

ペストの病原体診断マニュアル（案）

国立感染症研究所 細菌第一部

目次

1. 概説	1
2. 検査材料の採取・輸送および保管	2
1) 検査材料の採取に関する一般的な注意	2
2) 検査材料の採取	2
(1) 肺ペストが疑われた場合	2
(2) 腺ペストが疑われた場合	3
(3) 敗血症型ペストが疑われた場合	3
3) 検査材料の包装と輸送	3
3. 細菌学的検査	3
1) 検査材料の取り扱い上の一般的な注意	3
2) 検査順序	3
3) 形態学的検査	4
(1) 塗抹・固定法	4
(2) グラム染色・単染色法	5
(3) 蛍光抗体法	6
4) 菌の分離および増殖形態の特徴	6
(1) 平板培養集落の特徴	6
(2) 液体培養増殖形態の特徴	7
5) PCR法を用いた迅速診断	7
6) 生化学的性状検査	8
(1) 一次確認培養試験	8
(2) 二次確認培養試験	9
(3) 毒力因子産生試験	9
(4) 鑑別試験	9
7) ファージ感受性試験	10
4. 血清診断	10
1) 血球凝集反応法	10
2) ウエスタンブロット法	10
5. ペスト菌の判定基準	10
1) 疑似	10
2) 確定	10
6. 付録	11
1) 治療の参考（抗菌薬：WHOおよびCDC提唱）	11
2) 予防の参考（抗菌薬・ワクチン：WHOおよびCDC提唱）	11
3) PCR法	11
4) 生化学的性状	13
5) 写真	
図1 ペスト菌のギムザ染色	
図2 ペスト菌の集落	
図3 ペスト菌の液体培養での増殖像	
図4 マルチプレックスPCR法によるペスト菌の検出	
図5 ウエスタンブロット法によるペスト菌の検出	

1. 概説

ペストは腸内細菌科に属する通性嫌気性のグラム陰性桿菌の *Yersinia pestis* に起因する病気で、リンパ節炎、敗血症、肺炎等を起こし、重症例では高熱、意識障害などを伴う急性細菌性感染症で、死に至ることも多い。その臨床像によって腺ペスト、肺ペストおよび敗血症型ペストに分けられる。腺ペストおよび敗血症型ペストは共に経皮感染によるもので、主にペスト菌を保有するノミに刺されて感染するが、稀に、感染動物との接触により、切傷や擦傷のある皮膚組織から感染する場合もある。前者は局所の出血・化膿性リンパ腺炎を起こし、更に遅れて肝臓、脾臓、肺臓に増殖性出血性炎を起こし敗血症で死亡する。後者は局所リンパ腺炎は起こらず、敗血症を主症状とするものである。肺ペストは腺ペスト末期や敗血症ペストの進行中に肺に菌が侵入して肺炎を続発した患者を初発患者として、患者から排出されたペスト菌エロゾールが基になって、人から人への急速な伝播が起こる呼吸器感染症である。

ペストは、本来、森林原野のペスト菌常在地域に生息する齧歯類、特にネズミ科やリス科の動物に罹る病気で、ノミを介して齧歯類間では常に流行を繰り返かしている。現在、危険なペスト菌常在地域はアフリカ、特に南東部の密林地帯、中国の雲南地方・蒙古地方・ヒマラヤ山脈周辺のアジア地域、北米南西部ロッキー山脈周辺、南米北西部アンデス山脈周辺等である。

昨今、森林原野の開発・文明化に伴い、田畑や家に住むネズミ属、ペット（猫、犬）や家畜（ラクダ、豚等）だけでなく、人ペストの発生も1990年代の始まりから増加傾向を示し、1997年には患者5,419（死者274）（WHOの報告）にも達している。日本では1926年以降人ペストの発生がないため過去の病気と考えられているが、日本市場の自由化に伴い、ペスト菌常在地域からの資材や食物の輸入が、又、それらの地域を訪れる日本人観光客等も年々増加している。更に、最近、日本（オウム心理教）やアメリカで起こった炭疽菌事件を始め、バイオテロ犯罪が起こらないともかぎらない国際状況が生まれてきている。従って、ペストの日本への侵入、流行の可能性を考慮した危機管理対策の強化、検査体制の強化が必要になっている。

世界各地で分離されたペスト菌は血清型、ファージ型による型別はなく一種類である。菌の大きさは多くが約1.5~2.0 x 0.5~0.8 μm の卵形短桿菌でギムザ染色やグラム染色などで安全ピン状の両極染色像が見られる。しかし、少数ではあるが棍棒状、繊維状、球菌状などの変形像も見られ、形態、配列が不規則の点がペスト菌の特徴である。特に3%の食塩を加えた寒天培地で増殖した菌や、抗生剤の作用を受けた菌はこん棒状、球菌等多形態性を示すのでペスト菌診断の一助となる。鞭毛（運動性）は無く、胞子は形成せず、O抗原の多糖体鎖を欠き、非抗酸性である。28℃からエンベロープ（荚膜抗原；Fraction 1）を産生し始めるが、動物体内での増殖菌や36~38℃での培養菌は特に多くのエンベロープを産生するため集落は非常に粘稠性を持つ。ペスト菌は1℃から増殖できるが、至適温度は28℃~30℃である。pH5.0~9.6の範囲で増殖出来るが至適pHは7.2~7.6で、世代時間は対数増殖期でも1時間以上である。

全ゲノム配列の解析から、*Yersinia pestis* は1,500~2万年まえに *Yersinia pseudotuberculosis* serovar O:1b から進化した菌で、多数の他の細菌のゲノムやウイルス遺伝子との組換えが頻繁に繰り返された痕跡や、腸管理病原菌時代には必要とされた遺伝子（約150個）の不活化が示される等、大規模なゲノム構成の変動を経て、現在の極めて毒性の強い菌に進化したことが明らかになった。ペスト菌は約4.65 Mbの染色体遺伝子と96.2 kb, 70 kb, 9.6 kbの3種類のヴィルレンスプラスミドから構成されている。9.6kb プラスミドにはプラスミノゲンアクチベーター、ペスチシン1、コアグララーゼ等、70 kb プラスミドには *Yersinia* の病原性に関与する Yops(外膜蛋白や分泌蛋白に関与する遺伝子) が、96.2 kb プラスミドには荚膜抗原 (Fraction 1)、murine toxin 等のヴィルレンス遺伝子がコードされていて、何れのプラスミドが欠損してもペスト菌の毒力は劇的に低下する。

本菌の乾燥、温熱、日光、消毒薬、抗菌薬に対する抵抗性は、比較的弱い。太陽光線で3から4時間、55℃で15分、10,000ppm次亜塩素酸ナトリウム、75%アルコール、5%ポピドンヨード等で1分以内で不活化される。従来使用されているストレプトマイシン、テトラサイクリン、ドキシテトラサイクリン、クロラムフェニコールや、新薬のニューキノロン系のレボフロキサシン、スパロフロキサシンは非常に抗菌薬として有効である。

