

# ペストの病原体検査・診断マニュアル

## 目次

- I. ペスト菌によって起こる疾患の概説
- II. 検査材料の採取・輸送
  - 1. 検査材料の採取に関する一般的な注意
  - 2. 検査材料の採取
    - 1) 肺ペストが疑われた場合
      - (A) 喀痰の採取
      - (B) 血液の採取
    - 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
      - (B) 血液の採取
    - 3) 敗血症型ペストが疑われた場合
      - (A) 血液の採取
  - 3. 検査材料の包装と輸送
- III. 検査の進め方
  - 1. 検査材料の取り扱いに関する一般的な注意
  - 2. 検査手順
- IV. 検査の判定
  - 1. 疑似
  - 2. 確定
- V. 検査方法
  - 1. 病原体の分離
    - 1) 菌の形態学的検査
      - (A) 塗抹・固定法
      - (B) グラム染色・単染色法
    - 2) 菌の分離および増殖性の特徴
      - (A) 平板培養における特徴
      - (B) 液体培養増殖形態の特徴
  - 2. 抗原検出
    - 1) 蛍光抗体法
      - (A) 蛍光抗体の作製法（直接法）
      - (B) 蛍光抗体による菌のラベル
      - (C) 蛍光顕微鏡判定
    - 2) スライド凝集試験法
  - 3. 抗体検出
    - 1) 血球凝集試験法
    - 2) 定量凝集試験法
    - 3) ELISA 試験法

- 4) ウェスタンブロット試験法
4. PCR 法を用いた迅速診断
5. 生化学的性状検査
  - 1) 一次確認培養試験
    - (A) ブドウ糖、乳糖、白糖発酵試験
    - (B) 運動性・インドール・リジン脱炭酸試験
    - (C) VP・MR 反応試験
    - (D) 尿素分解試験
  - 2) 二次確認培養試験
    - (A) 白糖、メリビオース、ラムノース試験
    - (B) 市販のキット
  - 3) 毒力因子同定試験
    - (A) Fraction 1 同定試験 (*cafI*)
    - (B) VW 抗原の同定試験 (*VW*)
    - (C) Pesticin 1 同定試験 (*pstI*)
    - (D) 色素吸着能をもつ表在抗原の同定 (*pgm*)
  - 4) 鑑別試験
    - (A) *Yersinia pestis* と *Yersinia pseudotuberculosis* との鑑別
    - (B) *Yersinia pestis* と *Yersinia enterocolitica* との鑑別
    - (C) *Yersinia pestis* と *Burkholderia pseudomallei* との鑑別
    - (D) *Yersinia pestis* と *Francisella tularensis* との鑑別
    - (E) *Yersinia pestis* と *Pasteurella multocida* との鑑別
6. ファージ感受性試験

## VI. 参考文献

## VII. 付録

1. ペスト菌のマルチプレックス PCR 法
2. ペスト菌の生化学的性状の特徴
3. ペスト菌とペストと誤診される菌との鑑別点
4. ペスト菌の写真
  - 写真 1. ペスト菌のギムザ染色
  - 写真 2. ペスト菌の集落
  - 写真 3. マルチプレックス PCR 法によるペスト菌の検出
  - 写真 4. ウェスタンブロット法によるペストの診断
5. 治療の参考 (抗菌薬)
6. 予防の参考 (抗菌薬・ワクチン : WHO および CDC 提唱)

## I. ペスト菌によって起こる疾患の概説

ペストは腸内細菌科に属するグラム陰性桿菌の *Yersinia pestis* に起因する全身性疾患で病型は感染経路や臨床症状によって腺ペスト、敗血症型ペスト、肺ペストに分けられる。

