

# 細菌性髄膜炎

(髄膜炎菌性髄膜炎をのぞく)

## 検査マニュアル

平成 23 年 9 月

# 目次

頁

1. 疫学	.....
2. 検査に関する一般的注意	.....
3. 検査方法	.....
3-1. <i>Haemophilus influenzae</i>	.....
3-1-1. 菌の分離	.....
3-1-2. 抗原検出	.....
3-1-3. 血清型別	.....
3-1-4. ワクチン	.....
3-2. <i>Streptococcus pneumoniae</i>	.....
3-2-1. 菌の分離	.....
3-2-2. 抗原検出	.....
3-2-3. 血清型別	.....
3-2-4. ワクチン	.....
3-3. <i>Streptococcus agalactiae</i>	.....
3-3-1. 菌の分離	.....
3-3-2. 血清型別	.....

3-4. その他の起因菌 . . . . .

3-5. 菌培養陰性髄液からの菌遺伝子増幅法 . . .

4. 参考情報

マイコプラズマ・ウレアプラズマ性髄膜炎 . . .

5. 引用文献 . . . . .

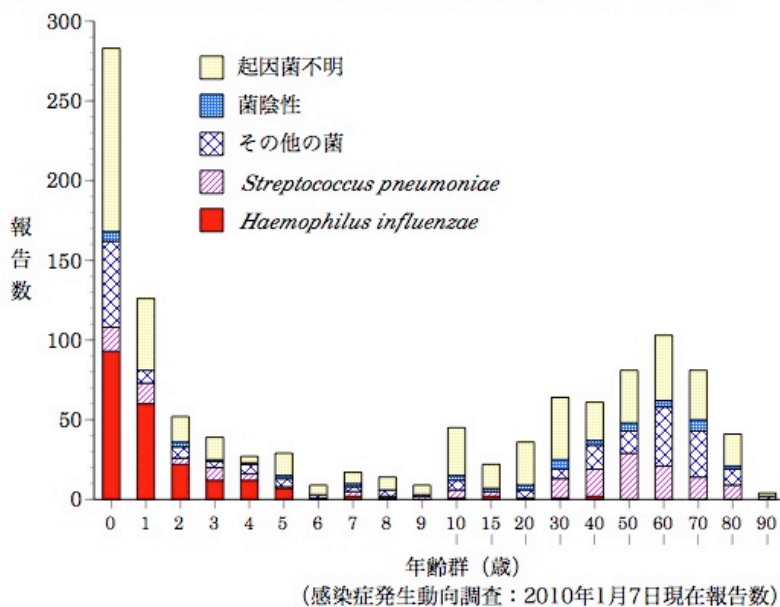
6. 執筆者 . . . . .

## 1. 疫学

髄膜炎に関して現行の感染症法の五類感染症には、「髄膜炎菌性髄膜炎（*Neisseria meningitidis* による急性化膿性髄膜炎）」（全数把握）、「細菌性髄膜炎（髄膜炎菌性髄膜炎はのぞく）（種々の細菌感染による髄膜炎の感染症）」（定点把握）、「無菌性髄膜炎（種々のウイルスを中心とした病原体の感染による髄膜炎の感染症）」（定点把握）の3つのカテゴリーがある。いずれのカテゴリーとも臨床症状において、少なくとも発熱、頭痛、嘔吐を主な特徴とするが、病初期には頸部硬直や髄膜刺激症状がみられないこともある。検査所見では髄液中の細胞数の増加を認める。カテゴリーにより髄液蛋白量や糖量の検査所見の違いがある。検査所見の違いで、髄液蛋白量ならびに糖量が正常であれば「無菌性髄膜炎」、蛋白量が増加し糖量が減少すれば「細菌性髄膜炎」、分離・同定で髄膜炎菌が検出されれば「髄膜炎菌性髄膜炎」となる。髄膜炎菌以外の起因菌についても発生数把握の試みが実施されており（Hib 感染症発症データベース等）、将来的には、髄膜炎菌以外の細菌性髄膜炎についても起因菌毎の感染症発生状況の把握が望まれる。本稿では、主として髄膜炎菌性髄膜炎をのぞく細菌性髄膜炎について記載する。ただし、菌培養陰性髄液からの菌遺伝子増幅法には髄膜炎菌も含めた方法を紹介するとともに、無菌性髄膜炎と診断されることも多いながら細菌の感染によるマイコプラズマ・ウレアプラズマ性髄膜炎の記載を参考情報に加えた。

細菌性髄膜炎は、発症年齢により起因菌が異なる。新生児では、産道感染する菌種、例えば *Streptococcus agalactiae*（B 群連鎖球菌）やマイコプラズマ等が起因菌となる。小児では、*Haemophilus influenzae*（インフルエンザ菌）、*Streptococcus pneumoniae*（肺炎球菌）が、成人では *Streptococcus pneumoniae* 等が起因菌となる<sup>1)</sup>。

図2. 細菌性髄膜炎と診断された患者の年齢，2006～2008年



IASR

Infectious Agents Surveillance Report

全国1道9県での調査結果においては、5歳未満小児人口10万人当たり罹患率は、2008年、2009年ならびに2010年の3年で、それぞれ *H. influenzae* 性髄膜炎が8.3、7.1、7.7であり、*S. pneumoniae* 性髄膜炎が3.1、2.6、2.6であり、*S. agalactiae* 性髄膜炎が1.2、1.4、1.3であった。人口比率で算出した2010年の国内推定患者発生数は、*H. influenzae* 性髄膜炎