また世界各地で分離された単一血清型のペスト菌を亜硝酸の形成能、グリセリン分解能を指標として

生物型を分類すれば3つの生物型に分けられる(表1)。

表1. ペストの3生物型

名称	亜硝酸形成	グリセリン分解能	分布地域
orientalis	+	-	インド、南西アジア、南米、北米西部
antiqua	+	+	東南アジア、中国東北・北部、ソ連、アフリカ
mediaevalis	-	+	トルコ、イラン、カスピ海沿岸

ペストと誤診される感染症の中で、腺ペストと類似した感染症には連鎖球菌性リンパ節炎、ブドウ球菌性リンパ節炎、伝染性単核球症、猫ひっかき病、リンパ性フィラデリア症、発疹チフス、野兎病が、肺ペストと類似した感染症には肺炎双球菌、連鎖球菌、ヘモフィルスインフルエンザ、炭疽菌、トラレミア、レジオネラ、レプトスピラ属菌、ハンターウイルス、インフルエンザウイルスによる重症性市中肺炎が、敗血症型ペストは敗血症症候群、グラム陰性菌敗血症があるので鑑別診断には注意を払う必要がある。

2. 検査材料の採取・輸送および保管

1) 検体の採取に関する一般的な注意

検体の採取のために患者に接触するときは、マスク、ゴム手袋、眼鏡および予防衣を必ず着用し、感染防止上の注意を怠ってはならない。感染の可能性が強い場合には、二次感染を防ため、抗菌剤の予防内服投与が勧奨されている。ペスト菌は増殖が遅いため、正確な診断をするためには雑菌の増殖をできるだけ最小限にする必要がある。採取した検体を直ちに検査するか、検査するまで時間を要する場合には検体をドライアイスや保冷剤を入れて輸送することが大切である。

2) 検査材料の採取

ペストの臨床症状が現れ、ペスト流行地への渡航歴、ノミによる咬傷がある場合や、バイオテロに襲われた可能性がある場合等、ペストであることが臨床的に疑われるときには、特定感染症指定医療機関や第1種感染症指定医療機関の感染症病棟に隔離させ、実験室診断のための検査用材料(血液、リンパ節、痰等)を採取し、直ちに、抗菌剤等による治療を開始する(緊急の場合には治療を優先させ、治療前後の抗体価で診断する)。肺ペストが疑われる場合は更に胸部レントゲンも撮る。尚、接触者等が感染の可能性が強いときは、二次感染を防ぐため、抗菌剤の予防投与が推奨されている。

ペストは1類感染症に指定されており、疑似症例を含め、直ちに保健所に届ける。

(1) 肺ペストが疑われた場合

a) 喀痰の採取

滅菌生理食塩液で口腔および喉をよくすすいで喀出させた痰を直接滅菌シャーレに採取し、肉眼で痰であることを確認後密封する。痰が採取できない場合は咽頭に付着している粘液部を綿棒又はトランスワブで拭い、これを滅菌シャーレに入れて密封する。雑菌が過剰の場合はペスト菌の集落を見逃すおそれがあるので、喀痰の検査にはまず均質化した喀痰の品質管理を行う必要がある。塗抹染色標本の弱拡大で、10視野以上の鏡検で、1視野あたり白血球数10個以上、扁平上皮細胞10個以下のものを検体として採用するのが望ましい。これに合致しないものは喀痰というよりも唾液なので、検体としての意義が少なく、再度の採取を依頼する必要がある。検体はストマッカー又はスプタゾール(oxid)で均一化すると良い。

b) 血液の採取

感染初期は血中への菌の出現は間歇的なので、採血回数が少ないと菌を検出できないことがある。45分間隔で3回採取するのが理想的である。血液は約15mlずつ採取し、速やかに、菌の検出のため、2.5mlずつ血液培養ボトル及び普通ブイヨンボトルに接種し、密封する。更に、血清診断用の検体として、血液5mlをセラムチューブに入れ、密封する。

(2) 腺ペストが疑われた場合

a) リンパ節吸引液や膿瘍の採取

腺ペストの初期患者ではリンパ節の化膿や壊死はまれであるので、疼痛のある部位のリンパ節を選ぶ。18～22ゲージ針付き注射器でまず1～2mlの滅菌生理食塩液を、局所麻酔した皮膚を通してリンパ節に注入したのち、強く吸引して採取した液を滅菌試験管に移す。次に、再度注射器に少量の滅菌生理食塩水を吸引して注射筒内を洗浄し、さきの吸引液に追加し、密封する。

b) 血液の採取

肺ペストが疑われた場合と同様に行なう。

(3) 敗血症型ペストが疑われた場合

上記と同様に血液の採取を行なう。

3) 検査材料の包装と輸送

密封した検体は、吸収紙の入ったビニール袋等に入れ、密封させ、更に二次容器の輸送用パックに入れて、ドライアイスや保冷剤をいれ、それを更にコンテナ（防疫用）を用いて、速やかに検査できる機関（衛研等に直接担当者が届け、検査を依頼する。必ず検体送付用紙および調査票（症状、疑わしき理由、旅行経路、遭遇状況、症状出現の日時、場所など）を添付する。

