



腸管感染症検査の進歩

こまつ まさる
小松 方
Masaru KOMATSU

I. 腸管感染症検査法の変遷

腸管感染症は細菌、ウイルス、および寄生虫によって引き起こされる。主訴は腹痛、下痢、嘔吐、発熱などであり、時に敗血症や溶血性尿毒症症候群に進展し死亡するケースも存在する。現在、病院検査室や登録衛生検査所における腸管感染症検査は、細菌の検出を目的とした場合は、糞便を用いた分離培養・同定法が主として実施されている。ウイルスは核酸増幅法や免疫拡散法が普及したことで、検出率が格段に向上している。寄生虫は形態学的検査が今もなお主流な検査法であるが、一部においては核酸増幅法も適応されている。

1876年、ドイツの細菌学者であるロベルト・コッホ (Robert Koch) は炭疽菌の純培養に成功し、炭疽の病原体であることを証明した。1881年にはロンドンで開催された国際学会において、現在の寒天平板を用いた分離培養法の礎である平板培養法を供覧、1883年にはインドでコレラ菌を発見した。以来数十年にわたり、多くの研究者により寒天平板を用いた細菌の分離培養法が研究された。1965年、Taylorらにより報告されたキシロース-リジン寒天: XL (Xylose-Lysine) 寒天は、赤痢菌 (*Shigella*) やサルモネラ (*Salmonella*) の集落と他の腸内細菌科細菌の集落を色調による違いで区別する画期的な培地であった。本培地が報告されてから早60年が経過しようとしているが、今なおこの検出原理は様々な病原細菌の分離培地に応用されている。近年、CHROM agar™ のように合成発色基質を添加した培地も利用

され、様々な種類の色を集落に着色させる培地も広く利用されつつある。一方、これまで同定検査のために、小試験管培地に充填した様々な生化学的性状試験は、自動分析器の普及により、マイクロプレートやカード内で数十種類の性状を一度に検査する事が可能となった。現在、この同定検査は MALDI-TOF MS を原理とした同定検査に置き換わりつつある。さらに、免疫拡散法や遺伝子検査法も導入され、細菌の病原因子やウイルスの抗原や核酸を迅速に検出することが可能となった。

わが国においては、日本臨床微生物学会が「腸管感染症検査ガイドライン」の初版を2010年に刊行、2021年には第2版が刊行され、表1に示す病原微生物の検査法が掲載された¹⁾。このガイドラインが

表1 腸管感染症検査ガイドライン第2版に記載されている感染症 (病原体)

細菌性腸管感染症	
サルモネラ	<i>Listeria monocytogenes</i>
赤痢菌	ウェルシュ菌
下痢原性大腸菌	ボツリヌス菌
エルシニア	<i>Providencia alcalifaciens</i>
カンピロバクター	<i>Klebsiella oxytoca</i>
<i>Vibrio</i> 属	<i>Brachyspira</i> 属
<i>Aeromonas</i> 属	抗菌薬関連下痢症
<i>Plesiomonas</i> 属	腸結核
黄色ブドウ球菌	<i>Helicobacter pylori</i>
セレウス菌	
ウイルス性腸管感染症	
ノロウイルス	A型肝炎ウイルス
ロタウイルス	E型肝炎ウイルス
アデノウイルス	
その他のウイルス (サポウイルス、アストロウイルス等)	
寄生虫性腸管感染症	
原虫性腸管感染症	蠕虫性腸管感染症

(文献1)を参考に作成)