人ペストの 80~90% を占める腺ペストおよび約 10% を占める敗血症型ペストは、ペスト菌保有ノミを介して (78%)、ペスト感染動物の体液を介して (20%) 経皮感染する。腺ペストの臨床症状は特に鼠径部、腋窩、頸部のリンパ節の膿瘍や腫脹 (クルミ大もしくはアヒルの卵大) が特徴である。通例 2~7 日の潜伏期の後、40℃前後の突然の発熱に見舞われ、頭痛、悪寒、倦怠感、不快感、食欲不振、嘔吐、筋肉痛、疲労衰弱や精神混濁等の強い全身性の症状が現れる。通例、発症後 3~4 日経過後敗血症を起こし、その後 2~3 日以内に死亡する。敗血症型ペストの臨床症状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、通例 2~7 日の潜伏期の後、40℃前後の突然の発熱、急激なショック症状や DIC (昏睡および、皮膚のあちこちに出血斑、手足の壊死、紫斑等) が現れ、通例発病後 2~3 日以内に全身が黒色となり死亡する。人ペストの約 2% を占める肺ペストはペスト菌エーロゾルを介して、人から人への急速な伝播が起こる。臨床症状は潜伏期間は通例 1~3 日であるが、最短 12~15 時間という報告例もある。強烈な頭痛、嘔吐、39~41℃の発熱、急激な呼吸困難、鮮紅色の泡立った血痰を伴う重篤な肺炎像を示し、発病後 12 時間~24 時間 (発病後 5 時間という例も記載されている) で死亡する。

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。

ペストの治療には抗菌薬が大変有効で、日本で認可されている抗菌薬にはスパロフラキシンとストレプトマイシンがある<sup>7)</sup> (付録-5. 参照)。

ペストは現在、危険なペスト菌常在地域 (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) の齧歯類、特にネズミ科やリス科の動物間で、ノミを介して常に流行を繰り返している。従って、ペストの流行はノミの繁殖する季節 (湿度 60% 以上で温度 20℃ から 26℃) と一致する。人間に対して、感染能力が強いノミはケオピス、セラトフィルス、ノソフィルス等での家住性ネズミに寄生するノミである。その中でもケオピスは貪食で頻繁に吸血し、本来の宿主と異なる人間を好んで吸血するため、人ペスト流行上重要な役割をしている。

日本では 1926 年以降 75 年間、人ペストの発生がなかったり、死亡した野生のネズミからペスト菌が検出されていないため、ペストは根絶されたと考えられている。しかし、安心ばかりしてられない状況、例えば、危険なペスト菌常在地域の開発・文明化に伴い、世界のペスト患者は 1990 年代の始まりから増加し、現在 5000 人以上の患者が発生していること、また日本へのペスト菌常在地域からの資材や食物、ペット等の輸入も増えてきていること、加えて、最近、オウム真理教やアメリカの炭疽事件を始めとする、国際的なバイオテロ犯罪が起こっていること等ペストが日本へ輸入される可能性が全くないとは言い切れない状況が新たに生まれている。

## II. 検査材料の採取および輸送<sup>1)</sup>

### 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。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のが理想的であるが、できない場合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<sup>2,3)</sup>。

### 2. 検査材料の採取

ペストの臨床症状が現れ、且つ、ペスト流行地への渡航歴や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、ペストを疑われた場合は、直ちに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）を採取後、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。

#### 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 (Oxoid) 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う。

3) 敗血症型ペストが疑われた場合

(A) 血液の採取

肺ペストが疑われた場合と同様に行う。

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（地方衛研等）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。

