

髄膜炎菌 *N. meningitidis* 検査マニュアル

(一部 淋菌 *N. gonorrhoeae* を含む)

輸送・保存、及びPCRを用いた簡易検査法に関しては「新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業、『マスギャザリングにおける髄膜炎菌感染症の検査体制強化に資する開発研究』」の研究活動の元、実技編の後に「簡易マニュアル」として最新の手法を掲載した(2019年)。

目次

解説編

概説

I. 疫学情報

1. 世界的疫学状況
 - 1) 血清群別発生状況
 - 2) 地域別発生状況
2. 国内疫学状況

II. 髄膜炎菌性髄膜炎の臨床症状

III. 病原性 *Neisseria* 属菌の特徴

1. *Neisseria* 属菌の特徴
2. 髄膜炎菌の特徴
3. 淋菌の特徴

IV. 作業上の一般的注意

1. 安全管理
2. 髄液の採取
3. 病原性 *Neisseria* の取り扱い
 - 1) 釣菌、培養
 - 2) 鑑別
 - 3) 保存
4. 検査に要する日数

V. 試薬と器材

1. 試薬
 - 1) グラム染色用試薬
 - 2) 抗原検出用試薬
 - 3) 輸送培地
 - (1) Transgrow 培地
 - (2) Trans-Isolate 培地
 - (3) 変法 Stuart 培地
 - 4) 増菌培地
 - 5) 二層培地
 - 6) 分離継代培地
 - (1) チョコレート寒天培地
 - (2) 血液寒天培地
 - (3) Kellogg 寒天培地
 - 7) 選択培地
 - (1) Modified Thayer-Martin 培地

- (2) New York City 培地
- 8) 生化学的性状確認培地
 - (1) Cystine Trypticase agar 培地
 - (2) 硝酸塩・亜硝酸塩還元試験用培地
 - (3) 食塩無添加普通寒天培地
 - (4) シュークローズ加寒天培地
 - (5) DNA 分解酵素産生性試験用培地
- 9) オキシダーゼ試験用試薬
- 10) カタラーゼ試験用試薬およびスーパーオクソール試験用試薬
- 11) 血清群別用抗血清
- 12) 酵素活性検出試薬
- 13) 分子遺伝学的手法用試薬・
- 14) ペニシリン分解酵素産生性試験用試薬
- 2. 器材・
 - 1) 検体の輸送
 - 2) 培養
 - 3) 菌株の保存

VI. 分離同定

- 1. 推定
 - 1) 髄液の染色
 - 2) 膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物
 - 3) 抗原検出
- 2. 菌の分離
 - 1) 分離の対象となる検体・
 - 2) 髄液からの分離
 - 3) 血液からの分離
 - 4) 髄液、血液以外の検体からの分離
- 3. 鑑別・同定
 - 1) オキシダーゼ試験およびグラム染色
 - 2) カタラーゼ試験およびスーパーオクソール試験
 - 3) 糖からの酸産生性
 - 4) 硝酸塩・亜硝酸塩還元性
 - 5) 各種培地での発育
 - 6) シュークローズからの多糖体産生性
 - 7) DNA 分解酵素産生性
 - 8) 酵素プロファイルによる鑑別・同定
 - 9) ペニシリン分解酵素産生性試験
 - 10) 同定用キットによる鑑別
- 4. 髄液からの PCR 法による検出
- 5. 淋菌の分子遺伝学的手法による検出
- 6. 血清型別
 - 1) 血清群
 - 2) typing および subtyping
- 7. Multilocus enzyme electrophoresis および Multilocus sequence typing
- 8. 栄養要求型

VII. 検体の輸送方法

- 1. 髄液および血液等の送付方法

- 1) 髄液の輸送方法
- 2) 血液の輸送方法
- 3) その他の臨床検体の輸送方法
2. 菌株の送付方法
 - 1) 培養菌
 - 2) 保存菌株

VIII. 菌株の保存方法

1. 一時的保存
2. 短期保存
 - 1) 綿棒保存
 - 2) 簡易保存法
3. 長期保存
 - 1) ゼラチン・ディスク法
 - (1) ゼラチン・ディスク法用試薬
 - (2) 必要な器材
 - (3) ディスクの調製法
 - (4) ディスクの溶解
 - (5) 保存期間
 - 3) 凍結保存法
 - 4) 凍結乾燥法

IX. 感染症発生動向調査事業における検査の進め方

1. 検体を受領する場合
2. 菌株を受領する場合

X. 文献

実技編

I. 検査の流れ

II. 検体の採取、検査手技

1. 髄液、皮膚穿刺液、関節腔液
2. 血液
3. 喀痰
4. (鼻) 咽頭粘液
5. 膣・子宮頸管分泌物
6. 尿道分泌物
7. 直腸粘液・

III. 菌の分離、同定・鑑別

1. 分離菌の同定・鑑別作業日程の目安
2. 釣菌
3. グラム染色
4. オキシダーゼ試験
5. カタラーゼ試験、スーパーオクソール試験
6. 糖からの酸産生性
7. 硝酸塩・亜硝酸塩還元性

8. 多糖体産生性試験
9. 各種培地での発育性
10. DNA 分解酵素産生性試験
11. 群別用血清凝集反応

概説

髄膜炎菌はグラム陰性球菌ナイセリア科に属する菌として分類される。髄膜炎菌は人にのみ感染し、人の鼻咽頭に定着してくしゃみ等の飛沫感染を介して人から人へ伝播する。化膿性髄膜炎の起炎菌としては髄膜炎菌の他にインフルエンザ菌、肺炎球菌、大腸菌 K-1 株などがあるが、流行性の髄膜炎を起こすのは髄膜炎菌のみであるため、髄膜炎菌性髄膜炎は流行性髄膜炎とも呼ばれる。

I 疫学情報

1. 世界的疫学状況

世界では髄膜炎菌に因る症例は毎年 30 万人に上り、その 10%にあたる 3 万人もの人々が命を落としている²⁾。髄膜炎菌は莢膜多糖体の種類によって少なくとも 13 種類 (A, B, C, D, X, Y, Z, E, W-135, H, I, K, L) の血清群 (Serogroup) に分類されているが、髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌としては A, B, C, Y, W-135 群が認められている。その中でも A, B, C 群の髄膜炎菌が大規模の髄膜炎菌性髄膜炎の起炎菌として一般的に多く認められる。

しかし、近年はイスラム教徒のメッカ巡礼からの帰国者による W-135 の流行やアフリカでの serogroup X 髄膜炎菌株による症例の増加など、過去の通例とは異なった症例も認められるようになってきた。

1) 血清群別発生状況

A 群髄膜炎菌による流行は歴史的に見ても髄膜炎ベルト (meningitis belt) と呼ばれる、降雨量が毎年 300mm から 1000mm である赤道北部のアフリカ諸国に最も多く認められる。今までの大規模な流行としては Rwanda (1978)、Sudan, Ethiopia (1988-89)、Kenya, Burundi (1989-92)、Burkina Faso (1996-97)、Nigeria (1996) が挙げられる。アフリカ以外では Finland (1973)、Brazil (1974)、Mongolia (1973)、Nepal (1983) で流行が起こっている。その発生率は先進国では 10 万人あたり 15 人以下と低いが、発展途上国では 1000 人あたり 1 人と異常に高く、2 歳以下の乳幼児に至っては 100 人あたりに 1 人となり、全体的に人口の 1%に相当する人々が罹患していると推測されている。一般的に小規模な髄膜炎菌性髄膜炎の流行に際しては乳幼児が感染の危険率が最も高いが、大規模なものになると乳幼児はもちろん 10-20 代の若年層まで感染する可能性が高くなる。

B 群髄膜炎菌による流行は主として 1970 年代の Norway, Finland 等の北ヨーロッパ諸国で大規模な流行が起こっている。それ以降はヨーロッパや北米といった先進国の地域で小規模な流行が散発的に起こることが多く、罹患率は 10-50 人/10 万人と A 群に比べると低い。

C 群はヨーロッパや南北アメリカ、アフリカの一部で散発的で小規模な発生を引き起こす起炎菌としてよく認められる。しかし、1999 年のイギリスので C 群 conjugated ワクチンの導入とその成果を期にヨーロッパ諸国や北米、そしてオーストラリアといった欧米諸国も C 群 conjugated ワクチン導入を行ない、2010 年代には C 群髄膜炎菌による髄膜炎菌性感染症の症例は激減している。

2) 地域別発生状況

アフリカでは髄膜炎ベルトで流行性髄膜炎が頻繁に発生するが、そのほとんどが A 群髄膜炎菌に因るものである。小規模な流行は毎年乾期において発生しており、大規模な流行は過去 50 年間においては 8 年から 12 年ごとに周期的に起こっている。1970 年から 1992 年にまでの統計においては、約 80 万人の患者が発生したと推定されている。

ヨーロッパでは 1970 年代に Norway, Finland で B 群髄膜炎菌による髄膜炎菌性髄膜炎が大流行した。1980 年以降においても各地で B 群及び C 群髄膜炎菌による小規模な流行が散発的に起こっている。記憶に新しいところでは 1998 年に英国で大発生した C 群髄膜炎菌性髄膜炎の流行が挙げられるが、その時には 1530 名もの患者が発生し、子供や若い世代を中心に 150 名もの死亡者が出たと報告されている。

1990 年代前半までは、アラブ諸国での発生率は高く、Iraq, Pakistan や Egypt では各国で約 5000 人/年、次いで Iran, Saudi Arabia で約 500 人/年の患者が見られていた。それ以降は WHO が中心となってハイリスクな血清群のワクチンの予防接種を強力に進めているため、髄膜

炎菌性髄膜炎の流行は激減してきている。しかし、この地域には世界各国から巡礼に訪れるイスラム教徒がこの地域で感染し、帰国後巡礼者自身、さらにはその近縁者が発症する例が多く認められている。特に 2000 年に入ってから、Mecca から帰国した巡礼者によって伝播されたと推測される髄膜炎菌性髄膜炎の発症例が欧州や米国などで次々と報告され、そのほとんどが W-135 群という、流行性髄膜炎の起炎菌としては比較的稀な血清群であることが明らかとなっている。

2. 国内疫学状況

国内では髄膜炎菌性髄膜炎の症例は戦前は 4000 例以上あったが、戦後は急速に減少し、現在は年間 10 例ほどが報告されているのみである。日本においては髄膜炎菌は健常者からは 100 人あたり数人程度の割合で単離され、その単離株は B 群、Y 群であることが多く、発症患者からの起炎菌も B 群及び Y 群が多く認められ、稀に C 群や W-135 群も単離される。日本においては感染症法に基づいて報告される髄膜炎菌性髄膜炎の臨床報告は年間 10～20 例程度であるが、その適用は髄膜炎発症例に限定されているため、実際の髄膜炎菌による感染例の例数把握は不完全であると考えられている。事実、感染症法に髄膜炎菌性感染症が導入された 1999 年から 2010 年まで単発例の髄膜炎菌性感染症しか報告されてこなかったが、2011 年 5 月に宮崎県の高校の寮で髄膜炎菌性敗血症を主症状とする死亡者 1 名、患者 5 名を含む集団感染事例が発生した例も認められた。

II. 髄膜炎菌性髄膜炎菌の臨床症状

髄膜炎菌はヒト以外からは分離されない。感染ルートとしては患者もしくは保菌者から飛沫感染が考えられる。保菌者が必ずしも発病するわけではなく、健常保菌者と発病者の間にどのような相違があるかはまだ解明されていない。

発病する場合には気道粘膜を介してまず血中に侵入し、高熱や皮膚、粘膜における出血斑、関節炎等の症状が呈する菌血症（敗血症）を起こす。さらに頭痛、吐き気、精神症状、発疹、項部硬直などの主症状を呈する髄膜炎に発展する。この時髄液検査では数百～数千に上る多核球優位の細胞増加、糖量減少、蛋白増加がみられる。また、劇症型とよばれる突然発症する急性の髄膜炎菌性髄膜炎もあり、頭痛、高熱、けいれん、意識障害を呈し、DIC（汎発性血管内凝固症候群）を伴いショックに陥って死に至る Waterhouse-Friderichsen 症候群も稀に認められる。

菌血症だけで治癒し、髄膜炎を起こさない場合もあるが、髄膜炎を起こした場合には、治療を施さないとその死亡率はほぼ 100%に達する。抗生物質が有効であるので、早期に適切な治療を施せば治癒する。潜伏期間は3～4日とされている。

III. 病原性 *Neisseria* 属菌の特徴

1. *Neisseria*属菌の特徴

Neisseria 属の菌種は、グラム陰性のそら豆状の球菌 (*N. elongata* は桿状) であり、非運動性で芽胞は形成しない。オキシダーゼ及びカタラーゼ反応は陽性 (*N. elongata* はカタラーゼ反応陰性) である。好気性で、多くは発育に際し CO₂ を要求する。一般に生体外での生物活性は弱く、生存は難しいとされている。温血動物の粘膜に生息し、特に淋菌と髄膜炎菌がヒトに対して病原性を示す。

集落の大きさは 0.5~2mm ほどで、正円、灰白色、半透明で光沢のある集落を呈する。多くは色素を産生しないが、一部の菌種は黄色色素を産生する。

2. 髄膜炎菌の特徴

髄膜炎菌は直径 0.6~0.8 μm で、そら豆状の球菌が相対する双球菌である。集落は 1~2mm で、淋菌に比べるとやや発育がよい。灰白色、半透明、光沢あるやや隆起した正円形の集落を形成する。A群およびC群株の集落はムコイド状になる。集落は粘稠で柔らかい。

髄膜炎菌はヒトの呼吸器系分泌物の飛沫で感染する。感染すると感染者の鼻咽腔に定着して健康保菌者となるか、軽度の鼻咽頭炎や髄膜刺激症状を呈することがある。粘膜から血中に入り菌血症や敗血症、脳脊髄膜炎を起こし、劇症型では皮膚、粘膜に出血斑を伴ってショック症状と播種性血管内凝固症候群 (DIC)、多臓器不全によって数時間から 1、2 日以内に死亡する (Waterhouse-Friderichsen 症候群)。他に上気道炎、肺炎、関節炎、膣・子宮頸管炎がある。

検査材料には、血液、髄液、鼻咽頭粘液、喀痰、皮膚穿刺液、関節腔液、中耳分泌物などが挙げられ、稀に尿道分泌物、膣・子宮頸管分泌物、直腸粘液から分離されることがある。患者の症状に合わせて検査材料を選択する。

3. 淋菌の特徴

淋菌は直径 0.6~1 μm の腎形またはそら豆状の球菌で、双球菌としてみられる。集落は直径 0.5~1mm くらいで、髄膜炎菌に比べてやや小さい。髄膜炎菌同様、集落は粘稠で柔らかく、18 時間を超えて培養すると自己融解によりさらに粘稠となり、培地からの釣菌が難しくなる。その集落型は T1~T4 型に分けられ、分離当初は T1、T2 型が主で、継代により集落型が T3、T4 に変化する。T1、T2 は小さく、灰白色から白色、光沢があるが不透明な隆起した集落である。T3、T4 は大きく、やや扁平で光沢はないがやや透明感のある集落である。栄養要求型の AHU 型は集落が小さく (0.25mm)、発育が遅い。

淋菌は代表的な性感染症 (STD) の原因菌であり、泌尿生殖器感染症、直腸炎、咽頭炎、播種性淋菌感染症 (disseminated gonococcal infection; DGI)、骨盤内炎症性疾患、新生児眼炎などの起原菌となる。検査材料として、尿道分泌物、膣・子宮頸管分泌物、直腸粘液、鼻咽頭粘液、気管支吸引液、結膜・中耳分泌物、関節腔液、血液、髄液などが挙げられる。髄膜炎菌同様、患者の症状に合わせて検査材料を選択する。

IV. 作業上の一般的注意

1. 安全管理

髄膜炎菌と淋菌を検査するには、バイオセーフティーレベル 2 の基準を満たした条件で扱い、安全上の管理を十分に行わなければならない。

2. 髄液の採取

多くの場合髄液が検査の対象となるが、必要以上の髄液の採取は患者にとって危険であるため、採取量は最小限にとどめなければならない。この点を考慮して医療機関における検査を優先し、残りの髄液を感染症発生动向調査事業に活用するか、または検体輸送が難しいことを考え合わせて、医療機関あるいは検査機関における分離菌の分与を受けることも一法である。

3. 病原性 *Neisseria* 属菌の取り扱い

病原性 *Neisseria* 属菌は注意深く取り扱わないと分離、培養、鑑別、保存が困難となる。

1) 釣菌、培養

分離・継代には白金線や白金耳の先に見える程度の菌体を採取して培地に接種し、培養する。病原性 *Neisseria* 属菌は栄養要求性が高く、適した培地を使用しなければならない。

培養するには、5%程度の CO₂ と 70~80%程度の湿度が必要である。寒天平板は厚めに作製し、表面は乾燥しすぎないように注意して、乾燥により表面にシワの寄った平板の使用は避ける。

CO₂ インキュベータ、CO₂ ジャーあるいはロウソク培養により CO₂ 濃度を高め、湿らせたガーゼを置くなどして加湿する。

病原性 *Neisseria* 属菌は自己融解しやすいので、菌株の性状試験、継代あるいは保存には 16~18 時間培養菌を使用する。培養時間が長くなると集落は粘性が高くなり、釣菌や集菌が困難となる。

2) 鑑別

性状試験用培地は病原性 *Neisseria* 属菌に適したものをを用い、大量に菌を接種する。市販のキットを使用する場合には説明書に従う。

3) 保存

菌株の保存は腸内細菌等と比較するとかなり難しく、平板や高層培地で保存することはできないので、適した保存方法を採用しなければならない。

培地上の病原性 *Neisseria* 属菌は死滅しやすいので、冷蔵しても 2 日が保存のめどである。

菌株の安定的な保存は凍結によるが、この場合新鮮培養菌を大量に必要とする。

4. 検査に要する日数

検体の採取から菌の分離までの培養に 1~2 日、継代に 1 日、性状確認による確定に 1 日を要する。したがって菌種を決定するのに 4~7 日、血液の増菌を行えばさらに 1~2 日以上を要する。

V. 試薬と器材

1. 試薬

1) グラム染色用試薬

髄液や膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物あるいは分離菌の染色に Hucker の変法を用いる¹⁾。

2) 抗原検出用試薬

髄液等から髄膜炎菌抗原として髄膜炎菌の莢膜多糖体を検出するラテックス凝集試験 (bioMerieux、BioRad) の試薬が以前は市販されていたが、2011 年現在は販売中止となっている。

膣・子宮頸管分泌物あるいは尿道分泌物から淋菌抗原を検出する方法として、酵素抗体法用キット (Abbott) がある。

3) 輸送培地

(1) Transgrow 培地

後述の Modified Thayer-Martin 培地と同じ処方であるが、寒天を増量して強度を増し、輸送に適した形態の容器に作製され、CO₂が充填された市販品がある。

(2) Trans-Isolate 培地 (T-I 培地)