が 412 人/年、*S. pneumoniae* 性髄膜炎が 137 人/年、*S. agalactiae* 性髄膜炎が 71 人/年と推定された<sup>2)</sup>。

*Haemophilus influenzae* 性髄膜炎における重症化例では、聴覚障害、脳波等の異常所見、発達や運動障害ならびに死亡があり、死亡率が髄膜炎患者中 2.4% という報告例もある<sup>3)</sup>。

*Streptococcus pneumoniae* 性髄膜炎の予後は治癒 88%、後遺症 10%、死亡 2%であったと報告されている<sup>4)</sup>。

## 2. 検査に関する一般的注意

### 2-1 検査材料の採取

髄液を滅菌済容器に採取する<sup>5)</sup>。採取手法に関しては、成書を参考にさせていただきたい。

### 2-2 検査材料の輸送

髄液検体は、採取後、できる限り迅速に検査を開始する。髄液の性状検査を行う場合は室温に保つ。性状検査終了後あるいは培養検査用に小分けされた髄液試料は、冷蔵する。培養検査までに輸送が必要な場合は、冷蔵で輸送することが勧められる。

マイコプラズマの培養検査用には、髄液検体を輸送液と混ぜ室温かドライアイス詰めとする（「肺炎マイコプラズマ検査マニュアル」を参考にさせていただきたい）。

医療機関での分離菌株の輸送は、培地上に発育した菌であれば室温または冷蔵輸送となる。

### 2-3 検査の進め方

細菌性髄膜炎が疑われる場合、髄液培養とともに、菌血症を伴うことが多いため血液培養を行う。採取した髄液は細胞数計測と分画、髄液糖・蛋白量の測定、グラム染色を行う。グラム染色及びその他の染色や培養検査での検出感度を上げるために、髄液が 1ml 程度以上あれば 3000~3500rpm（または 1,500~2,000Xg）、10~15 分遠心をする。髄液量が少ない場合はそのまま検査に用いる。沈渣は、塗抹検査及び培養検査を行い、上清は抗原抗体反応等迅速検査に使用する。必要に応じて墨汁染色や抗酸染色を行う。

血液培養は、他菌等による汚染の危険性を考慮して、可能であれば 1 セット 2 本ずつ、2 セットを培養する。

### 2-4 届出基準

診察した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ、以下の 2 つの基準により細菌性髄膜炎と診断した場合は、届け出なければならない。

#### 1. 届出のために必要な臨床症状（2 つすべてを満たすもの）

- ・発熱、頭痛、嘔吐を主な特徴とする
- ・項部硬直、Kernig 徴候、Brudzinski 徴候などの髄膜刺激症状

（いずれも新生児や乳児などでは臨床症状が明らかではないことが多い）

#### 2. 届出のために必要な検査所見（2 つすべてを満たすもの）

- ・髄液細胞数の増加（多核球優位であることが多い）
- ・髄液蛋白量の増加と糖の減少

### 3. 検査方法

培養は、血液寒天培地、チョコレート寒天培地に沈渣を塗抹する。髄液沈渣、あるいは血液検体の培養は、血液寒天培地、チョコレート寒天培地に塗抹し、5% CO<sub>2</sub> 存在下で培養を実施する。髄液試料のグラム染色等の結果によりサブロー寒天培地や嫌気培養用培地、抗酸菌用培地等を追加する。

#### 3-1. *Haemophilus influenzae* (インフルエンザ菌)

##### 3-1-1. 菌の分離

*Haemophilus influenzae* の分離には、髄液と血液を検査材料とすることができる。髄液の試料を遠心し、沈渣を得る。遠心時に温度が上昇しないように注意する。沈渣の一部はグラム染色に利用し、一部を菌培養に使用し、残りを追加の検査のために冷凍保存する。

*Haemophilus influenzae* の分離用に血液試料をカルチャーボトルに接種することもできる。35～37°Cで 18 時間培養後から毎日培養液を観察し、濁りなどの菌の増殖が観察された場合は、無菌的に培養液を採取し、分離用培地に接種する。ただし、濁りが観察されなくても菌が増殖している場合があるので、48 時間後から毎日 7 日後まで培養液を分離培地に接種し、分離を試みる。

菌の分離には X 因子(ヘミン)と V 因子(NAD)を含むチョコレート寒天培地を用いる。試料の 1 白金耳を培地に接種し、5% CO<sub>2</sub> 存在下、35～37°Cで 18～24 時間培養する。コロニーがみられない場合は、3 日目まで観察する。

ヒツジ血液寒天培地には V 因子破壊酵素が存在するため、*H. influenzae* は発育しない(ウサギあるいはウマ血液寒天培地には、発育する)。

##### 3-1-1-1. コロニー形態

チョコレート寒天培地では、直径 1～2mm の露滴状で灰白色、かつ辺縁がスムーズ、光沢があり、湿潤でバター状の柔らかい集落を形成する。継代を続けることで莢膜の消失が起こることが知られており、コロニー形態の変化(莢膜がある S 型と、莢膜の無い R 型)が起こることがある。