### III. 検査の進め方

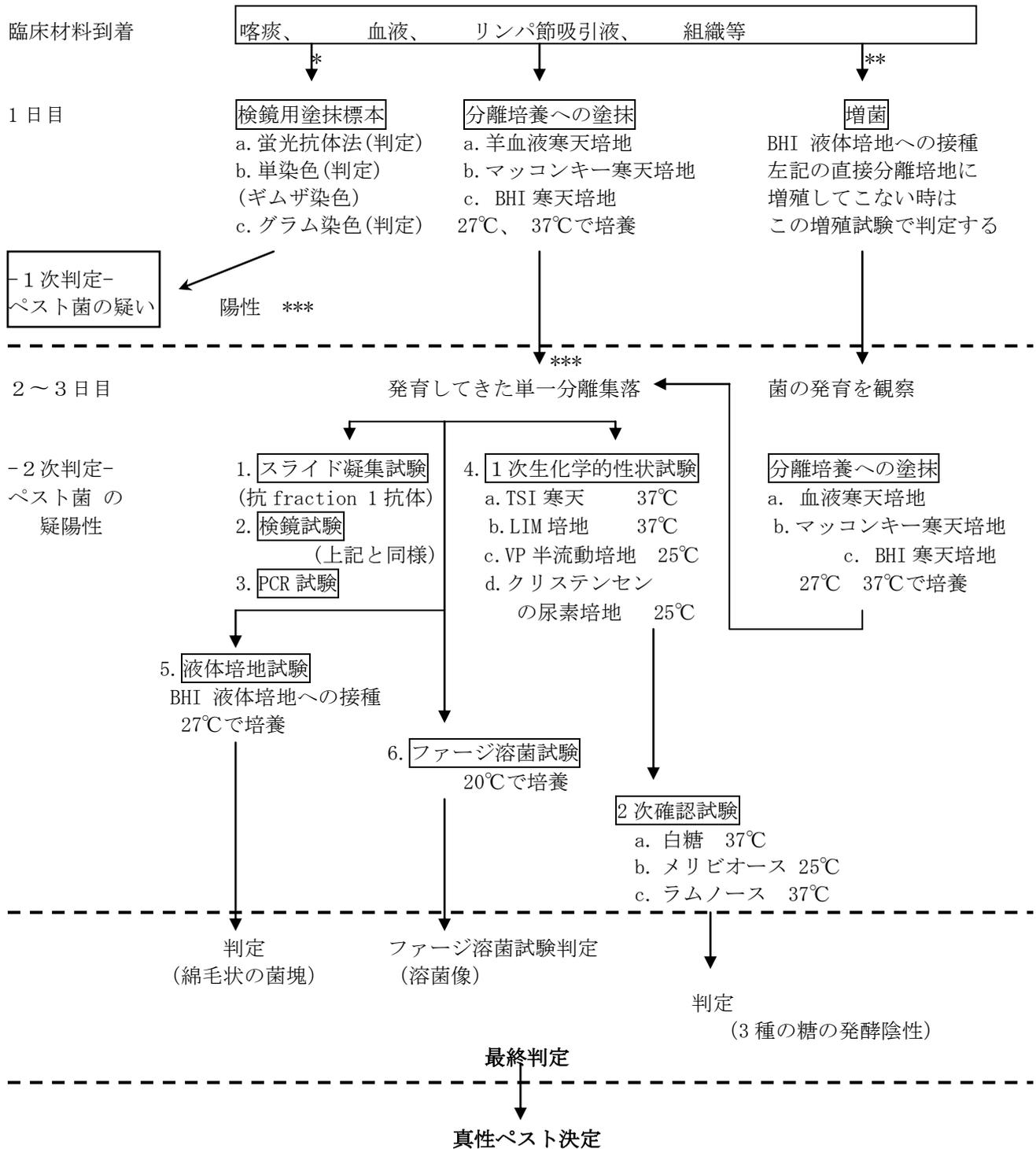
#### 1. 検査材料の取り扱いに関する一般的な注意

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1,000ppm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、1,000ppm次亜塩素酸ナトリウムの拭き消毒をする<sup>2,3)</sup>。

#### 2. 検査手順

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。

図 1. ペスト菌検査のフローチャート



- \* 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。単一の分離菌が得ら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發育してくる。27°Cで3～5日間増殖の様子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、検鏡試験、スライド凝集試験、マルチプレックスPCR試験、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等を行い、総合的に真性ペスト判定を行う。もし、10日経過しても集落が観察されない時は検査を打ち切る。