液状部と固相部からなる、増菌および輸送用培地である²⁾。細菌性髄膜炎の原因である髄膜炎菌、インフルエンザ菌および肺炎球菌等の栄養要求性の高い細菌を髄液から分離する場合に用いることができる。密栓をして 25~37℃で 1~2 週間程度菌は生存する。25℃よりも温度が低いと、菌は死滅しやすい。通気性の栓を使用すれば生存期間は延びるとされているが、乾燥に注意しなければならない。

作製手順

①3-(N-morpholino)propanesulfonic acid (MOPS) 20.93g を 1,000ml の精製水に溶解し、NaOH で pH7.2 にして MOPS buffer を作製する。

②固相部の作製は下記の試薬を混合して加熱溶解後、5ml ずつを 20ml 程度の T-I medium 用容器に分注し、軽く栓をして高圧滅菌する。滅菌後、容器内で斜面を作る。

固相部

活性炭	2.0 g
可溶性デンプン	2.5 g
寒天	10.0 g
MOPS buffer	500 ml

③液状部は高圧滅菌後、5ml ずつを斜面のできた容器に分注する。

液状部

トリプトソイブロス (または同等品)	30.0 g
ゼラチン	10.0 g
MOPS buffer	500 ml

T-I medium は密栓して冷蔵すれば 2 年間は保存できる。発育促進剤を加える場合は使用時に添加する。

(3) Stuart 培地 (変法)

咽頭ぬぐい液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物等の検体の輸送に用いる。市販の粉末培地等 (Difco、Oxoid、BBL 等) がある。

4) 増菌培地

血液の培養や髄液の予備的培養にトリプトソイブロスやブレインハートインフュージョンブロスを用いる。発育促進剤を加えることもできる。Sodium polyanetholesulfonate (SPS) は病原性 *Neisseria* 属菌の発育に抑制的に働くので、これが添加されている培地は使用を避ける方がよい。

第6章 分離同定 3. 菌の分離の2) 髄液からの分離および3) 血液からの分離の各項を参照のこと。

5) 二層培地

淋菌を血液から検出する場合に用いる。血液培養用液体培地よりも良く発育するとされている。市販品はない。

斜面および液層に1% defined supplement あるいは IsoVitaleX、supplement B、Vitox 等の発育促進剤を加える。

斜面：GC 基礎培地＋発育促進剤

液層：トリプトソイブロス＋発育促進剤

6) 分離継代培地

病原性 *Neisseria* 属菌は栄養要求性が高いので、血液成分、グルコース、補酵素、グルタミン、ビタミン類等が添加された培地を用いなければならない。髄膜炎を対象に細菌の分離を行うには、髄膜炎菌のみならず、インフルエンザ菌、肺炎球菌あるいはその他の病原菌による場合を想定して、広範囲の菌種を検出できるように適切な分離培地を選択する必要がある。

(1) チョコレート寒天培地

髄液等からの分離や増菌培地からの転用培養に用いる。基礎培地は GC 寒天培地やトリプトソイ寒天培地とし、オートクレーブで滅菌後、50°C程度に冷ました後にヘモグロビンを加えるか、ウマあるいはヒツジ脱線維素血液を5%に加えて作製する。インフルエンザ菌の発育を考慮して発育促進剤 (1% defined supplement、IsoVitaleX (BBL)、supplement B (Difco)、Vitox (Oxoid) 等) を添加して平板とする。後述の2% defined supplement はインフルエンザ菌の培養には適さない。また、髄膜炎菌等の培養に適した市販の培地を使用することができる。

(2) 血液寒天培地

髄液等からの分離や髄膜炎菌の血清型別の前培養に用いる。インフルエンザ菌の分離には適さない。トリプトソイ寒天培地、ハート・インフュージョン寒天培地あるいはコロンビア寒天培地等を基礎培地としてウマ、ヒツジあるいはウサギ脱線維素血液を5%に加えて作製する。チョコレート寒天培地同様、市販の培地を使用できる。

(3) Kellogg 寒天培地

Neisseria 属菌の菌株の継代、性状検査の前培養、菌株の保存のための前培養等に用いる。市販の GC 粉末培地を滅菌し、2% defined supplement あるいは IsoVitaleX、supplement B、Vitox 等の発育促進剤を加えて平板とする。

2% Defined supplement

グルコース	20 g
Coccarboxylase	0.001 g
L-グルタミン (L-glutamine)	0.5 g
硝酸鉄 (Ⅲ) 九水和物 (Ferric nitrate)	0.005 g
精製水	100 ml

ろ過滅菌し、必要量ずつ分注して-20℃以下に保存する。
培地 1,000ml に対して 20ml を添加する。

7) 選択培地

(1) Modified Thayer-Martin medium (MTM 培地)

咽頭ぬぐい液、喀痰、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物等の混在菌の多い検体の培養に用いる。
市販の生培地がある (Difco、BBL)。

基礎培地

GC 培地	7.2 g
精製水	100 ml

発育促進剤にグルコースが含まれていなければ最終濃度が 0.25%になるように基礎培地に添加しておく。できた平板が柔らかいようであれば、寒天を 1.2~1.5%になるように加える。
高圧滅菌 (121℃、15分) する。

ヘモグロビン溶液

ヘモグロビン	2 g
精製水	100 ml

ビーカーに精製水 100ml をとり、ヘモグロビン 2g を加えてスターラーまたはミキサーで均一な浮遊液になるまで攪拌する。

均一になったら高圧滅菌 (121℃、15分) する。

基礎培地とヘモグロビン溶液を別々に高圧滅菌し、手で触れるくらいの温度 (約 50℃) になったら混合する。さらに発育促進剤 (1% defined supplement、IsoVitaleX 等) と選択剤 (VCNT : vancomycin:3 μ g/ml、colistin:7.5 μ g/ml、nystatin:13.5 μ g/ml および trimethoprim lactate:5 μ g/ml、※各々培地量に対する濃度) を分注直前に加える。VCNT や VCN は市販品がある。

1% Defined supplement

(前ページの 2% Defined supplement より成分が多いことに注意)

L-シスチン (L-cystine)	1.1 g
Guanine HCl	30 mg
Thiamine HCl	3 mg
p-aminobenzoic acid	13 mg
Vitamin B ₁₂	10 mg
Coccarboxylase	100 mg
NAD	0.25 g
アデニン (Adenine)	1.0 g
L-グルタミン (L-glutamine)	10 g
グルコース	100 g

硝酸鉄 (Ⅲ) 九水和物 (Ferric nitrate)	0.2 g
精製水	1,000 ml

ろ過滅菌し、必要量ずつ分注して-20℃以下に保存する。

培地 1,000ml に対して 10ml を添加する。

Neisseria 属菌の分離培地、薬剤感受性測定用培地（髄膜炎菌を除く）等に加える。

(2) New York City 培地

New York City 培地には原法では溶血ウマ血球、ウマ血漿および酵母エキスが加えられており、選択剤（vancomycin:2 μg/ml、colistin:5.5 μg/ml、amphotericinB:1.2 μg/ml および trimethoprim lactate:3 μg/ml、※各々培地量に対する濃度）を添加する。市販品がある（BBL、Oxoid）。

8) 生化学的性状確認培地

(1) Cystine Trypticase agar (CTA) 培地

糖からの酸産生能を調べるために用いる。市販の粉末培地がある（Difco）。

- ①グルコース、マルトース、シュークロース、フルクトースおよびラクトースの 10%水溶液をろ過滅菌する。
- ②高压滅菌（121℃、15分）後に約 50℃になった CTA 培地に、糖の濃度が 1%となるように添加する。
- ③それぞれの糖が添加された培地を滅菌チューブに 3ml ずつ分注する。
- ④使用時まで密栓して冷蔵保存する。
- ⑤使用時滅菌キャップに交換するか、スクリューキャップを緩めて空気交換が出来るようにする。

(2) 硝酸塩・亜硝酸塩還元試験用培地

試験用培地の作製

- ①ハートインフュージョンブロスに硝酸塩還元試験用培地には 0.1%に硝酸カリウムを、亜硝酸塩還元試験用培地には 0.001%に亜硝酸ナトリウムを加える。
- ②チューブに約 3ml ずつ分注して高压滅菌する。亜硝酸ナトリウムを入れたチューブにはダーラム管を入れておく。
- ③ウマ血清を 5~10%になるようにそれぞれのチューブに加える。

判定用試薬

試薬 1

スルファニル酸	0.8 g
5N 酢酸	100 ml

試薬 2

<i>N,N</i> -ジメチル-1-ナフチルアミン	0.5 g
または <i>N</i> -(1-ナフチル)エチレンジアミン-2 塩酸塩	
5N 酢酸	100 ml

褐色ビンに入れて、冷蔵する。

(3) 食塩無添加普通寒天培地

発育試験に用いる。

肉エキス	0.3g
ペプトン	0.5g
寒天	1.5g
精製水	100ml

pH6.8 に調整して高圧滅菌後、平板とする。

(4) シュークローズ加寒天培地

シュークローズからの多糖体産生能を調べるために用いる。

トリプトソイ寒天培地を高圧滅菌後、ろ過滅菌したシュークローズ水溶液を1%になるように添加し、平板を作製する。従来用いられている5%シュークローズ加培地は菌の発育に抑制的に働く場合があるので、1%シュークローズ加トリプトソイ寒天培地の使用が勧められている⁹⁾。多糖体の産生はLugol 液(グラム染色用ヨード液を1:4に希釈した溶液)を滴下する。*N. meningitidis* と *N. polysaccharea* との鑑別に用いる。特に、*N. polysaccharea* の生息部位である咽頭からの分離菌には重要である。

(5) DNA 分解酵素産生性試験用培地

DNase 寒天培地に2% defined supplement あるいは5%に血清を加える。*Moraxella (Branhamella) catarrhalis* の鑑別に用いる。

9) オキシダーゼ試験用試薬

1% Tetramethyl- ρ -phenylenediamine·HCl 水溶液を作製し、少量ずつ分注して冷凍保存する。赤変した溶液や一度解凍した溶液は廃棄する。

市販の試薬を使用することもできる。

10) カタラーゼ試験用試薬およびスーパーオクソール試験用試薬

カタラーゼ試験には3%過酸化水素水を、スーパーオクソール試験には30%過酸化水素水を用いる。

11) 血清群別用抗血清

群別のための血清が市販されているが2011年の時点で血清群別用抗血清はすべて医薬品扱いになっているため国内の代理店からの通常購入は不可能であり、購入には医薬品輸入代理業者を介して海外から輸入する方法しかない。血清凝集反応はスライドグラス上で常法どおりに行う。

莢膜多糖体の合成遺伝子の全貌が解析されたため、DNA レベルでも血清群別は可能となってきた。PCR による検出は死菌体に対しても検出可能なので培養法に比べて迅速、簡便で感度の高い方法としては最も優れた方法であると考えられる。しかし、2005年の時点においてもWHOを含めた国際検査機関から統一的なPCR法による髄膜炎菌検出方法は提示されておらず、各研究者が基礎実験レベルで検討された方法がいくつか報告されているに留まっている。本書ではその内、国立感染症研究所細菌第一部にて実際に実施している方法を簡単に紹介する。以下の方法に従えば髄膜炎菌の検出のみならず髄膜炎菌の莢膜多糖体合成遺伝子を遺伝子レベルで区別するため、抗血清を用いずにA、B、C、Y、W-135の血清型別も可能である。必ず髄膜炎菌と菌種を確定した上で実施すること。詳細は原著を参照すること¹⁴⁾。

a) 鋳型DNAの精製

検体からのDNA調製は市販のDNA精製キットを利用すれば検査に必要な量と質を備えたDNAサンプルが十分に得ることができる。しかし、髄膜炎菌のコロニーとして単離できているには以下のような簡便な方法で十分である。1ml ディスポーザブル白金耳分の髄

膜炎菌体をかき取り、100ml の TE buffer (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH8.0) に懸濁する。100°C で 5 分間加熱後、卓上遠心器で最大速度 (~15,000rpm)、5 分遠心し、その上清を鋳型 DNA 溶液として使用する。

b) PCR 用プライマー

髄膜炎菌の検出には *crgA* 遺伝子、血清群型別にはその合成遺伝子群の一つ、*siaD* を検出する。それぞれのプライマーは二つ一組であり、一組ずつの単独 PCR を実施する。即ち 6 組のプライマーセットを 6 本の PCR チューブを用いて各々 PCR を実施することになる。本検査は他の組のプライマーと混合して multiplex PCR としては機能しないので注意すること。

① *crgA* : 髄膜炎菌検出用プライマー

<i>crgA</i> -1	5' -GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC-3'	25mer
<i>crgA</i> -2	5' -CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT-3'	24mer

② *orf2* : A 群髄膜炎菌同定用プライマー

<i>orf2</i> (A)-1	5' -CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3'	24mer
<i>orf2</i> (A)-2	5' -CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3'	24mer

③ *siaD*(B) : B 群髄膜炎菌同定用プライマー

<i>siaD</i> (B)-1	5' -GGATCATTTTCAGTGTTTTCCACCA-3'	24mer
<i>siaD</i> (B)-2	5' -GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3'	24mer

④ *siaD*(C) : C 群髄膜炎菌同定用プライマー

<i>siaD</i> (C)-1	5' -TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3'	25mer
<i>siaD</i> (C)-2	5' -CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3'	23mer

⑤ *siaD*(W135) : W-135 群髄膜炎菌同定用プライマー

<i>siaD</i> (W135)-1	5' -CAGAAAGTGAGGGATTTCCATA-3'	22mer
<i>siaD</i> (W135)-2	5' -CACAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	27mer

⑥ *siaD*(Y) : Y 群髄膜炎菌同定用プライマー

<i>siaD</i> (Y)-1	5' -CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3'	22mer
<i>siaD</i> (Y)-2	5' -CTGAAGCGTTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	27mer

c) PCR 反応液組成及び反応条件

① 反応組成液は 1 反応あたり以下のように調製する。

鋳型 DNA	1	μl
1.5M Tris-HCl (pH8.8)	3	μl
0.1M (NH ₄) ₂ SO ₄	8.5	μl
0.1M MgCl ₂	2.5	μl
2.5mM dNTPs	10	μl
primer-1 (100mM)	0.5	μl
primer-2 (100mM)	0.5	μl
Taq polymerase	0.5	μl
H ₂ O	23.5	μl
Total	50	μl

② PCR 反応条件は以下のように行なう。

94°C × 3min.	} 2cycles
55°C × 30sec.	
72°C × 20sec.	
↓	

94°C×40sec.	}	35cycles
55°C×30sec.		
72°C×20sec.		

d) 結果の判定

PCR 反応終了後、5ml の PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV イルミネーターでバンドの有無を確認する。以下に確認されるバンドの長さを示す。図 8 は B 群髄膜炎菌の検出・判定例を示す。

crgA	230bp
orf2 (A)	400bp
siaD (B)	450bp
siaD (C)	250bp
siaD (W135)	120bp
siaD (Y)	120bp

1 2) 酵素活性検出用試薬

Neisseria 属菌および近縁の菌種を鑑別するためのキット (Gonocheck II (E・Y Laboratories) 等) が市販されている。髄膜炎菌と淋菌、*N. lactamica* の鑑別に用いる。

1 3) 分子遺伝学的手法用試薬

髄膜炎菌では、分子遺伝学的手法を用いた診断用試薬は市販されていないが、髄液からの Polymerase chain reaction 法による検出に関する報告がある。

淋菌感染症診断用には液相ハイブリダイゼーション法 (Gen-Probe)、Polymerase chain reaction 法 (Roche)、Ligase chain reaction 法 (Abbott) がある。液相ハイブリダイゼーション法は膣・子宮頸管分泌物と尿道分泌物を対象とする。Polymerase chain reaction 法および Ligase chain reaction 法は検出感度が高く、膣・子宮頸管分泌物と尿道分泌物だけでなく、尿を検査対象とすることができる。

1 4) ペニシリン分解酵素産生性試験用試薬

淋菌にはペニシリン分解酵素 (β-ラクタマーゼ) 産生能を有する株 (Penicillinase producing *Neisseria gonorrhoeae* : PPNG) がある。この検出には、ニトロセフィン (Oxoid) や検出用試験紙 (BBL、Oxoid、Glaxo) が市販されている。

2. 器材

髄膜炎菌や淋菌の検査で用いる器具・器材は、他の病原菌の検査で用いられるものと同じであるが、それに加えて以下の器材を必ず、あるいは必要に応じて準備する。

1) 検体の輸送

検体の輸送に 5%CO₂ の環境が必要な場合は CO₂ 発生装置付の輸送用バッグ等を用意する。保温や保冷で輸送する場合には、それぞれの条件に応じた輸送用容器を準備する。

2) 培養

髄膜炎菌や淋菌の培養には 5%前後の濃度の CO₂ 環境が必要なため、炭酸ガス培養器、CO₂ ジャー、ロウソク培養用容器等を準備する。発育を促進するために、湿らせたガーゼ等を入れて培養器の内部を高湿度に保つことも必要である。

3) 菌株の保存

菌株の保存に高層培地や斜面培地を用いることはできない。冷凍保存による方法で保存する。

ゼラチン・ディスク法で菌株を保存するには、真空デシケータと真空ポンプを準備する。凍結乾燥法では、凍結乾燥機が必要となる。

菌株は冷凍庫で -40～-80℃ に保存することが望ましく、-20℃ 前後でも保存できるが、その場合は霜取り機能のない冷凍庫を用いる。

VI. 分離同定

1. 推定

1) 髄液の染色⁴⁾

髄液を 3,000rpm で 20 分遠心し、沈渣の一部をスライドグラス上に取り、自然乾燥する。乾燥後、炎に 2~3 回かざして火炎固定し、Hucker の変法でグラム染色する。ただし髄液量が 1ml 以下であれば遠心せずにそのまま少量を取って染色する。グラム陰性双球菌（そら豆状）が多形核白血球の内外に観察されれば、髄膜炎菌の感染が疑われる。

2) 膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物の染色

膣あるいは子宮頸管の分泌物は滅菌綿棒 2 本で採取する。尿道分泌物は尿道口を滅菌脱脂綿等で清拭してから尿道をマッサージして分泌物を 2 本の滅菌綿棒で採取する。

1 本は培養用とし、もう 1 本の分泌物を清浄なスライドグラスに塗抹する。自然乾燥させた後に軽く火炎固定し、Hucker の変法でグラム染色する。多形核白血球が多く、扁平上皮や他の細菌は少なく、一部の多形核白血球内にグラム陰性の双球菌として認められる（図 1）。

