

病原体検査マニュアル

腸チフス・パラチフス

I. 概説

II. 検査

1. 作業上の一般的注意
2. 分離培地および増菌培地
 - ① 分離培地
 - ② 増菌培地
3. 検査材料および検査方法
 - ① ヒトの検査材料の採取および検査方法
 - ② 食品の検査方法
 - ③ 水系材料の検査方法
4. 同定法
 - ① 分離培地上の集落の特徴
 - ② TSI寒天培地とLIM培地の性状
 - ③ 血清型別
 - ④ その他の性状試験
5. フェージ型別

III. 参考文献

IV. 執筆者一覧

I. 概説

ここで述べる検査法は主に原発的にチフス症の原因となる数種のサルモネラ、とくに*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi（チフス菌）、*Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Paratyphi A（パラチフスA菌）に限定する。

チフス菌、パラチフスA菌はヒトを固有宿主とし、原則として動物からは分離されない。これらの菌は、同定のための生化学的性状が一般のサルモネラのそれとはかなり異なるため、通常のサルモネラ食中毒の検査法では見逃される恐れがある。また、腸チフス、パラチフスは「感染症の予防および感染症の患者に対する医療に関する法律」の改正（平成19年）により、3類感染症に位置付けられている。また、同改正によりチフス菌、パラチフスA菌は四種病原体に位置づけられている。さらに、食品衛生法（平成12年12月28日改正）においては、チフス菌、パラチフスA菌を細菌性食中毒の病因物質として取扱うことが通達されている。したがって食中毒発生時には、チフス菌、パラチフスA菌も考慮して原因菌の分離を行わなくてはならない。

チフス症は、通常10-14日の潜伏期の後に発熱で発症する。第1病期には段階的に体温が上昇し39-40℃に達し、さらに典型的な症例では、三主徴である徐脈、バラ疹、脾腫が出現する。近年は、三主徴の出現頻度は低く発熱と同期に下痢を伴う症例が多い。第2病期は極期であり、40℃台の稽留熱（最高38℃以上、日内差1℃以内）、下痢または便秘を呈する。なお、第1病期、第2病期の発熱は4-6日間持続する。第3病期には弛張熱を呈することが多く、その後徐々に解熱する。また腸出血をきたし易い病期であり、腸穿孔を起こすことがある。第4病期には、解熱し、回復に向かう。

チフス症の細菌学的検査材料は、病期の第1病期は血液から高率に菌が検出される。第2,3病期では血液培養、便培養ともに菌の検出率はもっとも高い。第4病期では血液中に菌は証明されないが、便中には排菌がみられる。骨髄中にはほとんどの場合全経過を通して菌が証明される。また、菌は尿中にも排泄されるので大便と同様に菌の検出を行う。胆汁にもしばしば菌が証明できるので必要に応じて検査材料とする。回復期に入っても菌はなお数週間ないし数ヶ月にわたって便・尿から排出されることもあり、時には永久保菌者となる。不顕性感染者を含めて保菌者の検査には便、尿及び胆汁等を検査材料とする。

わが国では、かつてチフス症の感染源の大半は国内保菌者であったが、現在は主に輸入感染症である。海外からの帰国・入国者で不明熱発症者では血液を検査材料とすることがチフス菌・パラチフスA菌の速やかな検出につながる。

以下に述べる検査法の基本的事項は、すでに（財）日本公衆衛生協会出版の「微生物検査必携細菌・真菌検査」に詳述されており、そちらも参照されたい。

II. 検査 (図1)

1. 作業上の一般的注意

チフス菌、パラチフスA菌はバイオセーフティレベル (BSL) 3に属するため、それに適合した実験施設内での取り扱いが必要である。しかし、患者又は疑わしい患者由来の検査材料を検査するときには、菌種が同定されるまではBSL2の施設を備えた細菌検査室で行うことができる。