##### 3-1-1-2. グラム染色性

グラム陰性短桿菌。髄液由来株は、多くの場合莢膜を有する。

##### 3-1-1-3. 鑑別・同定

発育には、炭酸ガス、X 因子：ヘミン、V 因子：ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(nicotinamide adenine dinucleotide: NAD)を要求する。溶血性は無い。カタラーゼ陽性。糖分解性は、グルコース分解、シュークロース・ラクトース・マンノース非分解性。

生化学的性状をベースとした同定キット(API NH、ID テスト・HN-20 ラピッド等)を利用する。

##### 3-1-1-4. 生化学的性状検査

###### (1) 発育要求性試験

#### a. X、V 因子要求試験

市販の X、V 因子含ディスク等を使用し、説明書に従って操作する。菌液作製時、もとの寒天培地から菌体とともに発育因子を持ち込まないように注意する。

#### b. ポルフィリン試験

ディスク法よりも X 因子要求が明確に判定できる。市販品もあるが、自家調製する場合は、小試に基質液、対照用基質液各 0.5ml をとり被検菌を濃厚に懸濁し、35~37°C、4 時間静置後 UV ランプ (340nm) を照射する。赤色蛍光は陽性 (X 因子非要求)、無色は陰性 (X 因子要求) と判定する。または、35~37°C、24 時間静置後 Kovac 試薬 0.5ml を添加混合し、静置後下層 (水層) 赤色は陽性で X 因子非要求、無色は陰性で X 因子要求と判定する。インドール産生菌は上層部赤色になるので必ず対照を置き比較判定する。Kovac 試薬添加前に液層が赤くなっている場合は試薬を加える必要はない。

##### 基質液

δ-アミノレブリン酸 (Sigma)	33.5mg
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	19.7mg
0.1mol リン酸緩衝液 (pH6.9)	100 ml

##### 対照用基質液

基質液から δ-アミノレブリン酸を除いた液

#### (2) 溶血性試験

溶血性試験にはウマあるいはウサギ血液を 5%に加えた寒天培地を用いる (ウサギ血液がより明瞭に観察できる)。5%ウサギ血液寒天培地に画線後、5% CO<sub>2</sub> 存在下で 35~37°C、18~24 時間培養する。集落の周囲に β 溶血が観察される。

#### Haemophilus 属菌の鑑別

	X 因子要求性	V 因子要求性	β 溶血
<i>H. influenzae</i>	+	+	-
<i>H. parainfluenzae</i>	-	+	-
<i>H. haemolyticus</i>	+	+	+
<i>H. parahaemolyticus</i>	-	+	+

#### 3-1-1-5. 薬剤感受性試験

*Haemophilus influenzae* の薬剤耐性機構としては、1) β-ラクタマーゼ産生に関わる TEM-1 β-lactamase 遺伝子の有無、2) 細胞膜のペニシリン結合蛋白 (penicillin-binding protein: PBP) 遺伝子 *pbp3* への点変異がある。両者の組み合わせにより、例えば β-lactamase non-producing ampicillin-resistant (BLNAR) *H. influenzae* 等と称されることがある。

β-ラクタマーゼ産生性試験 (ニトロセフィン法) は市販セフィナーゼディスクを使用する方法である。ディスクの上に滅菌水約 20 μl を滴下し、菌のコロニーを白金耳にて塗り付ける。1 分程度でディスクが赤く変色した場合は、β-ラクタマーゼ産生株と判定される。

薬剤感受性試験は、ディスク法、微量液体希釈法や E-test が実施できる。各試験方法は、それぞれの成書に従い実施する。

薬剤例を以下に記す。

Ampicillin (ABPC)、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤の一つである sulbactam が入った Ampicillin-sulbactam (ABPC/SBT)、Piperacillin (PIPC)、Meropenem (MEPM)、Cefotaxime (CTX)、Ceftriaxone (CTRX)

### 3-1-2. 抗原検出

*Haemophilus influenzae* 血清型 b 型については、特異抗体感作ラテックス粒子によるラテックス凝集法のキットが市販されている。

### 3-1-3. 血清型別

莢膜抗原に対する血清型として a~f の 6 莢膜型ならびに非莢膜型 (Non-typable) に分類される。髄膜炎の主な起因型である血清型 b の莢膜を有する菌が、*H. influenzae* b 型、略して Hib と呼ばれ、ワクチンが存在する。a~f 型特異的免疫抗体による菌凝集試験により型を判別できる。市販抗血清として「インフルエンザ菌莢膜型別用免疫血清 生研 (デンカ生研)」がある。血清ロットあるいは菌株によって反応の強弱があるものの有用である。使用法は説明書に従う。a~f 型の抗血清のどれでも菌凝集が見られない株は、非莢膜型の可能性が高い。

血清型別特異遺伝子の PCR による増幅法も開発されている<sup>6)</sup>。a~f 型ならびに非莢膜型の菌株は、東京大学医科学研究所内、病原微生物資源室から教育用菌株の分譲がされている。