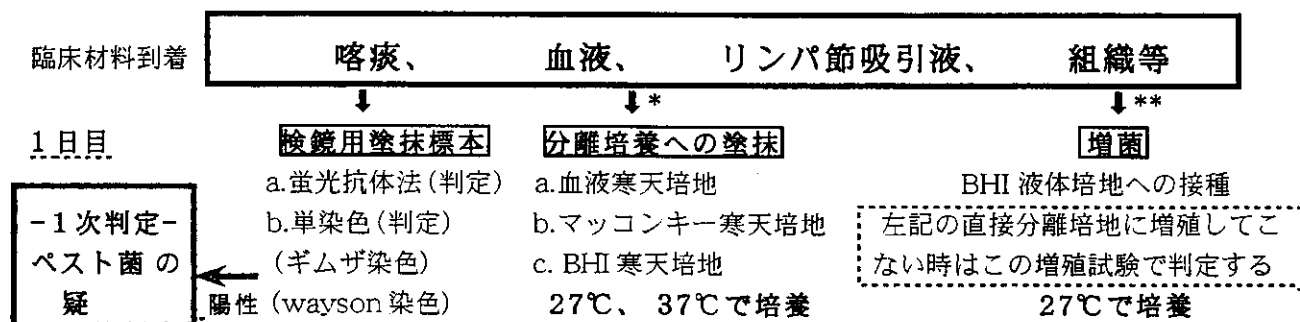
3. 細菌学的検査

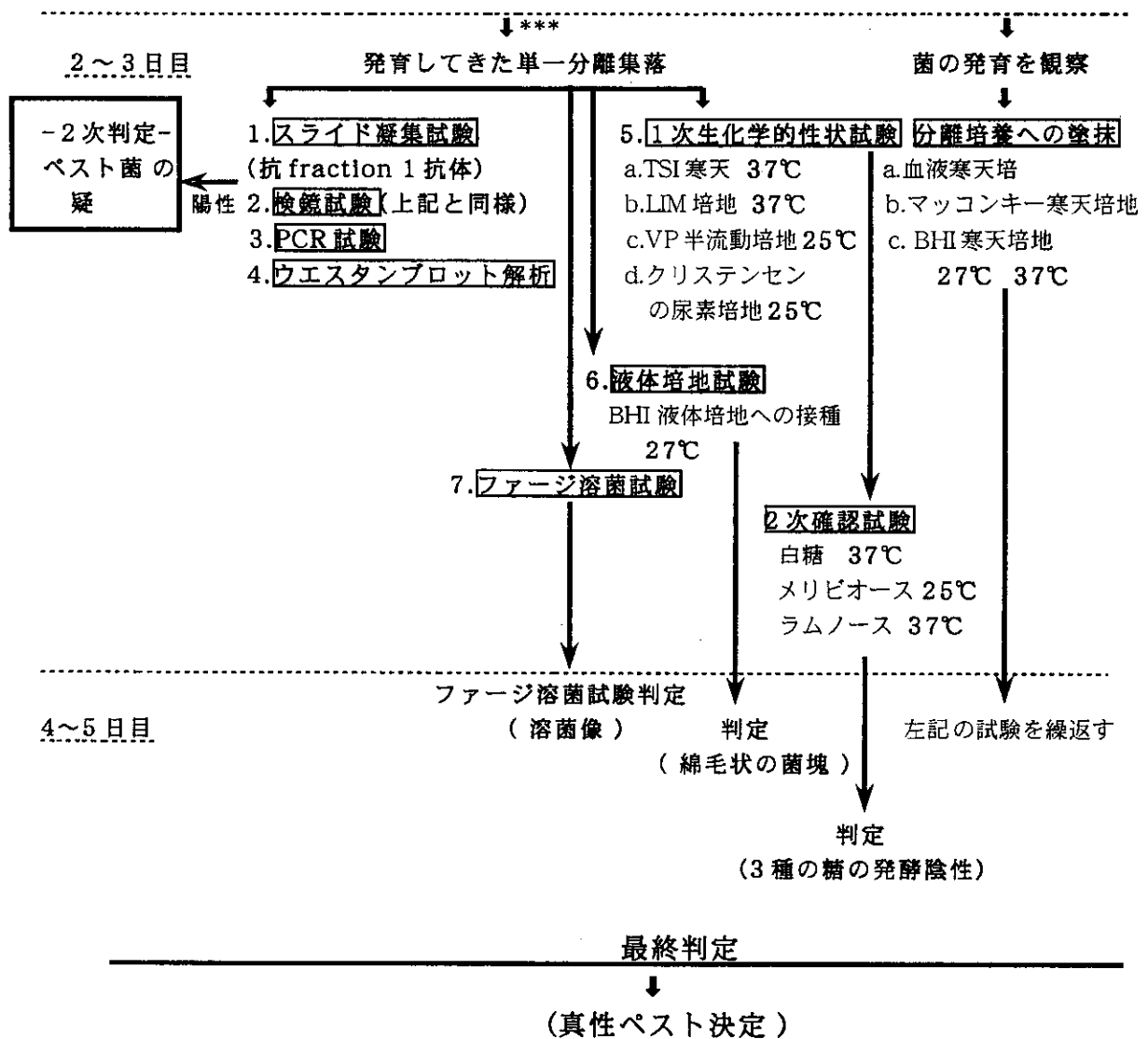
1) 検査材料の取り扱い上の一般的な注意

臨床検査材料の検査を行う検査室は生物学的安全基準(BSL 2)の条件を満たしていなければいけない。分離した菌を増殖させるにはBSL3の施設で行う。検体はセーフティーキャビネット内でマスク、ゴム手袋、予防衣を必ず着用し、感染防止上の注意をはらって操作する。ペスト菌は消毒薬に比較的弱いので、操作中は75%エタノールを使用する。操作後、使用した器具及び身に付けていたものはできるだけ121℃で15分で高圧滅菌し、高圧滅菌できないものは1000ppm次亜塩素酸ナトリウムや5%フェノール等の消毒薬に浸けたり、機械等は75%エタノール噴霧消毒、1000ppm次亜塩素酸ナトリウムの拭き消毒をする。

2) 検査順序

2次感染を防ぐための適切な防疫対策を講じるために、また隔離された患者の人権を守ると言う観点から出来るだけ早く正確な診断結果を出さなければならない。検査の概略を以下に示したが菌の発育状態によって多少判定日が遅くなる。





* 臨床材料中に含まれる菌量により、分離培地上で増殖してくる集落の数が異なる。単一の分離菌が取れるように原液材料および希釈した材料を何枚かのプレートに播いておくのが良い。

** 増菌培養は、直接分離培養で菌が分離されない場合の予備であり、患者材料が適切に採取されていればそこからは、一般的には分離培養で菌が発育してくる。27℃で3～5日間増殖のようすを見ながら増菌培養する。

*** 3日目以降に集落が観察された場合はその時点で必ず、検鏡試験、スライド凝集試験、マルチプレックスPCR試験を行い、生化学的性状試験、ファージ溶菌試験、ウエスタンブロット試験から真性ペスト判定を行う。もし、10日立っても集落が観察されない時は実験を打ち切る。

3) 形態学的検査

(1) 塗抹・固定法

血液、リンパ腺吸引液、喀痰等の各検体や培養菌について3枚以上の塗抹標本を作製する。スライドガラスに検体を薄く均一に塗布し、空气中で自然に乾燥させる。グラム染色用と、ギムザ染色又はwayson染色用はメタノールで約10分間固定する。蛍光抗体用はアセトンで約10分間固定する。蛍光抗体用のスライドガラスは必ず無蛍光のものを使う。尚、火炎固定法は、メタノール固定法より染色像のコントラ

ストが悪いこと、また必ずしも全部の菌を殺すことができないので、ペスト菌の固定法としては勧められない。

(2) グラム染色・単染色法

a) グラム染色

最初クリスタルバイオレット（ゲンチアナバイオレット）でペプチドグリカンを染めた後、イオジンで色止めし、アセトン・エチルアルコールで脱色する。グラム陰性菌はペプチドグリカン層が薄い、または全く持たないので、容易に脱色されるので、次にサフラニンを加えるとピンク色に染まる。グラム陽性菌はペプチドグリカン層が厚いので、クリスタルバイオレットが抜けないので紫色に染まる。

Quality control としてグラム陰性菌 (*Esherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*) やグラム陽性菌 (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) を置く。

