

腸管系細菌

日常検査でしばしば遭遇する各細菌の分離同定検査の実際について、各段階の詳細な検査法等は他の専門書（参考資料を掲載）に委ね、ここでは写真を中心に紹介する。

（微生物部）

▶ 1. 腸内細菌科（Family *Enterobacteriaceae*）

(1) 腸内細菌 (2) 腸内細菌の検査 (3) 腸内細菌の分離培地

(4) 主な腸内細菌

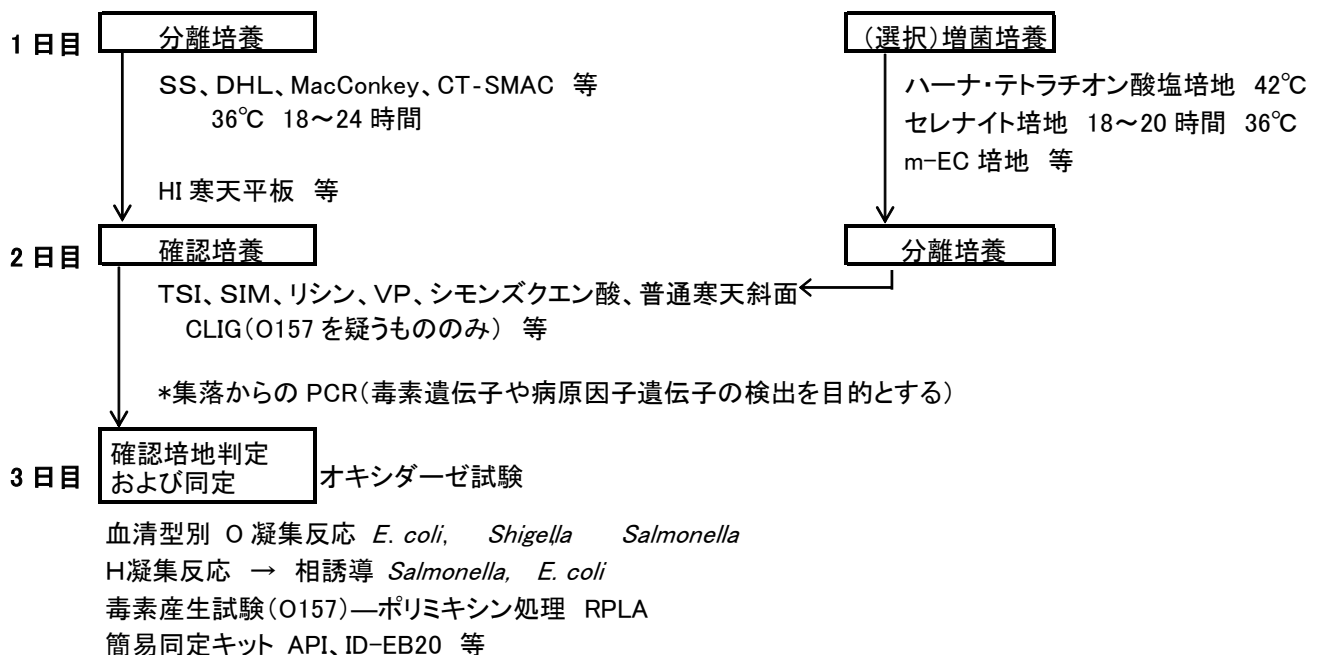
- | | | | |
|------------------|----------------|-----------------|--------------------|
| ① <u>大腸菌属</u> | ② <u>赤痢菌属</u> | ③ <u>サルモネラ属</u> | ④ <u>プロテウス属</u> |
| ⑤ <u>クレブシエラ属</u> | ⑥ <u>セラチア属</u> | ⑦ <u>エルシニア属</u> | ⑧ <u>エンテロバクター属</u> |

1. 腸内細菌科 (Family *Enterobacteriaceae*)

(1) 腸内細菌

- ・「腸内細菌」とは、腸内細菌科 (Family *Enterobacteriaceae*) に属する菌の総称名の和名で、通常、慣用的に「腸内細菌」とよばれている。
- ・「腸の中にいる菌」と誤解されたり、「腸内細菌叢」あるいは「腸内フローラ」と混同されたりするが、ここでは分類学上の腸内細菌科について、和名の「腸内細菌」をそのまま慣用する。
- ・腸内細菌は芽胞を作らないグラム陰性桿菌である。
- ・嫌氣的にも発育するが好氣的条件で発育がよい（通性嫌気性菌）。
- ・多くは周毛性鞭毛をもち（赤痢菌とクレブシエラ属を除く）運動性があり、ブドウ糖を分解し酸を産生、オキシダーゼ*)は陰性である。
 - *) オキシダーゼは菌のチトクロームオキシダーゼの存否を判定する試験で、「陰性」の腸内細菌と「陽性」のビブリオ属やシュードモナス属とを鑑別する上で重要な試験である。なお、プレジオモナスは、オキシダーゼ「陽性」であるが、遺伝学的には腸内細菌に近いことから、ビブリオ科から腸内細菌科に移された (1986))
- ・基本的な分離用培地としては SS 寒天培地、DHL 培地、MacConkey 培地、BTB 乳糖加寒天培地等がある。
- ・主な腸内細菌には、大腸菌属、赤痢菌属、サルモネラ属、プロテウス属、クレブシエラ属、セラチア属、エルシニア属、エンテロバクター属等がある。(腸内に常在しない菌も含まれる)

(2) 腸内細菌の検査



(3) 腸内細菌の分離培地

腸内細菌の分離培地には、次の特徴がある。

- ・胆汁酸塩を加えてグラム陽性菌の発育を阻止する。
- ・胆汁酸の種類により大腸菌の発育も抑制する。
- ・乳糖の分解性の違いにより目的菌の集落を鑑別する。

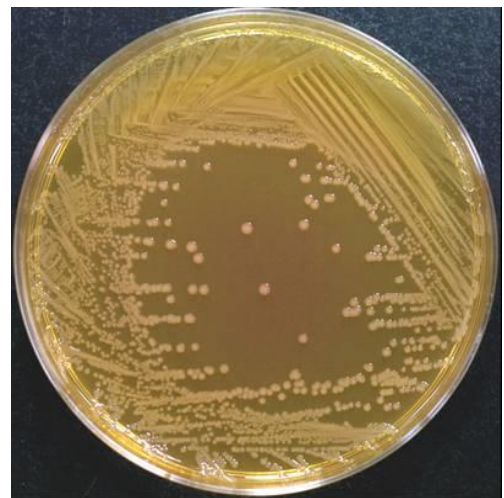
以下に、基本的な分離培地について記載する。

① SS 寒天培地（サルモネラ・シゲラ培地）（Leifson：1935 の改良）

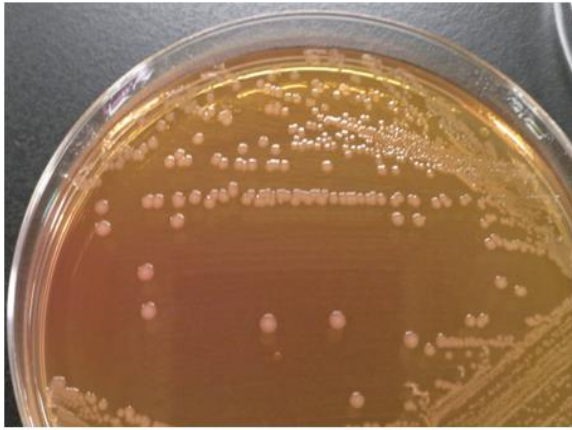
- ・乳糖を含む—SS 寒天培地は胆汁酸塩の種類により大腸菌の発育を抑制するよう考案された。サルモネラ (*Salmonella*) や赤痢菌 (*Shigella*) を分離する目的で考案された培地。
- ・鑑別の基準となる成分は乳糖で、pH 指示薬として中性紅（ニュートラルレッド）が含まれている。
- ・多くの乳糖分解菌の発育を強く抑制し、発育しても赤色の酸性の色調を示し、集落周囲にレンガ色の色素沈着が生じる。
- ・乳糖非分解のサルモネラや赤痢菌は、半透明の集落を形成するが、硫化水素産生のサルモネラは、培地に添加されている鉄分により黒色集落を示す。
- ・チフス菌は硫化水素産生量が少ないため、無色半透明の集落を示す。
- ・*Shigella sonnei* は 24 時間以内に薄い赤色を呈するものがある。



