

所のうち、福島県衛生公害研究所、石川県保健環境センター、香川県衛生研究所、愛媛県立衛生環境研究所および大分県衛生環境センターが健康保菌者調査を実施した。その内容は分担研究「検査法検討及び健康保菌者調査」で述べられている。研修会で習得された分離培養技術と同定鑑別技術を保菌者調査に活用することができた。今後、感染症発生动向調査事業において、髄膜炎菌性髄膜炎の診断、症例の確定等のレファレンスとしての業務、医療機関や保健所等に対する技術伝達を行う等の研修業務、集団発生の調査や分離された菌株の型別による疫学マーカーの解析等を行う研究業務並びに積極的疫学調査業務に活用されることが期待される。

髄膜炎菌はその莢膜抗原により A、B、C、29E (Z)、H、I、K、L、W135、X、Y、Z の血清群に分けられ、臨床的にはこのうち A、B、C、29E、W135 および Y が重要である。群別用血清あるいは群別用キット製品は海外のメーカーが作製して国内で市販されているが、以下のようない問題点がある。

- 1) 海外から輸入するため、入手に時間がかかる場合がある。
- 2) A、B、C 等の特定の血清群のみの試薬からなる製品があり、それ以外の型の型別ができない。
- 3) 販売を中止したメーカーがあり、将来的に安定した供給があるか疑問がある。
- 4) 型別の判定が難しい製品がある。

そこで、A、B、C、29E、W135、X、Y、Z に対する群別用血清の作製を試み、評価を行った。これまでのところ、抗 B 群血清の力価が低い、凝集の出方に差があるなどの問題があり、より抗体価の高い血清を作製することを検討している。

E. まとめ

地方の衛生行政の技術的・科学的中核機関であり、感染症発生の監視機関として感染症発生动向調査事業において重要な役割を果たしている地方衛生研究所における髄膜炎菌検査体制を確立し、監視を強化することを目的として本研究を行った。まず、地方衛生研究所に導入することが適していると考えられる標準的な髄膜炎菌等 *Neisseria* 属菌の検査法を検討した。検討した結果に基づいてマニュアルを作成し、これを用いて全国 4 カ所で地区（ブロック）毎（北

海道・東北地区、東海・北陸地区、中国・四国地区、九州・沖縄地区）に髄膜炎菌を中心にした *Neisseria* 属菌の講習会を地方衛生研究所の細菌検査担当者を対象にして開催した。全国で 31 機関の 41 名が参加し、検査技術を習得した。得られた技術は本研究班が実施している髄膜炎菌健康保菌者調査に生かされている。

群別の普及と試薬の安定的な供給を目的として、髄膜炎菌の群別血清の作製を試みた。試作された血清には問題点があり、実用には至っていない。

F. 文献

1. 松崎稔：衛生研究所及び保健所における行政検査の質の向上に関する研究 平成 5 年度研究報告書、平成 6 年 3 月。
2. 益川邦彦：地方衛生研究における感染症サーベイランス情報の解析に関する研究 平成 11 年度報告書、平成 12 年 3 月。
3. 衛藤繁男：行政検査における精度管理システム構築に関する研究、平成 8 年度報告書、平成 9 年 3 月。
4. 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 1987。
5. Murray, P.R., Baron, E.J., Tenover, F.C. and Tenover, R.H. (ed.): Manual of clinical microbiology 7th ed. American Society for Microbiology, Washington, D.C. pp1773, 1999.
6. 病原性 *Neisseria* 属菌検査法、国立公衆衛生院特別課程細菌コース
7. 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/cidod/dbmd/diseaseinfo/meningitd_manual.pdf 1998.
8. 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.