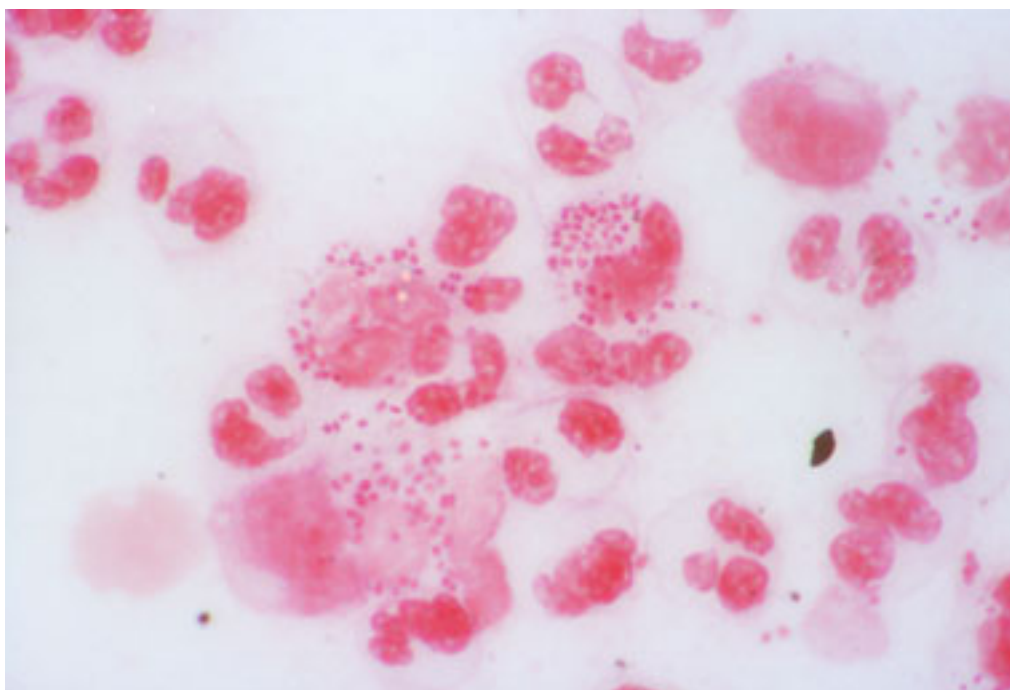


図 1 淋菌症患者の尿道分泌物を観察したもの（神奈川県衛生研究所 提供）

3) 抗原検出

キットの説明書に従って試験を行う。髄膜炎菌の検出では、通常は髄液を 3,000rpm で 20 分遠心し、上清をラテックス凝集反応に用いる。

2. 菌の分離

1) 分離の対象となる検体

髄膜炎菌感染症では、患者の髄液、血液、皮膚穿刺液、関節腔液、喀痰、鼻咽頭粘液が診断のための検体となる。髄膜炎の症状があれば髄液が検査対象となるが、菌血症を伴うことが多いので血

液も検査する。出血斑や関節炎があれば皮膚穿刺液や関節腔液を検査対象とする。稀に肺炎や上気道炎も見られ、喀痰を検査する。鼻咽頭粘液を採取する場合には滅菌綿棒で鼻咽頭粘液あるいは咽頭後壁から扁桃窩の粘液をぬぐい取る。髄膜炎以外の症状でも血液から検出されることがあるので、採血して培養する。髄膜炎菌感染症の患者の家族、接触者あるいは保菌者は、鼻咽頭粘液から菌の分離を試みる。

特殊な事例として、淋菌のように膣分泌物、子宮頸管分泌物、尿道分泌物あるいは直腸粘液から髄膜炎菌が分離されることがある。

淋菌感染症では、膣分泌物、子宮頸管分泌物、尿道分泌物、直腸粘液等が検査材料となる。尿道分泌物は滅菌綿棒か白金耳で採取する。分泌物が少ないときは滅菌綿棒で前部尿道分泌物を採取する。子宮頸管分泌物は子宮頸管部を圧迫し、浸出した分泌物を採取するか、頸管内に綿棒を挿入して粘液を採取する。直腸粘液は滅菌綿棒を直腸内に3～5cm挿入し、肛門輪内側の腋窩から粘液を採取する。播種性淋菌感染症では血液、皮膚膿瘍では膿瘍内容物を検査する。性的接触の状況によっては、咽頭から淋菌が検出されることがあるので、必要に応じて咽頭粘液を採取する。乳児の淋菌性結膜炎では膿、眼結膜分泌物を滅菌綿棒で採取する。

2) 髄液からの分離

髄液を3,000rpmで20分遠心し、滅菌パスツールピペットで1滴程度の沈渣をチョコレート寒天培地と血液寒天培地に接種する。ただし髄液量が1ml以下であれば遠心せずにそのまま接種する。

検体を接種した平板を5～10%CO₂環境下(あるいはロウソク培養)、35～37℃で18～24時間培養し、集落を観察されれば継代して同定を行う。集落を観察されなければ3日目まで培養し、毎日観察する。

可能であれば、予備的に寒天平板による分離と併用して、髄液の一部をトリプトソイブロスあるいはブレインハートインフュージョンブロス(＋発育促進剤)等の液体培地に接種して35～37℃で培養し、7日目まで菌の発育を毎日確認する。

髄液は採取直後に培地に接種することが望ましいが、そうでなければ極力1時間以内に接種する。その場合、髄液の入ったチューブの栓をゆるめて5%CO₂存在下、35～37℃で保管する。

5%CO₂の環境が得られなければ密栓して4～5℃あるいは室温(22℃前後)で保管するのが望ましい。髄液のpHが急激に上昇して髄膜炎菌等の病原菌の生存性に影響を与えるとの報告⁷⁾があるため、決して大気中に(あるいは密栓したまま)30℃以上で放置してはならない。

また1時間を過ぎる場合は4～5℃あるいは室温で保管するが、できるだけ早く培地に接種する。輸送などにより採取後1時間以内に寒天培地に接種することができないことが髄液採取当初から分かっている場合は、T-I mediumに接種することが勧められている²⁾。この場合、25～37℃に保って輸送する。

髄液以外の、通常は無菌である検体(関節腔液等)は髄液と同様に扱う。

3) 血液からの分離

髄膜炎菌性髄膜炎を含む細菌性髄膜炎では、血液は採取直後に血液培養用液体培地に接種する。接種する血液量は、培地容量に対して1:5から1:10となるように、5～10mlを50mlの培地に接種する。幼小児では1:10～20程度になるように、1～2mlの血液を20mlの培地に接種する。

培地は通気性を保ち、3～10%CO₂環境下、35～37℃で培養し、7日後まで毎日観察する。菌の増殖が観察されたら培地の一部を無菌的に血液寒天培地とチョコレート寒天培地に接種する。菌の増殖が観察されなくても18～24時間後、48時間後および7日後に血液寒天培地とチョコレート寒天培地に接種して菌の増殖の有無を確認する。

市販の血液培養用キット(Isolator等)を利用することもできる。

血液から淋菌を検出する場合には、二層培地の使用が推奨される。

4) 髄液、血液以外の検体からの分離

喀痰や鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物等のように混在菌の多い検体は、MTM 培地等の選択培地に接種し、5~10%CO₂ 環境下（あるいはロウソク培養）、35~37℃で培養すると、24~48 時間で集落は観察されるが、観察されない場合 3 日目まで培養する。

病原性 *Neisseria* 属菌にはバンコマイシン感受性株があるため、選択培地に発育しない株も検出できるようにチョコレート寒天培地といった非選択培地を併用する。平板は 3 日目まで毎日観察し、集落が見られれば非選択培地に継代する。

3. 鑑別・同定

髄膜炎菌の平板上の集落は、正円形、直径 1~2mm、半透明で、表面平滑で光沢がある（図 2）。

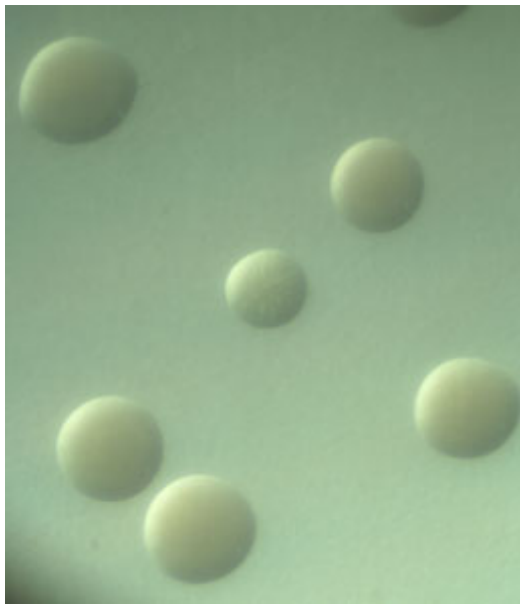


図 2 髄膜炎菌のコロニーを実体顕微鏡で観察した像
(神奈川県衛生研究所 提供)

淋菌の集落は正円形、直径 0.5~1mm、不透明から半透明で光沢ある隆起した集落である。淋菌のコロニーは継代するにしたがって円すい状の先が尖った小さい状態から先の凹んだ円すい状の大きなコロニーに変化し、その尖り具合の鋭い状態から完全に平たい状態までを順に T1、T2、T3、T4 という表現によりおおまかに分類している。分離直後は T1、T2 が多いが、長時間または継代により T3、T4 となる。推定試験としてオキシダーゼ試験とグラム染色を行い、さらに糖からの酸産生性、硝酸・亜硝酸還元性、食塩無添加普通寒天培地における発育、シュークロースからの多糖体産生性、DNA 分解酵素産生能等の性状を調べる。検査の流れを図 3 に、*Neisseria* 属菌および近縁種の集落の特徴を表 1 に、生化学的性状を表 2 に示した^{8,9)}。

日常的には、平板上の集落の形態、オキシダーゼ試験、グラム染色、糖からの酸産生性および硝酸・亜硝酸還元性ではほぼ鑑別することができる。これらの性状と検体採取部位を考慮し、必要に応じて各種培地での発育、シュークロースからの多糖体産生性、酵素プロファイル等を調べる。

Neisseria 属菌の中には髄膜炎菌と同様にグルコースとマルトースから酸を産生する菌種がある。また髄膜炎菌をはじめとする *Neisseria* 属菌には、稀に糖からの酸産生性が非典型的な株があり、鑑別を誤ることがある。鼻咽頭粘液等の雑菌の多い検体からの分離を非選択培地を用いて行った場合は非病原性 *Neisseria* 属菌を拾う可能性があるため、生化学的性状を十分検討した上で鑑別を行うことが重要である。特に *N. meningitidis* と *N. polysaccharea*、*N. gonorrhoeae* とマルトース非分解 *N. meningitidis*、*N. meningitidis* と *N. subflava* の鑑別には注意を要する。

1) オキシダーゼ試験およびグラム染色

分離培地上の疑わしい集落をオキシダーゼ試験用試薬を用いて調べる。新鮮集落に直接試薬を滴下するか、試薬を滴下したろ紙に新鮮菌を塗抹する。陽性であれば数秒で青紫色に発色する。*Neisseria* 属菌はオキシダーゼ陽性である。

Hucker の変法を用いてグラム染色を行い、顕微鏡下でグラム陰性双球菌であることを確認する。

2) カタラーゼ試験およびスーパーオクソール試験

Kellogg 培地で培養した集落に直接、あるいはシャーレに取った菌に試薬をかけて発泡の状態を観察する。発泡があれば陽性、なければ陰性とする。

血液寒天培地にはカタラーゼが含まれているため、試験に用いてはならない。

3) 糖からの酸産生性

試験には 16~18 時間程度培養した平板上の大量の菌体を必要とする。培養時間が長いと自己融解が始まり、掻き取りや CTA 培地中での均一化が難しくなるので、18 時間以内とする。特にチョコレート寒天平板では融解が早い。

Kellogg 培地等の平板 1~2 枚全体に菌を発育させ、1 チューブ当たり 2 白金耳程度の菌体をかき取る。培地表面から 0.5~1cm 程度までに菌を接種し、培地とよく混和して接種部を白濁させた後に管底まで穿刺する (図 4 参照)。35~37°C で 24 時間静置後に CTA 培地の変化を観察する。

グルコース、マルトース、シュークロース、フルクトース、ラクトースを 1% に添加した各 CTA 培地に菌を接種し、培地の上部が黄変したチューブを陽性、赤変したチューブを陰性とする (図 5、6)。

培地に変化のないチューブは接種量が不足しているのでやり直す。また、穿刺部位や培地全体に菌の増殖が認められるチューブは他の菌種による汚染としてやり直す。

4) 硝酸塩・亜硝酸塩還元性

Kellogg 培地等で 16~18 時間培養した菌をそれぞれの培地に多めに (1 白金耳程度) 接種し、大気中に 35~37°C で 24~48 時間培養する。

培養後、0.8% スルファニル酸と 0.5% *N,N*-ジメチル-1-ナフチルアミンまたは *N*-(1-ナフチル)エチレンジアミン-2 塩酸塩を等量に混ぜ、約 0.5ml ずつ加える。

硝酸カリウムを加えた培地が赤変すれば硝酸塩還元陽性、赤変せず亜鉛末を加えて赤変すれば陰性、赤変しなければ陽性とする。亜硝酸カリウムを加えた培地が赤変すれば亜硝酸塩還元陰性、赤変しなければ陽性と判定する。ダーラム管中のガスの有無を観察する。

5) 各種培地での発育

35~37°C における病原性 *Neisseria* 属菌用選択培地 (分離時に選択培地を用いなかった場合) や食塩無添加普通寒天培地、あるいは 22°C におけるチョコレート寒天培地あるいは Kellogg 培地での発育性を調べる。発育試験には新鮮培養菌から $10^6 \sim 10^7$ CFU/ml 程度の菌液を作製し、これを各培地に接種して選択培地では 5~10% CO₂ 環境下、食塩無添加普通寒天培地および 22°C における発育では大気中、35~37°C で 48 時間観察する。

これらの性状は *Neisseria* 属菌の鑑別に補助的に用いられる。

6) シュークロースからの多糖体産生性

試験用培地に菌を濃厚に接種し、大気中に 35~37°C で 24~48 時間培養する。集落に Lugol 液 (グラム染色用ヨード液を 1:4 に希釈した溶液) を滴下し、暗赤紫色から濃青色を示した株を陽性とする。淋菌はこの培地で発育しにくい。市販のグラム染色用ヨード液では反応が正しく現れない場合があるので注意する⁹⁾。*N. meningitidis* と *N. polysaccharea* の鑑別に有用である。

7) DNA 分解酵素産生性

DNA 分解酵素産生性試験用培地に菌を濃厚に接種し、5%CO₂環境下、35~37℃で 24 時間培養する。1N 塩酸を培地全面に注ぎ、集落の周辺が透明となれば陽性とする。

8) 酵素プロファイルによる鑑別・同定

病原性 *Neisseria* 属菌および *M. (B.) catarrhalis* 等の鑑別には、β-ガラクトシダーゼ、ハイドロキシプロリルアミノペプチダーゼおよびγ-グルタミルアミノペプチダーゼの3酵素の保有の有無を用いることができる(表3)。迅速な鑑別や生化学的性状が典型的でない株の鑑別に有用である。

ここで調べる酵素は *Neisseria* 属菌が固有に保有するものではないため、キットの対象とする菌は MTM 培地等の選択培地で発育したオキシダーゼ陽性のグラム陰性双球菌に限られている。したがって、チョコレート寒天培地や血液寒天培地といった非選択培地から分離した菌を鑑別する際には注意しなければならない。

9) 同定用キットによる鑑別

Neisseria 属菌の生化学的性状による菌種同定キットは、日水製薬、ビオメリユー、Becton Dickinson、Dade Behring 等から市販されており、*Neisseria* 属菌とともに *Haemophilus* 属菌やその他近縁の菌種の同定ができる。以下の2種類の診断キットが簡易診断には便利である。

日水製薬から市販されている ID テスト・HN-20 ラピッドは *Neisseria* 属菌と *Haemophilus* 属菌の同定キットであり、4 時間で鑑別が可能であり、比較的急を要する検査の場合には便利である。しかし、簡易的であるために最終的な菌の同定はやはり前述の生化学的性状を検査した後の方が確実であると思われる。

また MTM で *Neisseria* 属と推測される菌が分離された場合には Gonocheck-II (コスモバイオ) によって淋菌、髄膜炎菌と他の2種の近縁株の簡易同定が可能である。しかし、この簡易診断薬に関しても MTM で培養された菌のみを限定したうえでの同定法であり、事実この診断薬では同定できなかった特殊な髄膜炎菌も臨床分類株として分離されているので確定同定はキットと従来の古典的な解析の両方の結果を合わせて判断するのが妥当であると思われる。

10) ペニシリン分解酵素産生性試験

ニトロセフィン溶液を直接 16~18 時間培養した集落に滴下するか、ろ紙にニトロセフィン溶液を滴下し、これに菌を塗抹して、赤紫色に発色した菌を陽性とする。

試験紙には発色性基質をしみ込ませて乾燥させてあり、滅菌精製水を滴下し、新鮮菌を塗抹して赤紫色に発色すれば陽性とする。

ペニシリンや第一世代セフェム系薬剤が治療に盛んに用いられていた時期には、ペニシリン分解酵素産生性を調べることは非常に重要であった。しかし、現在わが国では淋菌感染症の治療にはこれらの薬剤はほとんど用いられておらず、したがってペニシリン分解酵素を保有していても治療にはほとんど影響を及ぼさなくなった。

4. 髄膜炎菌の髄液からの PCR 法による検出

髄液から髄膜炎菌が分離されなくても、PCR 法による検出が可能である⁵⁾。髄膜炎菌、インフルエンザ菌および *Streptococcus* 属菌を同時に検出するシステムも報告されている⁶⁾。

血清型を決定する抗原とそれに関与する遺伝子の検出も PCR 法により検出可能となっている。したがって、何らかの理由により髄膜炎菌の分離が不能であった髄液等の検体を疫学的解析のために

冷凍保存（-80℃）することが推奨される。髄液の量が少なく染色や培地への接種に全て使用されてしまった場合、髄液が接種された液体培地が残っていれば、これを遠心して PCR 法の材料とすることも可能である。

しかし現状においては PCR 法による検出や血清型別の同定は実用化・基準化はされておらず、現時点では検査に直接携わる人の判断で論文に発表された PCR 法による検査の実施とその結果を判断することとなる。