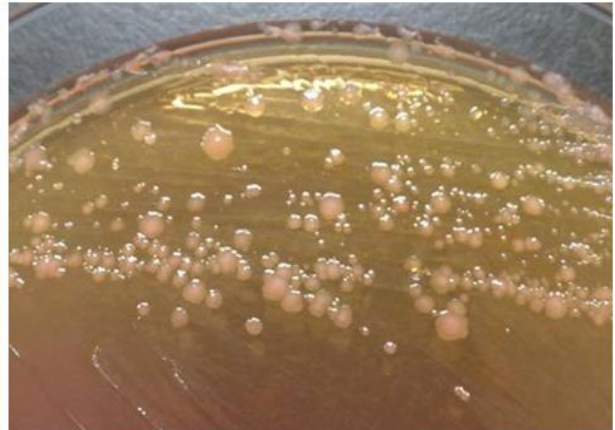
一般のサルモネラ



チフス菌



Sigella flexneri

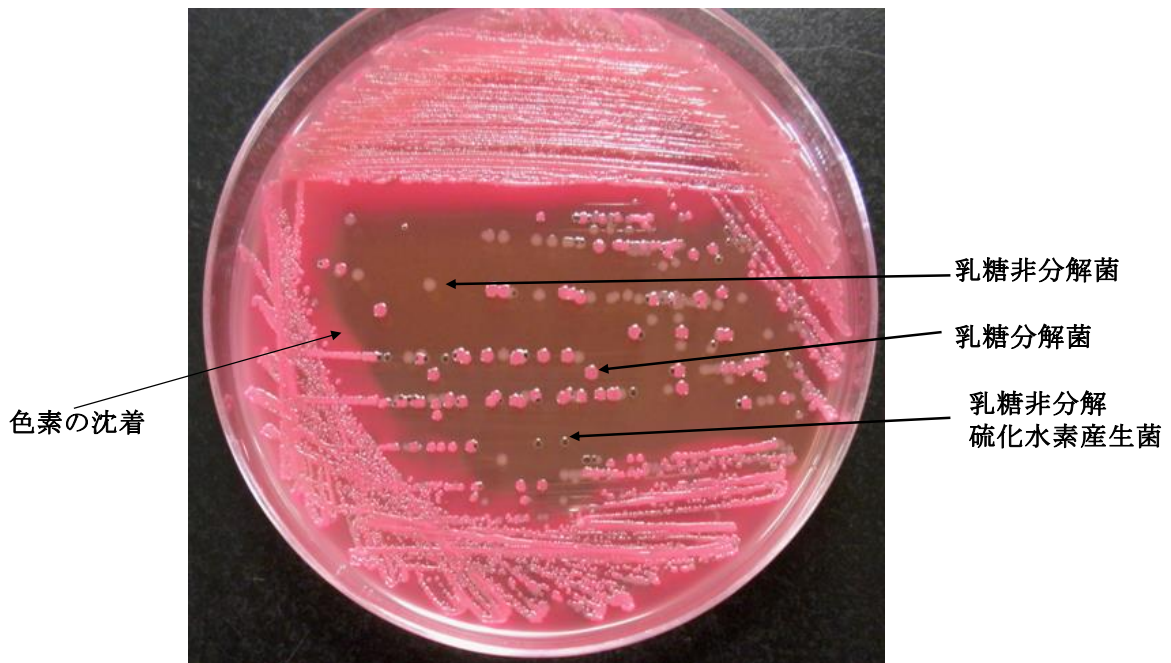


Shigella sonnei

② DHL 寒天培地 (坂崎ら : 1960)

- 乳糖、白糖を含む—サルモネラ・赤痢菌分離用の培地だが、他の培地より発育が良く、とくに硫化水素産生菌が明瞭に発育し、黒色集落を形成する。

DHL 寒天培地上の乳糖分解性の違い



③ マッコンキー培地 (MacConkey : 1905)

- ・乳糖を含む—胆汁酸を加えた腸内細菌分離用では最も古典的培地。腸内細菌、ブドウ糖非発酵性グラム陰性桿菌等の鑑別分離用培地、大腸菌検査にも使用。

④ ソルビット・マッコンキー培地

- ・マッコンキー培地の乳糖をソルビットに替えた培地で腸管出血性大腸菌 O157 分離用培地である。(第二世代セフェム剤のセフィキシムと亜テルル酸カリウムを添加する)。

*その他、多種類の酵素基質培地や腸管出血性大腸菌 O26、O111 の分離培地なども考案されている。

⑤ BTB 乳糖加寒天培地 (ドリガルスキー改良培地 : Conradi & Drigalski:1902)

- ・乳糖を含む—培地の色調の変化により乳糖分解能を鑑別する。腸内細菌とその他のグラム陰性桿菌を分離する(一部のグラム陽性球菌が発育)。原法は指示薬としてリトマスを使用した。
- ・非選択性の培地で、胆汁酸は含まれていない。

(4) 主な腸内細菌

① 大腸菌属(Genus *Escherichia*)

- ・乳糖を発酵的に分解し、多くは運動性を有する (一部に乳糖を分解しない菌がある)。



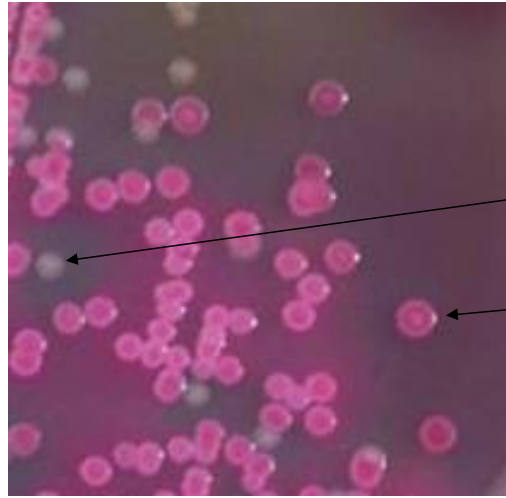
Escherichia は *Enterobacteriaceae* の type genus で、*Escherichia coli* (大腸菌) は、この属 (genus) の type species である。Buchner により初めて記載 (1885)され、名前の由来にもなる細菌学者 Escherich (独) により詳細に検討された。