#### IV. 検査の判定<sup>1,2,3,4,5)</sup>

##### 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、臨床材料から両端染色性を示すグラム陰性桿菌で、Fraction 1 抗原に対する蛍光抗体に対しても陽性を示す菌が検出された場合。
- 2) ペスト菌に特異的なプライマーを用いた PCR 法で、ペスト菌に特異的なバンドが検出される菌が臨床材料から分離された場合。
- 3) 患者血清中の抗 Fraction 1 抗体価が passive haemagglutination test で 16 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) 、 2) 、 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菌と同定された時：

- 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

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抗体価が、感染初期の血清の抗体価の 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。

## V. 検査方法<sup>1,2,3,4,5)</sup>

### 1. 病原体の分離

#### 1) 菌の形態学的検査

##### (A) 塗抹・固定法

血液、リンパ節吸引液、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。

##### (B) 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、又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(*Escherichia 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°C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充分に水洗し、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* 属, *Pasteurella* 属, *Escherichia 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

<作製法>

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 95 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

(B) 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【VII. 付録 - 4. - 1】 写真1】。但し、両端染色菌像は *Yersinia* spp., *Pasteurella* spp., *Escherichia 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  $1\mu \text{l}$  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。

### (C) 蛍光抗体法

#### a) 蛍光抗体の作製法（直接法）

抗 Fraction 1 抗体から  $\gamma$ -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  $-20^{\circ}\text{C}$  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、 $37^{\circ}\text{C}$  で 60 分反応させる。次に、PBS を満た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、 $10\mu \text{l}$  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で、ペスト菌であっても黄緑蛍光色は観察されない。

## 2) 菌の分離および増殖性の特徴

### (A) 平板培養における特徴

#### 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あるため、肉眼での発見は困難であることが多い。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 1~1.5 mm 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 で潰した銅貨や目玉焼きのように見える【VII. 付録-4. -2】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一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。また溶血は見られない。

#### マッコンキー寒天培地

*Yersinia* 属菌は乳糖を発酵しないので、27℃、48 時間培養では大腸菌の半分以下の直径 1~2mm 前後の半透明、灰白色の集落を形成する。*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* は扁平でスムーズな集落を形成するのに対して、*Y. pestis* は目玉焼きのような集落を形成する。尚、集落形態や分離菌の顕微鏡による形態学的特徴やペストに特異的な抗体を用いたスライド凝集試験からペスト菌を疑う場合は、分離菌に対して PCR 法、液体培養試験、フェージ感受性試験、生化学的性状試験等を行う。

#### (B) 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、綿毛様の菌塊として発育し、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。綿毛様の菌塊発育は、時には *Y. 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 *Y. pestis* は綿毛様の菌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 個又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

## 2. 抗原検出

### 1) 蛍光抗体法

(5) 検査方法-1. 病原体の分離-1) 菌の形態学的検査- (C) 蛍光抗体法にすでに記述

### 2) スライド凝集試験法

ペスト診断用抗体もしくは、抗ペスト菌全血清 (*Y. pseudotuberculosis* が全く凝集しなくなるまで希釈した抗体) を更にペスト菌と抗体が凝集する範囲で適宜に希釈してからスライド凝集反応を行う。抗体を希釈する液は 0.425% 食塩水 (ペスト菌はラフ型

なので0.85%生理食塩水では自然凝集を起こす可能性がある)を使う。尚、同様の理由から抗体の対照として置く液も0.425%食塩水を用いる。常に対照では凝集しないことを確かめてから行う。

### 3. 抗体検出

#### 1) 血球凝集試験法<sup>8)</sup>

WHOで標準化されている方法(抗原および抗原感作血球の作製方法、血球凝集反応および血球凝集阻止反応のやり方、判定基準等)で試験を行なう。

抗原:

タンニン酸で処理した2.5%血球浮遊液と25~50mg/mlの濃度に調整したFraction 1抗原を等量混ぜ、室温で15分間振盪後1,500rpmで3分間遠心して血球分画を集める。抗原液は血球で換算した場合0.5%になるように調節する。患者ペア血清を用いた血球凝集反応試験で、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、血球凝集阻止反応試験を行い決定する。ペア血清が無い場合の判定はWHOの基準に従い、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。

試薬

タンニン酸

材料

羊血液

精製 Fraction 1

生理食塩水

マイクロタイタープレート

プラスチックテープ

マイクロタイターミラー

#### 2) 定量凝集試験法

マイクロタイター上で患者血清を2倍段階希釈した後、60℃で30分間加熱処理した菌(37℃で48時間培養した菌を1mg/mlになるように調整した懸濁液)を等量加えて、良く混合後37℃で2時間反応させてから一次判定する。冷蔵庫で一夜静置後二次判定して血清の凝集価を決める。

quality controlとして、positive controlに*Y. pestis*をnegative controlに*Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*を置く。

試薬

0.425%食塩水

材料

37℃培養菌

マイクロタイター用Vプレート

#### 3) ELISA 試験法 (9)

WHO で奨励している Cavanaugh, D. D. 等の方法に準じて行う。実際使用するのは ELISAmate キット (Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc.) を用いてメーカーのプロトコールに基づいて行う。患者ペア血清を用いて 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、ELISA 阻止試験を行って判定する。患者ペア血清がない場合は 32 倍以上を陽性とする。

#### 試薬

ELISAmate キット  
Fraction 1 抗原

#### 4) ウェスタンブロット試験法

1000  $\mu\text{g}$  /ml に調整した診断用抗原 (Fraction 1) をウェル当たり 10  $\mu\text{l}$  アプライし SDS-PAGE を行う。更に、PVDF メンブレンに転写後、患者血清を用いてウェスタンブロットを行う。*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【VII. 付録-4. -4) 写真4】。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ェ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。

#### 試薬

SDS-PAGE 用試薬一式  
ウェスタンブロット用試薬一式 (判定は ECL 試薬を用いる)

#### 材料

SDS-PAGE 用ゲル  
SDS-PAGE 用、ウェスタンブロット用装置一式  
フィルム  
自動現像機

#### 4. PCR 法を用いた迅速診断<sup>10)</sup>

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。プライマーはペスト菌の莢膜抗原遺伝子 (*caf1*)、プラスミノゲン活性化遺伝子 (*pla*)、侵入性遺伝子 (*inv*) のペスト菌と仮性結核菌に共通で *Y. enterocolitica* には無い領域から 3 種のプライマーを作製した。テンプレートは加熱死菌 (蒸留水に菌を少し濁る程度に懸濁後、100°C で 10 分間沸騰させた菌) を用いた。PCR 条件は熱変性は 94°C で 30 秒、アニーリングは 55°C で 60 秒、伸長反応は 72°C で 90 秒のサイクルで 25 回行い、更に最終延長を 72°C で 10 分行った後冷蔵保存する。検出方法は 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  $\mu\text{g}$  /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 (*caf1*)、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 *Salmonella*、*Shigella*、*Escherichia* や腺ペストと類似した症状を持つ *Francisella tularensis* 等からはいずれのバンドも検出されない。

quality control として positive control に *Y. pestis*, negative control に *Y. enterocolitica*, *E. coli* 等を置く【VII. 付録 1. ペストのマルチプレックス PCR 法と, 7】付録 4. - 3】写真 3】参考。

## 5. 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* serovar 0:1b) から進化した菌ではあるが、消化管を経る感染形態をとらなくなっただけから、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。ペスト菌の主な生化学的性状を(7)付録 2. ペスト菌の生化学的性状の特徴(1)(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。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は菌の発育が遅くなるので、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、25℃ で 48 時間培養する。1 本に VP 試薬を加えて良く振り、27℃ 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