5. 淋菌の分子遺伝学的手法による検出

膣・子宮頸管分泌物はそのまま各キットの検査材料とすることができる。尿は遠心して得られる沈渣を検査対象とする。

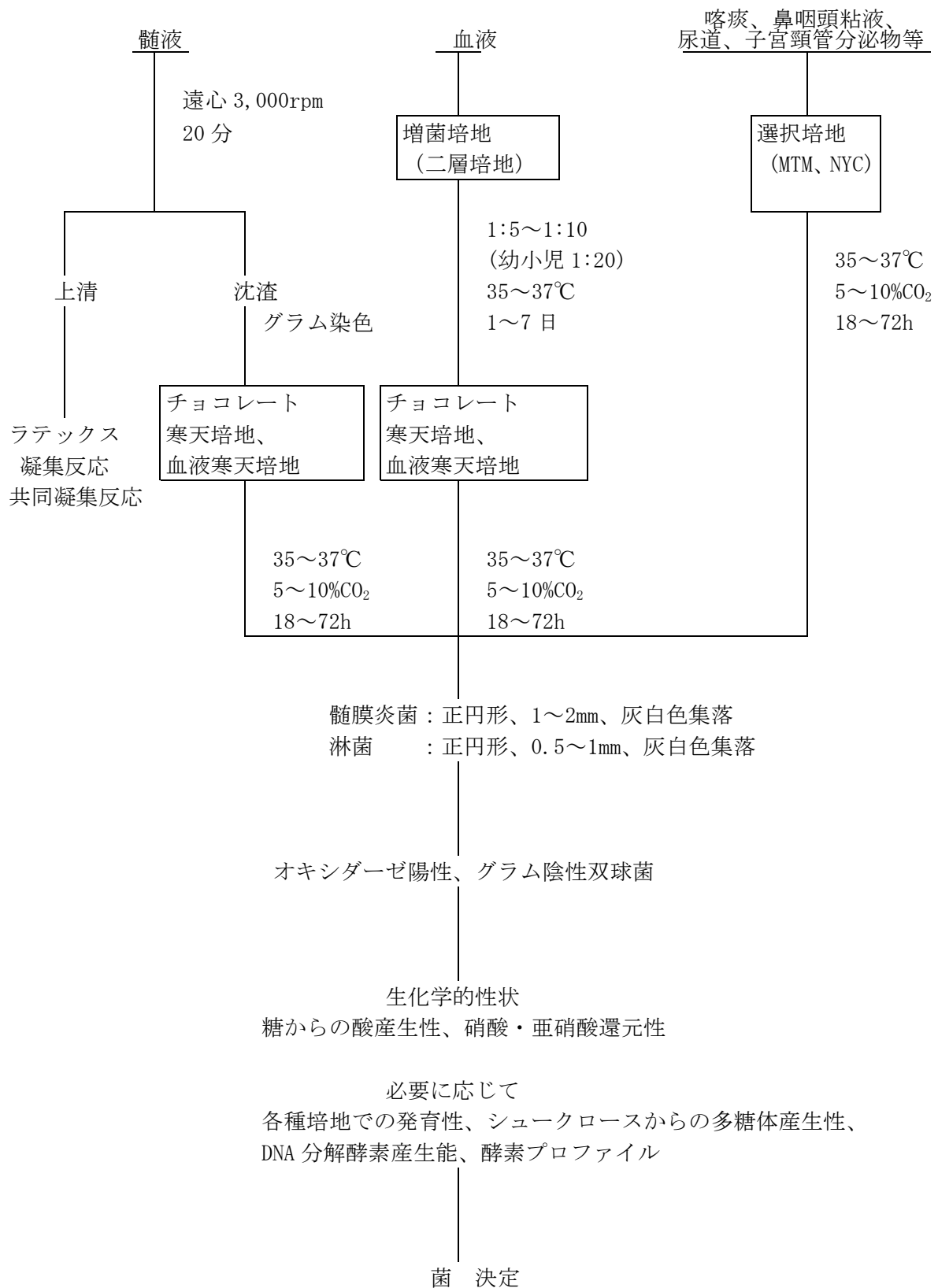


図3 病原性 *Neisseria* 属菌の検査の流れ

表1 *Neisseria* 属菌および類縁菌の集落の特徴

菌種	集落の特徴
<i>N. gonorrhoeae</i>	直径 0.5~1mm、不透明から半透明の光沢ある隆起した正円形集落。4タイプ (T1~T4) の集落の変異あり。初代分離では複数のタイプが混在することが多いので注意が必要。T1、T2：分離当初は優勢。小型 (0.5mm 程度)、光沢があり、隆起する。T3、T4：大きく (1mm 程度)、やや扁平で T1、T2 ほど光沢はない。
<i>N. meningitidis</i>	直径 1~2mm で淋菌よりも大型。半透明、光沢あるやや隆起した正円形集落。ムコイド状のこともある。
<i>N. lactamica</i>	髄膜炎菌に似るが、やや黄色みを帯びることがあり、湿潤性に欠ける。
<i>N. sicca</i>	髄膜炎菌よりも大型。しわのある、粗造で乾燥した集落。培地に固着。
<i>N. mucosa</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色、透明から不透明の円形集落。しばしば培地に固着。
<i>N. subflava</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色を帯びることあり。ムコイド状。培地に固着。
<i>N. flavescens</i>	髄膜炎菌よりも大型。黄色、不透明な正円形集落。
<i>M. (B.) catarrhalis</i>	髄膜炎菌よりも大型。灰白色、不透明、光沢のある正円形集落。

注：自家調製したチョコレート寒天培地あるいは Kellogg 培地で 35~37°C、18~24 時間程度培養したときの集落の特徴を示した。集落の特徴は既製培地のメーカーや製品により異なる可能性がある。可能な限り対照株を置いて釣菌することが望まれる。

釣菌に際して、白金耳で触れると集落全体が動くような堅い集落、白色で堅い感じの集落、MTM 培地やチョコレート平板上で集落周辺が緑色を帯びている集落および培地に食い込むような扁平な集落は *Neisseria* 属菌ではない。

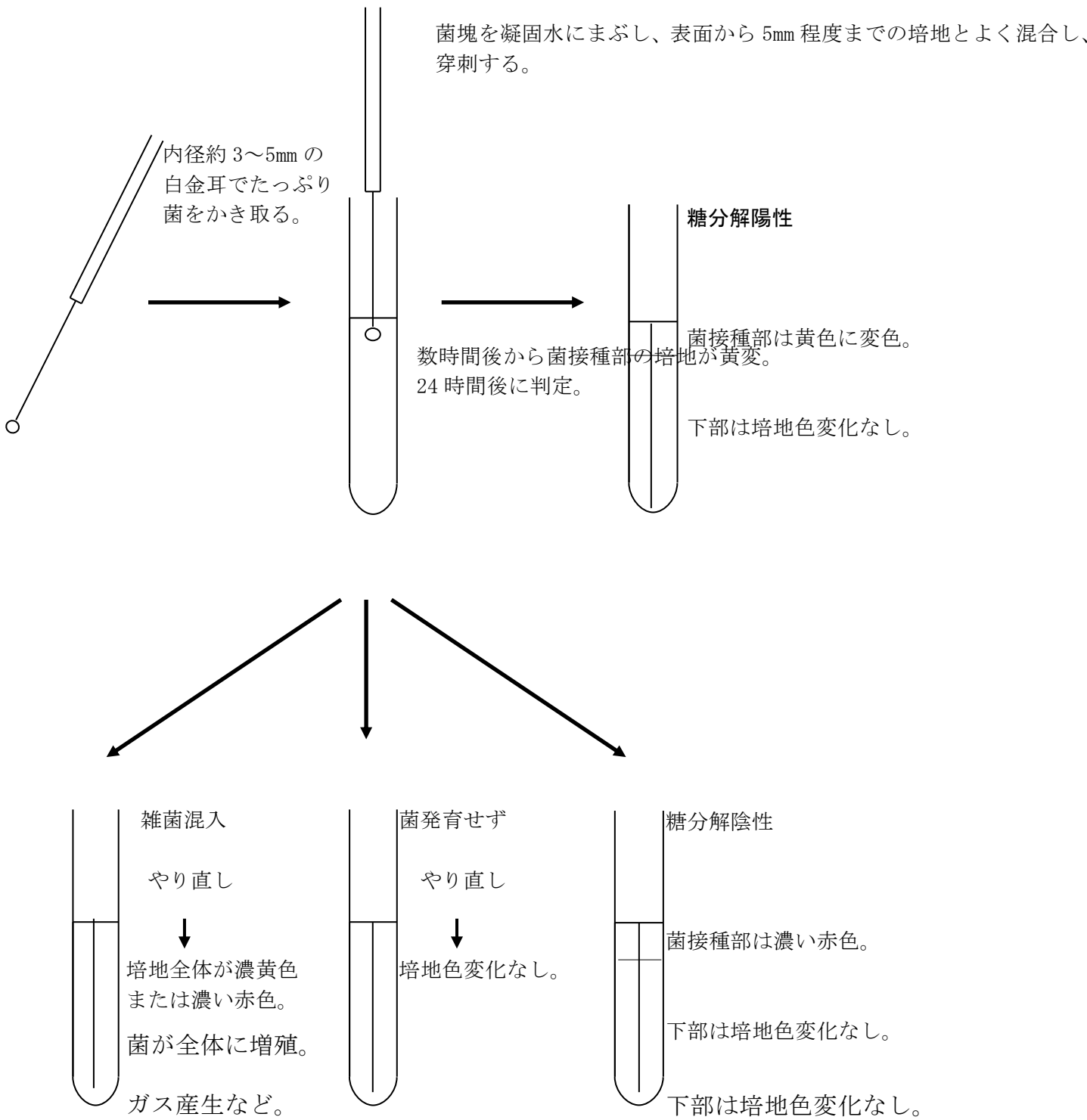


図 4 *Neisseria* 属菌の CTA 培地への接種法と判定

表2 *Neisseria* 属菌および近縁種の生化学的性状

	<i>N. gonorrhoeae</i>	<i>N. meningitidis</i>	<i>N. lactamica</i>	<i>N. polysaccharea</i>	<i>N. cinerea</i>	<i>N. flavescens</i>	<i>N. mucosa</i>	<i>N. subflava</i>	<i>N. sicca</i>	<i>N. elongata</i>	<i>M.(B.) catarrhalis</i>	<i>K. denitrificans</i>	
菌形態	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S
オキシダーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
スーパーオキソール	4+	+-4+	+-3+	+-3+	2+	2+	2+	2+	2+	2+	-	+-4+	-
酸産生性													
グルコース	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	
マルトース	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	
シュークロース	-	-	-	-	-	-	+	v ^a	+	-	-	-	
フラクトース	-	-	-	-	-	-	+	v ^b	+	-	-	-	
ラクトース(ONPG)	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
還元性													
硝酸塩	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	
亜硝酸塩	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ガス産生	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
発育性													
MTM, NYC	+	+	+	v	v	-	-	v	-	-	v	+	
22°C	-	-	v	v	v	+	+	v	v	+	+	?	
普通寒天	-	-	+	+	+	+	+	v	+	+	+	+	
多糖体産生性	-	-	-	+	-	+	+	v ^c	+	-	-	-	
DNase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	
色素	-	-	v	-	- ^d	+	- ^d	+	- ^d	-	-	- ^d	

S : 球菌。 R : 桿菌。 v : 株により陽性と陰性がある。 MTM : modified Thayer-Martin medium NYC : New York City 培地。

a : *N. subflava* biovar *subflava*(-)、*N. subflava* biovar *flava*(-)、*N. subflava* biovar *perflava*(+)。

b : *N. subflava* biovar *subflava*(-)、*N. subflava* biovar *flava*(+)、*N. subflava* biovar *perflava*(+)。

c : *N. subflava* biovar *subflava*(-)、*N. subflava* biovar *flava*(-)、*N. subflava* biovar *perflava*(+)。

d : 色素を産生する株もある。

表3 髄膜炎菌の鑑別に用いる酵素プロファイル

	γ -glutamyl aminopeptidase	Hydroxyprolyl aminopeptidase	β -galactosidase
<i>N. meningitidis</i>	+	/	-
<i>N. gonorrhoeae</i>	-	+	-
<i>N. polysaccharea</i>	-	+	-
<i>N. lactamica</i>	-	/	+
<i>M.(B.) catarrhalis</i>	-	-	-

/ : 鑑別には用いない。

6. 血清型別

1) 血清群

髄膜炎菌の血清群は莢膜多糖体を抗原としている。A、B、C、29E (Z')、H、I、K、L、W135、X、Y、Zがある。海外ではAとCが流行株として注目され散発例はBが多いが、B群株による流行もある。国内の症例ではこれまでBとYが多数を占めている。

2) typing および subtyping

髄膜炎菌の外膜タンパクを抗原として typing および subtyping 法がある。開発当時はモノクローナル抗体を用いていたが、現在ではその外膜タンパクの遺伝子配列を解読してデータベースと照らし合わせるにより判別することが主流となってきた。型別は国立感染症研究所で検査は可能である。

7. Multilocus sequence typing (MLST)

過去には **Multilocus enzyme electrophoresis (MLEE)** という複数の特定の酵素の、電気泳動による移動度の違いを組み合わせた酵素型 (enzyme type: ET) を決定する手法がとられており、髄膜炎菌の疫学マーカーとして利用されていた¹⁰⁾。しかし、今現在はそれらの酵素の中から7つの必須遺伝子に焦点を絞り、その塩基配列を解読・相互比較することにより分子疫学的に分類する方法が Multilocus sequence typing (MLST) が適用されており、sequence type (ST) として髄膜炎菌株を分子疫学的に分類・同定する手法がとられている。ST はインターネット上でデータベース化されており^{11,12)}、日本国内では国立感染症研究所細菌第一部でその解析が可能である。

ST を決定することにより世界で大流行を起こし、伝播した髄膜炎菌の由来とルートを推測することが可能である。ST と髄膜炎菌の病原性との直接的な関連性は不明であるが、流行起炎株と ST の関連は疫学的観点から明らかになっている。ST-32 (ET5) と分類されるものは1970年代の北欧、英国を中心に大流行し、現在においても先進国を中心に小規模の流行を起こす危険菌であると考えられている。また ET: Group III-1 は1983年のネパールの大流行から始まり、インド、パキスタン、サウジアラビアを経由して1989年にアフリカのナイロビにまで大流行をもたらしたとされている。

また日本国内においても MLST による ST の決定により海外由来株か日本固有株であるかをある程度類推することも可能となり、髄膜炎菌の分子疫学的解析法の最も有効な方法として使われている。実際に日本国内の分離株200株以上を解析した結果、1) 海外で古くから同定されている ST (海外由来株)、2) 海外由来株と同じグループに属するが異なる ST として同定された株 (海外由来国内派生株)、3) 海外では分離されていない ST として同定された株 (日本固有株) とその派生株、の3種類が日本国内に潜在しており、それらがモザイク状に存在していることが明らかとなった¹⁵⁾。

8. 栄養要求型

淋菌の株の、アミノ酸、ビタミン類等に対する要求性の違いを利用した型別法である。35型が知られている。多くは Proto 型、Pro- 型に属する。AHU 型は播種性淋菌感染症 (DGI) から高頻度に分離される。

VII. 検体の輸送方法

髄膜炎菌および淋菌を輸送・保存する条件に関する様々な報告がなされているが、標準的方法は確立されていない。特に髄液等の検体の輸送・保存に関しては、検体の状態や株の性状により適した条件が異なることが予想され、温度条件さえも定まっていない。一般的に検体は室温から 37°C に保つようにされているが、35~37°C では短時間で死滅することもある。低温でも死滅しやすいとされているが、髄液を冷蔵して数日間生存することもあり、また Stuart 培地では 4°C で良好な成績が得られている。これらの状況を踏まえ、最も妥当と思われる方法を記す。

1. 髄液および血液等の輸送方法

1) 髄液の輸送方法

髄液をそのまま冷蔵または室温で搬送することはできるが、検出率が低下する可能性がある。確実に菌を分離するには、医療機関においてチョコレート寒天培地（搬送するまでに数日を要する場合は T-I medium）に接種し、3~5%CO₂ 環境下で 25~37°C に保ちながら輸送する。あるいは寒天平板に接種して培養後で既に集落が観察されれば冷蔵で送付・搬送することが奨められる。5%CO₂ 環境を保つことができるキットも市販されている。

2) 血液の輸送方法

血液は液体培地（あるいは二層培地）に接種し、あるいは Isolator を用いて 22~37°C に保ちながら送付・搬送する。Isolator では、22°C あるいは 34°C で 15 時間静置後も分離率が変わらなかったとの報告がある¹³⁾。培地中に菌の増殖が認められる場合は冷蔵で送付・搬送する。

3) その他の臨床検体の輸送方法

選択培地などの適切な培地に接種し、3~5%CO₂ 環境下で 25~37°C に保ちながら、あるいは培養後で既に集落が観察されれば冷蔵で送付・搬送する。市販の輸送培地（Transgrow 培地等）と輸送用キット（JEMBEC）を使用することもできる。鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物は Stuart 培地（変法）等に接種して冷蔵で搬送する。

2. 菌株の送付方法

1) 培養菌

チョコレート寒天培地に接種し、35~37°C で 18 時間程度培養した培養菌を培養直後に発送し、翌日到着するのであれば、冷蔵で送付することができる。24 時間以上培養した菌は死滅する可能性が高いので送付してはならない。

T-I medium に接種して密栓した状態では 25~37°C で 1~2 週間程度生存するので、その間に送付することができる。

綿棒で新鮮培養菌を多くかき取り、スクリューキャップ付滅菌試験管等の滅菌容器に入れておけば菌種や菌株により異なるが室温でも 3~7 日程度、冷蔵では 1 週間、冷凍ではさらに長く生存するので、培養菌の送付に利用できる。綿棒保存法は IV. 菌株の保存方法を参照。

送付中に死滅することもあるので、必ず別に菌株を保存しておく。

2) 保存菌株

後述の綿棒保存、ゼラチン・ディスク法あるいは凍結乾燥法で保存された菌株は冷蔵（3~7 日程度であれば室温も可）で搬送あるいは送付することができる。冷凍で送付するのが理想だが、送付中に温度変化が激しいと菌数は急激に減少するため、むしろ冷蔵の方が安全である。

VIII. 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16～18時間培養菌を用いる。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 培地を使用するほうが扱いが楽である。

1. 一時的保存

寒天平板で培養した18時間培養菌は、培養後冷蔵庫で保存すれば1～2日は生存する。それ以後の生存性は株により異なるので、3日以上は保存は避ける。

2. 短期保存

1) 綿棒保存

滅菌綿棒で寒天平板上の18時間培養菌を平板からできるだけ多く掻き取り、滅菌スクリーキャップ付チューブ等に入れて-20～-80℃で冷凍保存すると、数カ月生存する。冷蔵保存でも1週間程度は生存する。室温では3～7日をめどにする。保存容器に滅菌したシリカゲルを入れておくと菌体の乾燥が確実になり、菌が死滅しにくい。

綿棒で掻き取る菌体の量が少ないと早期に死滅してしまうので、寒天平板上に画線で菌苔状に培養し、できるだけ多く菌体を掻き取る方が保存は確実である。

2) 簡易保存法³⁾

ゼラチン・ディスク法用溶液(A、B、C 5:1:5混合液)を滅菌スクリーキャップ付チューブに0.5mlずつ分注し、菌苔状の18時間培養菌の平板半分程度を浮遊させる。これを-20～-80℃で冷凍保存すると数年間保存することができる。

3. 長期保存

1) ゼラチン・ディスク法³⁾

あらかじめ凍結することなく、菌保存液の水分を真空または減圧下で蒸発させ、ディスク状に乾燥させる方法である。継代培養による性状の変異なしに長期間保存でき利用価値が高く、常時一定の条件のまま菌株が保存できる。*Vibrio*属菌を除く多くの臨床細菌に応用することができる。

*Neisseria*属菌、*Haemophilus*属菌等の保存が難しい菌株の保存に欠かすことができない方法であるので、ここで詳述する。作製方法等については、*Neisseria*属菌に限定せず一般的な方法とする。

