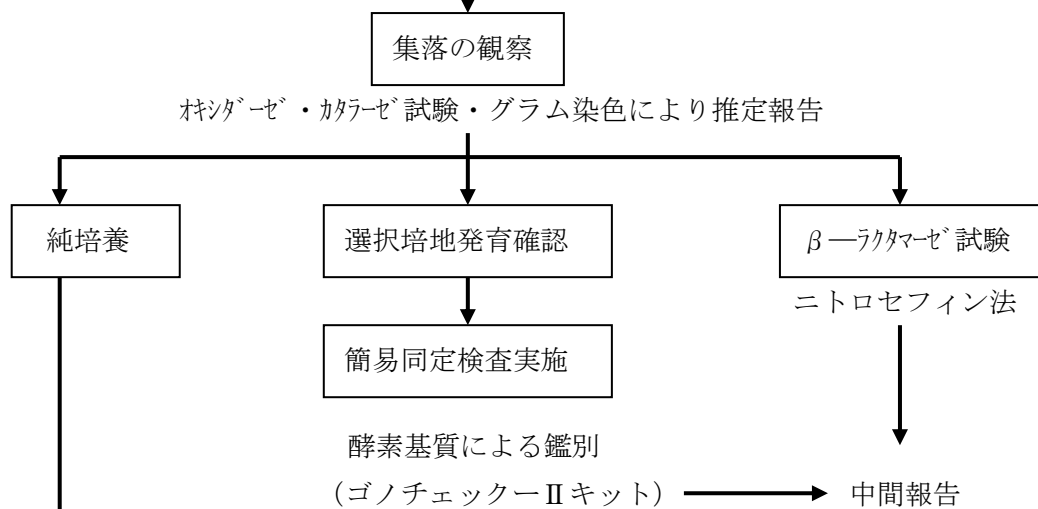
＋：菌株中 85～100%陽性、d：菌株中 16～84%陽性、—：菌株中 0～15%陽性

図 検査の進め方

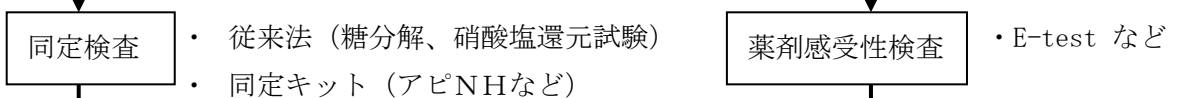
第1日



第2日



第3日



第4日

最終報告