わが国の臨床微生物検査室における腸管感染症検査法の最新版である。

II. 腸管感染症原因細菌検出のための分離培地開発の変遷

1965年、Taylorにより報告されたXL寒天培地は、培地中にキシロースとL-リジンを含有している培地であり、分離を目的とする集落性状に一定の特徴を持たせる選択分離培地として注目された。その反応原理は、腸管内常在性の多くの腸内細菌科細菌がキシロースを発酵し、培地上では酸性集落（黄色）を形成するが、*Shigella*はこれを発酵せずにアルカリ性集落（赤色）を形成する。本培地に含まれる乳糖や白糖の両者が非分解である腸内細菌科細菌は、*Shigella*と同一のアルカリ性集落を形成するが、キシロースの添加によって*Shigella*との鑑別がより行いやすくなる。さらに、本培地にはチオ硫酸塩とクエン酸鉄アンモニウムが含まれているため、*Salmonella*や*Citrobacter*のような硫化水素産生菌は集落の色調が硫化鉄の生成により黒色化する。これら両者は、キシロースを分解するため集落上では理論上区別することができないが、*Salmonella*はリジンを脱炭酸により分解するため、その生成物である強アルカリ性のカダペリン（アミン系物質）が、キシロース分解により産生された酸を中和することから、結果的にアルカリ性集落（赤色で中心部黒色）を形成し、リジンを分解しない*Citrobacter*（黄色で中心部黒色）と区別することが可能となる。このように、XL寒天培地は複数の生化学的性状を同時に確認することができるが、さらにデオキシコール酸塩を添加することにより*Escherichia coli*などの腸管内常在性の腸内細菌科細菌の発育を抑止し、高効率に*Shigella*や*Salmonella*の集落検索を行えるXLD寒天培地として改良された。XLD寒天培地で使用されているデオキシコール酸塩は、現在多くの検査室で使用されているマッコンキー寒天培地、DHL寒天培地、SS寒天培地、TSBS寒天培地等にも含有している。

一方、抗菌薬を選択剤として添加している分離培地を使用する代表的な細菌に*Campylobacter jejuni*が挙げられる。*C. jejuni*は酸素分圧が5%程度の環境下で発育する感染性腸炎の原因細菌であるが、分離培養法はButzlerらにより1973年に報告された。

その後、1977年のSkirrowらの報告以降、基礎培地は肉エキスを含むブルセラ寒天、発育支持性を高めるために血液あるいは溶血液の添加、選択剤は抗菌薬であるトリメトプリム、バンコマイシン、ポリミキシンBが添加され、これが現在検査室で使用されているSkirrow寒天培地の組成となった。その後、血液成分が必ずしも*C. jejuni*を検出するために必要ないことが知られるようになり、1983年にBoltonらによって血液成分の代わりに活性炭を添加したCCD（Charcoal-Cefoperazone-deoxycholate）培地が報告された。この成分をベースとした改良培地が国内のいくつかのメーカーから販売されている。選択剤として入っているセフォペラゾン第三世代セファロスポリンである。

1993年、CHROM agarTM (<https://www.chromagar.com/>) がパリに設立された。本培地は多くの検査室で様々な材料の微生物検査に汎用されている。腸管感染症病原細菌の検出用としては、*Yersinia enterocolitica*、*Salmonella*、腸管出血性大腸菌（EHEC）、*Campylobacter*、*Clostridioides difficile*用の培地がある。詳細な組成は明らかにされていないが、選択剤と様々な色に着色する合成基質を含有している。現在、CHROM agarTMは医療関連感染上重要な薬剤耐性菌を検出する事を目的としたさまざまな培地も開発している。MRSAはその筆頭格であり、最近では基質拡張型βラクタマーゼ（ESBL）産生菌、カルバペネマーゼ産生菌、バンコマイシン耐性腸球菌（VRE）などの臨床的にも重要な薬剤耐性菌検出用培地が開発され、糞便中の保菌検査にも利用されている。耐性菌検出用の培地はCHROM agarTM以外にもいくつかのメーカーからも市販されている。

III. 腸管感染症原因細菌の同定法の変遷

病原細菌の同定は、生化学的性状検査（糖分解性、アミノ酸分解性等）を用いた方法が今なお多くの検査室で実施されている。例えば、腸内細菌科細菌の同定検査はTSI培地、SIM培地、VP培地などガラス製の小試験管に培地を充填し、合計6～7本の培地を同時利用している。現在もなお、細菌の簡易同定法として利用されている方法である。これらの方法で同定が困難な場合、簡易同定キットを使用する。現在は自動化が進み、簡易同定キットの概念がマイ

