

食水系感染症病原体の検査法 - 4

赤痢菌

こ ぬま ひろ たか
小 沼 博 隆
Hirota KONUMA

I. 病原体

1. 病原体

赤痢菌は、1898年、志賀潔によって発見され、その名にちなんで *Shigella* という属名が名付けられた。本菌は、グラム陰性通性嫌気性桿菌で腸内細菌の仲間である。

赤痢菌属に属する4つの亜群は、いずれも細菌性赤痢（以後赤痢）の原因になる。このうちA亜群 (*S. dysenteriae*) は志賀赤痢菌とも呼ばれ、志賀毒素（シガトキシン）という外毒素を産生する。毒性の強さはA亜群が最も強く、B亜群 (*S. flexneri*)、C亜群 (*S. boydii*) がこれに続き、D亜群 (*S. sonnei*) は比較的毒性が弱い。

赤痢菌は、ヒトとサルを自然宿主として、その腸内に感染する。ヒトでの感染は、主に汚染された食物や水を介して経口的に感染し、腸管の上皮細胞の細胞内に感染する。細胞内ではアクチンを利用して細胞質内を移動して、さらに隣接する細胞に侵入し感染を広げるといった特徴を持つ。

2. 疫学

赤痢菌はヒトに感染すると症状は重くなることが多いが、サルでは症状は軽い。また、ヒトでは少量菌でも発症することからヒトからヒトへの直接感染も考えられるが、大部分の事例では本菌に汚染された水・氷・食品などを摂取することにより感染する。極少の菌量でも感染することから、トイレのドアノブ、水道カランあるいは食器、箸などを介して感染することも考えられる。

赤痢は2007年4月1日施行の感染症法に基づく

三類感染症として、疑似症患者、無症状病原体保有者を含む症例の届け出が義務づけられている。過去の年間累積報告数は2000年（843事例）から2006年（488事例）の範囲にあり、7年間の平均は643事例であった。このうち国内発生は30%前後であるが、14歳以下の患者では大半が国内で発生している。志賀菌 (*S. dysenteriae*) およびボイド菌は、先進国での分離例はまれで、わが国でも両菌種が分離されるのは、途上国からの帰国者で、感染地はインドおよびインドネシアが多い。

先進国での集団事例は幼稚園、保育園および小学校での流行が多く、児童から家庭での2次感染例も報告され、いずれもゾンネ菌 (*S. sonnei*) による。

食品からの感染は、先進国ではサラダによるものが多い。その他、レタス等の野菜、スイカ等のくだもの、生カキが原因食と報告されている。わが国でも平成13年11月～14年1月に30都道府県、160名の赤痢患者が報告された事例がある。原因菌はゾンネ菌で、分離菌と冷凍保存されていた韓国産カキから分離された株の遺伝子型が一致し、生カキが原因と考えられた。また、同時期に同一遺伝子型菌株による保育所、小学校での集団感染事例も多発しており、それらは生カキ感染患者からの2次感染と考えられた。

3. 臨床症状

感染後、通常1～3日の潜伏期間（摂取する菌の量が多ければ数時間でも発病する場合あり）の後、倦怠、食欲不振、発熱、腹痛（しぶり腹をとともなう場合が多い）、下痢等の症状が始まる。菌の種類によって症状に軽重があり、最も病原性の強い *Shigella dysenteriae*（志賀菌）では、腸内からの出血によって血便がみられ、しぶり腹（トイレにいっ

食水系感染症病原体の検査法－4

た後でもすっきりせず、またトイレに行きたくなくなる状態)があらわれることがあるが、他の3種の赤痢菌では血便をみることはほとんどない。特に *S. sonnei* では症状が軽く、軟便程度で発熱もないか、あっても微熱程度しかみられないケースもある。通常1週間程度で軽快に向かうが、完全に菌が陰性になるには3～4週間かかる場合がある。

II. 検査法

1. 増菌培養法

1) 食品

ストマッカー袋中の試料に増菌培地 225mL を注加した後、時々手揉みしながら 10 分間室温放置する(ストマッカー処理はしない)。室温放置後、増菌培地が BPW の場合は、35～37℃で 18～24 時間好気培養する。増菌培地が *Shigella* broth の場合は 44℃で 18～24 時間嫌気培養する(*Shigella sonnei* 以外の赤痢菌を対象とする場合は、42℃で 18～24 時間嫌気培養する)。また、食中毒検体の検査にあたっては、検査検体数を増やしたり、一次および二次増菌に加え、*Shigella* broth を用いた三次増菌やビーズ法などの導入に加え、分離平板培地の種類を増やすなどの工夫が必要と思われる。

2) 水

濾過したフィルターを必要に応じ細切し、中試験管など適当な滅菌容器に入れ、増菌培地が BPW の場合は培地 15mL を注加して 35～37℃で 18～24 時間好気培養する。増菌培地が *Shigella* broth の場合は培地 15mL を注加して 44℃で 18～24 時間嫌気培養する。