試薬

メタノール
グラム染色キット

材料

滅菌エーゼ
滅菌蒸留水
滅菌チップおよびマイクロピペット
顕微鏡用スライドガラス
染色用ラック
顕微鏡および油浸レンズ

b) 単染色

Wayson 染色液の場合は室温で 5～10 秒間、Giemza 染色液の場合は約 60 分間、37℃ の孵卵器内で反応させて染色する。染色を終えたすべてのスライドガラスは十分に水洗し、濾紙で軽く押さえ、自然乾燥後、検鏡する。

Quality control として両端染色像を示す菌 (*Yersinia spp.*, *Pasteurella spp.*, *Esherichia coli*) や示さない菌 (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*) を置く。

試薬

メタノール
Giemza 染色液：蒸留水（ミリQ）で 100～200 倍に希釈した液
Wayson 染色液：作製の仕方：
A 液 塩基性フクシン 0.2 g とメチレンブルー 0.75 g に 95% エタノール 20 ml を加え、良く混ぜた後 Watman No.1 濾紙を使って不溶物を濾した液
B 液 フェノール 5 ml を 195 ml の蒸留緩水で薄めた 5% フェノール液
A 液 B 液を混ぜ、褐色瓶に入れて室温で保存する。

材料

(2) a) と同じ

c) 顕微鏡判定

顕微鏡は油浸系対物レンズを用いて、1000 倍以上で観察する。ペスト菌はグラム陰性の多形形態を示すが、組織内および培養菌等の新鮮な菌では、約 $1.5 \mu \times 0.7 \mu \text{m}$ の両端の丸い楕円形の短桿菌で、単染色法では、ペスト菌は特徴ある明瞭な両端染色菌像（両端部分が濃く、中央部が脱けたように淡く染まる）を示す【6.付録5, 写真 図1】。但、両端染色菌像は *Yersinia* 属、*Pasteurella* 属や *Esherichia coli* にも観察されることから、ペスト菌 のみに特異的なものではない。しかし、ペストを疑われる患者から両端

染色菌像が認められれば、診断上の大きな手がかりになるため意義はきわめて大きい。

又、ペスト患者の場合は血液1 μ l 当たり1.2万~2.5万の白血球（主に成熟型の好中球）が見られるのが特徴的で、時には白血球様反応も示す場合もある。

(3) 蛍光抗体法

a) 蛍光抗体の作製法（直接法）

抗 Fraction 1 抗体から γ -グロブリンを分離し、これに Fluorecein isothiocyanate(FITC) もしくは Alexa Fluor 488(AF) を結合させた後、セファデックス G25 カラムを通して結合しなかった蛍光色素を除く。次に DEAE セルロースカラムを通して蛍光抗体を集め、使用するまで-20℃で保存しておく。凍結融解は行わないこと。

b) 蛍光抗体による菌のラベリング

アセトンで固定したスライドガラスに蛍光標識抗体をのせ、液が乾かないように密閉箱の中に入れ、37℃で60分反応させる。次に、PBSを満したバットに標識スライドガラスを置き、更に2分、6分、10分毎にPBS液を取り換えて、洗浄する。自然乾燥後、10 μ lのグリセリン緩衝液をスライドガラスの真中に置き、その上にカバーガラスをのせて蛍光顕微鏡で観察する。

quality control として、クロス反応を持つ可能性がある *Y. pseudotuberculosis* と negative control 菌の *E. coli* を置く。

試薬

アセトン

抗 Fraction 1 抗体

Fluorecein isothiocyanate(FITC) もしくは Alexa Fluor 488(AF) kit

10%グリセリン緩衝液 (pH7.5)

材料

(2) a)と同じ但、スライドガラスは無蛍光のもの

c) 蛍光顕微鏡判定

生体内のペスト菌（血液、リンパ腺吸引液、喀痰等）は、蛍光標識した Fraction 1 特異抗体と反応して黄緑蛍光色に見える。培養菌での検査は誤診を避けるため、必ず Fraction 1 の産生量が多い36~37℃で培養した菌を用いる。27℃以下で培養した菌は Fraction 1 が全く産生されないのので、ペスト菌であっても黄緑蛍光色は観察されない。

4) 菌の分離および増殖形態の特徴

(1) 平板培養集落の特徴

a) 培地

Y. pestis の分離には通常ヒツジ血液寒天培地、又は Brain Heart Infusion (BHI) 寒天培地とマッコンキー寒天培地を用いるが、顕微鏡観察の結果、菌が少ない場合は増菌のために BHI 液体培地も併用する。いずれの培地もペスト菌の至適発育のため pH は 7.2~7.6 にする。

quality control としてグラム陽性菌（*S. aureus* 等）とグラム陰性菌で両端染色像を示す菌（*Y. pseudotuberculosis* または *E. coli* 等）を置く。

材料

滅菌エーゼ

ヒツジ血液寒天培地

BHI 寒天培地

マッコンキー 寒天培地（腸内細菌分離用培地）

b) 培養温度

ペスト菌は1~45℃で発育する。発育には28~30℃位が最適だが、ペスト菌の特徴ある形態学的性質（エンベロープの産生性）を見る場合は36~37℃が適している。従って、培養温度は27~28℃と36~37℃培養を併用する。

c) 集落の特徴

ペスト菌は栄養要求のきびしい菌ではないが、その発育は他の一般的な菌よりも遅く、血液寒天培地でさえも24時間培養での集落は透明で針の先ほどの大きさで、肉眼では発見の困難なことが多い。発育が明らかに認められるのは培養後48時間以降である。

○ 血液寒天培地

37℃、48時間培養で、ペスト菌は大きさ1-1.5mmになり、48~72時間培養すると、灰色ないし灰白色のやや粘稠性を帯びた集落を形成し、個々の集落を実体顕微鏡で4倍に拡大して観察すると、やや持ち上がった中心部と辺縁が分葉形で波状のハンマーで潰した銅貨のように見える【6.付録5, 写真 図2】。集落の粘稠性はエンベロープに関係し、37℃培養の時エンベロープの産生量が1番多いとされている。集落を拾い上げると糸を引くようになるのが特徴である。また溶血像は見られない。

○ マッコンキー寒天培地

ペスト菌は乳糖を発酵しないので、無色の集落を形成する。

d) 純培養

集落形態や顕微鏡観察でペスト菌を疑う場合は、更に、ペスト診断用抗体もしくは、抗ペスト菌全血清と*Y. pseudotuberculosis*が全く凝集しなくなるまで希釈した抗体を用いて、スライド凝集反応を行う。尚、ペスト菌はラフ型なので生理食塩水では自然凝集を起こすので、生理食塩水を蒸留水で2倍に薄めた0.425%食塩水を対照におき、対照では凝集しないことを確かめてから行う。スライド凝集試験から、ペスト菌の疑いがある場合は、更に集落を単離培養した後、集落についてPCR法、坑 Fraction 1モノクロナル抗体を用いたウエスタンブロット法、ファージ感受性試験、生化学的性状試験でペスト菌の同定を行う。