- ・腸管に常在する大腸菌は非病原性であるが、以下の 5 つのカテゴリーの大腸菌はヒトに病原性を有する。

<腸管病原性大腸菌（下痢原性大腸菌）の分類>

腸管病原性大腸菌 <i>enteropathogenic E. coli</i> (EPEC)
<ul style="list-style-type: none">・ 幼小児に下痢を起こすことが多い。・ 長い間、血清型により決定されていたが、病原因子 (<i>eae</i> 遺伝子を保有) が特定されたことにより、O 血清に凝集しない (OUT) 大腸菌も EPEC に含まれることになった。・ 血清型 O26、O44、O55、O86、O111 などが良く検出されるが OUT の菌も多数検出されている。・ 今後の研究により新たな知見が得られる可能性がある。
腸管毒素原性大腸菌 <i>enterotoxigenic E. coli</i> (ETEC)
<ul style="list-style-type: none">・ コレラ菌と類似した毒素を産生する。LT(易熱性)と ST(耐熱性)がある。・ コレラ様の激しい下痢を起こす。・ 血清型 O6、O25、O148、O169 などで、海外渡航者下痢症からの検出例が多い。
腸管組織侵入性大腸菌 <i>enteroinvasive E. coli</i> (EIEC)
<ul style="list-style-type: none">・ 赤痢菌と類似した性状と症状で組織侵入性遺伝子がある。・ 運動性がないことから、赤痢菌との鑑別が重要である。・ 海外渡航者下痢症から検出されることが多い。・ 血清型 O18ac、O112、O124、O136 など。
腸管出血性大腸菌 <i>enterohemorrhagic E. coli</i> (EHEC) or (STEC)
<ul style="list-style-type: none">・ Vero 細胞に毒性を示す毒素(VT1、VT2)を産生する。・ 志賀赤痢菌の毒素と類似することから <i>stx1</i>、<i>stx2</i> ともいう。・ 溶血性尿毒症症候群 (HUS) や脳症を発症することがある。・ 血清型 O157、O26、O111、O153 など多くの血清型がある。
腸管凝集性大腸菌 <i>enteroaggregative E. coli</i> (EAggEC) or (EAEC)
<ul style="list-style-type: none">・ Nataro らによって発見(1985)された新しいカテゴリーの下痢原性大腸菌である。・ 腸管上皮細胞に接着し増殖する。・ 慢性的な下痢症状が特徴である。開発途上国だけでなく、国内での感染も多い。・ 今後の研究により、新たな知見が得られる可能性がある。

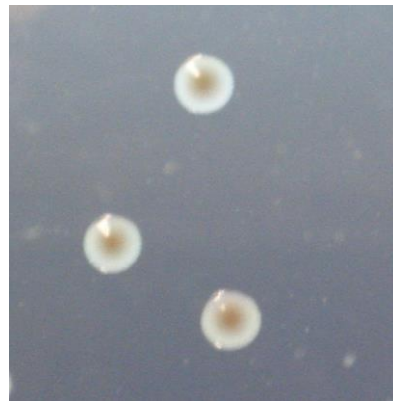
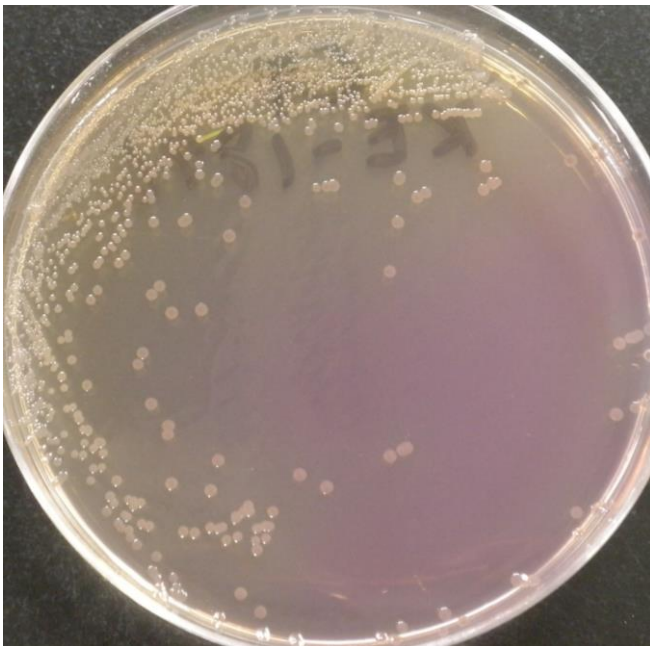
ソルビット・マッコンキー培地上の大腸菌



ソルビット非分解

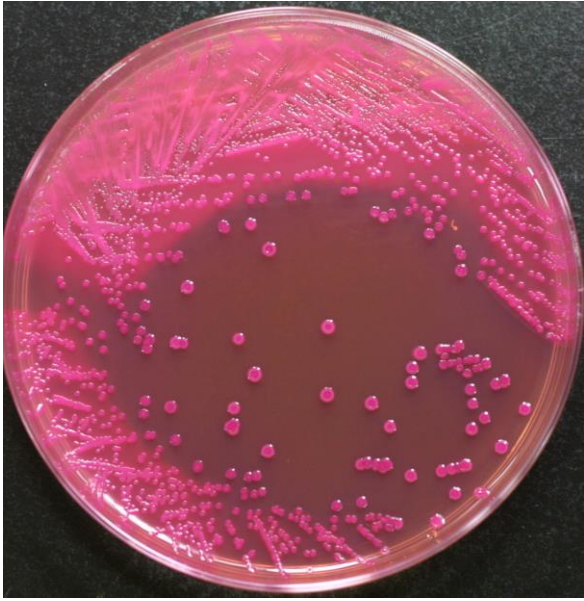
ソルビット分解

ソルビット・マッコンキー培地上の腸管出血性大腸菌 O157



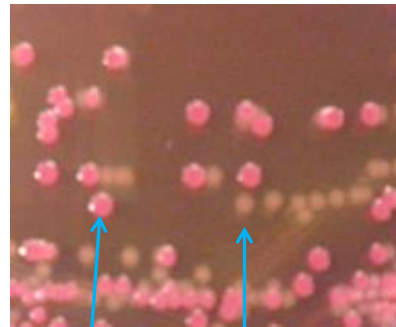
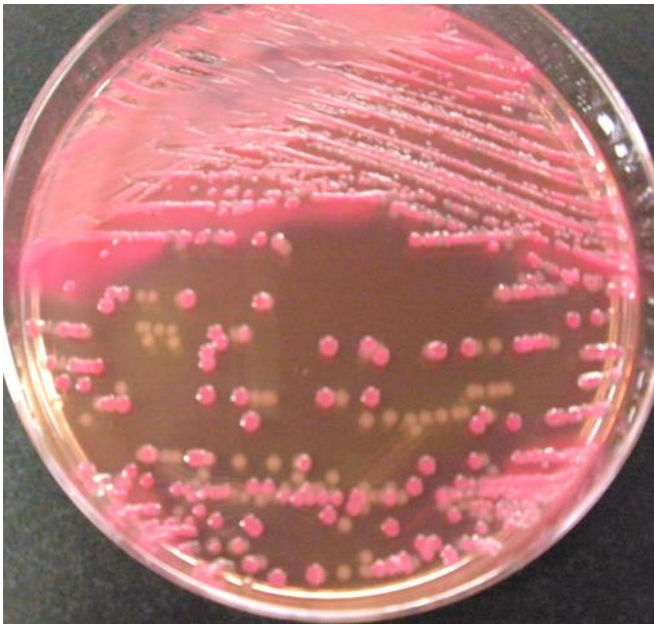
- 腸管出血性大腸菌 O157 はソルビット非分解
- 一般の大腸菌はソルビット分解
- 選択剤として、セフォペラゾンと亜テルル酸カリウムを添加

マッコンキー培地上の大腸菌



赤色の集落は乳糖分解菌

DHL 寒天培地上の大腸菌



乳糖分解

乳糖非分解

多くの大腸菌は乳糖を分解する（一部に乳糖非分解菌もある）

② 赤痢菌属 (Genus *Shigella*)

- 赤痢菌は細菌性赤痢 (dysentery) の原因菌で、日本で志賀 潔により初めて分離された (1898)。
- Shigella* という学名は志賀に因んで命名され、分離した菌は *S. dysenteriae* (志賀赤痢菌) と呼ばれる。
- 赤痢菌は生化学的な性状により 4 菌種に分類され、その主抗原により、A-D 群の 4 つの血清型に分けられる。
- S. dysenteriae* (A 群) は、志賀毒素 (stx) とよばれる非常に強い細胞変性毒素を産生する。この毒素は腸管出血性大腸菌が産生する Vero 毒素と同じである。
- S. flexneri* (B 群) は Flexner (米)、*S. boydii* (C 群) は Boyd (英)、*S. sonnei* (D 群) は Sonne (独) という細菌学者の名前に由来する。