沈渣の場合は、20 分間遠心後、上清を捨て、沈渣に上記の液体培地 0.5～1.0mL (遠心管が複数以上の場合は、それぞれに上記の液体培地 (BPW または *Shigella* broth) 0.5～1.0mL) を加え均一に浮遊させた後、中試験管など適当な滅菌容器に入れ、総量が 15mL になるよう目的の液体培地を注加した後、所定の培養条件で培養する。

3) 分離培養

一般に、標的菌(赤痢菌)を分離しようとする場

合には、多くの単離集落が出現するように塗抹することである。また、使用する分離培地の種類や平板数を増やしたり、あるいは増菌培養液を希釈するなどの操作を行うことが重要である。釣菌する集落は、疑わしい集落をできる限り多く釣菌しないと、標的菌を得ることは難しい。分離用培地としては、以下のものが利用できるが、培地組成はメーカーにより若干異なっているので、それぞれの研究室あるいは検査室で日常使い慣れた培地を用いることを薦める。はじめて使用するところでは、標準菌を各分離培地に接種して、集落の大きさ、色調、形状などを確認しておくこと。

①MAC : MacConkey Agar No.3

(OXOID, Difco, 栄研, 日水, その他)

②CRT : CHROMagarO157TAM

(CHROMagar ; 関東化学)

③DHL Agar

(日水, 栄研, OXOID, MERCK, その他)

④XLD Agar

(OXOID, 栄研, Difco, MERCK, その他)

⑤エネツ : Salmonella Agar acc. to Onoz

(MERCK)

⑥HEA : Hektoen Enteric Agar

(OXOID, Difco, その他)

⑦SS Agar : Salmonella Shigella Agar

(OXOID, 日水, 栄研, MERCK, Difco)

4) 確認培養

分離平板培地上に発育した赤痢菌と疑われる集落を釣菌して普通寒天斜面培地に接種し、35～37℃で 18～24 時間培養する。この培地を基株としてグラム染色、チトクロームオキシダーゼおよびカタラーゼ試験を行う。また、普通ブイヨンに接種、培養後、本培養液を TSI 斜面寒天培地、LIM 培地、ブドウ糖加普通ブイヨン(ダーラム管入り)、オルニチン培地(メラー)、シモンズクエン酸塩斜面寒天培地およびアセテート斜面寒天培地にそれぞれ接種し、35～37℃で 18～24 時間培養する。培養後、TSI 斜面寒天培地では高層部黄変、斜面部赤変(黄変の場合あり)硫化水素陰性、糖からのガス産生陰性(TSI で糖からのガス産生の有無を判定することもできるが、糖の種類を特定するのは困難)、ブド

ウ糖からのガス産生陰性、LIM 培地では運動性なし、インドール陰性 (*Shigella sonnei* 以外の赤痢菌では、まれに (+) あり、また、*Shigella boydii* は (+) になるものが比較的多い)、硫化水素陰性、リシンデカルボキシラーゼ陰性、オルニチンデカルボキシラーゼ陽性、クエン酸塩培地陰性およびアセテート培地陰性の菌株を赤痢菌陽性と確定し、血清学的試験を行う。

5) 血清学的試験

生化学的試験により赤痢菌と同定された菌株を普通ブイヨンに接種し、35～37℃・18～24時間で好気培養後、普通寒天平板培地に画線塗抹し同様に好気培養し純培養菌であることを確認する。その平板から5～6集落を掻き取り、0.5mL生理食塩水に均一に浮遊させ抗原液とする。

①スライド凝集法

ガラス鉛筆でスライドグラスあるいは窓用透明ガラスを区分けし、区画毎に各多価血清および生理食塩水 (30μL) を滴下する。それに抗原液の1白金耳

(またはマイクロピペットで5～10μL) をおき、よく混和する。スライドグラスあるいは窓ガラスを前後に傾斜させながら凝集の有無を観察する。

②因子血清

多価血清で陽性と判定された場合は、その多価血清を構成する因子血清を用いて同様に試験する。

③結果の判定

凝集の観察は、透過光下で行う。最初に、凝集抗原が生理食塩水との反応で凝集していないことを確認する。各血清との反応では、1分間以内の強い凝集が観察されたものを陽性とする。

2. 遺伝子検出法

1) 赤痢菌および腸管侵入性大腸菌病原因子遺伝子のPCRによる検出

ipaH 遺伝子は、ゲノムあるいはプラスミドのいずれかに存在するといわれており、ほとんどの赤痢菌株はこの遺伝子が陽性であるが、その機能はわかっていない。*invE* 遺伝子はプラスミド上にある