2. 分離培地および増菌培地

① 分離培地

選択分離培地として亜硫酸ビスマス寒天培地、SS寒天培地、DHL寒天培地、酵素基質培地（クロモアガーサルモネラ寒天培地）を、非選択分離培地として血液寒天培地を用いる。

各選択分離培地の優劣は一概にいけないがチフス菌に対しては亜硫酸ビスマス寒天培地がもっとも高い検出率を示す。しかし、パラチフスA菌は、この培地では後述するようなサルモネラの特徴的な集落を作らないので大腸菌等として見逃される可能性が非常に大きいため、SS寒天培地、DHL寒天培地またはクロモアガーサルモネラ寒天培地を併用すべきである。クロモアガーサルモネラ寒天培地はサルモネラ等に特異的な発色をする酵素基質培地であり、他菌種との鑑別が容易である。

② 増菌培地

セレナイトーマンニット培地、セレナイトーシスチン培地、血液培養用ブイヨン。前者二つは選択増菌培地で、他菌の混入が著しい検査材料、たとえば糞便などからの増菌の際に用いる。他のサルモネラ増菌培地よりもチフス症系サルモネラをよく増殖させる。

3. 検査材料の採取および検査方法

① ヒトの検査材料の採取および検査方法

1) 血液

一般的には患者血液は10mlを正中静脈から無菌的に採取する。発病初期には、1日4回までの範囲で頻回行くと検出率が高くなる。血液からの直接分離培養は通常行わない。

採取した血液を、市販の血液培養セットに加えて37°Cで増菌培養する。市販の血液培養用ブイヨンはポリアネトール硫酸ナトリウムあるいはアミロ硫酸ナトリウムが添加されている。これらの物質は抗血液凝固作用、補体不活化作用のほか、ある種の抗生物質の作用も不活化するので菌の発育を促進する。他の培地としてはチオグリ

コレート酸塩培地、コロンビア・ブイヨンが勧められる。血液にクエン酸ナトリウムが加えられていないときは培地にあらかじめ0.1%を加えておく。菌の発育が認められない場合でも7日間培養を続け、毎日分離培地に塗抹する。自動機器を使用する場合はマニュアルに従う。分離培地は血液寒天、DHL寒天等を用い、分離培地上の疑わしい集落をTSI寒天培地とLIM培地に釣菌して同定する。

2) 糞便

できるだけ新鮮なものを採取し、その場で培養に供するものがもっともよいが、それができないときは、適当な容器に拇指頭大以上の大きさを採取し1-2 時間以内に検査に供する。大便の輸送を要するとき、または、短時間に検査できないときは、綿棒で採取してCary-Blair 培地で保存する。

培養は直接分離培養と増菌培養を行う。

【直接分離培養】白金耳で直接又は約1g (1ml) を滅菌生食あるいはブイヨン約10ml に均等に浮遊させ、その1～数白金耳を平板に塗抹する。Cary-Blair 培地で保存された綿材料は生理食塩水またはブイヨン1ml 中でよくしぼりだし、その1～数白金耳を塗抹する。

【増菌培養】約1g(1ml)の便をセレナイト培地12～15mLに接種し、37°Cで12～18時間培養する。セレナイト培地は溶存酸素が選択性を弱めることから、培地液高が6cm以上必要である。また、添加する亜セレン酸ナトリウムは毒性が強いため取り扱いに注意しなければならない。

分離培地は直接分離培養、増菌培養後ともに選択性の強い培地(SS寒天培地または亜硫酸ビスマス寒天培地)と、選択性の弱い培地(DHL寒天培地、XLD寒天培地、クロモアガーサルモネラ寒天培地等)を用い、分離培地上の疑わしい集落をTSI寒天培地とLIM培地に釣菌して同定する。

3) 尿

新鮮な中間尿、またはカテーテルで採取した尿の40～50mLを3,000rpm、30分遠心した沈渣から1～数白金耳を塗抹して直接分離培養するほか、セレナイト培地で増菌培養する。採取後直ちに検査できないときは氷冷する。