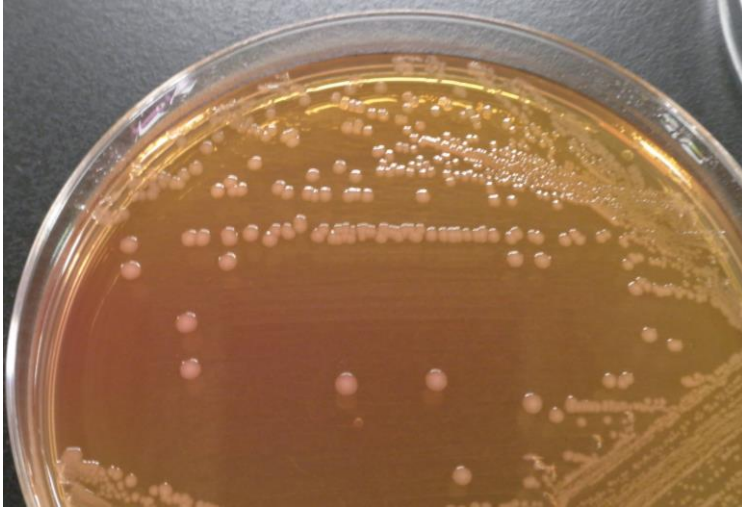
分類学的には、*S. dysenteriae* は原則的にマンニット非発酵、その他の 3 菌種はマンニット発酵菌である。マンニット発酵菌のうち、乳糖および白糖を遅れて発酵する一群の菌は *S. sonnei*、また、それ以外のマンニット発酵菌の中で血清学的に関連のある菌が、*S. flexneri*、血清学的に関連性の無いものは *S. boydii* に含まれる。

Shigella spp. の鑑別性状

性状	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>E. coli</i>
インドール	d	d	d	—	d
β-ガラクトシダーゼ	d	—	d	+	+
オルニチンデカルボキシラーゼ	—	—	—	+	+
ブドウ糖からのガス産生	—	d	d	—	+
糖(酸):					
マンニット	—	+	+	+	+
乳糖	—	—	—	(+)	+, (+)
白糖	—	—	—	(+)	d
ラフィノース	—	d	—	(+)	d
キシロース	d	d	d	—	+
ズルシット	d	—	—	—	d
クエン酸(クリステンゼン)	—	—	—	—	d
酢酸ナトリウム	—	d	—	—	+, (+)

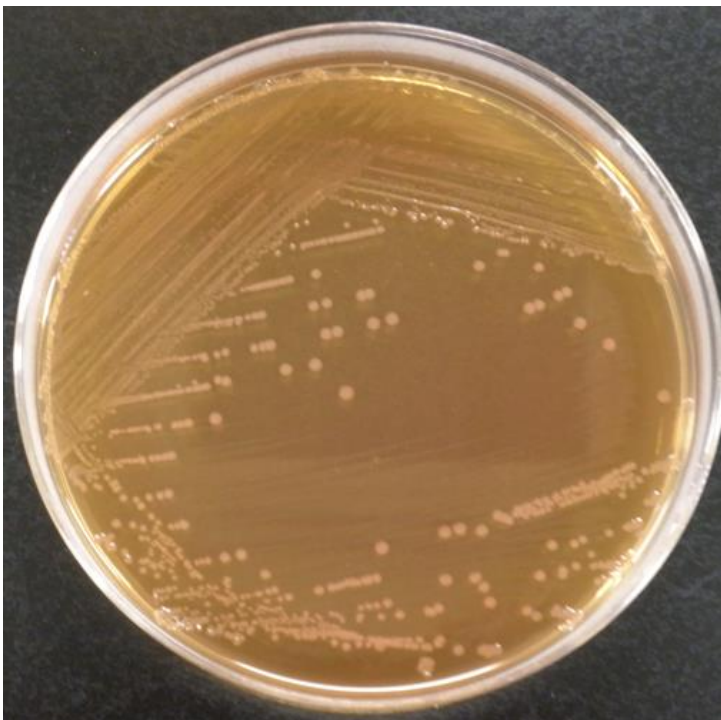
+:90%以上が陽性、 -:90%以上が陰性、(+):遅れて陽性、d:菌株(血清型)によって異なる

SS 寒天培地上の *S. flexneri*



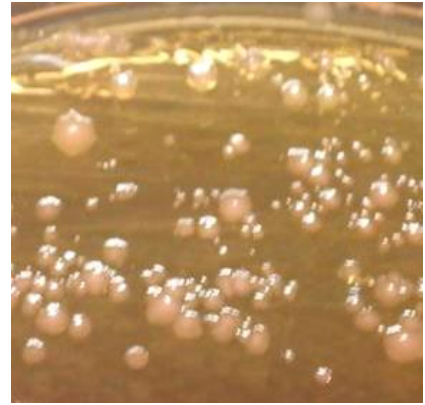
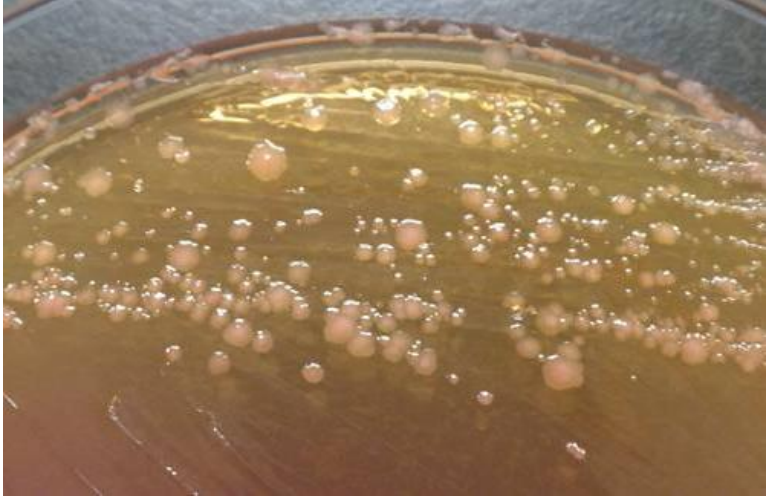
湿潤、滑沢、正円、培地色、半透明の集落で、乳糖非分解