(1) ゼラチン・ディスク法用試薬

A液

グルコース	5 g
スキムミルク	3 g
活性炭末	0.6 g
精製水	100 ml

グルコースとスキムミルクを加温溶解し、炭末を加えてよく混合してスクリーキャ

ップ付チューブに適量分注する。110℃、10 分間高圧滅菌後、直ちに流水で冷却し、密栓の上冷蔵保存する。通常の 121℃ 15 分間ではスキムミルクと炭末が凝固するので、温度と圧力に注意する。

B 液

L-アスコルビン酸ナトリウム	5 g
精製水	100 ml

ろ過滅菌して少量ずつスクリーキャップ付チューブに分注し、-20℃以下で凍結保存する。

C 液

ゼラチン	20 g
精製水	100 ml

加熱溶解後、スクリーキャップ付チューブに適量ずつ分注し、121℃、15 分間高圧滅菌する。密栓して室温保存する。

(2) 必要な器材

①デシケーター

吸引コック付きの真空用デシケーターで、真空ゲージがついていれば使い易い。

②五酸化リン

菌保存液をディスク状に乾燥するために、潮解性を利用する。多量の水があると強く反応するので、取り扱いに注意する。炎症を起こすので、皮膚や粘膜につけないこと。一度に処理する株数が少なければシリカゲルで代用することも可能である。

③クッキングペーパー

従来使用していたパラフィン濾紙の代用として、市販のクッキングペーパー（オープン料理用）を使用することができる。クッキングペーパーをガラス製シャーレのサイズに切り、オートクレーブで 121℃、15 分滅菌後乾燥する。この 1 枚ずつをガラス製滅菌シャーレに入れる。片面用クッキングペーパーではシャーレに入れる際に、クッキングペーパーの裏表に注意する。

参考までにパラフィン濾紙の作製法は、病理標本用固形パラフィンを溶解し、140～145℃に保つ。これに直径 7cm の円形濾紙を 1 枚ずつ入れて 1 分間程度放置する。ピンセットで 1 枚ずつ取り出し、余分なパラフィンを除き、ガラス製滅菌シャーレ中で固化させる。

④真空ポンプ

20～30mm/Hg 以下の減圧度が得られるものがよい。

(3) ディスクの調製法

①保存菌株の準備

培養は、保存菌に適した平板培地を 1 株あたり 1～数枚を使い、適切な温度と方法で行う。発育阻止剤などの入った選択培地は使用しない。腸内細菌などのように良く発育する菌は、トリプトソイ寒天培地、ハートインフュージョン寒天培地でよいが、栄養要求性が高い菌には血液寒天培地やチョコレート寒天培地等の発育に適した培地を用いる。

平板の枚数は菌の発育度により異なるので、発育が良ければ1~2枚、悪ければ3~4枚あるいはそれ以上必要とする。保存には対数増殖期の新鮮培養菌を用い、長時間培養したものは不適である。

②ディスクの作製

試薬A液はミキサーでよく混合し、B液、C液をそれぞれ液状にしておく。解凍したB液は再凍結せずに残りは捨てる。A液1容、B液1/5容およびC液1容を滅菌試験管に分注し、保存菌を均等に浮遊させる。*Neisseria*属菌のように粘調性で浮遊させにくい菌ではA液1容とB液1/5容を滅菌試験管に分注してから保存菌を注意深く均等に浮遊させたのち、C液1容を加えてよく混合する。滅菌試験管に分注する量は作製するディスクの枚数による。通常はA液、B液およびC液合わせて1mlが適量である。

新鮮培養菌を掻き取り、ABC混合液に浮遊する。浮遊液の菌濃度はディスク乾燥時に菌数が減少するので、浮遊時に菌量が $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml以上得られるように十分に濃厚でなければならない。しかし、必要以上に大量の菌を浮遊させることは、ゼラチン強度の低下を招きディスクがもろく壊れ易くなる。

菌浮遊液を毛細管ピペットで、気泡が入らないようにガラス製滅菌シャーレ中のクッキングペーパー上に適当な間隔で0.025~0.03mlずつ滴下する。1mlの浮遊液でおよそ30滴滴下できる。

ディスクの作製と同時に、掻き取った残りの平板を冷蔵したり、菌種によっては簡易保存法あるいは綿棒保存法により株を保存する。作製したディスクの菌数が少ない場合や雑菌の混入がある場合にこれから株を再び起こす。

③乾燥

デシケーターの中に、シャーレ数枚に入れた十分量（表面積が広いほど乾燥能率がよい）の五酸化リンを置き、浮遊液を滴下したクッキングペーパーの入ったガラス製滅菌シャーレを置く。乾燥しやすいように滅菌ガラス棒をシャーレの蓋の間に入れ、デシケーターの蓋を閉じて真空ポンプで約20mmHg（2700 Pa）まで減圧する。4~5時間経過すると、五酸化リンは吸湿して表面が潮解し、滴下した菌浮遊液はディスク状に平坦になっている。この時点で一度常圧に戻し、五酸化リンの潮解部を取り除き、必要があればさらに五酸化リンを追加して、今度は強く減圧する。

なお、潮解した五酸化リンは強酸性なので、中和処理を施したのち廃棄する。

④ディスクの保存

乾燥したディスクは、火炎滅菌した先の細かいピンセットでクッキングペーパーから剥す。濾紙を軽く湾曲させると自然に剥がれ落ちる。これを滅菌したシリカゲル入りの小瓶（あるいは小容器）に集め、密栓して-20℃以下の冷凍庫で保存する。

また、保存と同時に、菌の生存と雑菌の混入の確認培養のため、1枚のディスクを溶解し、平板に塗抹して培養する。生菌数が十分あることと雑菌の混入が無いことを確かめる。菌数が不十分であるか、雑菌の混入があれば、ディスクを作り直す。

(4) ディスクの溶解

菌を使用するときは、ディスク1枚を取り出し滅菌小試験管に入れる。適当な液体培地を0.1~0.2ml加えて35~37℃で約5分間ときどき攪拌しながら溶解し、その1滴を平板培地に塗抹し培養する。

(5) 保存期間

腸内細菌、*Pseudomonas*、*Streptococcus*、*Haemophilus*、*Neisseria*、*Branhamella*、*Bacteroides*等の限定された菌での保存実験では、いずれの菌も3年以上生存し、生菌数の減少も1オーダーにすぎなかった。しかし、コレラ菌では乾燥直後には生存していたが、凍結保存1週間で死

滅した。

標準株や薬剤感受性用対象株、分離株などを $-40\sim-80^{\circ}\text{C}$ で保存することが可能である。淋菌をはじめとする *Neisseria* 属菌、*Streptococcus* で 25 年、*Campylobacter* で 17 年を経過しても比較的良好に保存されている。生化学的性状や集落型、病原性、薬剤感受性などに保存中の変異は全く認められていない。

2) 凍結保存法⁴⁾

凍結保存にはヒツジ、ウマあるいはウサギ脱線維素血液、15～20%グリセリン加 TSB あるいは Greaves 液を用いることができる。保存液を滅菌スクリーキャップ付チューブに 1 ml 分注し、これに菌苔状の 18 時間培養菌の平板 1 枚分を浮遊させ、 $-40\sim-80^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存する。菌を浮遊させた保存液をドライアイス・エタノールで急激に凍結させると生存性が増す。

3) 凍結乾燥法

通常の凍結乾燥法により菌株を保存する。

ゼラチン・ディスク法のディスクの乾燥を凍結乾燥機のチャンバー内で行うこともできる。この場合高い生存性が得られ、保存菌株の扱いも容易である。

IX. 感染症発生動向調査事業における検査の進め方

病原性 *Neisseria* 属菌は死滅しやすく、輸送や保存が難しい。そのため、感染症発生動向調査事

業等において衛生研究所で病原性 *Neisseria* 属菌（淋菌および髄膜炎菌）の検査を行う場合には、調査の目的やその他の状況に応じた検査の進め方を設定しなければならない。

1. 検体を受領する場合

検体採取直後に検査を始めることが理想であり、輸送・保存は最小限にとどめる。輸送・保存が避けられない場合は、①輸送培地の使用を検討する、②分子遺伝子学的手法による検出や抗原検出による検査をおこなう、③医療機関や検査機関において培地に接種し、（可能であれば培養後に）それを輸送する、④検体は受領せずに医療機関や検査機関において菌を分離し、分離菌株を受領する、といった選択肢が挙げられる。特に検体を採取してから検査を始めるまでに1日以上輸送・保存期間がある場合には、十分な検討が必要である。

鼻咽頭粘液、膣・子宮頸管分泌物あるいは尿道分泌物は滅菌綿棒で採取し、Stuart 培地（変法）等に接種して冷蔵で輸送・保存することができるが、検出率の低下は免れない。

髄膜炎菌は髄液を対象にしたラテックス凝集法による試薬がある。また、髄液からの PCR 法による検出が報告されている。淋菌では、膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物あるいは尿を対象にした分子遺伝学的手法および酵素抗体法を用いた検出用キットが市販されている。これらの手法は、検体採取から検査開始までの期間が長いなどの理由により菌の分離が困難な場合に有効である。

検体を培地に接種してから輸送する方法は、検体を衛生研究所に搬送してから検査する場合よりも検出率が高くなる。輸送・保存期間（検体採取から検査開始までの期間）が1～2日までの場合に有効である。髄液を T-I medium に接種する方法では、25～37℃に保てば菌は1～2週間程度生存する。

検体の輸送方法は **V. 検体の輸送方法** を参照。

2. 菌株を受領する場合

菌株の受領は、検体採取から検査開始までの期間が3日以上の場合や確実に菌株を確保する方法として選択する。菌株の輸送・保存方法は **V. 検体の輸送方法** および **VI. 菌株の保存方法** を参照。

菌株を受領する場合、輸送中に死滅することを勘案して、菌株分与元においても菌株を保存しておくように依頼する。

コンタミネーションの可能性があるので、受領した株を継代培養し、純培養であることを確認する。純培養であることを確認後、同定・鑑別を進めながら、菌株を保存する。保存法は **VI. 菌株の保存方法** を参照。

X. 文献

- 1) 細菌学実習提要 東京 丸善.
- 2) G. W. Ajello *et al*: Trans-Isolate medium: a new medium for primary culturing and transport of *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. J. Clin. Microbiol. 1984; 20:55-58.
- 3) 浅井良夫、山井志朗：死滅しやすい細菌の保存法 ―ゼラチン・ディスクの作製方法― 日本臨床微生物学雑誌 1996;6:44-48.
- 4) Laboratory methods for the diagnosis of meningitis caused by *Neisseria meningitidis*, *Streptococcus pneumoniae*, and *Haemophilus influenzae*. Centers for Disease Control and Prevention.
http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/meningitd_manual.pdf 1998.
- 5) D. A. Caugant, E. A. Hoiby, L. O. Froholm and P. Brandtzeig :Polymerase chain reaction for case ascertainment of meningococcal meningitis :application to the cerebrospinal fluids collected in the course of the Norwegian meningococcal serogroup B protection trial. Scand. J. Infect. Dis. 1996; 28:149-153.
- 6) P. Radstrom *et al*: Detection of bacterial DNA in cerebrospinal fluid by an assay for simultaneous detection of *Neisseria meningitidis*, *Haemophilus influenzae*, and Streptococci using a seminested PCR strategy. J. Clin. Microbiol. 1994; 32:2738-2744.
- 7) J. G. Cunniff, S. Whitby-Strevens and M. H. Wilcox: Effect of pH changes in cerebrospinal fluid specimens on bacterial survival and antigen test results. J. Clin. Pathol. 1996;49:249-253.
- 8) 微生物検査必携 細菌真菌検査 第3版 東京 日本公衆衛生協会.
- 9) Identification of *Neisseria* and related species. *Neisseria meningitidis*. Centers for Disease Control and Prevention.
<http://www.cdc.gov/ncidod/dastlr/gcdir/NeIdent/Nmen.html> 1998.
- 10) R. K. Selander *et al*: Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. Appl. Environ. Microbiol. 1986;51:873-884.
- 11) M. C. J. Maiden *et al*: Multilocus sequence typing: a portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. Proc. Natl. Acad. Sci. 1998;95:3140-3145.
- 12) Multilocus Sequence Typing. The Wellcome Trust. University of Oxford.
<http://mlst.zoo.ox.ac.uk/default.htm>
- 13) J. S. Cashman, R. Boshard and J. M. Matsen: Viability of organisms held in the Isolator blood culture system for 15 h and their rapid detection by acridine orange staining. J. Clin. Microbiol. 1983;18:709-712.

- 1 4) Muhamed-Kheir Taha: Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*. *J Clin Microbiol* 2000 ; **38**: 855-857.
- 1 5) Hideyuki Takahashi, Toshiro Kuroki, Yuko Watanabe, Hiroshi Tanaka, Hiroo Inouye, Shiro Yamai and Haruo Watanabe. Characterization of *Neisseria meningitidis* isolates collected from 1974 to 2003 in Japan by multilocus sequence typing. *J. Med. Microbiol.* **53**:657-662, 2004.

I. 検査の流れ

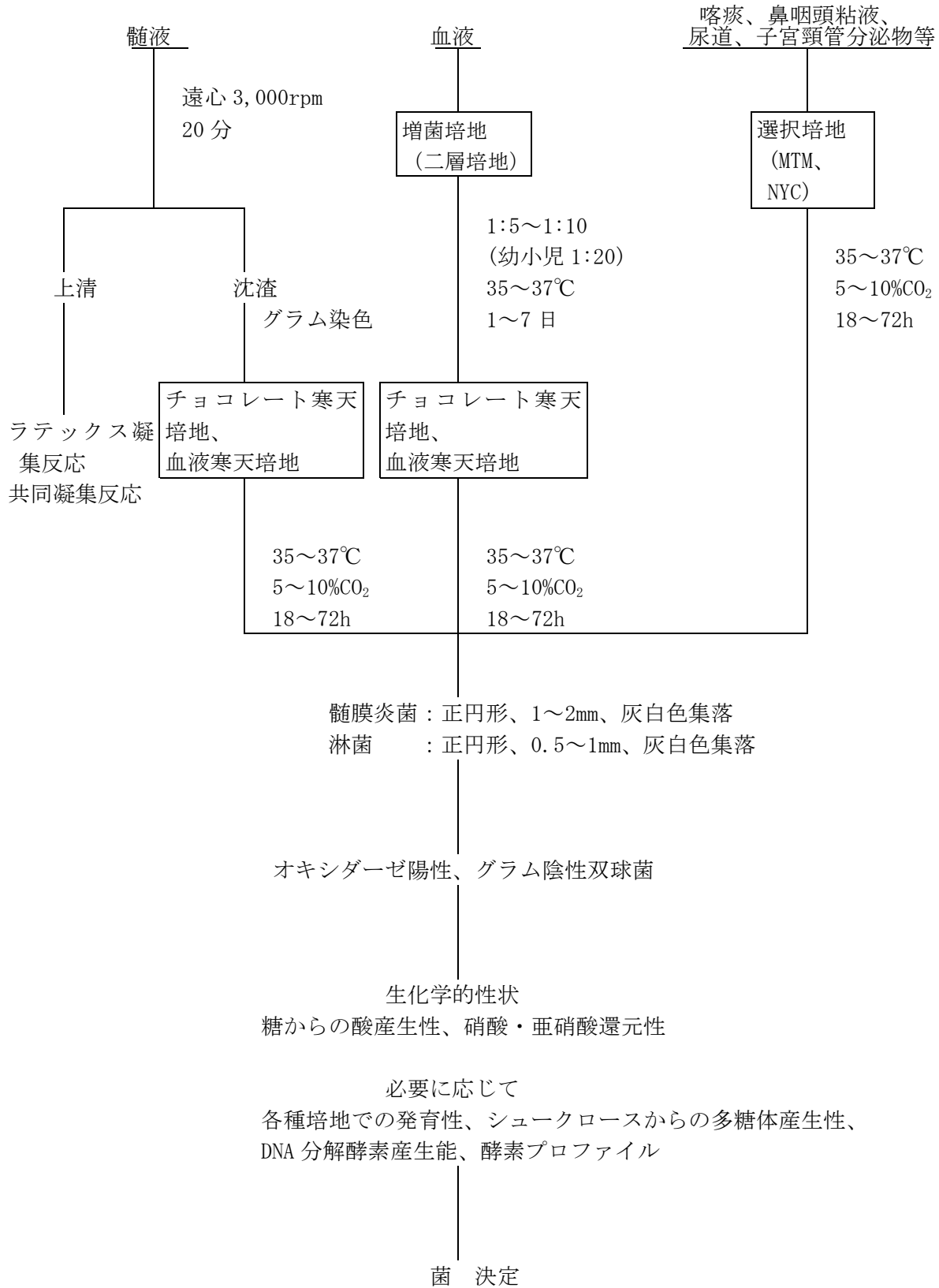


図1 病原性 *Neisseria* 属菌の検査の流れ

II. 検体の採取、検査手技

1. 髄液、皮膚穿刺液、関節腔液

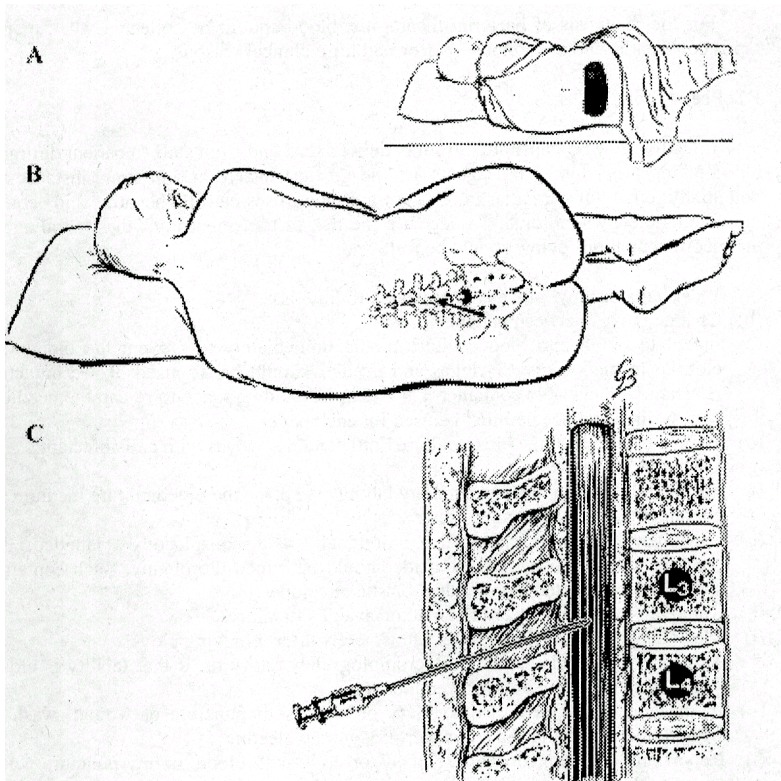
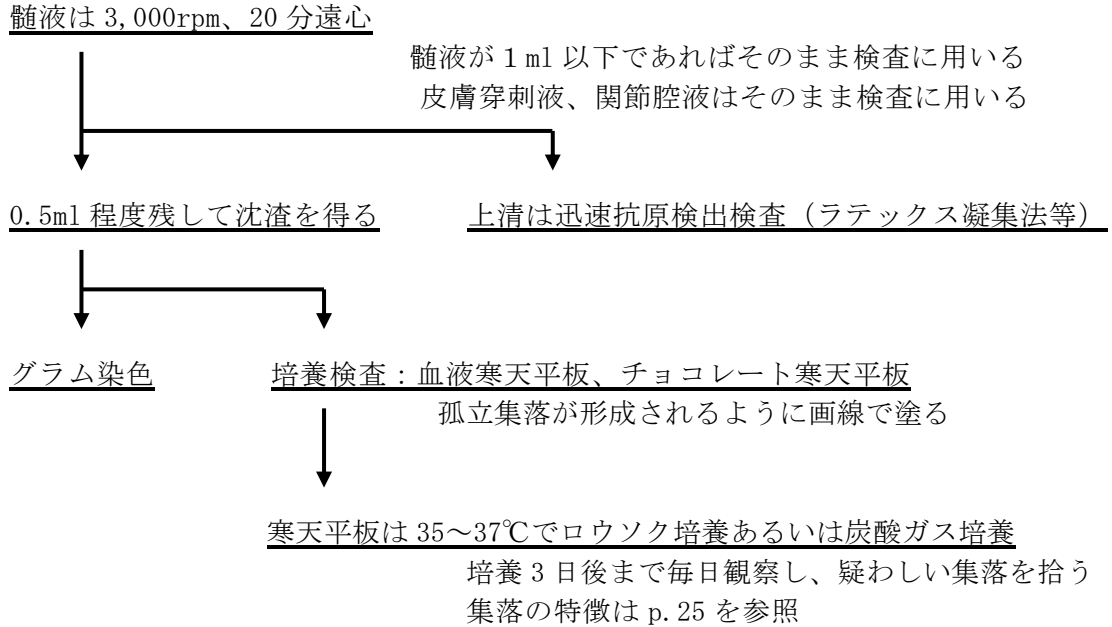


図2 腰椎穿刺術

A：患者の穿刺を実施する周囲を消毒する。

B：患者の穿刺部位を示す。

C：穿刺針が脊髄腔に達するように注意深く刺す。

出典：Diagnostic Microbiology, Elmer W. et al, J. B. Lippincott, 1992.