表2 腸管感染症原因細菌と質量分析での同定上の注意点

	MALDI Biotyper [®] リファレンスライブラリーVer7.0.0.0での結果表示
<i>Salmonella</i> spp.	属レベルでのみ同定可能。血清型試験を追加して最終決定する。
<i>Shigella</i> spp.	<i>E. coli</i> と鑑別不可能。ライブラリに登録なし。
下痢原性大腸菌	<i>E. coli</i> レベルでのみ同定可能。
<i>Escherichia albertii</i>	1株のみ登録あり。
<i>Yersinia</i> spp.	<i>Y. pseudotuberculosis</i> と <i>Y. pestis</i> (ライブラリ登録なし) は鑑別不可。
<i>Vibrio cholerae</i>	ライブラリに登録なし。
<i>Aeromonas</i> spp.	17菌種の登録があるが菌種間のパターンが類似しているため鑑別不可。
<i>Bacillus cereus</i>	同定可能だが、炭疽菌 (ライブラリ登録なし) との鑑別不可。
<i>Clostridium botulinum</i>	ライブラリに登録なし。
<i>Klebsiella oxytoca</i>	同定可能だが、 <i>Raoultella ornithinolytica/planticola/terrigena</i> とは鑑別不可。

(文献1)より抜粋、一部改変)

クロープレートウェルや小型カード内に充填され、20種類ほどの性状検査が完全自動化で検査できるようになった。

以上が現在の検査室で主流の同定検査であるが、まれに上記方法でも鑑別ができない場合に遭遇する。その場合、細菌や真菌に共通配列をPCRで増幅し、シーケンスにより同定する方法が普及しつつある。共通配列とは、細菌は16S rRNA領域、真菌は18S rRNAおよびrRNA間の2つのITS (Internal Transcribed Spacer) 領域であり、これら領域は近縁種を分類するのに十分な特異性を持つ。多くの検査室はシーケンサーを保有していないが、自施設内でPCRまで実施し、シーケンスを外注する運用をもつ施設が増えている。シーケンス後のデータ解析は、leBIBI IV 16S Automated ProKaryotes Phylogeny (<https://umr5558-bibiserv.univ-lyon1.fr/lebibi/lebibi.cgi>) 等の無償データベースサイトから検索できる。

1988年に、田中により報告された質量分析法の一種であるMatrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS、マトリックス支援レーザーイオン化飛行時間型質量分析) が、2011年に同定装置として国内承認された。本装置は2種類が販売されており、1つはブルカー・ダルトニクス社の「MALDI Biotyper」、もう1つは島津製作所の「AXIMA 微生物同定システム」である。後者は、バイオメリュー・ジャパン社から「VITEK MS」としても販売されている。現在国内のおよそ300施設に導入されている。同定に要する時間は、集落をプレートに塗布し装置に充填後、1～2分程度である。従来の生化学的性状検査より検査所要日数が1日短縮され、感染症の迅速診断や

治療薬選択の情報として利用価値が高まっている。ただし、本装置の反応原理はリボゾームタンパクを中心にデータベースが構築されているため、大腸菌や赤痢菌のようにリボゾーム配列が類似している細菌群は鑑別ができない(表2)。

IV. 遺伝子検査の開発と発展

PCR法を用いた結核菌遺伝子の検出法が開発されて以降、本技術は様々な病原体検出法として急速に普及した。「腸管感染症検査ガイドライン第2版」には、PCR法を用いた病原体遺伝子や病原因子のプライマー配列が50種類以上表記されている。PCRプライマーは外注でも千円程度で合成が可能であり、PCR装置も安価になっていることから広く検査室で利用することが可能である。市販キットは、リアルタイムPCR法、LAMP法などを使用して、ノロウイルスや*Clostridioides difficile*の毒素遺伝子などの検査キットが普及している。多項目同時測定遺伝子検査キットであるFilmArray[™] (バイオメリュー・ジャパン株式会社) は13種類の細菌、5種類のウイルス、および4種類の寄生虫の核酸を1時間以内に同時に検出できる(表3)。本装置は、糞便をキットに充填後、装置内で核酸抽出、核酸増幅および検出が全自動で行われる。

V. 下痢原性大腸菌検査について

下痢原性大腸菌は病原性の違いから5つのカテゴリーに分類されている。一般の検査室で行われている検査フローは、分離培養で大腸菌を検出した株に対してO抗原の血清型別を行う。しかし、血清型