DHL 寒天培地上の *S. flexneri*



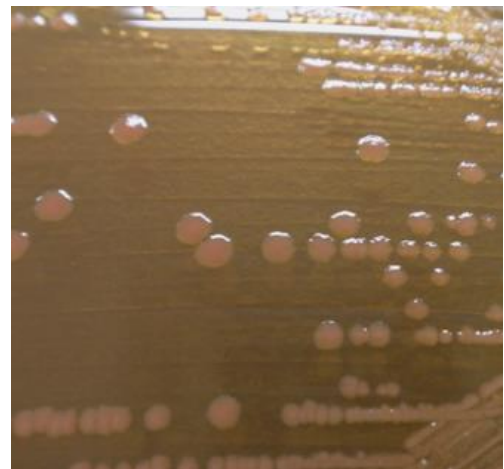
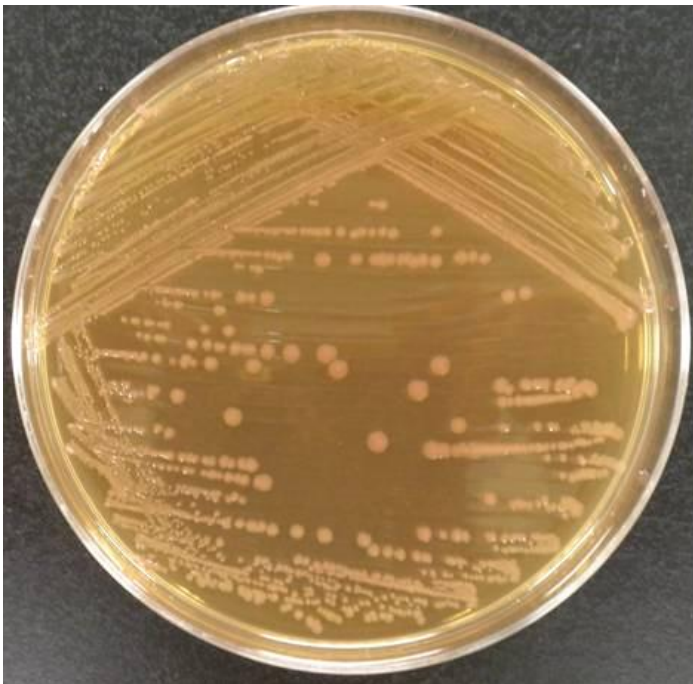
湿潤、滑沢、正円、培地色、半透明の集落で、乳糖非分解

SS 寒天培地上の *S. sonnei*



S. sonnei の集落は矮小（コビト）集落が多く見られる
乳糖遅分解で、24 時間で薄いピンク色集落を形成するものが多い（乳糖遅分解）

DHL 寒天培地上の *S. sonnei*



湿潤、滑沢、辺縁不正円、培地色、半透明の集落で、乳糖を遅れて分解する

③ サルモネラ属 (Genus *Salmonella*)

- ・ サルモネラは Salmon と Smith (米) によって分離 (1885) され、*Bacillus cholerae-suis* (後に、*Salmonella choleraesuis*) と命名された。
- ・ チフス菌、パラチフス A 菌はサルモネラ属の菌であるが、その病原性の強さから三類感染症に、その他のサルモネラは五類感染症に含まれる。
- ・ 分類学上は *Salmonella enterica* と *Salmonella bongori* の 2 菌種に分類され、*Salmonella enterica* はその性状からさらに 6 亜種に分類される (2005)。

Salmonella enterica

- I *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ヒトに病原性がある
- II *Salmonella enterica* subsp. *salamae*
- III a *Salmonella enterica* subsp. *arizonae* ヒトに病原性のものもある
- III b *Salmonella enterica* subsp. *diarizonae* ヒトに病原性のものもある
- IV *Salmonella enterica* subsp. *houtenae*
- V *Salmonella enterica* subsp. *indica*

Salmonella bongori

**Salmonella subterranea* は、2004 年にサルモネラの菌種として報告されたが生化学性状は *E. hermannii* に近似していることから、米国 CDC 及び WHO はサルモネラ属と認めていない。

- ・ サルモネラの血清型は 2,500 種類以上 (*Salmonella enterica* 2,557 種類、*Salmonella bongori* 22 種類 (Antigenic formulae of The *Salmonella* serovers 2007 WHO)) 知られている。
- ・ サルモネラの血清型別は O 及び H 抗原を決定し、抗原構造表により同定する。サルモネラの固有名は医学上の重要性から、分離された病気および動物名にちなんでつけられたものが多い。しかし、1934 年以降は最初に分離された町、地方または国の名称を付けることになっており、現在では血清型名は亜種 I のみ固有名を付ける。血清型に固有名を付けるのは異例で、「国際腸内細菌委員会」での取り決めにすぎない。亜種 I 以外の亜種については、抗原構造で表記する。
- ・ 血清型名は大文字ではじまるローマン体で記載し、例えば、チフス菌は *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar Typhi となるが、長くなることから日常的には短縮した名称が慣用されている。 (*Salmonella Typhi* 又は *S. Typhi* 等)
- ・ 血清型を抗原構造で表すには、O 抗原、第 1 相 H 抗原および第 2 相 H 抗原をコロン (:) で結ぶように決められている。

(例) *Salmonella* Typhi = 9,12,[Vi] : d : -

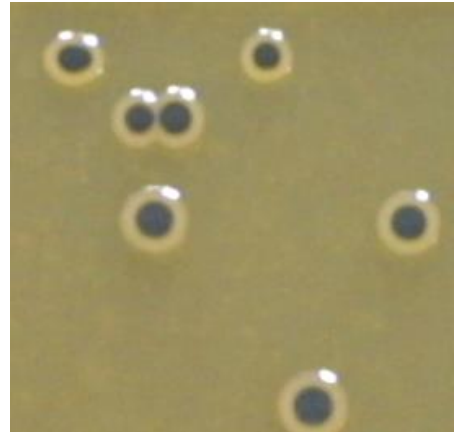
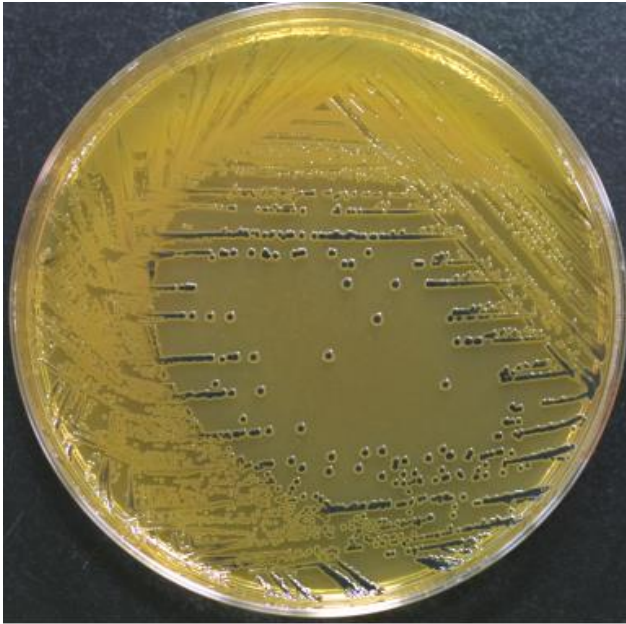
Salmonella Typhimurium = 1,4,[5],12 : i : 1, 2

*サルモネラの命名や記載法に関しては、坂崎利一・田村和満 著「腸内細菌 上」に詳しく記載されているので参考にされたい。



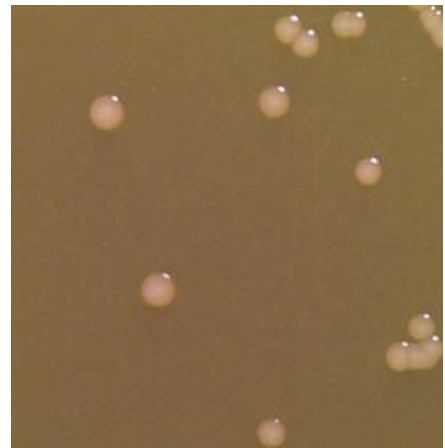
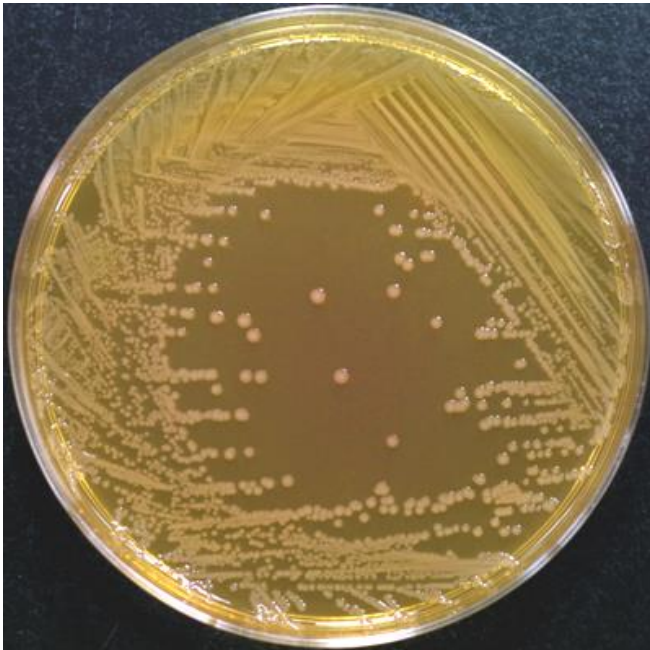
サルモネラの学名は、発見者の一人である Salmon に因んで *Salmonella* と命名された(1900)。
type strain である *Salmonella choleraesuis* は Smith (1894) が記載した。