### 3-1-4. Hib ワクチン

*Haemophilus influenzae* 血清型 b 型菌 (Hib) に対するワクチンには、現在国内で任意接種されているものとして「乾燥ヘモフィルス b 型ワクチン (破傷風トキソイド結合体)」がある。Hib ワクチンの抗原は、Hib の莢膜多糖であるポリリボシルリビトールリン酸 (polyribosyl-ribitol-phosphate: PRP) である。PRP をはじめとする多糖抗原は、それ自体では、B 細胞が未熟な乳幼児における抗体誘導能が低い。そのため、PRP にキャリアタンパク抗原を結合させた結合体を抗原とし、T 細胞を介する免疫記憶等の働きを借りて免疫原性を高めている。当該ワクチンの場合、破傷風ワクチンに用いられている破傷風トキソイド (無毒化された破傷風トキシン) がキャリアタンパクとして用いられる。接種スケジュールは、標準として、初回 3 回接種 (2 ヶ月齢以上 7 ヶ月齢未満で 1 回目の接種を開始し、4-8 週間の間隔で 2 ならびに 3 回目の接種を行う) ならびに追加接種 (初回接種後おおむね 1 年の間隔をおいて接種する) であるが、開始年齢によるバリエーションがある。Hib ワクチンは、他のワクチンと混合させてはいけないうえに (免疫原性が低下する可能性がある)、他のワクチンとの同時接種の際には、別部位に接種される。血中の抗 PRP 抗体価の最小感染阻止レベルは、0.15  $\mu$ g/ml、長期感染阻止レベルは、1  $\mu$ g/ml とされている。

## 3-2. *Streptococcus pneumoniae* (肺炎球菌)

### 3-2-1. 菌の分離



5%ヒツジ血液寒天培地(5% CO<sub>2</sub> 存在下で 35-37°C培養)にコロニーを形成する。カタラーゼ陰性。

### コロニー形態

血液寒天培地、チョコレート寒天培地に生育する。α-溶血。

### 同定

#### 胆汁酸溶解試験

10%デオキシコール酸ナトリウムを菌液に等量加える。肺炎球菌であれば、通常、数秒-数十秒で菌の溶解がみられる。

#### オプトヒン感受性試験

SBA に純粋培養し、オプトヒンディスクを置く、大気、35C 一晚培養。肺炎球菌はオプトヒンディスクの周辺に 14mm 以上の阻止円をつくる。

胆汁酸溶解試験とオプトヒン感受性試験の結果が一致しないときは、前者の結果を優先する。

#### *lytA* 遺伝子検査

文献 7 に従い、*lytA* 遺伝子を増幅し、*Bsa*AI で切断後の泳動パターンにより、肺炎球菌の同定を行う。

### 薬剤感受性測定

詳細な記述は「ペニシリン耐性肺炎球菌のマニュアル」を参照。ここでは概説にとどめる。

薬剤感受性測定には平板法、微量液体希釈法、ディスク法、Etest、automated 法がある。製品を用いる測定法に関する QC は製造者によってなされている。製造者の示す手順を守ることが重要である。

平板法は、CLSI では認められていない。

微量液体希釈法、フローズンプレートやドライプレート（栄研化学）を用いて行う。

KB ディスク法、1 μg のオキサシリンディスクを使用することにより、ペニシリンGの感受性の判別ができるとされている。

Etest、製造者の指示に従い感受性測定を行う。あらかじめ薬剤ごとに微量液体希釈法との相関を見ておく必要がある。

Automated 法、very major error, major error, minor error の出現頻度は文献 8 と 9 を参照。

## 3-2-2. 抗原検出

### 尿中抗原キット

*Streptococcus pneumoniae* による呼吸器感染の診断用に尿中抗原検出キットが利用可能

である (Binax NOW *Streptococcus pneumoniae*)。 *S. pneumoniae* がコロナイズしている例で偽陽性が出るということが報告されている<sup>10)</sup>。肺炎球菌性髄膜炎診断にも有効であることが示されている。

### 3-2-3. 血清型別

2011年時点で、肺炎球菌には93の型が報告されている (Table 1)。膨潤法 (Quellung 法) による型別が標準である (Statens Serum Institute [Copenhagen, Denmark] 製血清が利用可能。また、日本国内では菌凝集による型別法用に血清が市販されている (デンカ生研、肺炎球菌夾膜型別用免疫血清) が、この方法では型別まではできない。