写真1 MAC : MacConkey Agar No.3

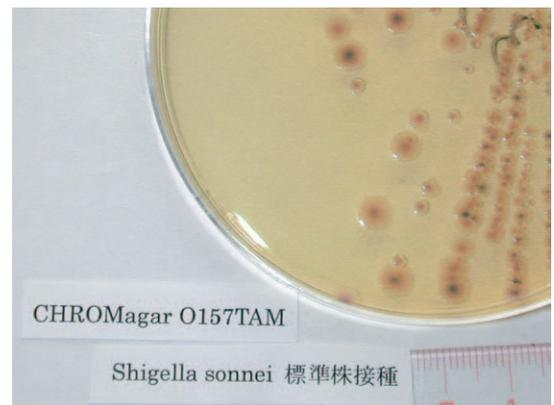


写真2 CRT : CHROMagar O157TAM



写真3 DHL Agar



写真4 HEA : Hektoene Enteric Agar

食水系感染症病原体の検査法 - 4

侵入性遺伝子なので、脱落する場合がある。*ipaH* 遺伝子陽性株のうち、約50%が*invE* 遺伝子陽性株といわれている。また、これらの遺伝子を検出しても、赤痢菌と大腸菌の区別はつかないので、他の生化学的性状での判定が必要である。

2) PCRのための検体DNA液調整

①ブロスによるPCR

培養液1mLを1.5mLチューブに採取し、5,000rpmで2分間遠心後、上清を捨て（感染性ある場合もあるので分離した液は滅菌すること、ピペット等で培

養液をできるだけ取り去ること）、滅菌蒸留水100 μ Lを加えて、攪拌後、95 $^{\circ}$ C、5分間加熱後、13,000rpmで10分間遠心し、上清液を分離使用する。

②コロニーでのPCR

1.5mLチューブに100 μ L滅菌水を入れ、コロニーを白金線で採取懸濁させ、①の加熱からと同様に処理する。

3) PCRのやり方

TaKaRa Ex Taq[®]とTaKaRa特殊細菌検出用Primer Set（赤痢菌、腸管侵入性大腸菌*invE*および

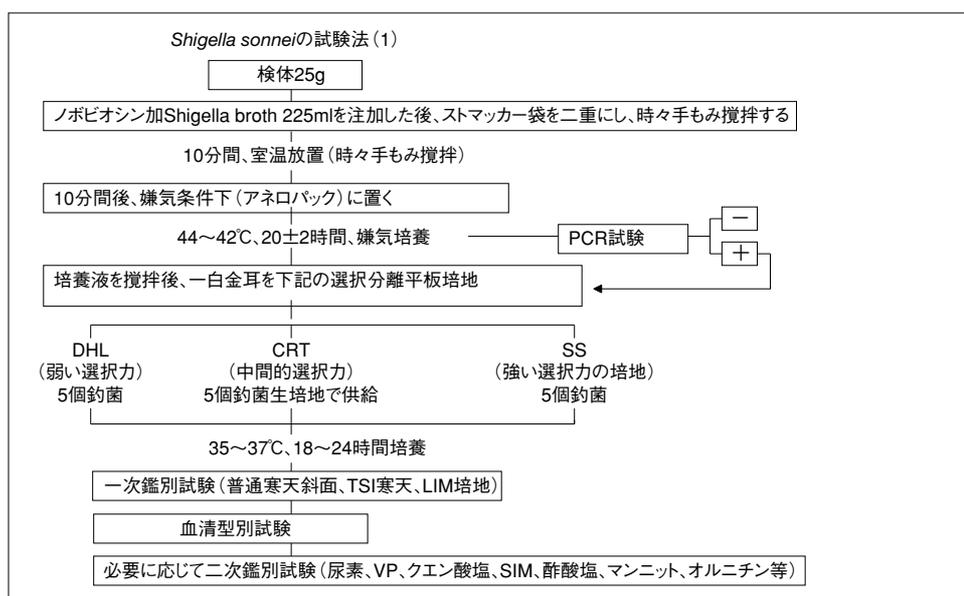


図1 *Shigella sonnei* の試験法 (1)