SS 寒天培地上のサルモネラ



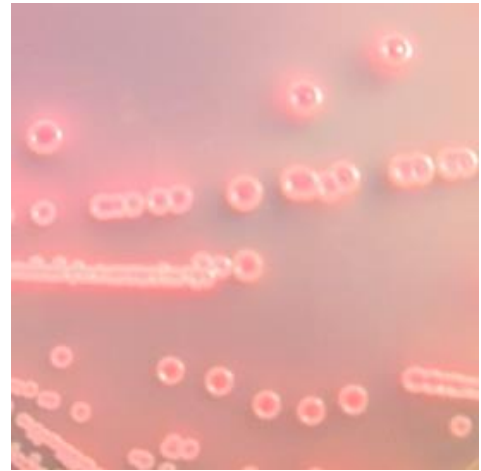
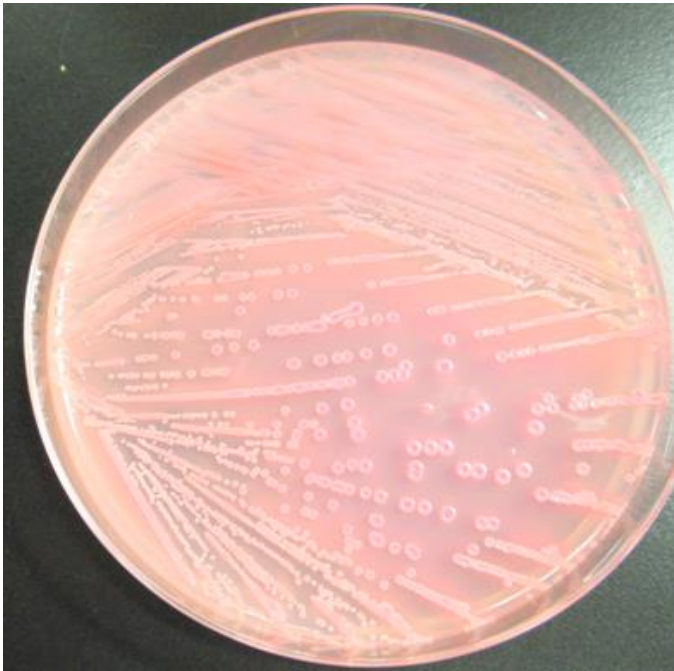
多くのサルモネラは硫化水素の産生により黒色に変化する。

SS 寒天培地上のチフス菌



チフス菌の硫化水素産生量は少ないため、SS 寒天培地上では黒色にはならない

ES サルモネラ培地Ⅱ (酵素基礎培地) 上のサルモネラ

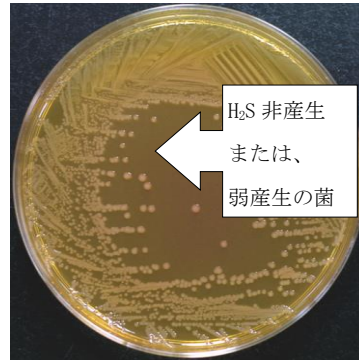


サルモネラの多くは硫化水素 (H_2S) を産生することから、SS、DHL 寒天培地で黒色を呈するが、 H_2S の産生が弱く黒色にならないものがある。特にチフス菌やパラチフス A 菌を見落とす可能性があることから、 H_2S を指標としない培地 (酵素基礎培地など) を併用することが望ましい。

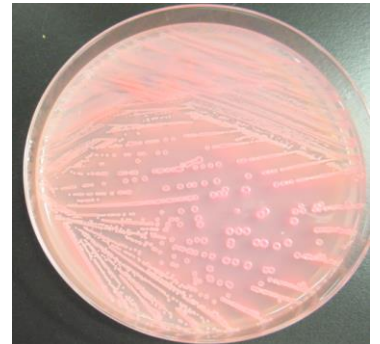
各種のサルモネラ分離用培地とサルモネラ



SS寒天培地



SS寒天培地



ESサルモネラ培地Ⅱ



DHL寒天培地



DHL寒天培地



MLCB寒天培地

④ プロテウス属 (Genus *Proteus*)

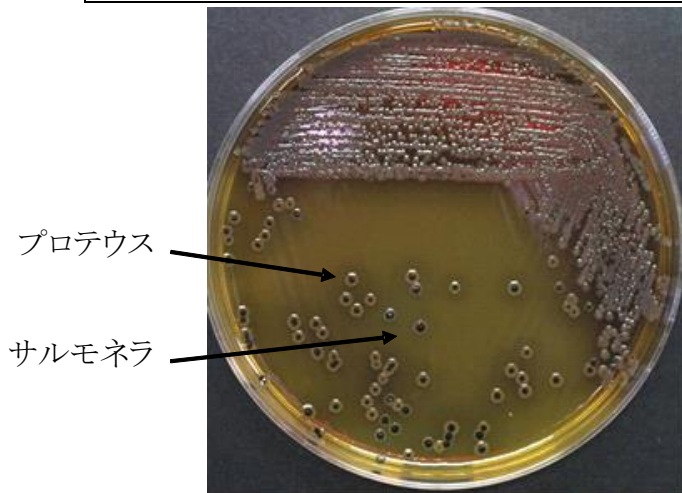
- ・ヒトの腸管に対する病原性はないが、スウォーミングの性質をもつ菌種 (*P. vulgaris*, *P. mirabilis*) は、他の集落の上に広がって、原因菌の分離を困難にすることが多く、昔から問題になっていた菌である。
- ・このため、多くの腸内細菌分離用培地には、プロテウスのスウォーミングを抑える成分 (胆汁酸塩) が添加されている。
- ・これらの菌種は、サルモネラと類似した集落を示すことから検査の上で重要な菌である。
- ・尿路感染症の原因菌のひとつで、日和見感染として問題となる。ヒトや動物腸管内に広く分布*) する。

*) *P. vulgaris*, *P. mirabilis*, *P. penneri*, *P. myxofaciens* の4菌種

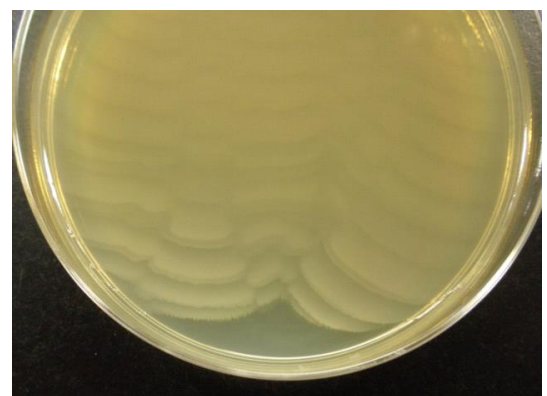


Proteus プロテウスはギリシア神話に登場する海神ポセイドンの従者の名前でいろいろな形に変身できる。本菌の集落が、培地表面を滑るように広がる性質 (スウォーミング、遊走) があることから命名 (1885) された。