材料

滅菌楊枝または滅菌エーゼ

BHI 寒天培地

(2) 液体培養増殖形態の特徴

ペスト菌は初期培養で少し混濁する場合もあるが、24時間以上培養すると、綿毛様の集塊として発育し、培地を混濁して発育することはない。綿毛様の菌塊は多くの場合あたかも鍾乳石のように試験管の一方の壁に付着し、試験管を振れば管底に沈殿する【7.付録5, 写真 図3】。綿毛様の集塊発育は、時には*Yersinia pseudotuberculosis*や*Streptococcus pneumoniae*でも見えることもある（*Y. enterocolitica*は必ず濁る）。また、長期に植え継いでいる*Yersinia pestis*は綿毛様の集塊発育を示さないこともあるので気をつけなければいけない。

液体培地での培養菌の形態は寒天培養菌のそれとはやや異なり、後者よりも長く、かつ幅広く、4~16個またはそれ以上の細胞が連鎖し、個々に離れて見られることはむしろまれである。長期間（4日以上）培養を続けると、細胞の多形化が見られるとともに、自家融解がおこる。

quality controlとして*Y. enterocolitica*と*Y. pseudotuberculosis*を置く。

材料

滅菌エーゼ

BHI 液体培地

5) PCR法を用いた迅速診断

安全且つ容易なマルチプレックスPCR法はペストの迅速遺伝子診断法として優れている。ペスト菌の英

膜抗原遺伝子 (*cafI*)、プラスミノーゲン活性化因子 (*pla*)、侵入性遺伝子 (*inv* ペスト菌と仮性結核菌に共通な領域) に対するプライマー、鋳型としては加熱処理した死菌 (蒸留水に菌を少し濁る程度に懸濁後、100℃で10分間沸騰させた菌) を用いて、熱変性は94℃で30秒、アニーリングは55℃で60秒、伸長反応は72℃で90秒のサイクルで25回行い、更に最終延長を72℃で10分行った後冷蔵保存する。PCR産物をTBE緩衝液を用いて、1.5%のアガロースゲルで50V、70分間電気泳動後、ゲルを0.5 μg/mlのエチジウムブロマイドで染色(20分)する。更に、蒸留水で3回(15分くらい)洗浄して過剰なエチジウムブロマイドを除く。UVでPCR産物の解析を行うために写真を撮る。ペスト菌の場合は各々171bp(*cafI*)、295bp(*inv*)、480bp(*pla*)のDNA増幅バンドが検出され、仮性結核菌の場合は295bp DNA増幅バンドが検出される。その他の腸内細菌科のサルモネラ属、シゲラ属、エシェリシア属や *Francisella tularensis*(野兎病)等からはいずれのバンドも検出されていない【6.付録5) 写真 図4】。

quality control)として分類上類似している菌 (*Y. pseudotuberculosis*) や negative control として *Y. enterocolitica*、*E. coli*等を置く。【詳細は6.付録3) PCR法に記述】

6) 生化学的性状検査

ペスト菌は前に記したように *Yersinia* 属の仮性結核菌 (*Y. pseudotuberculosis* serover O:1b) から進化した菌ではあるが、消化管を経る感染形態を取らなくなってから、腸管生活環境で必要だった遺伝子は不活化され、新たにノミの中で生きていくために必要な遺伝子を獲得したため、ペスト菌の生化学的性状も仮性結核菌とかなり異なる。仮性結核菌は25℃で運動性のあること、ウレアーゼ陽性、ラムノースおよびアドニトールを発酵するなどの点でペスト菌と鑑別できる。ペスト菌のおもな生化学的性状を表2に示した。ペスト菌は発育が遅いため、テストの観察時間を他の菌よりもやや延長する必要がある。ペスト菌の特色は生化学性状が陰性の場合が多い【6.付録4)の生物学的性状を参考に】。菌が抗生剤や宿主の防御因子によって痛めつけられた等の場合、本来、生化学的性状が陽性の菌でも、陰性を示す場合がしばしばあるので、ペスト菌でないのに、ペスト菌と誤って判定する場合があるので気をつけなければならない。

材料

滅菌エーゼ

TSI 培地

LIM 培地

VP・MR 培地

クリステンセン尿素培地

(1) 一次確認培養試験

a) ブドウ糖、乳糖、白糖発酵試験

TSI培地で37℃で48時間培養し、判定する。ブドウ糖を発酵し、酸を産生するがガスは産生しない。乳糖、白糖も発酵せず、硫化水素も産生しない。従って、TSI寒天培地の高層部は黄色で、気泡、亀裂、黒色は認められない。

b) 運動性・インドール・リジン脱炭酸試験

LIM培地に穿刺培養し、25℃と37℃で72時間培養する。運動性とリジン脱炭酸試験を行った後、Kovacのインドール試薬を加えて判定する。運動性は培地全体に菌の発育が見られる場合は陽性とする。リジン脱炭酸試験は培地の色が対象に比べて明確な紫色を呈した場合は陽性とする。インドールは試薬滴下後、赤色を呈したものを陽性とする。ペスト菌はいずれも陰性である。

c) VP・MR反応試験

VP・MR用培地2本に菌を接種後、37℃で48時間培養する。1本にVP試薬を加えて良く振り、37℃で2時間置いて赤くなったものは陽性、ペストは陰性である。もう一本にMR試薬を5~6滴加えて振り、赤色になると陽性、ペストは陽性である。

d) 尿素分解試験

クリステンセンの尿素培地に接種後、25℃で72時間培養し、赤変したら陽性とする。ペスト菌は陰性である。

(2) 二次確認培養試験

一次確認培養で *Y. pestis* の性状に一致したものは二次確認培養を行う。

a) 白糖、メリビオース、ラムノース試験

フェノールレットブイオンにこれらの糖を加えて37℃で48時間培養後判定する。但、メリビオース試験は25℃～28℃で48時間培養後判定する。赤色から黄色に変化したものを陽性とする。ペスト菌は全て陰性である。

市販の数値同定システムにはペスト菌のプロファイルを含むものがあり、それらを同定に使用することもできるが、指定された菌液濃度では十分な反応が得られず、誤同定されるので注意を要する。もしそれらのシステムを用いるときには、数個の集落を浮遊させた通常よりもやや濃度の高い菌液を接種し、培養を30-36時間とする。

(3) 毒力因子産生試験

Fraction 1、VW 抗原、ペスチシン1、および色素吸着能をもつ表在抗原の同定を行う。ペスト菌のみが全て陽性である。自然界にはこれらの毒力因子を欠損したペスト菌も見つかっている。