ここでは、標準法である Quellung 法による型別法を記載する。

新鮮コロニーを McFarland 0.5-1 程度の濁度になるように PBS でサスペンドする。

スライドグラスに菌液を少量 (1-2  $\mu$ l) スポットする。

0.05%メチレンブルー溶液を少量加えた後、血清 (1-2  $\mu$ l) を加え、カバーグラスをかける。

1000倍 (油浸) で鏡検し夾膜が膨潤して見える血清の型をその菌の型とする (図 1)。

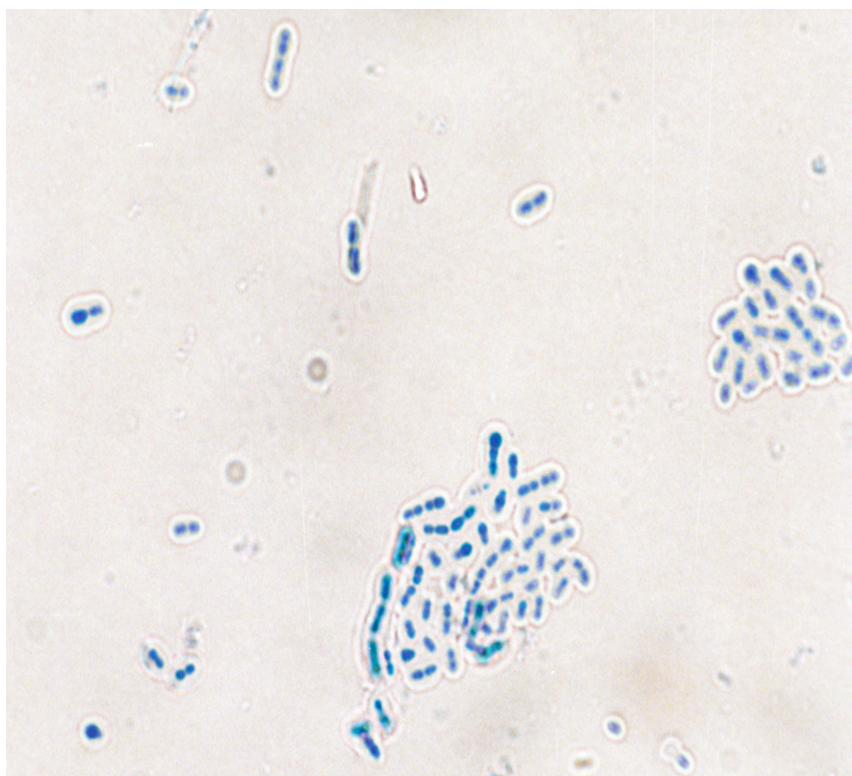


図 1 膨潤法による肺炎球菌の血清型別

23 価多糖ワクチンに含まれる血清型の型別は Statens Serum Institute 製の Pneumotest-Kit によっておこなうことができる。これは、いくつかの血清のプールとの反応性を調べるものである。手法は Type/Group 血清をもちいる方法と同じである。各プールに含まれる血清を Table 2 に示す。

Table 1 *S. pneumoniae* の血清型 (Danish)

---

Type	Group	Type	Group
1		24	(24F, 24A, 24B)
2		25	(25F, 25A)
3		27	
4		28	(28F, 28A)
5		29	
6	(6A, 6B, 6C, 6D)	31	
7	(7F, 7A, 7B, 7C)	32	(32F, 32A)
8		33	(33F, 33A, 33B, 33C, 33D)
9	(9A, 9L, 9N, 9V)	34	
10	(10F, 10A, 10B, 10C)	35	(35F, 35A, 35 B, 35C)
11	(11F, 11A, 11B, 11C, 11D, 11E)	36	
12	(12F, 12A, 12B)	37	
13		38	
14		39	
5	(15F, 15A, 15B, 15C)	40	
16	(16F, 16A)	41	(41F, 41A)
17	(17F, 17A)	42	
8	(18F, 18A, 18B, 18C)	43	
19	(19F, 19A, 19B, 19C)	44	
20		45	
21		46	
22	(22F, 22A)	47	(47F, 47A)
23	(23F, 23A, 23B)	48	

Table 2 Pneumotest-kit に含まれる血清

Pool serum	SGTs <sup>a</sup> in pool					Non-vaccine SGTs <sup>a</sup>
	P	Q	R	S	T	
A	1	18	4	5	2	
B	19	6	3	8		
C	7				20	24, 31, and 40
D			9		11	16, 36, and 37
E			12	10	33	21 and 39
F				17	22	27, 32, and 41
H	14	23		15		13 and 28

a, Serotypes and serogroups

### 3-2-4. ワクチン

#### 肺炎球菌ポリサッカライドワクチン(成人用)

23種類の莢膜抗原を含む多糖ワクチンニューモバックスNPは、1983年に米国で承認され、日本では1988年から販売された。接種対象者は2歳以上で肺炎球菌による重篤疾患に罹患するリスクが高い方である。このワクチンの成分は多糖であるため、T細胞非依存性の抗体産生を惹起する。T細胞のメモリー効果はない。日本では、再接種が禁忌とされていたが、2009年10月に再接種が可能となった。基礎疾患のある方、慢性呼吸器疾患のある方は、5年毎の追加接種が認められている。

#### 肺炎球菌コンジュゲートワクチン(小児用)

血清型4、6B、9V、14、18C、19Fおよび23Fの莢膜多糖に、無毒化したジフテリア毒素(CRM<sub>197</sub>)をキャリアタンパクとして結合させて作成したワクチンである。日本では2010年2月から販売され、生後2か月以上9歳以下の小児を接種対象者とする。肺炎球菌コンジュゲートワクチンの効能・効果は、ワクチンに含まれている血清型の肺炎球菌に起因する侵襲性感染症の予防である。接種スケジュールは、標準として、初回3回接種(2ヶ月齢以上7ヶ月齢未満で1回目の接種を開始し、27日間以上の間隔を開けて2ならびに3回目の接種を行う)、3回目接種から60日間以上の間隔を開けて1回の追加接種で接種が完了する。肺炎球菌コンジュゲートワクチンを他のワクチンと同時に接種することは可能である。ただし、1本の注射器にて他のワクチンと混合して接種することはできない。