DHL 寒天培地上のプロテウス (*P. mirabilis*) とサルモネラ



HI 寒天培地上のプロテウス (*P. mirabilis*)



*スウォーミングは胆汁酸によって抑制される



スウォーミングと鞭毛 ～H 抗原と O 抗原のはなし～

- プロテウスは腸管感染症の原因菌ではないが、腸内に生息し、その発育形態ゆえに、古くから細菌学者が注目した。
- **Weil & Felix (1917)**は、鞭毛が有るときにはスウォーミングで激しく培地上に広がり、鞭毛を失った（あるいは、培地にフェノールを加えて鞭毛の形成を阻止した）菌株では単独集落を形成することを発見した。
- スウォーミングは、ガラスに息を吹きかけたときの曇りガラスの状態に似ており、これをドイツ語で **Hauchbildung** ということから、プロテウスのスウォーミングを **Hauchbildung** と表現、一方、鞭毛のない菌の発育は **Hauchbildung** がないということで **ohne Hauchbildung** と表現し、これを語源として、鞭毛のあるプロテウスの菌株を **H 型**、鞭毛のない菌株を **O 型** と呼んだ。
その後、鞭毛の抗原を **H 抗原**、菌体の抗原を **O 抗原** と呼ぶようになった。

⑤ クレブシエラ属 (Genus *Klebsiella*)

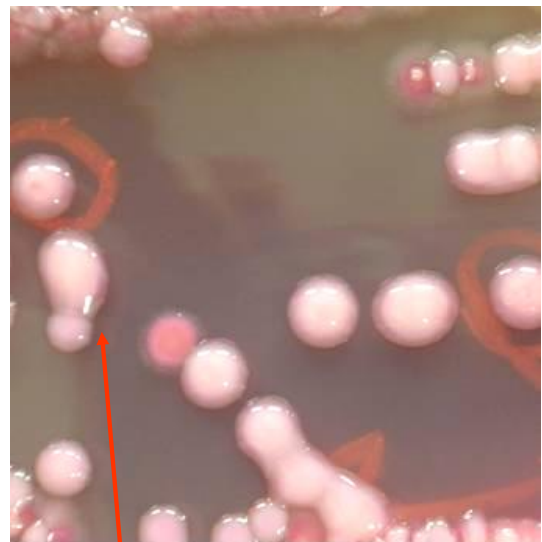
- ・自然界に広く分布し、本来は非病原性の菌で、日和見感染や二次感染で重要である。
- ・赤痢菌と同様に運動性のない菌である。
- ・多量の莢膜物質を産生し、寒天培地上で粘稠性の集落を形成する (写真)。
- ・近年、多剤耐性 (多くの抗生物質が効かない) の *Klebsiella pneumoniae* が問題になっている。
- ・主な菌種は、*K. pneumoniae subsp. pneumoniae*、*K. pneumoniae subsp. ozaenae*、*K.aerogenes*、*K. oxytoca* などがある。



肺炎から分離された菌に *Klebsiella pneumoniae* (和名は肺炎桿菌) と命名 (1887) された。

属名は細菌学者 Edwin Klebs (独) に因んだ学名、pneumonia は肺炎の意味である。

DHL 寒天培地上のクレブシエラ



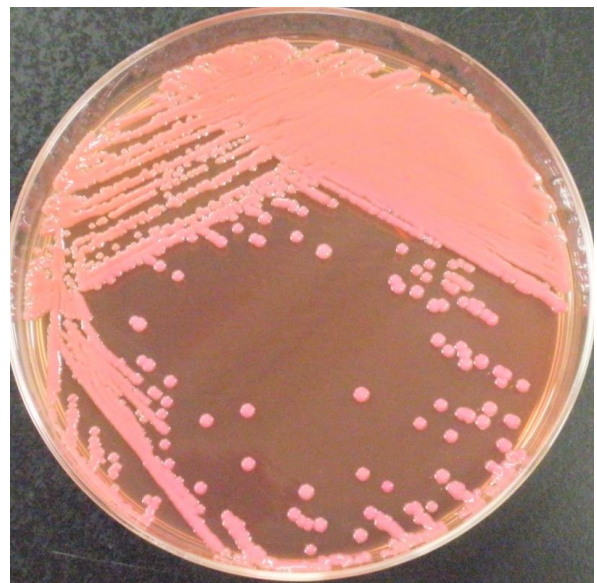
粘稠性集落で集落が融合

Klebsiella aerogenes

HI 寒天培地



DHL 寒天培地



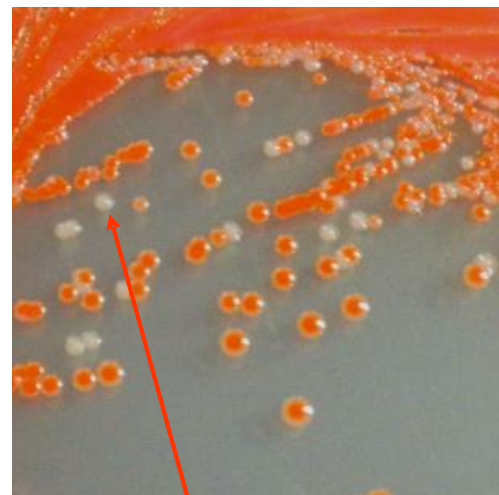
- aer は空気 (ギリシャ語)
- gennatio は産生する (ギリシャ語)
- aerogenes はガス産生性の (モダンラテン語)
- *Aerobacter* 属、*Enterobacter* 属として分類されたこともある

⑥ セラチア属 (Genus *Serratia*)

- ・自然界に広く分布する。一部の菌株で赤色の色素を産生するが、変異株や培養法によっては色素を産生しない。
- ・霊菌（レイ菌）とも呼ばれ、自然界で発育した菌による赤色の色素がキリストの血液といわれたことから付けられたと言われる。
- ・日和見感染の原因菌であるが、近年、院内感染の原因菌として問題。術後やがんなどによる免疫機能の低下により感染することがある。
- ・主な菌種は、*S. marcescens*、*S. liquefaciens*、*S. rubidaea* などがある。

Serafino Serrati に因んで命名された(1823)。イタリアの物理学者で 1787 年に、Florence で蒸気船を発明した。

普通寒天培地 (室温培養) 上の *Serratia marcescens* (色素産生)



色素非産生変異株

⑦ エルシニア属 (Genus *Yersinia*)