4) 胆汁

早朝空腹時にゾンデで採取し、培養まで37°Cで保温しておき、直接分離培養と増菌培養を糞便の方法に準じて行う。

5) その他のヒト由来の材料

患者もしくは保菌者の胆石、膿汁、内臓の膿瘍、死亡した患者からの臓

器や腸内容物などが検査材料となることがある。固形物(臓器など)は無菌的に一片を採取、磨砕する。これらも糞便の方法に準じて培養する。

② 食品の検査方法

食中毒の原因と推定された食品からチフス菌、パラチフスA菌が分離された事例はなく、食品からの検査法は確立されていない。一般のサルモネラ検査法と同様に前培養を緩衝ペプトン水で行い、選択増菌培養にセレナイト培地を使用する方法が提案されている。

③ 水系材料の検査方法

飲料水は1~10Lを0.45 μ mのメンブレンフィルターで濾過し、フィルターを増菌培地に入れて培養する。排水など夾雑物が多い検体は、あらかじめ滅菌ガーゼまたは0.6 μ mのメンブレンフィルターで濾過後、0.45 μ mのメンブレンフィルターで濾過する。いずれも前培養方法は通常のコレラ分離法に準じ、増菌培養はセレナイト培地で行う。

4. 同定法

分離培地上にチフス菌、パラチフスA菌を疑わせる集落が生じたら、できるだけ多く(5個以上)の集落をとって同定検査を行う。被検菌がチフス菌・パラチフスA菌であることの決定は生化学的性状試験と血清型別試験により行う。

① 分離培地上の集落の特徴

- 1) 亜硫酸ビスマス寒天培地：チフス菌は黒色集落を作るが大腸菌および*Proteus*は無色ないし中心部暗色、緑色又は褐色の集落を作る。チフス菌の黒色集落は24時間後ますます黒色度を増し時には周辺集落の培地まで黒色化し金属光沢のある輪で囲まれる。ただし、多くのパラチフスA菌、*S. Sendai*のような硫化水素非産生性のサルモネラ集落は大腸菌のそれと鑑別しにくい。本培地の培養時間は48時間である。
- 2) SS寒天培地：大腸菌(乳糖分解菌)はレンガ色の混濁集落を、チフス菌、パラチフスA菌は無色透明の集落を作る。一般のサルモネラ集落は中心部暗色で(硫化水素産生による)、時間の経過とともに黒色となる。*Citrobacter freundii*も類似した黒色集落を作る。
- 3) DHL寒天培地：乳糖および白糖分解菌はレンガ色の混濁集落を作りかつ*Citrobacter freundii*では集落が強く黒色となる。これらに対し、チフス菌の集落はやや小さく無色または中心部のみが黒色で半透明である。パラチフスA菌は硫化水素非産生のため無色の集落を作る。
- 4) クロモアガーサルモネラ寒天培地：チフス菌、パラチフスA菌を含めサルモネラは均質で明るい紫(いわゆる藤色)の集落を作る。中心部

のみが暗紫色の集落はサルモネラではない。大腸菌および
Citrobacter freundii は青い集落、*Proteus* は白い集落を作る。

《分離培養上の注意事項》

分離培地、とくに選択分離培地は表面を適度に乾燥させて使用する。ただし、選択分離培地では、必要以上の乾燥によって菌に対する発育阻止作用が強まるので留意しなくてはならない。自家製の亜硫酸ビスマス寒天培地は抑制が強いため作製当日のものは使用してはならない。

② TSI寒天培地とLIM培地における性状(表1)

【チフス菌】

TSI寒天培地: 斜面がアルカリ性の赤色、高層部が酸性の黄色を示し、ガス産生がみられず、硫化水素産生による黒色が斜面と高層部の境界部にわずかに認められる。硫化水素産生性が認められない場合もある。