表1 群別用血清の作製に使用した菌株

群	菌株
A	3/59
B	114/9、ATCC13090
C	8/59
29E	ATCC35558
W135	ATCC35559
X	18/63
Y	19/63

表2 髄膜炎菌検査法の研修会の開催場所、日程、参加地方衛生研究所および人数

地区 参加地方衛生研究所	開催場所 参加人数	開催日程
北海道・東北・新潟地区	福島県衛生公害研究所	平成12年11月16～17日
北海道立衛生研究所	1名	
秋田県衛生科学研究所	1名	
岩手県衛生研究所	1名	
宮城県保健環境センター	1名	
仙台市衛生研究所	1名	
山形県衛生研究所	1名	
福島県衛生公害研究所	3名	
計 7機関	9名	
東海・北陸地区	石川県保健環境センター	平成12年11月30日～12月1日
富山県衛生研究所	2名	
福井県衛生研究所	1名	
岐阜県保健環境研究所	1名	
三重県衛生研究所	1名	
石川県保健環境センター	3名	
計 5機関	8名	
中国・四国地区	愛媛県立衛生環境研究所	平成12年11月9～10日
鳥取県衛生研究所	1名	
島根県保健環境科学研究所	1名	
山口県環境保健研究センター	1名	
岡山県環境保健センター	1名	
広島県保健環境センター	1名	
広島市衛生研究所	1名	
徳島県保健環境センター	1名	
香川県衛生研究所	1名	
高知県衛生研究所	1名	
愛媛県立衛生環境研究所	3名	
計 10機関	12名	
九州・沖縄地区	大分県衛生環境研究センター	平成12年11月7～8日
福岡県保健環境研究所	1名	
北九州市環境科学研究所	1名	
佐賀県衛生研究所	1名	
長崎県衛生公害研究所	1名	
大分県衛生環境研究センター	4名	
熊本県保健環境科学研究所	1名	
宮崎県衛生環境研究所	1名	
鹿児島県衛生研究所	1名	
沖縄県衛生環境研究所	1名	
計 9機関	12名	
全国計	31機関	41名

表3 *Neisseria* 属菌等研修会で実習した項目

<i>Neisseria</i> 属菌	<i>Haemophilus</i> 属菌	菌株保存法
検体採取法	分離培養法	ゼラチン・ディスク法
検体輸送法	XV因子要求性	簡易保存法
分離培養法	ポルフィリン試験	綿棒保存法
グラム染色像観察	溶血性判定法	
オキシダーゼ試験	ペニシリナーゼ産生性試験	
糖分解試験		
酵素プロファイル鑑別法		
ペニシリナーゼ産生性試験		

病原性 *Neisseria* 属 菌

(髄膜炎菌 *N. meningitidis* および淋菌 *N. gonorrhoeae*)

検査マニュアル

病原性 *Neisseria* 属菌（髄膜炎菌 *N. meningitidis* および 淋菌 *N. gonorrhoeae*） 検査マニュアル

A. 解説編	
I. 病原性 <i>Neisseria</i> 属菌の特徴	33
1. <i>Neisseria</i> 属菌の特徴	33
2. 髄膜炎菌の特徴	33
3. 淋菌の特徴	33
II. 作業上の一般的注意	34
1. 安全管理	34
2. 髄液の採取	34
3. 病原性 <i>Neisseria</i> 属菌の取り扱い	34
1) 釣菌、培養	34
2) 鑑別	34
3) 保存	34
4. 検査に要する日数	34
III. 試薬と器材	
1. 試薬	35
1) グラム染色用試薬	35
2) 抗原検出用試薬	35
3) 輸送培地	35
(1) Transgrow培地	
(2) Trans-Isolate medium	
(3) 変法Stuart培地	
4) 増菌培地	36
5) 二層培地	36
6) 分離継代培地	36
(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	37
(1) Modified Thayer-Martin medium	
(2) New York City 培地	
8) 生化学的性状確認培地	38
(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	39
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	39
11) 血清群別用抗血清	40
12) 酵素活性検出試薬	40
13) 分子遺伝学的手法用試薬	40
14) ペニシリン分解酵素産生性試験用試薬	40
2. 器材	40
1) 検体の輸送	40
2) 培養	40
3) 菌株の保存	40
IV. 分離同定	41
1. 推定	41
1) 髄液の染色	41
2) 膣・子宮頸管分泌物、尿道分泌物	41
3) ラテックス凝集反応および共同凝集反応	41
2. 菌の分離	41
1) 分離の対象となる検体	41
2) 髄液からの分離	42
3) 血液からの分離	42
4) 髄液、血液以外の検体からの分離	42