2. 血液

採取直後に血液培養用増菌培地に接種

5~10ml を 50ml の培地 (1:5 から 1:10) に接種
幼小児 : 1~2ml を 20ml の培地 (1:10~20 程度) に接種
淋菌感染の疑いでは二層培地

↓
35~37℃で培養、7日後まで毎日観察

培地の通気性を保ち、3~10%CO₂ 環境下に置く

菌の増殖を観察 : 血液寒天培地

チョコレート寒天培地 } 継代培養

菌の増殖が観察されない : 18~24 時間後、48 時間後、7 日後

血液寒天培地

チョコレート寒天培地 } 継代培養

平板上における菌の増殖の有無を確認

3. 喀痰

痰を滅菌シャーレあるいは採痰用の滅菌容器等に喀出



痰 (膿様であればその部分) の 1 白金耳を接種

MTM 培地等の選択培地

血液寒天培地、チョコレート培地等の非選択培地
も併用

孤立集落が形成されるように画線で塗る

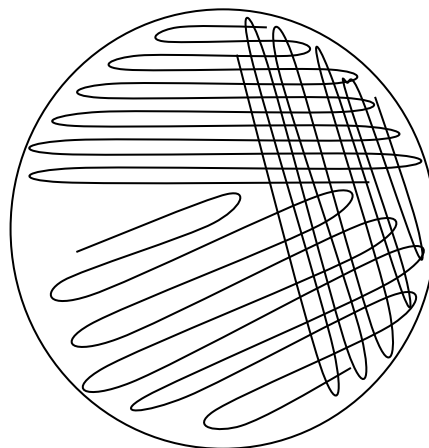
選択培地では濃いめに塗ることができる



35~37℃でロウソク培養あるいは炭酸ガス培養 (5~10%)

培養 3 日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

図 3 画線塗抹の 1 例



4. (鼻) 咽頭粘液

滅菌綿棒で鼻咽頭粘液、咽頭後壁から扁桃の表面の粘液をぬぐい取る (下図参照)



採取後直ちに MTM 培地等の選択培地の全面に塗抹

採取直後の培地への接種不可ならば Stuart 培地での
保存・輸送可 (冷蔵)



35~37°Cでロウソク培養あるいは炭酸ガス培養 (5~10%)

培養3日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

5. 膣・子宮頸管分泌物

滅菌綿棒2本で膣、子宮頸管分泌物を採取



1本をスライドガラスに塗抹



グラム染色

1本は採取後直ちに MTM 培地等の選択培地の全面に塗抹

採取直後の培地への接種不可ならば
Stuart 培地での保存・輸送可 (冷蔵)

35~37°Cでロウソク培養あるいは炭酸ガス培養 (5~10%)

培養3日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

6. 尿道分泌物

尿道口を滅菌脱脂綿等で清拭



尿道をマッサージし、尿道分泌物を滅菌綿棒2本で採取



1本をスライドガラスに塗抹



グラム染色

1本は採取後直ちに MTM 培地等の選択培地の全面に塗抹

採取直後の培地への接種不可ならば
Stuart 培地での保存・輸送可 (冷蔵)

35~37°Cでロウソク培養あるいは炭酸ガス培養 (5~10%)

培養3日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

7. 直腸粘液

滅菌綿棒を直腸内 3～5 cm 挿入、肛門内側腺窩から粘液採取



採取後直ちに MTM 培地等の選択培地の全面に塗抹

採取直後の培地への接種不可ならば Stuart 培地での
保存・輸送可（冷蔵）



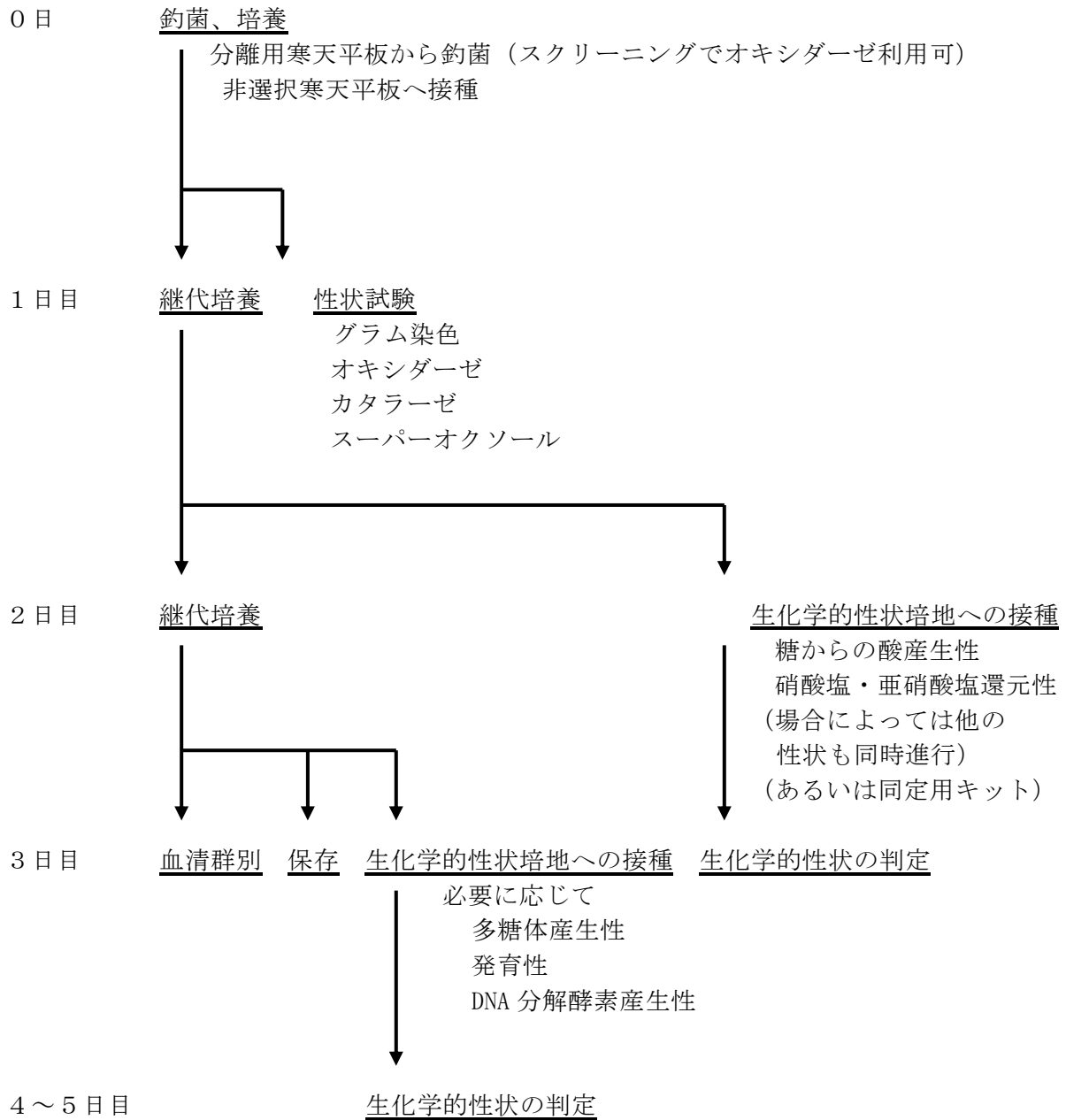
35～37℃でロウソク培養あるいは炭酸ガス培養（5～10%）

培養 3 日後まで毎日観察し、疑わしい集落を拾う
集落の特徴は p. 17 を参照

III. 菌の分離、同定・鑑別

1. 分離菌の同定・鑑別作業日程の目安

検体を分離用寒天平板に接種してから *Neisseria* 属菌の鑑別が完了するまで、通常 4~7 日を要する。以下に分離用寒天平板からの釣菌に続いて性状試験終了までの作業の流れと日程の目安を示す。



2. 釣菌

18～48 時間培養後、寒天平板上の集落を観察



髄膜炎菌：直径 1～2mm、半透明、

光沢のあるやや隆起した正円形集落

淋菌：直径 0.5～1mm、

T1、T2：0.5mm ほど、不透明、光沢ある隆起した集落

T3、T4：1mm ほど、半透明、光沢少ないやや扁平の集落

小さめの白金耳で多めに釣菌



白金耳の先に菌が見える菌量を拾う

非選択培地（血液寒天培地、Kellogg 培地等）に転培

釣菌すべき集落が判別できない場合は、1% Tetramethyl- ρ -phenyldiamine・HCl 水溶液（オキシダーゼ試験試薬）を集落上に滴下し、オキシダーゼ陽性集落を 30 秒以内に拾う（オキシダーゼ試験によるスクリーニング）。