LIM培地: リジン脱炭酸陽性の紫色を示し、インドール陰性で、運動性がみられる。運動性が弱い場合や、認められない場合もある。

【パラチフスA菌】

TSI寒天培地: 斜面がアルカリ性の赤色、高層部が酸性の黄色を示し、ガス産生がみられる。硫化水素産生は通常は陰性であるが、陽性の非定型的性状を示す菌株もある。

LIM培地: リジン脱炭酸陰性の黄色を示し、インドール陰性で、運動性がみられる。

③ 血清型別試験

チフス菌、パラチフスA菌の血清型別のためにVi血清、O9群血清およびH-d血清、ならびにO2群血清およびH-a血清を、それぞれ準備する。これらの診断用血清は市販のものを利用する。(なお、チフス菌、パラチフスA菌とも通常H抗原のII相は有していない。II相の確認については上記微生物検査必携を参照のこと。)

【チフス菌】

O抗原、Vi抗原: TSI寒天培地の斜面部または普通寒天培地等の非選択培地上の菌を用いてスライド凝集試験を行う。まず、培地上の新鮮な生菌を釣菌しスライドガラス状で血清と混合させ、Vi血清とO9群血清の凝集をみる。通常患者からの菌株ではVi血清に凝集し、O9群血清は弱く凝集するか凝集しない(V型菌)。ときにはVi血清に凝集せず、O9群血清にのみ凝集する場合もある(W型菌)。V型菌のときには加熱死菌での凝集をみる。生理食塩水約1mLに菌を濃厚に浮遊させ、オートクレーブで121℃、15分、または100℃で30分間加熱した後、3,000rpm、30分間遠心する。得られる沈渣を

生理食塩水に再浮遊させ、これを抗原液としてスライド凝集試験に使用する。菌体表面のVi抗原は加熱によって菌体から遊離するため、加熱死菌はVi血清に凝集せず、O9群血清に強く凝集する。

H抗原:試験管内凝集試験で行う。

1) 抗原はトリプトソイブイオンで37°C、8時間～一晩静置培養したものに、1%ホルマリン加生理食塩水を等量加えて調製する。菌を死滅させるために37°Cで30分以上置いてから使用する。チフス菌は他のサルモネラに比べて運動性が弱い場合が多く、クレイギー管を通過させて運動性を強化すると良い抗原液が得られる。

2) 試験は規定量のH-d血清(通常2-3滴)を小試験管にとり、上記抗原液を0.5mL加えてよく混和した後、50°Cの温浴槽中に1時間、または37°Cで2時間静置して綿状の凝集塊の有無を肉眼で判定する。凝集塊は試験管を振るとこわれるので、振らずに判定する。

3) チフス菌は通常H-d血清に凝集するが、H抗原がz₆₆またはjである場合があり、その場合はH-d血清に凝集しない。

【パラチフスA菌】

O抗原:TSI寒天培地の斜面部または普通寒天培地等の非選択培地上の菌を用いてスライド凝集試験でO2群血清への凝集をみる。

H抗原:試験管内凝集試験でH-a血清への凝集をみる。

④ その他の性状試験

TSI、LIM培地以外に確認すべき生化学的性状およびその試験に必要な培地または試薬は次の通りである。

- 1) クエン酸利用性* : Simmons クエン酸寒天培地
- 2) ズルシット発酵性 : 糖分解用基礎培地+1%ズルシット
- 3) アラビノース発酵性 : 糖分解用基礎培地+1%アラビノース
- 4) キシロース発酵性 : 糖分解用基礎培地+1%キシロース
- 5) マロン酸利用性 : マロン酸塩培地
- 6) オルニチンデカルボキシラーゼ : オルニチン脱炭酸テスト用培地
- 7) d-酒石酸発酵性 : 変法K-P培
- 8) ONPG : ONPGディスク

(*実際には、Simmonsクエン酸培地にて、チフス菌が陰性を示すのは、チフス菌が当該培地中のアンモニウム塩からトリプトファンを合成できないためであり、クエン酸利用能がないためではない)