- 一般の腸内細菌に比べて発育が遅く、SS 培地や DHL 寒天培地では、48 時間で 1.5-2.0mm の集落を形成する。
- 主な菌種に以下のものがある。

Y. pestis : ペストの原因菌、一般の検査・研究機関では保持できない

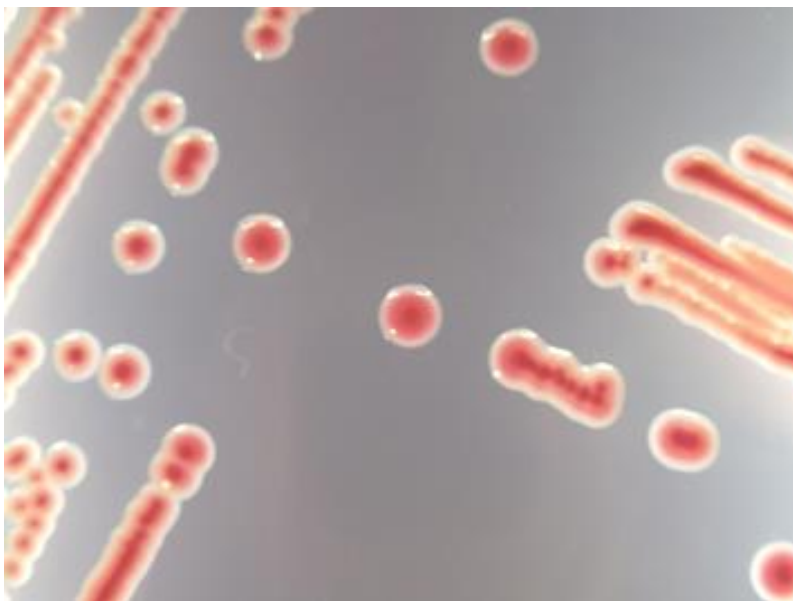
Y. pseudotuberculosis : 仮性結核菌

Y. enterocolitica : 食中毒原因菌の 1 つ



- 1894 年にペスト菌を発見した Yersin (仏) に因んで命名された。
- *Yersinia* として編入されたのは 1972 年で、それ以前には、40 年間あまり *Pasteurella* として分類されていた。
- 1890 年初旬、日清戦争前の香港で原因不明の感染症の大流行があり、当時の内務省衛生局は、北里柴三郎を香港に派遣し原因解明にあたらせた
- Yersin もフランスから派遣されて香港で研究をしていた。
(「ミクロの世界の開拓者たち」くろきいわお著)
- Yersin と北里柴三郎がほとんど同時期に論文を提出したのは有名な話であるが、検討の結果、Yersin の名前が学名に残っている
- 北里の報告に「グラム陽性桿菌、運動性が弱くある」ことが論点になり、グラム陰性、非運動性のペスト菌と異なったことによる。

CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin) 寒天培地上の *Yersinia enterocolitica*



マンニット分解により赤色 22°C、48 時間培養

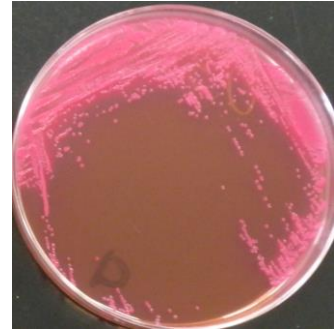
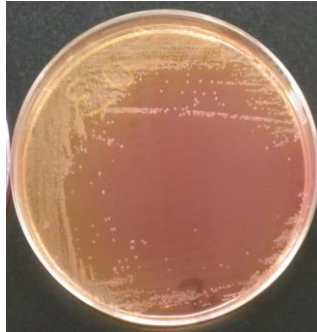
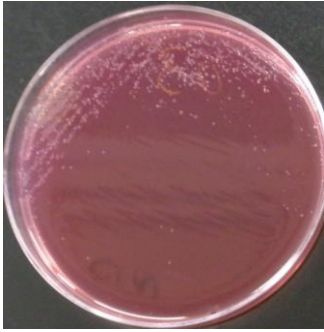
培養時間による発育状況の比較

CIN 培地

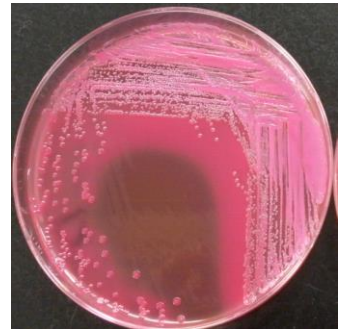
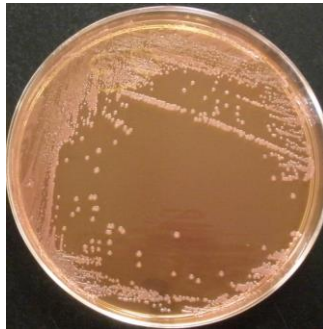
SS 寒天培地

DHL 寒天培地

24 時間



48 時間



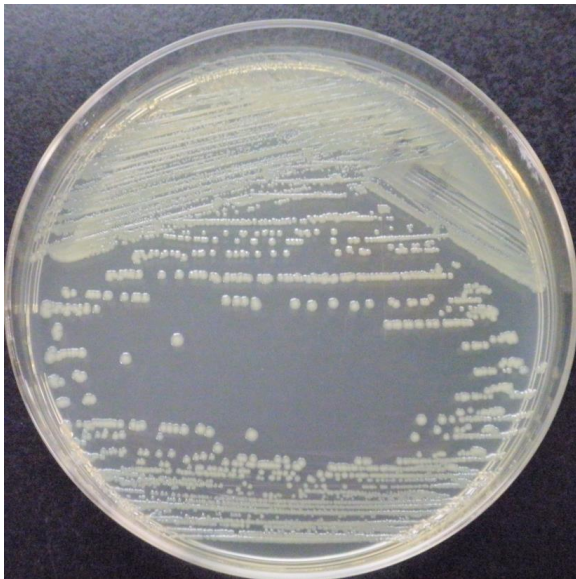
⑧ エンテロバクター属 (Genus *Enterobacter*)

- ・ 主な菌種は、*E. cloacae*、*E. agglomerans* などがある。
- ・ ヒトや動物の腸管内および環境中に広く分布している。
- ・ 臨床的には病原性は確認されていないが、近年、本菌の一菌種である *E. sakazakii** が乳児の髄膜炎起因菌の一つとして注目されている。

* *E. sakazakii* は、2008年にエンテロバクター (*Enterobacter*) 属からクロノバクター (*Cronobacter*) 属に再分類され、*C. sakazakii* となったが、現在でも *E. sakazakii* と呼ぶことが多い。

Enterobacter cloacae

HI 寒天培地



DHL 寒天培地



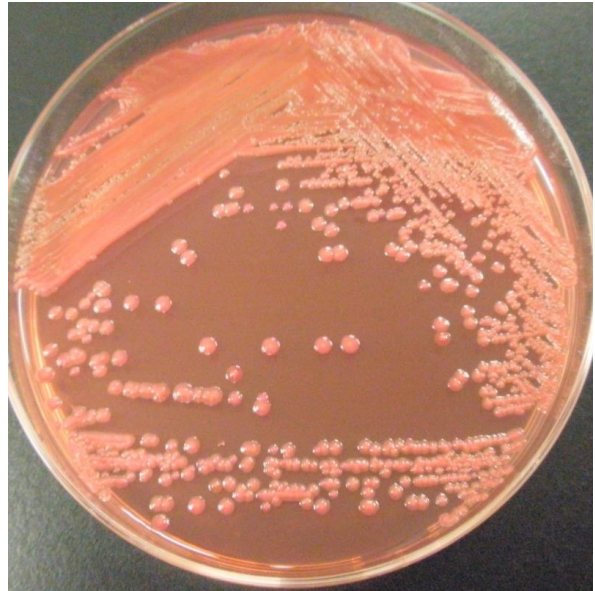
- ・ 腸内の正常フローラ
- ・ 日和見感染症の原因菌の一つ
- ・ 2014年9月に5類全数報告疾患の届出感染症の対象となった
- ・ カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE)の1菌種として報告される頻度が高い
- ・ *cloacae* は 下水の(ラテン語)

*Cronobacter sakazakii**

HI 寒天培地



DHL 寒天培地



- ・黄色い色素を産生する（pH 指示薬や発育抑制物質を含まない培地では黄色の集落を形成）
- ・2008 年にエンテロバクター (*Enterobacter*) 属からクロノバクター (*Cronobacter*) 属に再分類された
- ・本菌による髄膜炎を報告した坂崎利一博士に因んで *E. sakazakii* と命名された
- ・粉ミルクによる乳児の髄膜炎が問題化している

- ・菌種名の *sakazakii* は、日本の細菌学者 坂崎利一に由来する。
- ・坂崎は、弟子たちが *sakazakii* と口々に言うのを聞きながら、「オレの名前が呼び捨てにされる」と苦笑いしていたとか…