(4) 鑑別試験

a) *Yersinia pestis* と *Francisella tularensis* との鑑別

Francisella tularensis は *Yersinia pestis* と異なり発育にシスチン又はシステインを必要とし、寒天培地やブイオンで発育しない等から鑑別は比較的簡単である。

b) *Yersinia pestis* と *Burkholderia pseudomallei* との鑑別

ペストの染色菌に特徴とされている両端染色像は *Burkholderia pseudomallei* の特徴でもある。*Burkholderia pseudomallei* は運動性陽性、キシロールを分解しない、白糖を分解、オキシダーゼ陽性、TSI 高層で増殖しない、メチルレット反応陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陽性が *Yersinia pestis* と異なる性状である。

c) *Yersinia pestis* と *Yersinia pseudotuberculosis* との鑑別【6. 付録4）生化学的性状を参考】

Yersinia pseudotuberculosis は運動性陽性、ウレアーゼ陽性、スレオニン・グリシンの生合成陽性、ラムノース発酵陽性、メリビオース発酵陽性、メチオニン生合成陽性、ロイシン・バリン生合成陽性、グルコース-6-リン酸-デハイドロゲナーゼ陽性、アスパルターゼ陽性、ペスチシン1産生能陰性、murine toxin 産生能陰性、クロマトフォア-から色素形成能陰性等が *Yersinia pestis* と異なる性状である。従って、鑑別は比較的簡単である。

d) *Yersinia pestis* と *Yersinia enterocolitica* との鑑別【6. 付録4）生化学的性状を参考】

Yersinia enterocolitica は運動性陽性、ウレアーゼ陽性、ソルビトール発酵陽性、蔗糖発酵陽性、オルニチンデカルボキシラーゼ陽性、セロビオース発酵陰性、ペスチシン1産生能陰性、murine toxin 産生能陰性、クロマトフォア-から色素形成能陰性等が *Yersinia pestis* と異なる性状である。従って、鑑別は比較的簡単である。

e) *Yersinia pestis* と *Pasteurella multocida* との鑑別

Pasteurella multocida はマッコンキー寒天培地で48時間では発育せず、硫化水素を産生、メチルレット反応陰性、メチレンブルー還元、インドール陽性等が *Yersinia pestis* と異なる性状である。従って鑑別

は比較的簡単である。

7) ファージ感受性試験

ファージの感受性試験は特異性の点では少し問題を抱えるが迅速という点では優れている。菌接種寒天培地にファージ液を一滴たらして20℃で18～24時間培養し、溶菌ゾーン形成を観察する。37℃で培養すると *Yersinia pseudotuberculosis* や他の腸内細菌科の菌でも溶菌するので気をつけなければならない。

材料

ファージ液
滅菌エーゼ
滅菌チップおよびマイクロピペット

4. 血清診断

1) 血球凝集反応法

ペスト菌が分離されなかった時は、Fraction 1 に対する passive haemagglutination test を行い、患者ペア血清で、4倍以上凝集価に差があった場合はペストの可能性があるので、更に、F1 antigen haemagglutination inhibition test で確定診断する。ペア血清が無い場合の判定は Meyer 等の報告に従い、血球凝集価が16倍以上の場合は陽性、8倍の場合は疑陽性とする。

2) ウエスタンブロット法

診断用抗原 (Fraction 1) を SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンに転写し、患者血清を用いてウエスタンブロット解析を行う。 *Y. pestis* のみに検出される 15kDa～18kDa の Fraction 1 のバンドが検出されればペストの可能性が高い【6付録5, 写真 図5】。ペストと疑わしき患者は、直ちに抗菌剤の投与を受けているため、患者の検体からの菌の分離は難しく、又、抗体価が低いためペストであっても陽性判定ができない場合があるので、高感度で特異性の高いウエスタンブロット解析は、血清診断のために非常に有効である。

5. ペスト菌の判定基準

1) 疑似

(1) ペスト流行地への渡航歴やバイオテロに巻き込まれた可能性がある場合で、臨床的特徴と合致する症状を示し、更に、臨床材料からグラム陰性で両端染色性を示す桿菌、又、Fraction 1 抗原に対する抗体、蛍光抗体に対して陽性を示す菌が検出された場合。

(2) 臨床材料から、ペスト菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法でペストに特異的なバンドが検出された場合。

(3) 患者血清中の抗 Fraction 1 抗体価が passive haemagglutination test で 10 倍以上を示した場合 (但、前にワクチンを接種したり、ペストに感染したことがない場合)。

(1)～(3)の内1つでも該当する項目がある場合は疑似患者と見なす。

2) 確定

(1) 臨床材料から分離した菌がペストと同定された時：

①顕微鏡所見で明らかな両端染色像を示すグラム陰性桿菌、②莢膜抗原に対する抗体や蛍光抗体に陽性、③ペスト菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法で陽性、④ペスト菌特異ファージに対して感受性、⑤生化学的性状 (ペスト菌の毒力因子の検査も含む) がペスト菌の性状と一致する、等から総合的に判断し、ペスト菌 (*Yersinia pestis*) と同定された場合。

(2) ペア血清を用いての血清診断：

診断用抗原 (Fraction 1) に対する回復期の血清の力価が、感染初期の血清の力価の4倍以上上昇している場合。

(1) (2) の内1つでも該当すれば確定患者と見なす。

6. 付録

1) 治療の参考（抗菌薬：WHOおよびCDC提唱）

ペストの治療には抗菌薬が非常に良く効くため、早く治療さえすればもう昔のように怖い病気ではない。予後は良好で、後遺症は殆ど残らない。肺ペストの場合は病気の進行が極めて速いので、特に、抗菌薬の早期の投与が必須である。

日本でペストの治療薬として保険が適用されているのはストレプトマイシンだけである。ストレプトマイシンはペストに最も効果があるが、副作用があるので過度の投与は避けたほうが良い。新生児、未熟児、乳児、小児に対する安全性はまだ確立されていない。

その他に、アメリカのCDC、WHOによって推奨されている抗ペスト薬があるので、次に、それらの薬剤名を記述した。尚、日本人は体格的にも人種的にも欧米人とは異なるため、用量は今日の治療薬（南江堂）を参考にして治療する。治療期間はすべての抗菌薬において10日を超えないことが肝要である。

(1) アミノ配糖体

ストレプトマイシン、ゲンタマイシンは全てのペストに最も効果がある。

(2) テトラサイクリン系

テトラサイクリン、ドキシサイクリンは腺ペスト及び肺ペストの治療にアミノ配糖体と適宜に併用して使用する。

(3) クロラムフェニコール

ペストによる髄膜炎、胸膜炎、内眼球炎等の治療に用いる。腺ペスト又は敗血症型ペストの治療にはアミノ配糖体と適宜に併用して使用する。

(4) ニューキノロン

ニューキノロン系の抗菌薬は全般的にペストに対して優れた効力を示し、その中でも特にレボフロキサシン、スパルフロキサシンが優れているので、副作用（腎障害、耳力障害）の強いアミノグリコシド系よりペストの治療に期待が持てる。