これらの培地の代わりに市販の同定キットを使用してもよいが、キットによってはこれらの鑑別試験が組み込まれてないものがあり、判定の結果、同定確率の低いものは追加試験を行わなければならない。自動同

定機を使用した場合も同様である。表2 を参考に鑑別する。このほか、VP反応試験、並びに、普通寒天培地上の菌を用いたオキシダーゼ試験を行い、それぞれ陰性を確認する。

5. ファージ型別

わが国では「腸チフス防疫対策実施要綱」（昭和41年11月、衛発788号、「腸チフス対策の推進について」）に基づいて感染経路等の疫学解析と患者の把握のために、日本国内で分離されたチフス菌、パラチフスA菌は国立感染症研究所細菌第一部に送付することとされている。国立感染症研究所細菌第一部では、送付された菌のファージ型別を行い、疫学情報としてファージ型別の結果を整理し各地方衛生研究所、保健所に情報を提供している。

III. 参考文献

1. 坂崎利一、田村和満：チフス性疾患—チフス・パラチフス菌、微生物検査必携細菌真菌検査 第2版、日本公衆衛生協会、120-139、1978.
2. 中村明子：チフス菌、パラチフス菌 微生物検査必携 細菌真菌検査 第3版、日本公衆衛生協会、E2-E19、1987.
3. 坂崎利一、吉崎悦郎、三木寛司：新培地学講座 第2版、近代出版、1988.
4. 依田清江、内村眞佐子：食品中の微生物検査法と食中毒発生時の疫学調査法 16 チフス菌・パラチフスA菌、防菌防黴誌、35: 609-619, 2007.
5. 依田清江：便からのチフス菌およびパラチフスA菌の検出法、検査と技術、37:253-258, 2009.
6. 田口真澄、泉谷秀昌：食品由来感染症と食品微生物、中央法規出版、154-191, 2009.