フェノールレッドブイヨンにこれらの糖を加えて 37℃で 48 時間培養後判定する。但し、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。

#### 材料

フェノールレッドブイヨン

白糖

メリビオース

ラムノース

### (B) 市販の同定キット

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) 毒力因子同定試験<sup>11)</sup>

WHO で推奨している M. J. Sugalla の方法に従って、Fraction 1、VW 抗原、Pesticin 1、および色素吸着能をもつ表在抗原の同定を行う。ペスト患者分離株はほとんど 4 種類の毒力因子が陽性であるが、中程度の病状を示したペスト患者分離株から、1～2 種類の毒力因子欠損株が見ついている。尚、他の *Yersinia* 属の病原性を持つ *pseudotuberculosis*、*enterocolitica* も VW 抗原陽性である。

#### 試薬

##### (A) Fraction 1 同定試験 (*caf1*)

8% Blood agar base

抗 Fraction 1 血清

Chloroform

##### (B) VW 抗原の同定試験 (*vw*)

Magnesium oxalate agar (Blood agar base, Na oxalate, glucose)

##### (C) Pesticin 1 同定試験 (*pst*)

Blood agar base

CaCl<sub>2</sub>

Ca-EDTA

Glucose

##### (D) 色素吸着能をもつ表在抗原の同定 (*pgm*)

Heart Infusion agar  
Galactose  
Congo-red stain

#### 材料

(A), (B), (C), (D)の同定試験ともにシャーレ

#### 4) 鑑別試験【VII.付録一 2. ー1】並びに2】およびー3.を参考】

##### (A) *Yersinia pestis* と *Yersinia pseudotuberculosis* との鑑別【VII.付録一 2. 参考】

*Y. 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-デヒドロゲナーゼ陽性、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、クロマトフォアーから色素形成能陰性等が *Y. pestis* と異なる性状である。従って、鑑別は比較的簡単である。

##### (B) *Yersinia pestis* と *Yersinia enterocolitica* との鑑別【VII. 付録一 2. 参考】

*Y. enterocolitica* は運動性陽性、ウレアーゼ陽性、ソルビトール発酵陽性、白糖発酵陽性、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、クロマトフォアーから色素形成能陰性等が *Y. pestis* と異なる性状である。従って、鑑別は比較的簡単である。

##### (C) *Yersinia pestis* と *Burkholderia pseudomallei* との鑑別【VII. 付録一 3. 参考】

ペストの染色菌に特徴とされている両端染色像は *B. pseudomallei* の特徴でもある。*B. 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、メチルレッド反応陰性、アルギニンジヒドロラーゼ陽性が *Y. pestis* と異なる性状である。

##### (D) *Yersinia pestis* と *Francisella tularensis* との鑑別

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

##### (E) *Yersinia pestis* と *Pasteurella multocida* との鑑別【VII. 付録一 3. 参考】

*P. 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、メチルレッド反応陰性、メチレンブルー還元、インドール陽性等が *Y. pestis* と異なる性状である。従って鑑別は比較的簡単である。

#### 6. 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 *Y. 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。

quality controlとして、positive controlに *Y. pestis* をnegative controlに *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica* 等を置く。

## 材料

ファージ液(松井株 : Ts-32 株)