表 3 FilmArray™ 消化管パネルで検出可能な病原微生物

細菌	ウイルス	寄生虫
<i>Campylobacter</i> 属	Adenovirus F40/41	<i>Cryptosporidium</i>
<i>Clostridioides difficile</i> toxin A/B	Astrovirus	<i>Cyclospora cayatanensis</i>
<i>Plesiomonas shigelloides</i>	Norovirus GI/GII	<i>Entamoeba histolytica</i>
<i>Salmonella</i> 属	Rotavirus A	<i>Giardia lamblia</i>
<i>Vibrio</i> 属 (<i>V. parahaemolyticus</i> , <i>V. vulnificus</i> 及び <i>V. cholerae</i>)	Sapovirus (Genogroups I, II, IV及びV)	
<i>V. cholerae</i>		
<i>Yersinia enterocolitica</i>		
Enteroadgregative <i>Escherichia coli</i> (EAEC)		
Enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> (EPEC)		
Enterotoxigenic <i>Escherichia coli</i> (ETEC) t1/st		
Shiga-like toxin-producing <i>Escherichia coli</i> (STEC) stx1/stx2		
<i>E. coli</i> O157		
<i>Shigella</i> /Enteroinvasive <i>Escherichia coli</i> (EIEC)		

別のみで本菌を同定することは出来ず、病原因子の確認が必要となる。伊藤ら (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/diseases/ka/ecoli/849-idsc/iasr-topic/iasr-topic-related/965-dj3831.html>) は、病原大腸菌血清型 (EPEC) および他の下痢原性大腸菌血清型の病原因子の保有状況を IASR に報告した。EPEC 血清型としての報告数は 590 件であったが、血清型の種類は O1 が最も多く、O18 がこれに次ぐが、これらの株のほとんどは EPEC 主要病原因子である *eae* 遺伝子を保有しておらず、*eae* 遺伝子陽性であった血清型は OUT (O antigen untypable)、O55、O128、O119、O8 の順であった。伊藤らの結論として、下痢原性大腸菌を鑑別するため古くから血清型が使われてきたが、病原因子が遺伝子検査で簡単に調べることができるようになり、血清型の意義は薄れてきたと述べている。磯崎らも、大腸菌血清型別は EHEC O157 や O26 の検出等、ある程度の精度を有する確立された検査法ではあるが、下痢原性大腸菌の検査を血清型別を主たる報告体系とすると、非病原性株を病原性株として報告してしまう可能性があるとし、血清型別を前提とした分類法に代わり、PCR 法を用いた下痢原性大腸菌検査法を採用する必要があると述べている。

多くの検査室は診療報酬項目である「大腸菌血清型別」(令和 2 年度診療報酬改定で 175 点と設定) の縛りがあるため、本検査法は臨床の現場においてはまだまだ主たる検査法であることには変わりがない。EHEC の病原因子であるベロ毒素は、遺伝子検査や抗原検査による検出は普及しているが、他の下痢原性大腸菌の遺伝子検査は普及していない。「腸管感染症検査ガイドライン第 2 版」では、病原因子を調

べられずに、血清型別試験結果を報告する場合には、医師に誤解を与えないよう、「大腸菌血清型群〇〇を検出した。下痢原性大腸菌の疑いはあるが、病原因子の確認試験が必要である。」等のコメントをつける必要があるとの注意喚起の文言が記載されている。

VI. 抗菌薬関連下痢症と

Clostridioides difficile の検査

抗菌薬関連下痢症 (Antibiotic-associated diarrhea, AAD) の原因細菌として *C. difficile*、MRSA、細胞毒性産生 *Klebsiella oxytoca* などが知られているが、これらの中で検査法が確立できているのは *C. difficile* だけである。*C. difficile* は 1935 年に *Bacillus difficilis* として登録され、途中 *Clostridium difficile* に学名変更後、2016 年に現在の学名となっている。1979 年、George らによって報告された CCFA (Cycloserine-Cefoxitin-Fructose-Egg Yolk) 培地は現在多くの検査室で使用されている選択分離培地である。*C. difficile* 感染症 (CDI) 検査法は、これまで糞便中のトキシン B 活性をベロ細胞培養を用いて検出する方法、トキシン A やトキシン B の抗原検出法、*C. difficile* の代謝産物であるグルタメートデヒドロゲナーゼ (GDH) 検出法、CCFA 培地を用いた分離培養および糞便中のトキシン遺伝子検出法が確立されている。糞便中のトキシン B 活性を細胞培養で検出する方法は感度・特異度ともにすぐれ、CDI 診断のためのゴールドスタンダードであるが、ベロ細胞の維持・管理や測定法が煩雑であり、国内検査室にはまったく普及していない。2017 年、日本臨床微生物学会感染症領域新規検査検討委員会から現在、いくつ