IV. 執筆者一覧

三重県保健環境研究所 岩出義人

千葉県衛生研究所 依田清江

大阪府公衆衛生研究所 田口真澄

福岡県保健環境研究所 村上光一

東京都健康安全研究センター 尾畑浩魅

国立感染症研究所細菌第一部 泉谷秀昌

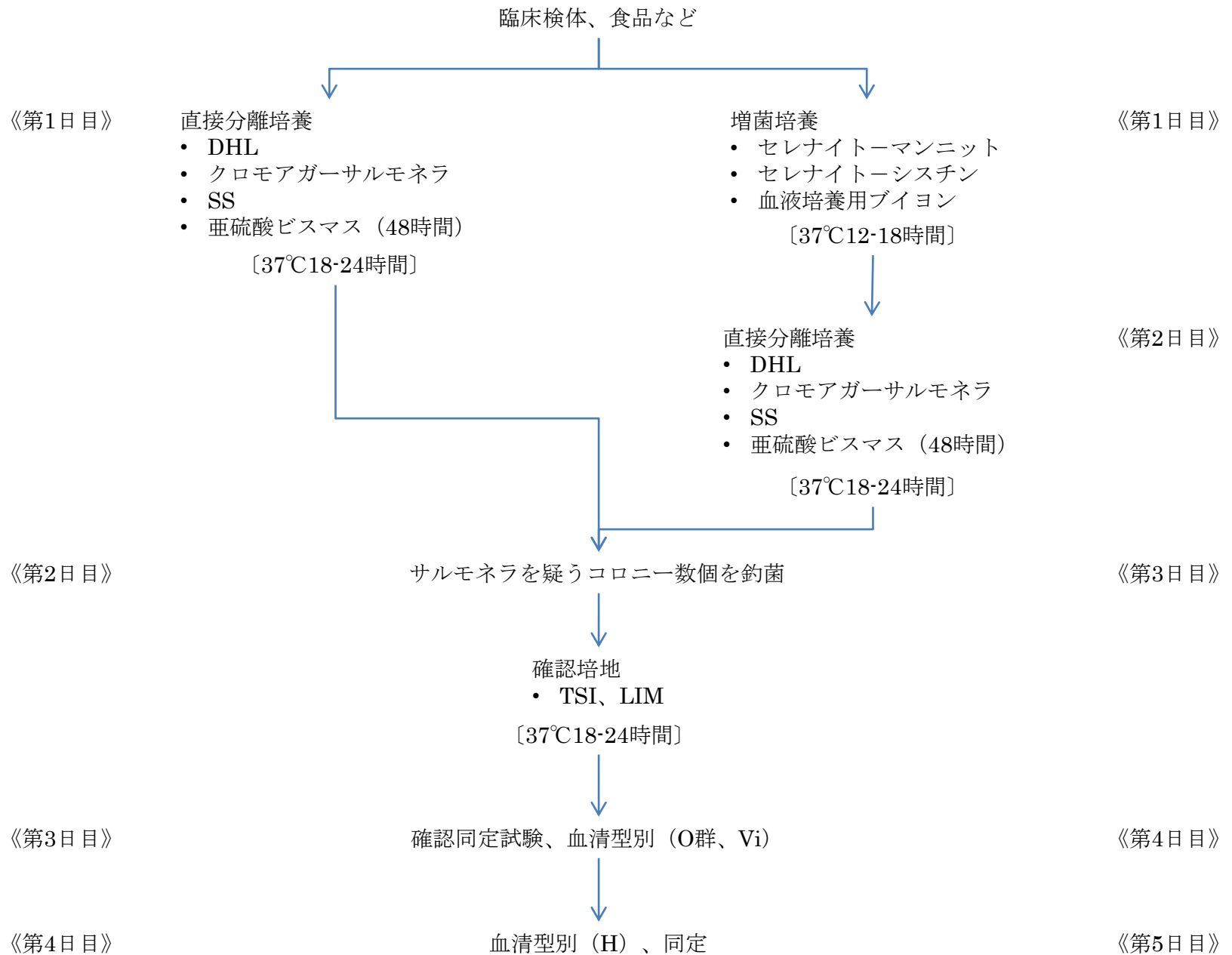


図1 チフス性サルモネラ同定の手順

表1 サルモネラと類似菌の鑑別性状

	TSI				LIM		
	斜面	高層	ガス	硫化水素	リジン	インドール	運動性
チフス菌	-	A	-	+w or -	+	-	+
パラチフスA菌	-	A	+	- or (+w)	-	-	+
その他のサルモネラ	-	A	+	+	+	-	+
<i>Citrobacter freundii</i>	A or -	A	+	+	-	-	+
<i>Edwardsiella tarda</i>	-	A	+	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	-	A	+	+	-	-	+

A、酸産生； -、90%以上陰性； +、90%以上陽性
 +w、弱い反応； ()まれな反応

表2 チフス菌、パラチフスA菌およびその他のサルモネラの性状

性状		チフス菌	パラチフスA菌	<i>S. Sendai</i>	その他のサルモネラ
TSI、LIM	硫化水素産生	+w or -	- or (+w)	-	+
	ブドウ糖からのガス産生	-	+ or (-)	+	+
	リジンデカルボキシラーゼ	+	- (+)	d	+
	運動性	+	+	+	+
	インドール	-	-	-	-
その他の性状	クエン酸塩 (Simmons)	-	-	-	+
	ズルシット	+	+	+	d
	アラビノース	-	+	+	+
	キシロース	d	-	[+]	+
	マロン酸塩	-	-	-	d
	オルニチンデカルボキシラーゼ	-	+	+	+
	d-酒石酸塩	+	-	-	+
	ONPG	-	-	-	d
血清型別	O群別	O2	+	-	
		O9	- or +	-	+
		Vi	+ or -	-	-
	H型別	H-a	-	+	+
		H-d	+	-	-
抗原構造		9,12,[Vi]:d:-	1,2,12:a:-	1,9,12:a:1,5	

+w、弱い反応；（ ）、まれな反応；d、菌株により異なる
 [+],遅れて陽性