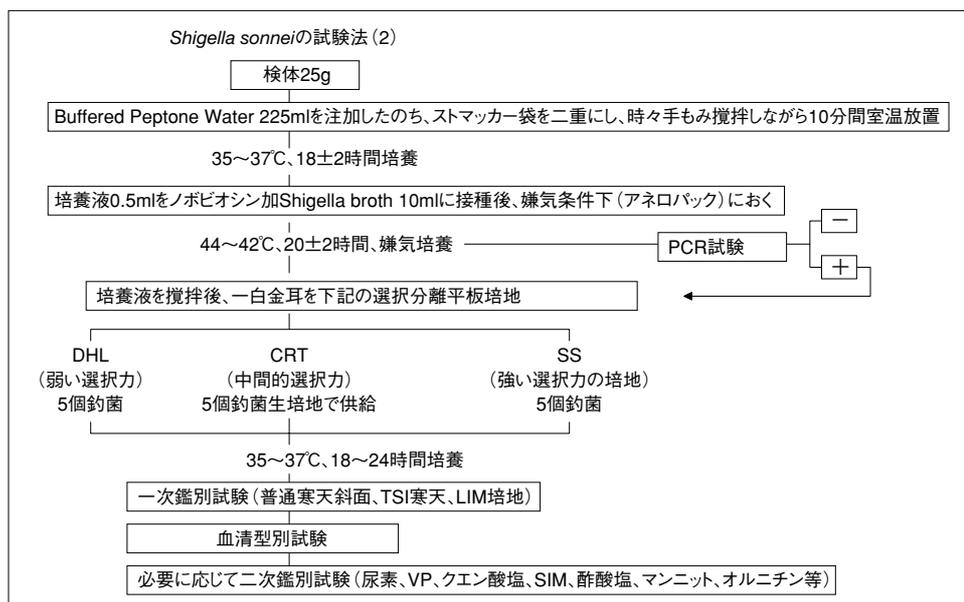


図2 *Shigella sonnei* の試験法 (2)

ipaH 遺伝子検出用) を使用する。

① PCR 試薬

TaKaRa Ex Taq[®] (RR001)

② Primer Set

TaKaRa *invE* 遺伝子検出用 Primer Set INV-1/2 (S016)

TaKaRa *ipaH* 遺伝子検出用 Primer Set IPA-1/2 (S017)

③ 反応液組成

X10 Ex Taq 添付 Buffer	2 μ L
添付 dNTP Mixture (2.5 mM each)	2 μ L
primer INV-1	0.2 μ L
primer INV-2	0.2 μ L
primer IPA-1	0.2 μ L
primer IPA-2	0.2 μ L
Ex Taq	0.1 μ L
滅菌蒸留水	14.1 μ L
Template DNA (検体 DNA 液*)	1 μ L

* 上記、検体 DNA 液調整①、②で調整した検体 DNA 液を使用。

④ PCR 条件

熱変性	94 $^{\circ}$ C	30 秒間
アニーリング	55 $^{\circ}$ C	30 秒間
伸長	72 $^{\circ}$ C	30 秒間

以上を 35 cycles. その後、72 $^{\circ}$ C 7 分間伸長後に 4 $^{\circ}$ C に温度を下げて終了。

⑤ 結果判定

2% アガロースによる電気泳動の結果、目的の遺伝子 INV-1/2 Primer Set によって 293bp の、IPA-1/2 Primer Set によって 242bp の長さの DNA バンドが出現したものを陽性とする。*ipaH* は赤痢菌およ

び腸管侵入性大腸菌の存在を、病原因子では *invE* の存在が必要であることから、判定材料として考える。

文 献

- Hartman, A. B., Venkatesa, M., Oaks, E. V., and Buysse, J. M.: Sequence and molecular characterization of a multi-copy invasion plasmid antigen gene, *ipaH*, of *Shigella flexneri*. *J. Bacteriol.*, **172** : 1905-1915, 1990.
- Watanabe, H., Arakawa, E., Ito, K., Kato, J., and Nakamura, A.: Genetic analysis of an invasion region by use of a Tn3-lac transposon and identification of a second positive regulator gene, *invE*, for cell invasion of *Shigella sonnei* : Significant homology of *InvE* with *ParB* of plasmid P1. *J. Bacteriol.*, **172** : 619-629, 1990.
- Anonymous (2001) *Bacteriological Analytical Manual Online*, January 2001, Chapter 6 *Shigella* (www.cfsan.fda.gov/~ebam/bam-6.html).
- 松下 秀, 有松真保, 高橋正樹, 横山敬子, 小西典子, 柳川義勢, 山田澄夫, 諸角 聖. 東京において最近 5 年間 (1995 ~ 1999 年) に分離された輸入および国内事例由来赤痢菌の菌種・血清型と薬剤耐性, *感染症学雑誌*, **74** : 834-840, 2000.
- 霜鳥翔一, 小島夫美子, 東島弘明, 天児和暢. 海産生鮮魚介類を対象とした赤痢菌検査法の検討, *感染症学雑誌*, **64** : 1337-1344, 1990.
- Uyttendaele, M., Bagamboula, CF., De Smet, E., Van Wilder S., Debevere, J.: Evaluation of culture media for enrichment and isolation of *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Int. J. Food Microbiol.*, **70** : 255-265, 2001.
- 坂崎利一訳. 医学細菌同定の手びき第 2 版, pp.143-145, 業根出版, 東京. 1974.
- Anonymous (1993) *Interpretation of biochemical results*. ISO 6579, 9.4.2.9