2) 予防の参考（抗菌薬・ワクチン：WHOおよびCDC提唱）

(1) 抗菌薬

患者と直接接触した人や肺ペスト患者に接近した人等、ペストに二次感染する可能性の高い人や、流行地への旅行者等のように短期間ペスト菌の暴露を受ける可能性がある人に対して、予防のためにWHO、CDCは抗菌薬（テトラサイクリン、ドキシサイクリン、ST合剤）の予防投与を勧めている。投与量は治療に用いられている用量の1/2～同量を経口投与する。

(2) ワクチン（ホルマリン処理死菌ワクチン）

ペストワクチンは腺ペストによる死亡率をある程度低下させるが、肺ペストに対してはほとんど効果が認められない。又、ワクチン投与により免疫を獲得するには数回の投与が必要であり、又、その免疫持続期間は6か月以内と短い。したがって、ワクチン投与による集団防衛や流行の制御は期待できないと考えるべきである。長期に渡って、ペスト菌常在地域に滞在する人で、ペスト菌に濃厚に暴露される可能性が高い人はワクチンの接種を受けることが勧められている。例えば、ペスト患者に接する医療従事者、ペスト流行を制圧するために派遣されたJICAやWHOの専門家等、並びにペスト菌保菌ネズミやノミに曝される危険性のある海外協力隊員や自衛隊員等の野外作業員、又、流行地に赴任したジャーナリスト、商社マン等も対象になる。旅行者などでワクチンを希望する人には、ワクチン投与による、副作用についてもよく説明すべきである。

3) PCR法

(1) プライマー

amplified gene	size of PCR product (bp)	oligonucleotide of primers		position	localization of gene	GC content (%)	Tm
		pair	Sequence (5' to 3')				
caf1	171	S	CAGGAACCACTAGCACATC	221-240	60 Md	52.6	58°C
		A	CCCCACAAGGTTCTCAC	391-374	plasmid	61.1	58°C
inv	295	S	TAAGGGTACTATCGCGGCGGA	2255-2275	chromosome	57.2	66°C
		A	CGTGAAATTAACCGTCACACT	2549-2529		42.8	60°C
pla	480	S	ATCTTACTTTCCGTGAGAAG	971-990	7 Md	40.0	56°C
		A	CTTGGATGTTGAGCTTCCTA	1450-1431	plasmid	45.0	58°C

(2) テンプレートの作製

ミリQの水を0.22 μ mのミリポアーフィルターを通した後、更に121°Cで15分間、高圧滅菌後、1.5mlのエッペンドルフチューブに100 μ lづつ入れる。ディスポーザブルのエーゼで菌を僅かにかき取り、蒸留水の中に入れる（菌量は少し濁る程度）。

100°CにセットされたMulti Heaterにエッペンドルフチューブを置いて10分間加熱後、すぐ冷やす。quality controlとして使用するnegative control(*E. coli*)、positive control(*Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*)のテンプレートは前もって作製し、-20°Cで保存しておいて、検査の都度使用する。検体と同じ場所で、同時には調製しない。

(3) PCR反応混合液の作製

精度管理の面から反応混液はまとめて作製し、小分けして-20°Cで保存することが望ましい。

以下に標準組成を示した。近年通常のMg⁺⁺濃度の異なるpolymeraseが市販されており、使用酵素の種類によって組成は若干異なる。

10 検体当たりの組成 (170 μ l)	
10 X PCR 緩衝液	50 μ l
25m M MgCl ₂	30 μ l
2.5mM dNTP 混液	30 μ l
5 μ M pla	10 μ l
5 μ M pla	10 μ l
5 μ M caF	10 μ l
5 μ M caF	10 μ l
5 μ M inv	5 μ l
5 μ M inv	5 μ l
滅菌蒸留水	10 μ l

良く混合する

(4) PCRワーキング溶液の作製 (試験毎に作製する)

ワーキング溶液の組成

1 検体当たりの組成		例 10 検体分
反応混液	17.0 μ l	170 μ l
Taq ポリメラーゼ	0.2 μ l (0.9unit/reaction)	2 μ l
滅菌蒸留水	30.8 μ l	308 μ l
	48.0 μ l	480 μ l

良く混合後、検体名を書いた0.2 mlのエピペンドルフチューブに48 μ lずつワーキング溶液を分注する。最後に各検体のテンプレートを2 μ l ずつ加えてから蓋をする。更に-20℃でストックしておいたnegative control、positive controlsのテンプレートを2 μ l 加えて直ぐ蓋をする。テンプレートは*E. coli*、*Y. pseudotuberculosis*、*Y. pestis*の順に加える。

(5) PCR 条件

熱変成	94℃	30 秒	} 25 サイクル
アニーリング	55℃	60 秒	
伸長	72℃	90 秒	
最終伸長	72℃	10 分	

(6) 電気泳動

1.5%アガロースを使用

charge volume: sample; 8 μ l [sample 10 μ l + loading buffer (5 x) 2 μ l を混合したもの]

marker; 5 μ l

泳動条件: 50V, 70 分

(7) 染色

0.5 μ g/ml ethidium bromide 溶液で 20 分間染色後、蒸留水で 15 分間洗淨

(8) 増幅 DNA 断片の解析

UV ライト上にゲルを置いて、ポラロイドカメラで写真を取り解析する。

4) 生化学的性状

(1) *Yersinia* 属の 3 種の病原性細菌間での生化学的性状の比較

Some Phenotypic Differences between Wild-Type *Yersinia pestis* and Other *Yersinia* Species*

	<i>Y. pestis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>
Fraction I (envelope) antigen	+	0	0
Pesticin, coagulase, fibrinolysin	+	0	0
Murine toxin	+	0	0
Pigment formation from chromatophore	+	0	0
Aspartase	0		+
Assimilation of low levels of NH ₃	0		+
Cellobiose fermentation	0	+	0
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	0		+
Isoleucine/valine biosynthesis	0		+
Methionine biosynthesis	0		+
Melibiose fermentation	0	0	+
Ornithine decarboxylase	0	+	0
Rhamnose fermentation	0	0	+
Sucrose fermentation	0	+	0
Sorbitol fermentation	0	+	0
Threonine/glycine biosynthesis	0		+
Urease	0	+	+
Motility at 26°C	0	+	+

* Adapted from R. R. Brubaker⁽¹⁾ in *Microbiology—1979*, with permission of author and publisher.