3. 鑑別・同定	43
1) オキシダーゼ試験およびグラム染色	43
2) カタラーゼ試験およびスーパーオクソール試験	43
3) 糖からの酸産生性	43
4) 硝酸塩・亜硝酸塩還元性	43
5) 各種培地での発育	44
6) シュークロースからの多糖体産生性	44
7) DNA分解酵素産生性	44
8) 酵素プロファイルによる鑑別・同定	44
9) ペニシリン分解酵素産生性試験	44
4. 髄液からのPCR法による検出	45
5. 淋菌の分子遺伝学的手法による検出	45
6. 血清型別	50
1) 血清群	50
2) typingおよびsubtyping	50
7. Multilocus enzyme electrophoresisおよびMultilocus sequence typing	50
8. 栄養要求型	50
V. 検体の輸送方法	51
1. 髄液および血液等の送付方法	51
1) 髄液の輸送方法	51
2) 血液の輸送方法	51
3) その他の臨床検体の輸送方法	51
2. 菌株の送付方法	51
1) 培養菌	51
2) 保存菌株	51
VI. 菌株の保存方法	52
1. 一時的保存	52

2. 短期保存	52
1) 綿棒保存	52
2) 簡易保存法	52
3. 長期保存	52
1) ゼラチン・ディスク法	52
(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	
2) 凍結保存法	55
3) 凍結乾燥法	55
VII. 文献	56
B. 実技編	
I. 検査の流れ	59
II. 検体の採取、検査手技	60
1. 髄液、皮膚穿刺液、関節腔液	60
2. 血液	61
3. 喀痰	61
4. (鼻) 咽頭粘液	62
5. 膣・子宮頸管分泌物	62
6. 尿道分泌物	63
7. 直腸粘液	63
III. 菌の分離、同定・鑑別	64
1. 分離菌の同定・鑑別作業日程の目安	64
2. 釣菌	65
3. グラム染色	65
4. オキシダーゼ試験	66

5. カタラーゼ試験、スーパーオクソール試験	66
6. 糖からの酸産生性	67
7. 硝酸塩・亜硝酸塩還元性	67
8. 多糖体産生性試験	69
9. 各種培地での発育性	69
10. DNA分解酵素産生性試験	70
11. 群別用血清凝集反応	70

A. 解 説 編

1. 病原性 *Neisseria* 属菌の特徴

1. *Neisseria* 属菌の特徴

Neisseria 属菌種は、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 CO_2 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 $0.5\sim 2\text{mm}$ 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 $0.6\sim 0.8\mu\text{m}$ で、そら豆状の球菌が相対する双球菌である。集落は $1\sim 2\text{mm}$ 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-Friedrichsen 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 $0.6\sim 1\mu\text{m}$ 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 $0.5\sim 1\text{mm}$ 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因菌となる。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。

II. 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動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。

菌株の保存は凍結によるが、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。

Ⅲ. 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

髄液の遠心上清から髄膜炎菌抗原を検出する方法として共同凝集試験（Phadebact）やラテックス凝集試験（Becton-Dickinson、bioMerieux等）の試薬が市販されている。群別を同時に行うことができるが、検出される血清群がA、BあるいはC等に限定されてしまう。

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）が市販されている。

3) 輸送培地

(1) Transgrow培地

後述のModified Thayer-Martin medium 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 medium (T-I medium)

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。ただし、長期間（1ヶ月程度）菌を生存させるには通気性のある栓を使用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、5 ml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液状部は高压滅菌後、5 ml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。

IV. 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、広範囲に発育する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培に用いる。基礎培地はGC寒天培地やトリプトソイ寒天培地とし、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%に加え加熱して作製する。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。
高压滅菌 (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。
均一になったら高压滅菌 (121℃、15分) する。

基礎培地とヘモグロビン溶液を別々に高压滅菌し、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) を分注直前に加える。VCNTやVCNは市販品がある。

1% Defined supplement

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 μ g/ml、colistin:5.5 μ g/ml、amphotericinB:1.2 μ g/mlおよびtrimethoprim lactate:3 μ g/ml) 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、フラ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高圧滅菌 (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替える。

(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0.1%に硝酸カリウムあるいは0.05~0.1%に亜硝酸カリウムを加える。
- ②チューブに約3 mlずつ分注して高圧滅菌する。亜硝酸カ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。*Molaxella (Branhamella) catarrhalis*の鑑別に用いる。

9) オキシダーゼ試験用試薬

1% Tetramethyl- ρ -phenylendiamine·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。

1 1) 血清群別用抗血清

群別のための血清が市販されている（Wellcome等）。血清凝集反応はスライドグラス上で常法どおりに行う。

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、ニトロセフィン粉末キット（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。

IV. 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1 ml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。

3) ラテックス凝集反応および共同凝集反応

キットの説明書に従って試験を行う。通常、髄液を3,000rpmで20分遠心し、上清をラテックス凝集反応あるいは共同凝集反応による抗原の検出に用いる。

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。