3. グラム染色

清浄なスライドグラス上に少量の精製水を滴下



新鮮集落から白金耳で菌を取り、精製水に浮遊



自然乾燥後、火炎固定



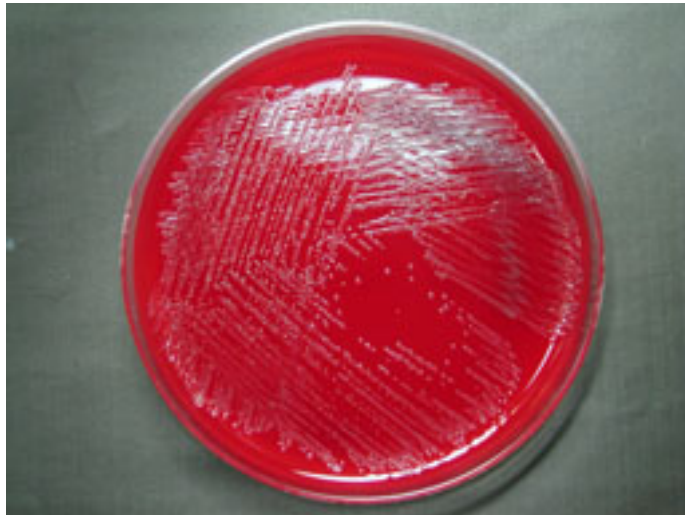
Hucker の変法でグラム染色



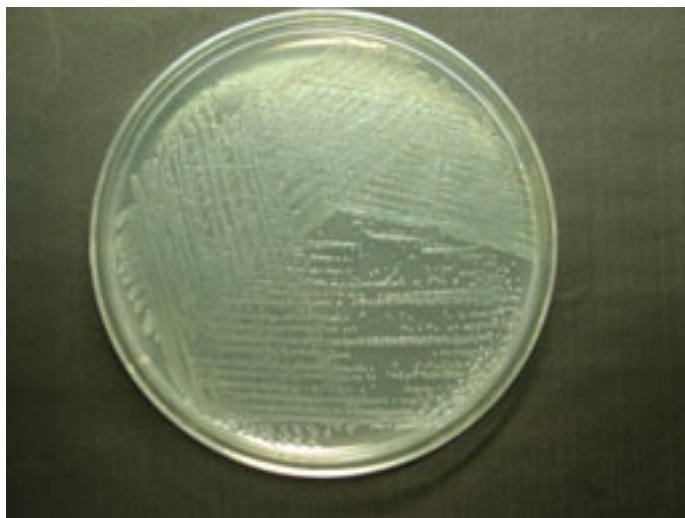
顕微鏡でグラム陰性双球菌であることを確認



MTM

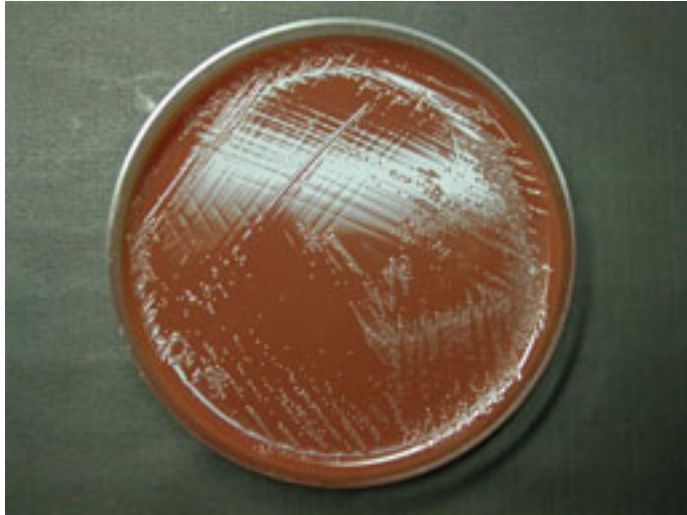


血液寒天培地

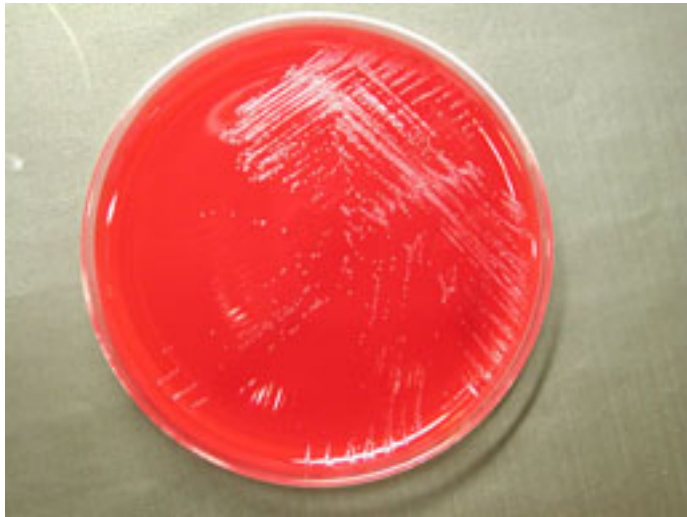


Kellogg 培地

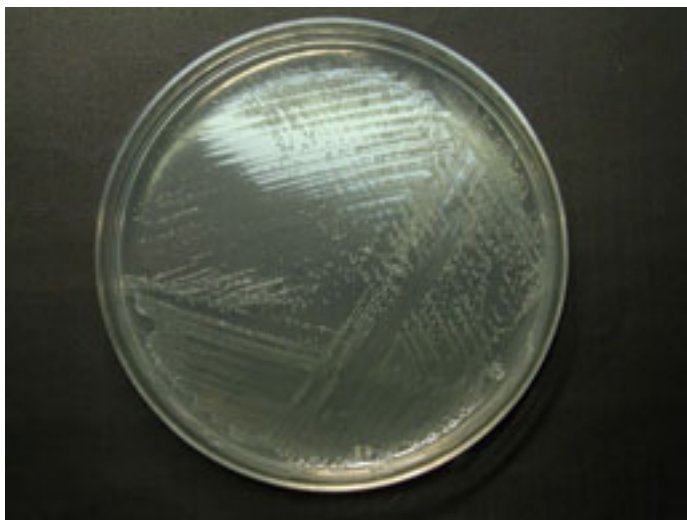
図 5 髄膜炎菌の平板状での様子



MTM



血液寒天培地



Kellogg 寒天培地

図 6 淋菌 (*N. gonorrhoeae*) の平板上の様子

4. オキシダーゼ試験

新鮮集落に 1% Tetramethyl- ρ -phenyldiamine·HCl 水溶液を滴下



数秒後、青紫色に発色

あるいは

1% Tetramethyl- ρ -phenyldiamine·HCl 水溶液をろ紙に滴下



新鮮集落から白金耳で菌を取り、ろ紙に塗抹



数秒後、青紫色に発色

キットや市販試薬の利用可

5. カタラーゼ試験、スーパーオクソール試験

Kellogg 培地で炭酸ガス存在下 35~37°C、16~18 時間培養



新鮮な集落上に あるいは シャーレに 1 白金耳の菌を採り

3%過酸化水素水 (カタラーゼ試験) 滴下

30%過酸化水素水 (スーパーオクソール試験) 滴下



判定

発泡すれば陽性

6. 糖からの酸産生性

非選択平板培地（Kellogg 培地等）1～2 枚全面に菌を塗抹



炭酸ガス存在下 35～37℃で、16～18 時間培養



白金耳でかき取り、CTA 培地表面から 0.5～1cm 程度に接種



1 チューブ当たり 2 白金耳程度接種し、接種部を白濁
最後に管底まで穿刺（図 5 参照）

大気中 35～37℃で、18～24 時間培養



判定

培地上部が黄変：陽性 vs 培地上部が赤変：陰性
培地全体が黄変または赤変：雑菌が混入

7. 硝酸塩・亜硝酸塩還元性

非選択培地（Kellogg 培地等）で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養



還元性試験用培地に 1 白金耳菌接種



大気中 35～37℃で、24～48 時間静置



試薬 1 と試薬 2 を等量混ぜ、約 0.5ml を培地に滴下



数秒後判定

硝酸塩培地：赤変＝陽性 vs 変化なし



亜鉛末の微量を添加

赤変＝陰性 vs 変化なし＝陽性

亜硝酸塩培地：赤変＝陰性 vs 変化なし＝陽性

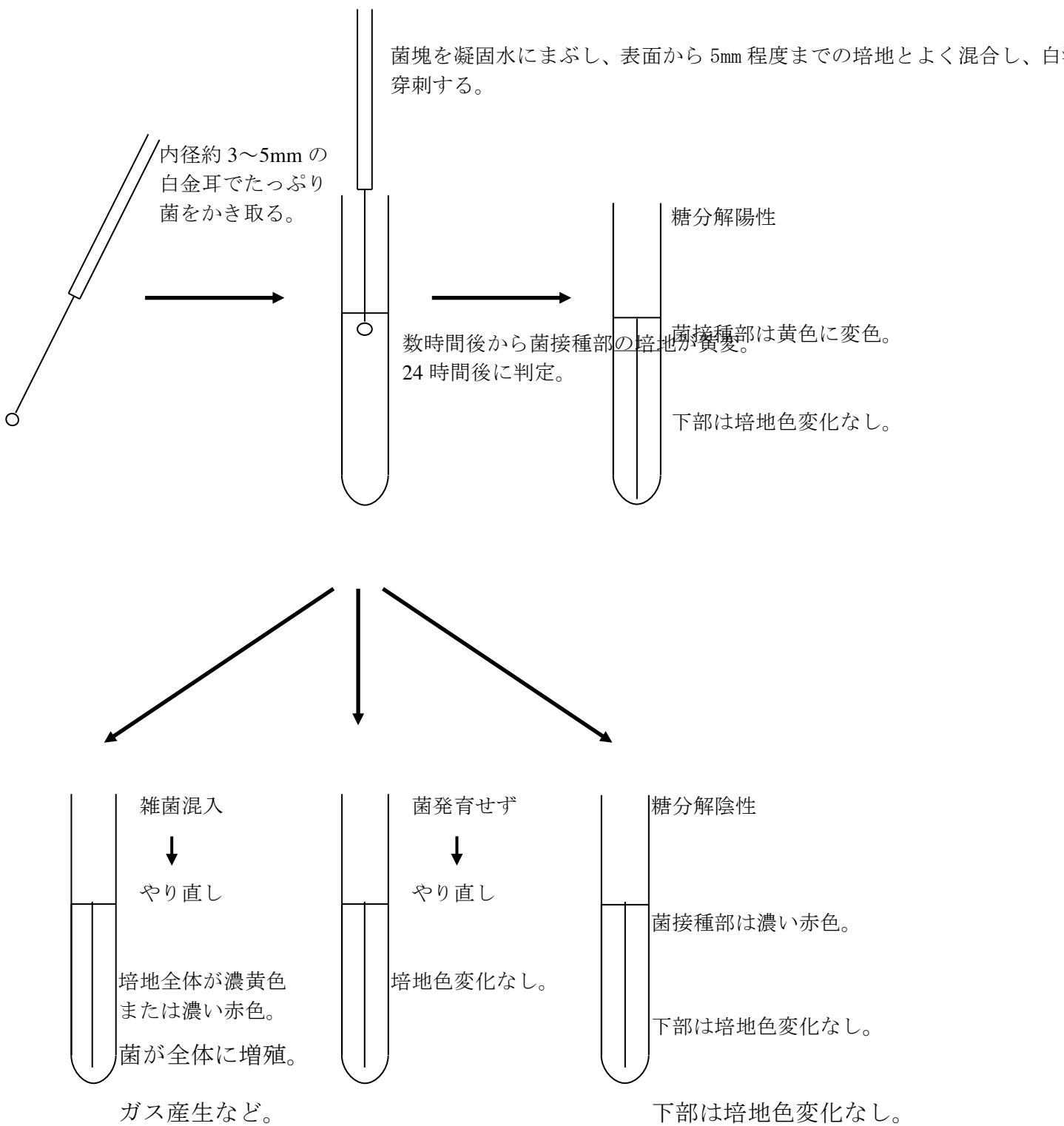


図 7 *Neisseria* 属菌の CTA 培地への接種法と判定

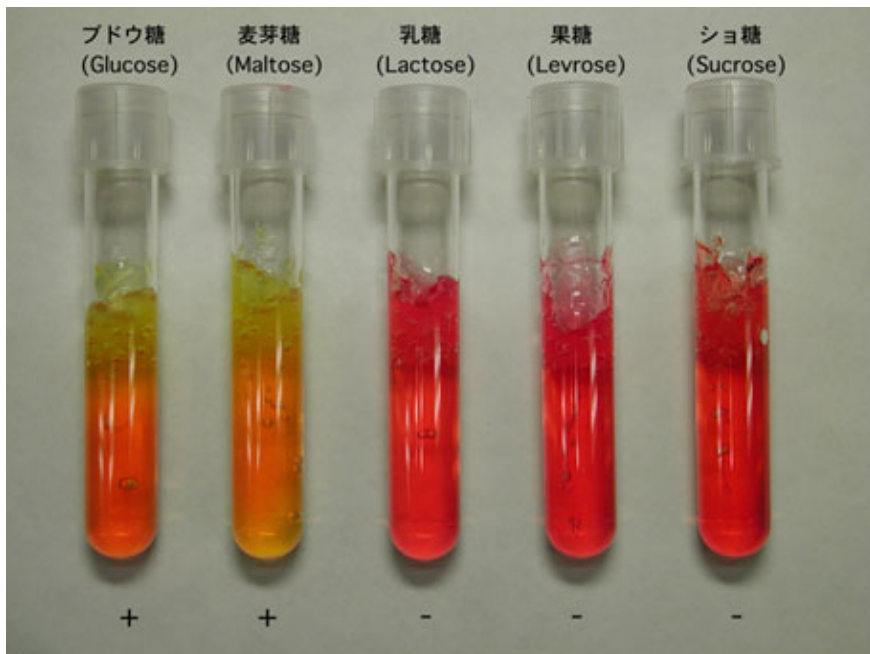


図 8 髄膜炎菌の CTA 培地での糖分解の結果

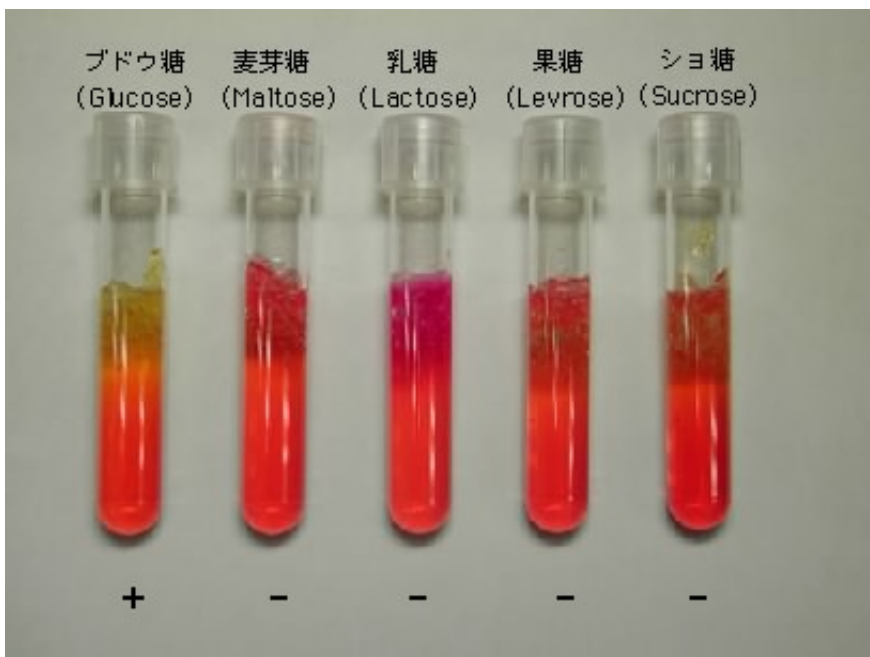


図 9 淋菌の CTA 培地での糖分解の結果

8. 多糖体産生性試験

非選択培地（Kellogg 培地等）で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養



10⁷～⁸CFU/ml 程度の浮遊液作製あるいは白金耳で濃厚に画線接種



1% シュークローズ加寒天培地に接種



大気中、35～37℃、48 時間培養



集落に Lugol 液滴下



判定

暗赤紫色から濃青色：陽性

9. 各種培地での発育性

非選択培地（Kellogg 培地等）で炭酸ガス存在下 35～37℃、16～18 時間培養



10⁶～⁷CFU/ml 程度の浮遊液作製



各種寒天培地に接種

MTM 培地あるいは NYC 培地

（MTM 培地や NYC 培地から分離した場合は不要）

Kellogg 培地

食塩無添加培地



MTM 培地あるいは NYC 培地炭酸ガス存在下 35～37℃で、48 時間培養

Kellogg 培地 (22°Cにおける発育) 及び食塩無添加培地大気中 35~37°C、48 時間培養

10. DNA 分解酵素産生性試験

非選択培地 (Kellogg 培地等) で炭酸ガス存在下 35~37°C、16~18 時間培養

↓
DNA 分解酵素産生性試験用培地に濃厚に画線接種

↓
炭酸ガス存在下 35~37°C、24 時間培養

↓
1N 塩酸を培地全体に滴下

↓
判定

集落周辺に透明帯：陽性

11. 群別用血清凝集反応

5%ウマまたはウサギ脱繊維血加 TSA 培地で炭酸ガス存在下 35~37°C、16~18 時間培養

↓
菌を白金耳で取り、1ml 生食に浮遊 (McFarland 3~4)

↓
菌浮遊液を 10 分間煮沸

↓
清浄なスライドグラスに抗血清を滴下

↓
抗血清と菌浮遊液を混合、攪拌

↓
凝集を観察

問い合わせ先

国立感染症研究所 細菌第一部 第五室 高橋英之
hideyuki@nih.go.jp

執筆者一覧

高橋英之：国立感染症研究所 細菌第一部
神奈川県衛生研究所 黒木俊郎
平成 12-14 年度厚生科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業
「髄膜炎菌性髄膜炎の発生動向調査及び検出方法の研究」研究班

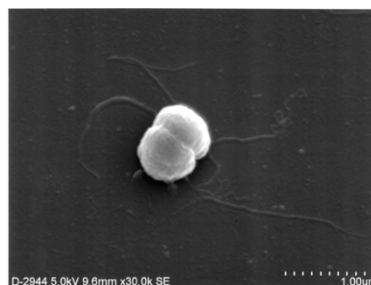
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

マスギャザリングにおける髄膜炎菌感染症の検査体制強化に資する開発研究

髄膜炎菌の保存・輸送・薬剤感受性試験マニュアル

PCR法を用いた髄膜炎菌 *Neisseria meningitidis* 検出・解析マニュアル

髄膜炎菌はグラム陰性の球菌であり、ヒトのみを唯一の宿主とする。通常ヒトの鼻咽頭に定着して、くしゃみ等の飛沫感染を介してヒトからヒトへ伝播する。0.5～30%のヒトには何の症状も発症しない「健康保菌者」として存在しうが、何かのきっかけで人の血中や髄液に侵入すると敗血症や髄膜炎の主症状を発症させる危険な病原菌である。髄膜炎菌の他にインフルエンザ菌、肺炎球菌、大腸菌 K-1 株などが化膿性髄膜炎の起炎菌として挙げられるが、流行性の髄膜炎を引き起こすのは髄膜炎菌のみである。侵襲性髄膜炎菌感染症の発生事例の後には近縁者への二次感染の可能性もあるため、十分に注意する必要がある。



-----目次-----

I. 髄膜炎菌の培養、保存及び輸送	P. 55
II. 薬剤感受性試験	P. 58
III. DNA の精製法	P. 59
IV. PCR法による髄膜炎菌の検出	P. 60
V. PCR法による髄膜炎菌の血清群型別法	P. 63

I. 髄膜炎菌の培養、保存及び輸送

1) 培養

髄膜炎菌を培養するには5%CO₂（微好気）及び湿度が高い培養環境が必要である。CO₂インキュベーターやガスパックを用いた加湿条件下で、チョコレート寒天培地、血液寒天培地（血液の動物種は問わない）、GC寒天培地（市販のGC粉末培地に発育促進剤を添加したナイセリア専用培地、生培地も市販されている）を用いて通常は12～16時間ほど培養する。逆に長時間（20時間以上）の培養は髄膜炎菌の自己融解を誘引し、死滅させてしまうので、培養時間には十分な注意が必要である。


2) 保存

髄膜炎菌を保存するには大量（培地 1/4 分画以上）の新鮮培養菌を用いた凍結保存法が最も安定的な保存方法である。具体的には、マイクロバンク（イワキ株式会社）を用いて-80℃で保存することを推奨する。髄膜炎菌の保存は腸内細菌科等と比較すると難しく、寒天培地で保存することは推奨しない（培地上の病原性 *Neisseria* 属菌は死滅しやすく、冷蔵・常温にかかわらず3日を過ぎると死滅する）。下記に本研究で作成した菌株保存の簡易マニュアルを示す。

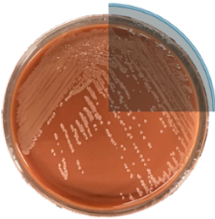
新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
マシヤザリグにおける髄膜炎菌感染症の検査体制強化に資する開発研究

髄膜炎菌の保存簡易マニュアル_{Ver.20191010}


他施設から輸送された菌株



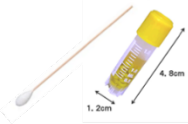
18h培養後（35℃、5%CO₂）のCA培地所見



スワブを取り出し、CA培地に直接塗抹後、16-20h培養（35℃、5%CO₂）




培地1/4分画程度の菌をスワブで採取し、マイクロバンク（マイクロバンク使用方法参照）を用いて保存（-80℃*）
*もし無ければ-20℃で代用する




マイクロバンクの使用方法

- マーカーペンを用いて保存菌名をバイアルに記載します。
- ①18～24時間純培養した幼若菌をとり、バイアル中の液体培地に濃度がマクファランド#3～4に相当するように浮遊させます（図1）。
- ②キャップを締め、浮遊菌がビーズに吸着するようにバイアルを穏やかに4～5回上下させます（図2）。この際、バイアルをうす状に回転させないでください。
- ③上記の操作により菌は多孔性ガラスビーズに吸着します。つぎに滅菌ピペットを用いて浮遊菌を残らず吸引します（図3）。キャップを固く締め、フリーザーに入れ保管します。



- 菌株の復元
- ①バイアルをフリーザーから取り出します。バイアルの凍結融解を防ぐため、別売のアルミ製保冷スタンドを使用することを推奨します（図4）。バイアルのキャップを開け、滅菌した白金線なしピンセットを用いてビーズを1個取り出します（図5）。バイアルはキャップを締め、直ちにフリーザーに戻します。
- ②取り出したビーズを平板ないし液体培地に接種します（図6）。



イワキ株式会社HPより

3) 輸送

髄膜炎菌を輸送するには大量（培地 1/4 分画以上）の新鮮培養菌を活性炭含有シードスワブ（シードスワブ γ3 号 ‘栄研’、栄研化学）で採取し、適切な容器に包装後、輸送を行う。その際、予備を含め 2 本以上のスワブを輸送するのが望ましい。室温輸送が可能である。スワブの包装は国立感染症研究所バイオセーフティー管理室の遵守事項を参照する。下記に本研究で作成した菌株輸送簡易マニュアルを示す。

※なお、室温輸送は生残菌数を速やかに減少させるが、輸送後 7 日までは多数の生残菌を得ることが出来る。

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業
マスギャザリングにおける髄膜炎菌感染症の検査体制強化に資する開発研究

髄膜炎菌の輸送簡易マニュアル Ver.20191010

菌株の継代培養とスワブ採取

- 他施設から輸送された菌株（スワブ）をCA培地に直接塗抹する
- 35℃（5%CO₂）で16-20h培養後、**培地1/4分画程度の菌をシードスワブ** *γ3号‘栄研’で採取し、培地入りチューブに挿入（キャップはしっかり閉める）
- 合計**3本**採取する



18h培養後（35℃、5%CO₂）のCA培地所見

（例）培養と輸送のタイムスケジュール

日	月	火
	起眠	スワブで採取、輸送

記載ラベルは下記の通り
1. 施設名①
2. 施設名②
3. 施設名③

輸送

採取したスワブを**二次容器***と**三次容器***で梱包し、それらを**ジュラルミンケース**を用いて指定された施設に**室温**で輸送する
*二次・三次容器は決められた組合せで用いる（カテゴリーAまたはB）



サンプルを二次容器に入れた様子
（写真ではスワブは6本あるが、実際は3本梱包する。二次容器のジッパーは閉じ、シールで密封する）



二次容器を三次容器で梱包した様子
（三次容器の蓋はテープ等を用いて開かないようにする）



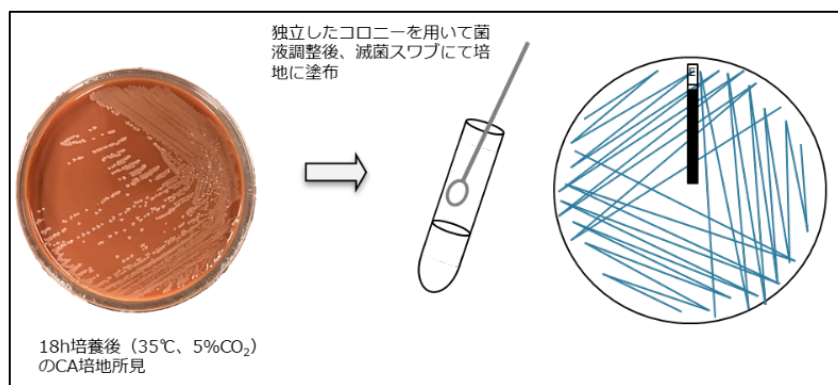
三次容器をジュラルミンケースに入れた様子

II. 薬剤感受性試験

1) E-test 法

新鮮培養菌を用いて、下記の手順に従い実施する。

1. 保存菌株をチョコレート寒天培地に塗布し、35°C (5%CO₂) で 16 時間程度培養する。
2. 独立したコロニーを釣菌し、生理食塩水を用いてマックファーランド #0.5 と同じ濁度の菌液を調整する。
3. 滅菌スワブを調整した菌液に浸し、過剰な菌液を試験管内壁に押し付けて除去する。血液加ミューラーヒントン寒天培地（日本 BD）の表面全体に、シャーレを 60 度ずつ回転させながら、むらなく 3 回塗布する（下図を参照）。



4. 培地表面が乾いたのを確認して E-test ストリップを置く（ただし、菌液塗布後、15 分以内に終える必要あり）。
5. 35°C (5%CO₂) で 24h 培養後、阻止帯から MIC 値を読み取る。
6. 各抗菌薬 MIC 値は、European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing が報告している clinical breakpoints を基に感性・耐性を判定する。



III. DNA の精製法

プレートに培養した髄膜炎菌を 1 μ l ループで
掻き取り、100 μ L TE に懸濁する。

その懸濁液を DNeasy Blood & Tissue Kits
(QIAGEN) を用いて精製する。



精製法の簡略版は以下に示すが、その詳細は添付プロトコルを参照のこと。

<DNeasy Blood & Tissue Kits を用いた髄膜炎菌の DNA の調製法>

1. Protease K 溶液を 20 μ l 添加する。
2. Vortex して混ぜる。
3. Buffer ATL を 200 μ l 添加する。
4. 56°C で 10 分インキュベートする。
5. その DNA 溶液を DNeasy Mini spin column に入れる
6. 8000rpm で 1 分 遠心
7. 新しい 2mL チューブ (付属) に DNeasy Mini spin column に移す
8. 500 μ l の Buffer AW1 を加える
9. 8000rpm で 1 分 遠心
10. 新しい 2mL チューブ (付属) に DNeasy Mini spin column に移す
11. 500 μ l の Buffer AW2 を加える
12. 最大速度で 2 分 遠心
13. 1.5mL チューブに DNeasy Mini spin column に移す
14. 200 μ l の Buffer AE を加える
15. 8000rpm で 1 分 遠心
16. DNeasy Mini spin column を外して捨てる。

※キアゲンのキットに限らず、通常使用している DNA 精製キットがあればそれを用いれば十分である。

※DNA 精製キットを用いた方が以下の検査結果がクリアに出るが、もし入手しにくい場合には菌懸濁液を 100°C で 5 分処理後、遠心処理した上清 (ボイルサップ) を用いても同様の結果を得られる可能性は高い。

IV. PCR法を用いた髄膜炎菌の検出・同定

髄膜炎菌の検出には莢膜多糖体合成酵素遺伝子群の一つである *ctrB* 遺伝子、髄膜炎菌の簡易同定マーカー、 γ -グルタミルアミノペプチダーゼの *ggt* 遺伝子を同時に検出することにより、莢膜多糖体非合成髄膜炎菌株も含めた形で同定と検出が可能となる。

詳細は以下の論文を参照のこと。

1. Hideyuki Takahashi and Haruo Watanabe. A gonococcal homologue of meningococcal γ -glutamyl transpeptidase gene is a new type of bacterial pseudogene that is transcriptionally active but phenotypically silent. *BMC Microbiology* **5**:56, 2005
2. Hideyuki Takahashi, Masae Haga M, Tomimasa Sunagawa, Takehito Saitoh, Takeru Kitahara, Shohkichi Matsumoto, Makoto Ohnishi. Meningococcal carriage rates in healthy individuals in Japan determined using Loop-Mediated Isothermal Amplification and oral throat wash specimens. *Journal of Infection and Chemotherapy* **22**:501-504, 2016.