### 3-3. *Streptococcus agalactiae* (B群連鎖球菌、group B Streptococcus: GBS)

#### 3-3-1. 菌の分離

ヒツジ血液寒天培地(5% CO<sub>2</sub>存在下で35-37°Cにて培養)にコロニーを形成する。

#### コロニー形態

比較的大きな扁平なコロニーを一晩で形成する。溶血性は多くの株が弱いβ溶血(α')であるが、ときにγ溶血(非溶血)を示す株もある。

#### グラム染色性

グラム陽性球菌

#### 同定

カタラーゼ陰性。現在、ヒトから分離されるレンサ球菌では、Lancefield B群に該当するのはひとつの菌種(*S. agalactiae*)のみである。Lancefield血清型別は市販ラテックスキットプロレックス「イワキ」レンサ球菌[イワキ]または市販血清によって可能である。生化学的性状をベースとしたApi 20 Strep (bioMérieux)キットを用いて同定は可能である。

試験方法は製品添付のマニュアルを参照する。

### 3-3-2. 血清型別

多糖体抗原として、Ia, Ib, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX、蛋白抗原として c, R, X がある。デンカ生研から販売されている「B 群溶血レンサ球菌型別用免疫血清」には、Ia, Ib, II, III, IV, V が含まれており、B 群溶血レンサ球菌型別用免疫血清 NT6 (VI) 型、B 群溶血レンサ球菌型別用免疫血清 JM9 (VII) 型、および B 群溶血レンサ球菌型別用免疫血清 7271 (VIII) 型による血清型別が可能である。試験方法は製品添付のマニュアルを参照する。IX 型は PCR 法によって同定可能である<sup>11)</sup>。

### 3-4. その他の起因菌

#### *Streptococcus gallolyticus* subsp. *pasteurianus*

##### 菌の分離

ヒツジ血液寒天培地 (5% CO<sub>2</sub> 存在下で 35-37°C にて培養) にコロニーを形成する。円形の無着色コロニー、α 溶血又は γ 溶血 (非溶血) である。

##### グラム染色性

グラム陽性球菌

##### 同定

カタラーゼ陰性。Lancefield D 群に該当する。Lancefield 血清型別は市販ラテックスキット (プロレックス「イワキ」レンサ球菌 [イワキ]) によって可能である。生化学的性状をベースとした Api 20 Strep (bioMérieux) キットを用いることにより、*S. bovis* biotype II/2 または *S. gallolyticus* subsp. *pasteurianus* を同定することが可能である。エスクリン分解陽性、tannase 陰性により<sup>12)</sup>、*S. gallolyticus* subsp. *gallolyticus* と区別することができる。tannase 活性の試験方法は、文献 12 の記述を参照する。

#### *Escherichia coli* (大腸菌)

培養、同定、感受性、他項を参照

#### *Neisseria meningitidis* (髄膜炎菌)

髄膜炎菌感染症の項目を参照

### 3-5. 菌培養陰性髄液からの菌遺伝子増幅法

髄液から抽出した DNA を鋳型に用いる。遺伝子増幅法として、nested PCR ならびにリアルタイム PCR が開発されている。

Nested PCR 法: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus agalactiae*, *Neisseria meningitidis* の 4 種の検出法。16-23S rRNA 遺伝子間領域配列を用い、1st PCR 用プライマーは全種共通で、2nd PCR が種特異的に設計されている。上記 4 種の

DNA を陽性対照として同時に解析し、増幅バンドサイズが予想サイズと同じ、かつ陽性対照と同じであることを確認する。増幅バンドが得られても、そのサイズが陽性対照と異なる場合には、必要に応じて、増幅遺伝子の配列決定を実施すること<sup>14)</sup>。

リアルタイム PCR 法 : *Haemophilum influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis* についてのマルチプレックス リアルタイム PCR<sup>15)</sup>。 *Streptococcus agalactiae* についての系<sup>16)</sup>。

#### 4. 参考情報

##### マイコプラズマやウレアプラズマによる髄膜炎疫学

マイコプラズマ・ウレアプラズマは、小型な細菌で、細胞壁を欠き脂質二重膜とリポ蛋白からなる細胞膜で被われている。ヒトから分離される種は、ヒト-ヒト間のみの感染経路を有する。感染により肺炎等の呼吸器疾患や尿道炎を起こす種(*Mycoplasma pneumoniae* 肺炎マイコプラズマや *Mycoplasma genitalium*)がある一方、口腔あるいは泌尿・生殖器の常在菌種も複数ある(*Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* や *Ureaplasma parvum*)。妊婦 351 人の臍帯血中、43 人で *U. urealyticum* が、21 人で *M. hominis* が、18 人で両方の種が検出されたという報告もある<sup>17)</sup>。マイコプラズマやウレアプラズマによる髄膜炎には、1)母親の常在菌種が新生児に侵襲性感染を起こす *M. hominis* や *U. urealyticum* による髄膜炎と、2) *M. pneumoniae* 感染による呼吸器疾患に併発する、あるいは肺外発症としての髄膜炎がある。マイコプラズマやウレアプラズマによる髄膜炎は、一般に髄液細胞の増加等が穏やかで、無菌性髄膜炎の範疇に診断されることも多い。新生児 *M. hominis* 髄膜炎 29 例のレビューによれば、症例により差があるとはいえ、髄液細胞数の増加、蛋白量の増加、糖量の減少という細菌性髄膜炎の検査所見を満たす例も複数ある。重症化については、29 例中 10 例 (34%) で中枢神経系の合併症、8 例 (28%) で神経の後遺症、3 例 (10%) で半身不随 (うち 1 例は梗塞によるもの) があり、8 例 (28%) が死亡している<sup>18)</sup>。マイコプラズマやウレアプラズマによる髄膜炎の臨床における診断が困難なことから、疫学については不明な点も多い。