滅菌エーゼ又は滅菌楊枝

滅菌チップおよびマイクロピペット

BHI 寒天培地

## VI. 参考文献

- 1) Prevention of plague. Centrals for Disease Control and Prevention (CDC) MMWR. 45:RR-14:1-11, 1996.
- 2) Plague manual: epidemiology, distribution and control. World Health Organization (WHO). 1-87, 1999.
- 3) Thomas, V., David, T., Donald, A., et.al.: Plague as biological weapon. JAMA. 283:2281-2290, 2000.
- 4) Thomas B. : Plague and other *Yersinia* Infections. Current topics in infectious disease. Series Editors: William B. Greenough III and Thomas C. Merigan. 1-213, Plenum Press, New York, 1983.
- 5) May, C. : Level A Laboratory procedures for identification of *Yersinia pestis*. Laboratory response network of Centrals for Disease Control and Prevention (CDC) Last revised dec. 13, 2001.
- 6) 春日忠善 : 日本のペスト流行史. 科学, 24 : 687-700, 1977.
- 7) 戸田忠雄 : 戸田新細菌学. 506-517, 南山堂, 昭和 26 年.
- 8) World Health Organization Expert Committee on plague, Fourth Report, W.H.O. Tech. Rep. Ser. 447:23-25, 1970.
- 9) Cavanaugh, D. D., Fortier, M.K., D. M., Robinson, Williams, J. E., and Rust, J.H. : Application of the ELISA technique to problems in the serological diagnosis of plague. Bull. PAHO 13:399-402, 1979.
- 10) Tsukano, H., Itoh, K., Suzuki, S., Watanabe, H. : Detection and Identification of *Yersinia pestis* by Polymerase Chain Reaction (PCR) using multiplex primers. Microbiol. Immun. 40: 773-775, 1996.
- 11) Sugalla, M.J., Beesley, E.D., and Ibizo, J.E. : Practical applications of new laboratory methods for plague investigation. Bull. WHO. 42:993-997. 1970.
- 12) Goto, S., Tsuji, A., Murai, T., Nishida, M., Tsukano, H., and Watanabe, H. : In vitro activity of twenty-three antimicrobials against *Yersinia pestis* strains. J. Infect. chemother. 1: 133-134, 1995.
- 13) Goto, S., Tsuji, A., Murai, S., Tsukano, H., and Watanabe, H. : Therapeutic effect of antimicrobial Drugs against experimental infections due to *Yersinia pestis* in mice. J. Infect. chemother. 4: 1-40, 1998.
- 14) Jefferson T. Demicheli V. and Pratt M. : Vaccines for preventing plague. Cochrane Database System Review. CD000976, 2000.
- 15) Meyer, K.F. : Effectiveness of live or killed plague vaccines in man. Bulletin World Health Organization. 43:653-666, 1970.
- 16) plague vaccine, USP, Physician's Desk Reference
- 17) Russell P., Eley S.M., Hibbs S.E., Manchee R.J., Stagg A.J. and Titball R.W. : A comparison of Plague vaccine, USP and EV76 vaccine induced protection against *Yersinia pestis* in a murine model. 13:1551-1556, 1995.
- 18) Richard W. Titball and Williamson E. Diane: Vaccination against bubonic and pneumonic plague. Vaccine. 16:4175-4184, 2001.

## VII. 付録

### 1. ペスト菌のマルチプレックス PCR 法

#### a) プライマー

gene	product size (bp)		oligonucleotide (5' to 3')	position	localization	GC content	Tm
<i>cafI</i>	171	S	CAGGAACCACTAGCACATC	221-240	60 Md	52.6	58°C
		A	CCCCACAAGGTTCTCAC	391-374	plasmid	61.1	58°C
<i>Inv</i>	295	S	TAAGGGTACTATCGCGCGGA	2255-2275	chromosome	57.2	66°C
		A	CGTGAAATTAACCGTCACACT	2549-2529		42.8	60°C
<i>pla</i>	480	S	ATCTTACTTTCCGTGAGAAG	971-990	7 Md	40.0	56°C
		A	CTGGATGTTGAGCTTCCTA	1450-1431	plasmid	45.0	58°C

#### b) テンプレートの作製

15分くらいエアレーションした安全キャビネット内で、0.22  $\mu\text{m}$  のミリポアフィルターを通し、更に 121°C で 15 分間、高圧滅菌したミリQ水を、1.5ml のエッペンドルフチューブに 100  $\mu\text{l}$  ずつ適当な数だけ分注する。更に、ディスポーザブルのエーゼで菌を僅かにかき取り、この滅菌蒸留水に入れ、懸濁する（菌量は少し濁る程度）。安全キャビネット内に置いた Multi Heater にこのエッペンドルフチューブのせ、100°C で 10 分間加熱後、すぐ冷やす。

quality control として negative control に *E. coli*、positive control に *Y. pestis*（3種のプライマーと反応する）、あるいは *Y. pseudotuberculosis* (*inv* プライマーに反応する) を置く。これら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。