1) プライマーセット

① *ctrB* : 髄膜炎菌 莢膜多糖体産生株検出用プライマー

ctrB-F3 5' - ACCAGTTGAACGATCGTGC -3' 19mer

ctrB-B3 5' - CCAGCTGGGTTTGAATCACA -3' 19mer

② *ggt* : 髄膜炎菌 γ -グルタミルアミノペプチダーゼ検出用プライマー

ggt-63 5' -ATGCCTTGTATGAATC -3' 16mer

ggt-20 5' - TGTCGTCTGCACCGCCACCATCGC -3' 24mer

2) PCR 反応液組成及び反応条件

反応組成液は1反応あたり以下のように調製する。

※Takara Ex Taq buffer の場合

(他メーカーのPCR酵素でも使用可能だが、その場合にはプライマーの至適濃度に注意して使用すること)

精製 DNA	1	μ l
10 x ExTaq buffer	2.5	μ l

2.5mM dNTPs	2	μl
ctrB-F3 (100μM)	0.25	μl
ctrB-B3 (100μM)	0.25	μl
ggt-63 (100μM)	0.25	μl
ggt-20 (100μM)	0.25	μl
Taq polymerase	0.25	μl
H ₂ O	18.25	μl
<hr/>		
Total	25	μl

※検体分(x)、更に PCR のクオリティコントロールが必要な場合には (1) 莢膜多糖体産生株陽性コントロール、(2) 莢膜多糖体非産生株陽性コントロール、(3) 淋菌 (陰性コントロール)、(4) DNA なしの 4 つを追加すること。

3) PCR 反応条件は以下のように行なう。

94°C × 30sec.	} 25 cycles
56°C × 30sec.	
72°C × 30sec.	

4) 結果の判定

PCR 反応終了後、2μl の PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV イルミネーターでバンドの有無を確認する。以下に確認されるバンドの長さを示す。図 1 は髄膜炎菌の検出・判定例を示す。

ctrB	210bp
ggt	327bp

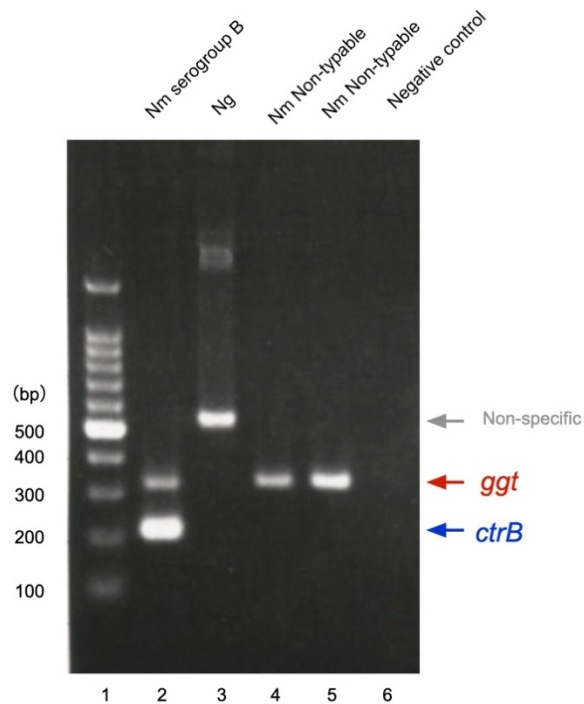


図1 Duplex PCRによる髄膜炎菌の同定例

lane 1: 100 bp ラダー、lane 2: 髄膜炎菌（血清群 B）、lane 3: 淋菌、lane 4: 髄膜炎菌（莢膜多糖体非合成株「血清群型別不能株」)-1、lane 5: 髄膜炎菌（莢膜多糖体非合成株「血清群型別不能株」)-2、lane 6: DNA なし (Negative control)

ctrB 遺伝子陽性の場合には、次項の血清群型別への作業へ移行する。

※*ctrB* 遺伝子陰性の場合には、次項の血清群型別への作業へは移行しない。

（「莢膜多糖体非合成株（型別不能株）」であるため）

※ExTaq より増幅効率の良い polymerase（例えば Takara ExTaqHS）を用いると薄い extra band（非特異的バンド）が検出されることを確認している。特異的なバンドと比べ、シャープではなく且つ薄いので、コントロールと比較するとその差別化は容易である。そのためにも必ずコントロール DNA はおくべきである。

V. PCR法を用いた髄膜炎菌の血清群の同定

髄膜炎菌の莢膜多糖体は複数の多糖体が数珠つなぎに繋がった構造をしており、その血清群は莢膜多糖体の末端に存在する糖の種類（もしくは分岐の違い）を抗体を用いて区別することにある。本検査ではその莢膜多糖体の末端に存在する糖の種類（もしくは分岐の違い）が一酵素の種類の違いにあることに着目し、各血清群に特異的な酵素の遺伝子を multiplex PCR法を用いて検出することにより、その血清群を迅速に決定することを可能としている。

詳細は以下の論文を参照のこと。

3. Muhamed-Kheir Taha. Simultaneous Approach for Nonculture PCR-Based Identification and Serogroup Prediction of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Clinical Microbiology* **38**:855-857, 2000.
4. Zacharoula Drakopoulou, Konstantinos Kesanopoulos, Maria Sioumalas, Alexandra Tambaki, Jenny Kremastinou & Georgina Tzanakaki. Simultaneous single-tube PCR-based assay for the direct identification of the five most common meningococcal serogroups from clinical samples. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* **53**:178-182, 2008.

1) プライマーセット

① sacB (serogroup A) : 髄膜炎菌 血清群 A 検出用プライマー

sacB-F 5' - GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC -3' 25mer
sacB-R 5' - CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT -3' 24mer

② siaD (B) : 髄膜炎菌 血清群 B 検出用プライマー

siaD (B)-F 5' - GGATCATTTTCAGTGTTTTCCACCA -3' 24mer
siaD (B)-R 5' - GCATGCTGGAGGAATAAGCATTA -3' 24mer

③ siaD (C) : 髄膜炎菌 血清群 C 検出用プライマー

siaD (B)-F 5' - TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT -3' 25mer
siaD (B)-R 5' - CAATCACGATTTGCCCAATTGAC -3' 23mer

④ siaD (Y/W) : 髄膜炎菌 血清群 Y/W 検出用プライマー

siaD (Y/W)-F 5' - TCCGAGCAGGAAATTTATGARAA -3' 23mer
siaD (Y/W)-R 5' - GCCATTCCAGAAATATCACCAG -3' 22mer

2) PCR 反応液組成及び反応条件

反応組成液は1反応あたり以下のように調製する。

※Takara Multiplex Assay Kit Ver.2の場合

(他メーカーのPCR酵素でも使用可能だが、その場合にはプライマーの至適濃度に注意して使用すること)

精製 DNA	1 μ l
2 x Multiplex PCR Buffer	12.5 μ l
sacB-F (20 μ M)	0.25 μ l
sacB-R (20 μ M)	0.25 μ l
siaD(B)-F (20 μ M)	0.25 μ l
siaD(B)-R (20 μ M)	0.25 μ l
siaD(C)-F (20 μ M)	0.25 μ l
siaD(C)-R (20 μ M)	0.25 μ l
siaD(Y/W)-F (20 μ M)	0.25 μ l
siaD(Y/W)-R (20 μ M)	0.25 μ l
Multiplex PCR Enzyme Mix	0.125 μ l
H ₂ O	9.375 μ l
Total	25 μ l

※検体分(x)、更に PCR のクオリティコントロールとして (1) 莢膜多糖体 A、B, C, Y, W5 種混合陽性コントロール、(2) DNA なしの2つを追加すること。

※上記の Multiplex PCR は各血清群の遺伝子が効率よく増幅させるために Takara Bio の Multiplex PCR Assay Kit Ver.2 を使用している。

しかし、各研究所の研究環境においてはこのキットを用意することが困難な場合もあると考えられる。その場合は通常の PCR 酵素 (執筆責任者は Takara Bio の ExTaq polymerase) でも実施可能であった。通常の PCR 酵素で行い場合には以下の組成で PCR を行う。

精製 DNA	1 μ l
10 x Ex Taq Buffer	2.5 μ l
2.5 mM dNTPs	2 μ l

sacB-F (<u>100μM</u>)	0.25 μl
sacB-R (<u>100μM</u>)	0.25 μ
siaD(B)-F (<u>100μM</u>)	0.25 μl
siaD(B)-R (<u>100μM</u>)	0.25 μl
siaD(C)-F (<u>100μM</u>)	0.25 μl
siaD(C)-R (<u>100μM</u>)	0.25 μl
siaD(Y/W)-F (<u>100μM</u>)	0.25 μl
siaD(Y/W)-R (<u>100μM</u>)	0.25 μl
Ex Taq polymerase	0.25 μl
H ₂ O	17.25 μl
<hr/>	
Total	25 μl

3) PCR 反応条件は以下のように行なう。

94°C × 1min	
↓	
94°C × 30sec] 25 cycles
57°C × 30sec	
72°C × 30sec	

4) 結果の判定

PCR 反応終了後、2μl の PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色後、UV イルミネーターでバンドの有無を確認する。以下に確認されるバンドの長さを示す。

Serogroup A	sacB	400 bp
Serogroup B	siaD(B)	450 bp
Serogroup C	siaD(B)	250 bp
Serogroup Y/W	siaD(Y/W)	120 bp

図 2 は髄膜炎菌の検出・判定例を示す。

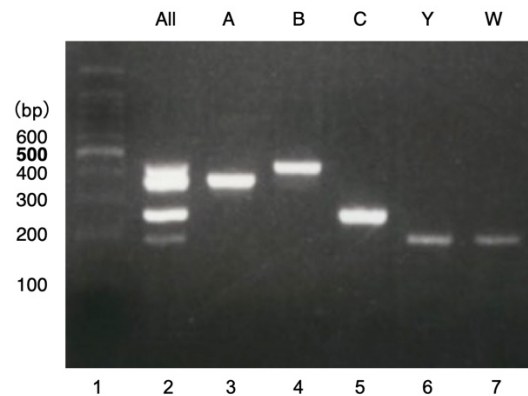


図2 Multiplex PCRによる髄膜炎菌の血清群同定例

lane 1: 100 bp ラダー、lane 2: 髄膜炎菌 (血清群 A+B+C+Y+W 5 種混合)、lane 3: 髄膜炎菌 血清群 A、lane 4: 髄膜炎菌 血清群 B、lane 5: 髄膜炎菌 血清群 C、lane 6: 髄膜炎菌 血清群 Y、lane 7: 髄膜炎菌 血清群 W

※この Multiplex 法は検体が複数ある場合には検査の手間を少なくするには有効であるが、Y と W の区別が出来ない欠点がある。

検体数が少ない場合には参考文献 3 の方法を試みる方法もある。以下に参考までに single PCR 法による血清群決定法を紹介する。

1) プライマーセット

①crgA : PCR 陽性コントロール用プライマー

crgA-1 5' -GCTGGCGCCGCTGGCAACAAAATTC-3' 25mer

crgA-2 5' -CTTCTGCAGATTGCGGCGTGCCGT-3' 24mer

②orf2 : A 群髄膜炎菌同定用プライマー

orf2 (A)-1 5' -CGCAATAGGTGTATATATTCTTCC-3' 24mer

orf2 (A)-2 5' -CGTAATAGTTTCGTATGCCTTCTT-3' 24mer

③siaD (B) : B 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD (B)-1 5' -GGATCATTTTCAGTGTTCACCA-3' 24mer

siaD (B)-2 5' -GCATGCTGGAGGAATAAGCATTAA-3' 24mer

④siaD (C) : C 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD (C)-1 5' -TCAAATGAGTTTGCGAATAGAAGGT-3' 25mer

siaD (C)-2 5' -CAATCACGATTTGCCCAATTGAC-3' 23mer

⑤ siaD(W) : W 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD(W)-1	5' -CAGAAAGTGAGGGATTTCATA-3'	22mer
siaD(W)-2	5' -CACAAACCATTTTCATTATAGTTACTGT-3'	27mer

⑥ siaD(Y) : Y 群髄膜炎菌同定用プライマー

siaD(Y)-1	5' -CTCAAAGCGAAGGCTTTGGTTA-3'	22mer
siaD(Y)-2	5' -CTGAAGCGTTTTCATTATAATTGCTAA-3'	27mer

2) PCR 反応液組成及び反応条件

①反応組成液は1反応あたり以下のように調製する。

精製 DNA	1	μl
10 x ExTaq buffer	2.5	μl
2.5mM dNTPs	2	μl
ctrB-F3 (100μM)	0.25	μl
ctrB-B3 (100μM)	0.25	μl
ggt-63 (100μM)	0.25	μl
ggt-20 (100μM)	0.25	μl
Taq polymerase	0.25	μl
H ₂ O	18.25	μl
Total	25	μl

②PCR 反応条件は以下のように行なう。

94°C × 3min.	} 2cycles
55°C × 30sec.	
72°C × 20sec.	
↓	
94°C × 40sec.	} 30cycles
55°C × 30sec.	
72°C × 20sec.	

3) 結果の判定

PCR 反応終了後、2μl の PCR 反応液を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマ

イド染色後、UV イルミネーターでバンドの有無を確認する。以下に確認されるバンドの長さを示す。

crgA	230bp
orf2(A)	400bp
siaD(B)	450bp
siaD(C)	250bp
siaD(W135)	120bp
siaD(Y)	120bp

図 3 は Y 群髄膜炎菌の判定例を示す。

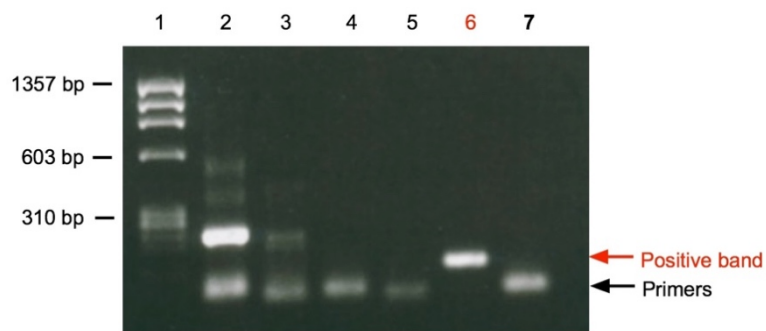


図 2 Multiplex PCR による髄膜炎菌の血清群同定例

lane 1: DNA マーカー、lane 2: PCR 陽性コントロール、lane 3: 血清群 A プライマー、lane 4: 血清群 B プライマー、lane 5: 血清群 C プライマー、lane 6: 血清群 Y プライマー、lane 7: 血清群 W プライマー

問い合わせ先

何か不明な点がございましたら、お気軽にお問い合わせ下さい。

〒113- 8510

東京都文京区湯島 1-5-45

東京医科歯科大学 大学院医歯学総

合研究科 分子病原体検査学分野

齋藤良一

E-mail: r-saito.mi@tmd.ac.jp

Tel:03-5803-5368

〒162-8640

東京都新宿区戸山 1- 23-1

国立感染症研究所 細菌第一部

第五室

高橋英之

E-mail:hideyuki@nih.go.jp

Tel:03-5285-1111(内線 2227)

Fax:03-5285-1163

執筆者一覧

東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 分子病原体検査学分野

齋藤良一 r-saito.mi@tmd.ac.jp

国立感染症研究所 細菌第一部 第五室

高橋英之 hideyuki@nih.go.jp

山口県環境保健センター 所長 調 恒明

愛媛県立衛生環境研究所 所長 四宮博人

結果検証協力者一覧

東京医科歯科大学医学部附属病院 検査部 中島 淳、小林亜由香

独協医科大学埼玉医療センター 感染制御部 飯草正実、永野栄子

横浜市立みなと赤十字病院 検査部 酒井雄一郎

千葉県千葉市立海浜病院 臨床検査科 大塚 武

県立宮崎病院 臨床検査科 佐多 章

那覇市立病院 医療技術部 検査室 大城健哉

さいたま市健康科学研究センター 保健科学課臨床微生物係 菊地孝司

横浜市衛生研究所 微生物検査研究課 細菌担当 松本裕子

千葉県衛生研究所 細菌研究室 菊池 俊、中村正樹

宮崎県衛生環境研究所 微生物部 吉野修司、宮原聖奈

沖縄県衛生環境研究所 衛生生物班 柿田徹也、宮平勝人

(敬称略)