##### チョコレート寒天・血液寒天の培養期間と *M. hominis* の分離

*Mycoplasma hominis* は、チョコレート寒天平板培地あるいはヒツジ血液寒天平板培地上 (5% CO<sub>2</sub> 存在下で 35-37°C 培養) に微小コロニーを形成する。発育速度が遅いため、コロニー形成には、1-2 日の培養では不十分で、少なくとも 3 日間以上の培養が必要となる<sup>19)</sup>。ウレアプラズマは、これらの培地には生育しない。

##### コロニー形態

*Mycoplasma hominis* は、チョコレート寒天平板培地あるいはヒツジ血液寒天平板培地においては、針の先ほどの微小コロニーを形成し、目玉焼き状にはならない。確認には、別途作製するマイコプラズマ用培地に継代培養を行う。

##### グラム染色性

マイコプラズマもウレアプラズマも細胞壁を欠くことからグラム染色の対象にならない。

### マイコプラズマ用培地での確認培養

マイコプラズマ用の Hayflick 変法液体培地（PPLO 液体培地）ならびに PPLO 寒天培地の組成については、「肺炎マイコプラズマ診断マニュアル」を参照いただきたい。

PPLO 液体培地にチョコレート寒天平板培地等上のコロニーを寒天ごとかき取り植え継ぐ（無菌操作で行う）。ブドウ糖添加 PPLO 液体培地ならびにアルギニン添加 PPLO 液体培地の2種類の培地を作製し、それぞれに植えつぐ。PPLO 液体培地を数日～2週間培養し、色調変化があれば、培養液を生理食塩水にて希釈し、PPLO 寒天平板培地に植え継いで1～2週間培養し、目玉焼き状コロニーを確認する。マイコプラズマ用 PPLO 培地作製法ならびに培養・保存法については、「肺炎マイコプラズマ検査マニュアル」を参照のこと。マイコプラズマの培養が困難な場合、チョコレート寒天平板培地等を3日間以上培養して出現した微小コロニーを寒天ごとかきとり、DNA を抽出して鋳型とし、マイコプラズマ遺伝子増幅法を実施することもできる。

### ウレアプラズマの培養

ウレアプラズマ用培地例としては、以下のようなものがある。

増菌液体培地：ウレア アルギニン LYO2（シスメックス・ビオメリュー社）

寒天平板培地 A7 マイコプラズマ寒天培地（同上）

成書にあるウレアプラズマ用の液体培地例の組成

変法 Taylor-Robinson の培地（1リットルあたりの組成）

#### 基礎培地

PPLO broth w/o CV（マイコプラズマブロス基礎培地：クリスタルバイオレット無添加 PPLO ブロス、Difco 255420, Becton Dickinson）21g

精製水 700ml

pH 6.0 に修正し、121°C で 15 分間高圧蒸気滅菌する。約 50°C 以下に冷えたら、無菌的に以下のものを加える。

ウマ血清 200 ml

25 % 新鮮酵母エキス 100 ml

10 % 尿素液 10 ml

0.4 % フェノールレッド液 10 ml

ペニシリン G カリウム 100 万単位

(2.5 % 酢酸タリウム溶液\* 5 ml)

\*毒性があるので、取り扱いに注意。酢酸タリウムは必須ではない。

培養は、37±1°C にて 5～10% 炭酸ガス存在下で行う（炭酸ガスインキュベーターあるいは、炭酸ガスのガスパックをジャーに入れて培養する）

### マイコプラズマ・ウレアプラズマ遺伝子増幅法

菌のコロニーから抽出した DNA を鋳型として用いる。

Nested PCR: 16S-23S rRNA 遺伝子間領域配列による複数種の検出用

培養細胞への混入マイコプラズマ種を検出するために開発された方法だが、*Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma fermentans*, *Mycoplasma salivarium*, *Mycoplasma orale*, *Ureaplasma urealyticum* 等多くの種の検出が可能なることから、スクリーニングに使用できる。さらに、増幅 DNA 産物の配列を決定し BLAST 検索にかけることで種の推定ができる。ただし、*M. pneumoniae* の検出には不適である。日本薬局方 16 局の参考情報に記載され、類似配列を利用したプライマーが Takara Mycoplasma Detection set として市販されている(タカラバイオ社)。プライマー配列は公開されている。

### ***Mycoplasma hominis* 用 PCR 法の例**

1 段階 PCR 法 (文献 20)

MYCHOMP: 5'-ATACATGCATGTCGAGCGAG-3'

MYCHOMN: 5'-CATCTTTTAGTGGCGCCTTAC-3'