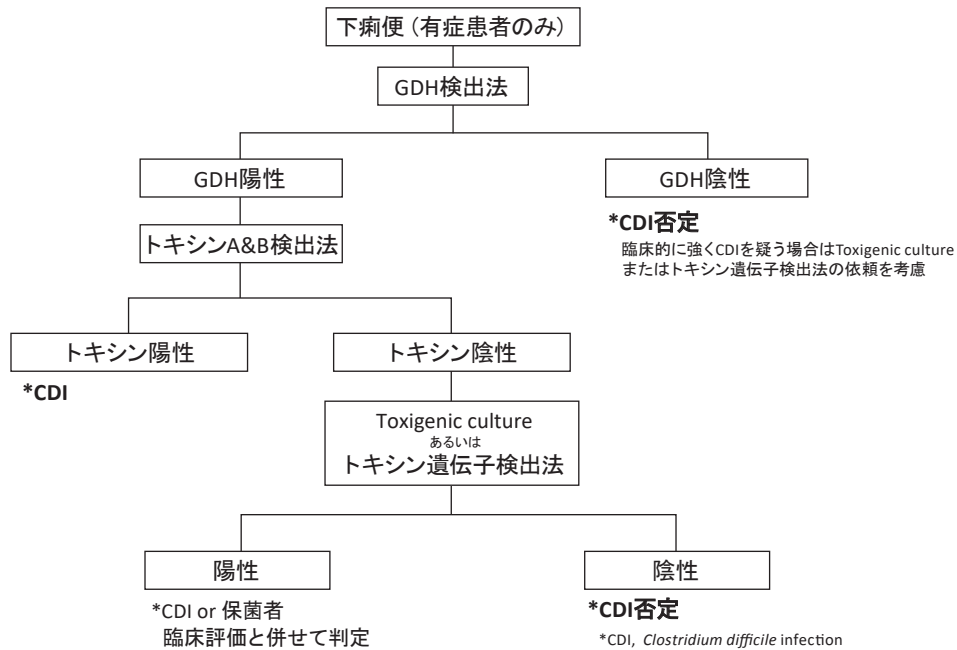


図1 CDI検査精度および検査効率を上げるための3ステップアルゴリズム
(文献1より転載)

かかる CDI 検査法を一定のフローチャート (3 ステップアルゴリズム) が公表された (図 1)。3 ステップアルゴリズムの特徴は、感度の高い GDH 検出をスクリーニングとし、陰性であれば CDI 否定、陽性であればトキシン A とトキシン B の検出を行う。トキシン検査は GDH 検査より感度が低いことから、GDH 陽性トキシン陰性の場合、高感度検出法である Toxigenic culture あるいはトキシン遺伝子検出法を行うことが推奨されている。Toxigenic culture とは、CCFA 培地に発育した集落から毒素を抽出してトキシン検査をあらためて行う方法である。核酸増幅法 (Nucleic Acid Amplification Test, NAAT) は専用機器の導入は必要であるが検査室に導入されつつある。Xpert C. difficile 「セフィエド」 (ベックマン・コールター株式会社) や BD マックス CDIFF (日本ベクトン・ディッキンソン株式会社) は、先に示した FilmArray と同様に糞便を反応試薬に添加するのみですべての検査工程を自動で行うことが可能である。

おわりに

2021 年に日本臨床微生物学会が刊行した「腸管感染症検査ガイドライン第 2 版」の内容が国内検査室における最新の考え方である。本ガイドラインは初版 (2012 年) には記載のなかった *Brachyspira* 属菌、*Escherichia albertii* 等が追記された。また、本項で記載しなかった寄生虫性腸管感染症、原虫性腸管感染症検査法に加え、回虫や鉤虫などの蠕虫の検査法、およびフェイヤー肉胞子虫やナナホシクドアなど、新たに食中毒を引き起こす病原体の検査法も追記された。本総説に加え、「腸管感染症検査ガイドライン第 2 版」もぜひご一読いただきたい。

文 献

- 1) 日本臨床微生物学会検査法マニュアル作成委員会・腸管感染症検査ガイドライン委員会. 2021. 腸管感染症検査ガイドライン第 2 版. 日臨微誌 31 (Suppl. 2)