(2) *Yersinia pestis* の生化学的性状*Yersinia pestis* の生化学的性状

運動性： 22℃	-(0)	L-アラビノース	+(100)
35℃	-(0)	セロビオース	-(0)
インドール	-(0)	乳糖	-(0)
Voges-Proskauer	-(0)	麦芽糖	d (80)
クエン酸 (Simmons)	-(0)	メリビオース	d (20)
硫化水素 (TSI)	-(0)	ラフィノース	-(0)
硝酸塩還元	-(85)	ラムノース	-(1)
リジン デカルボキシラーゼ	-(0)	白糖	-(0)
アルギニン ジヒドロラーゼ	-(0)	トレハロース	+(100)
オルニチン デカルボキシラーゼ	-(0)	D-キシロース	+(90)
フェニルアラニン デアミナーゼ	-(0)	アドニトール	-(0)
ゼラチナーゼ	-(0)	D-アラビトール	-(0)
DNase	-(0)	ズルシトール	-(0)
Tween 80 エステラーゼ	-(0)	グリセロール	d (50)
マロン酸	-(0)	イノシトール	-(0)
KCN 培地における発育	-(0)	マンニトール	+(95)
β -ガラクトシダーゼ	d (50)	ソルビトール	d (50)
エスクリン 加水分解	d (50)	α -メチル-D-グルコシド	-(0)
炭水化物： サリシン	d (70)	粘液酸	-(0)
ブドウ糖、酸	+(100)	メチルレット反応	-(0)
ガス	-(0)		

+ : 陽性、 - : 陰性、 d : 陽性または陰性、括弧内は % を示す。

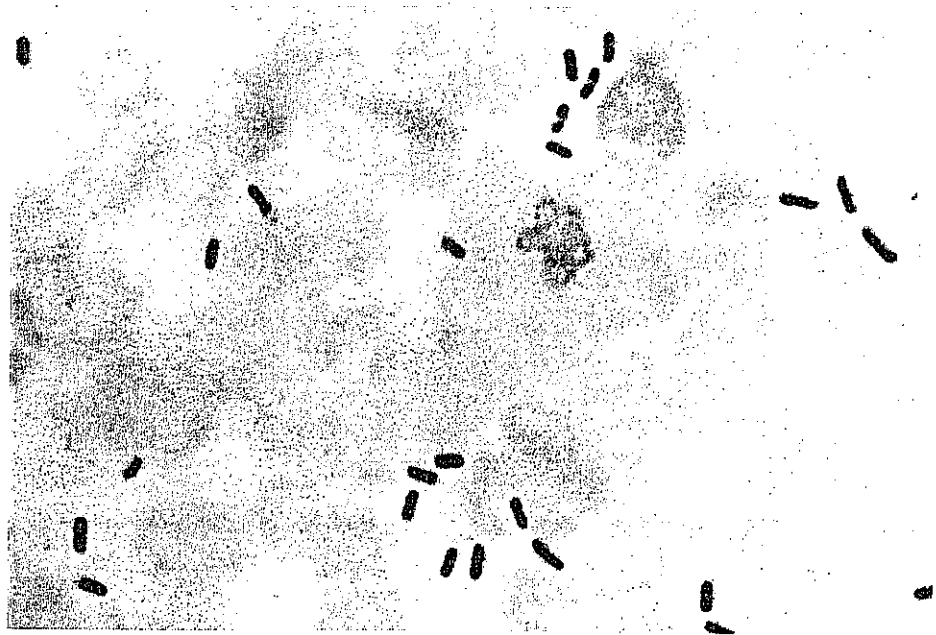


図1 ペスト菌のギムザ染色 (ペスト菌感染マウスの脾臓スタンプ)
(800 x ; 安全ピン状の極小体が特色)

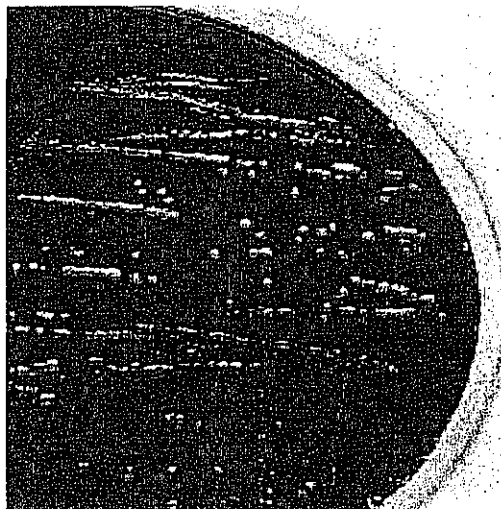


図2 ペスト菌の集落
個々の集落はやや持ち上がった中心部と辺縁が分葉形で
波状のハンマーで潰した銅貨のように見える。(4 x)

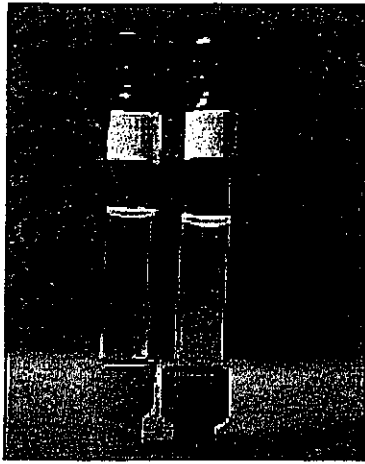


図3 ペスト菌の液体培地での増殖像 (BHI 液体培地)
綿毛様の集塊として発育し、培地を混濁して発育することはない。
綿毛様の菌塊は多くの場合あたかも鍾乳石のように試験管の
一方の壁に付着し、試験管を振れば管底に沈殿する。
右; *Yersinia pestis*, 左; *Yersinia pseudotuberculosis*



図4 マルチプレックス PCR 法によるペスト菌の検出
Lanes; 1, enteropathogenic *Escherichia coli*; 2, *Salmonella typhimurium*;
3, *Yersinia enterocolitica*; 4, *Yersinia pseudotuberculosis*;
5, *Yersinia pestis*; M, DNA markers (100-bp ladder)

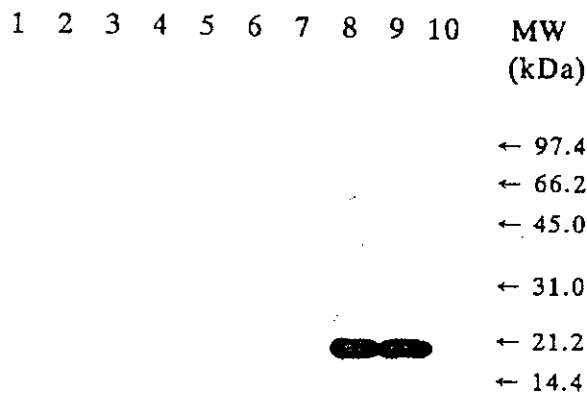


図5 ウェスタンブロット法によるペスト菌の検出
Lanes; 1, enteropathogenic *Escherichia coli*; 2, *Salmonella typhimurium*;
3, *Yersinia enterocolitica*; 4, *Yersinia pseudotuberculosis*;
5, *Francisella tularensis*; 6, *Francisella novicida*; 7, *Staphylococcus aureus*;
8, *Yersinia pestis*; 9, Fraction 1 antigen