増幅サイズ 170bps

### **リアルタイム PCR 法の例**

文献 21 を参照。

## **5. 引用文献**

- 1) Hib (インフルエンザ菌 b 型) 侵襲性感染症と Hib ワクチン、病原体検出情報 31: 92-93, 2010
- 2) 神谷 齋、中野貴司、小児における侵襲性細菌感染症の全国サーベイランス調査、病原体検出情報 31: 95-96, 2010
- 3) 大日康史、菅原民枝、多屋 馨子、山本久美、佐藤 弘、安井良則、岡部信彦、「Hib (b 型インフルエンザ菌) 感染症発生データベース」による Hib 感染症の動向、病原体検出情報 31: 97-98, 2010
- 4) 厚生労働省科学研究費補助金 ワクチンの有用性向上のためのエビデンスおよび方策に関する研究(研究代表者 神谷齋)平成 21 年度総括・分担研究報告書
- 5) 穿刺・髄液検査 第 3 章 II 235-259. 臨床検査法提要 第 3 1 版、金原出版
- 6) Falla, T. J., Crook, D. W. M., Brophy, L. N., Maskell, D., Kroll, J. S. and Moxon, E. R. PCR for capsular typing of *Haemophilus influenzae*. *J. Clin. Microbiol.* 32: 2382-2386, 1994
- 7) Llull, D., López R., García E. Characteristic signatures of the *lytA* gene provide a basis for rapid and reliable diagnosis of *Streptococcus pneumoniae* infections. *J. Clin. Microbiol.* 44 :1250-1256, 2006



- 8) de Cueto M., Ceballos E., Martinez-Martinez L., Perea E.J., Pascual A. Use of positive blood cultures for direct identification and susceptibility testing with the vitek 2 system. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3734-3738, 2004
- 9) Lupetti A., Barnini S., Castagna B., Capria A. L., Nibbering P. H. Rapid identification and antimicrobial susceptibility profiling of Gram-positive cocci in blood cultures with the Vitek 2 system. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 89-95, 2010.
- 10) Dowell, S. F., Garman, R. L., Liu, G., Levine, O. S., Yang Y. H. Evaluation of Binax NOW, an assay for the detection of pneumococcal antigen in urine samples, performed among pediatric patients. *Clin. Infect. Dis.* 32: 824-825, 2001
- 11) Slotved, H. C., Kong, F., Lambertsen, L., Sauer, S., Gwendolyn L. Gilbert, G. L. Serotype IX, a proposed new *Streptococcus agalactiae* serotype. *J. Clin. Microbiol.* 45: 2929–2936, 2007
- 12) Osawa, R., Fujisawa, T., Sly, L. I. *Streptococcus gallolyticus* sp. nov.; gallate degrading organisms formerly assigned to *Streptococcus bovis*. *Syst. Appl. Microbiol.* 18: 4–78, 1995
- 13) 日本結核病学会抗酸菌検査法検討委員会、新結核菌検査指針、財団法人結核予防会、2000
- 14) Hall, L. M., Duke, B., Urwin, G. An approach to the identification of the pathogens of bacterial meningitidis by the polymerase chain reaction. *Eur. J. Microbiol. Infect. Dis.* 14: 1090-1094, 1995
- 15) Abdeldaim, G. M. K., Strålin, K., Korsgqrd, J., Blomberg, J., Welinder-Olsson, C., Herrmann, B. Multiplex quantitative PCR for detection of lower respiratory tract infection and meningitis cause by *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae* and *Neisseria meningitidis*. *BMC Microbiology* 10: 310, 2010
- 16) Bergseng, H., Bevanger, L., Rygg, M., Bergh, K. Real-time PCR targeting the sip gene for detection of group B streptococcus colonization in pregnant women at delivery. *J. Medical Microbiol.* 56: 223-228, 2007
- 17) Goldenberg, R. L., Andrews, W. W., Goepfert, A., Faye-Petersen, O., Cliver S. P., Carlo, W. A., Hauth, J. C. The Alabama preterm birth study: Umbilical cord blood *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* cultures in very preterm newborns. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 198: 43.e1-43.e5, 2008
- 18) Hata, A., Honda, Y., Asada, K., Sasaki, Y., Kenri, T., Hata, D. *Mycoplasma hominis*

meningitis in a neonate; case report and review. J. Infect. 57: 338-343, 2008

19) 田中洋輔、佐々木裕子、和田昭仁、安西桃子、秋田博伸、子宮筋腫核手術施行後に *Mycoplasma hominis* 腹膜炎を認めた 1 例、感染症顎雑誌 35 : 275-279、2011

20) Pascual, A., Jatón, K., Ninet, B., Bille, J., Greub, G., New diagnostic real-time PCR for specific detection of *Mycoplasma hominis* DNA. Int. J. Microbiol. 2010. ID 317512, 2010

21) Grau, O., Kovacic, R., Griffais, R., Launary, V., Montagnier, L. Development of PCR-based assays for the detection of two human mollicute species, *Mycoplasma penetrans* and *M. hominis*. Mol. Cell. Probes 8: 139-147, 1994

## 6. 執筆者

神奈川県衛生研究所 微生物部

黒木俊郎

渡辺祐子

国立感染症研究所 細菌第一部 第三室

和田昭仁

常 彬

国立感染症研究所 細菌第二部 第二室

佐々木裕子

### 問い合わせ先

国立感染症研究所 細菌第一部 第三室

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

国立感染症研究所 細菌第二部 第二室

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

神奈川県衛生研究所 微生物部

〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎下町屋 1-3-1