#### c) 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  $\text{Mg}^{++}$  濃度の異なる Taq 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。また、市販されている Taq polymerase は読み違いの頻度や耐熱性由来、ユニット定義が異なっていたり、バンドの濃淡やエクストラバンドの出現性等異なっているので自分の系で最適な条件を確かめてから使用する。

10 検体当たりの組成 (170 $\mu\text{l}$ )	
10 × PCR 緩衝液	50 $\mu\text{l}$
25mM $\text{MgCl}_2$	30 $\mu\text{l}$
2.5mM dNTP 混液	30 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$ <i>pla</i> -S	10 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$ <i>pla</i> -A	10 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$ <i>caf</i> -S	10 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$ <i>caf</i> -A	10 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$ <i>inv</i> -S	5 $\mu\text{l}$
5 $\mu\text{M}$ <i>inv</i> -A	5 $\mu\text{l}$

滅菌蒸留水 10  $\mu$  l  
※良く混合する。

d) 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 $\mu$ l	170 $\mu$ l
Taq ポリメラーゼ	0.2 $\mu$ l (0.9unit/reaction)	2 $\mu$ l
滅菌蒸留水	30.8 $\mu$ l	308 $\mu$ l
48.0 $\mu$ l		480 $\mu$ l

良く混合後、検体名, control 名を書いた 0.2 ml のエッペンドルフチューブに 48  $\mu$  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  $\mu$  l ずつ加えてから蓋をする。

更に、-20°C でストックしておいた negative control (*E. coli*) を、更に positive controls (*Y. pseudotuberculosis*, *Y. pestis*) のテンプレートを順に 2  $\mu$  l 加えて直ぐ蓋をする。

e) PCR 条件

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

f) 電気泳動

1.5% アガロースを使用

charge volume: sample; 8  $\mu$  l

【sample 10  $\mu$  l + loading buffer (5 x) 2  $\mu$  l を混合したもの】

marker; 5  $\mu$  l

※泳動条件: 50V, 70 分

g) 染色

0.5  $\mu$  g/ml ethidium bromide 溶液で 20 分間染色後、蒸留水で 15 分間洗浄

h) 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撮り、解析する。

## 2. ペスト菌の生化学的性状の特徴

### (1) ペスト菌 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)	スクロース	- (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)
β-ガラクトシダーゼ	d (50)	マンニトール	+ (95)
エスクリン 加水分解	d (50)	ソルビトール	d (50)
炭水化物：			
α-メチル-D-グルコシド	- (0)		
サリシン	d (70)		
粘液酸	- (0)		
ブドウ糖 酸	+ (100)		
ガス	- (0)		

+：陽性、-：陰性、d：陽性または陰性、括弧内は % を示す。

※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。

しかし、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。

#### <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

(2) Some Phenotypic Differences between Wild-Type *Yersinia pestis* and Other *Yersinia* Species<sup>a</sup>

	<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 <sub>3</sub>	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	+	+

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

3. ペスト菌とペストと誤診される菌との鑑別点

	<i>Yersinia Pestis</i>	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	<i>Pasteurella multocida</i>
運動性			
22°C, 18h	-	+	
オキシダーゼ	-	+	
インドール	-		+
キシロール	+	-	
白糖	-	+	
アルギニンジヒドロラーゼ	-	+	
H <sub>2</sub> S	-		+
メチルレッド	+	-	-
メチレンブルー還元	-		+
マッコンキー培地	+		-
TSI 高層培地	+	-	

#### 4. ペスト菌の写真

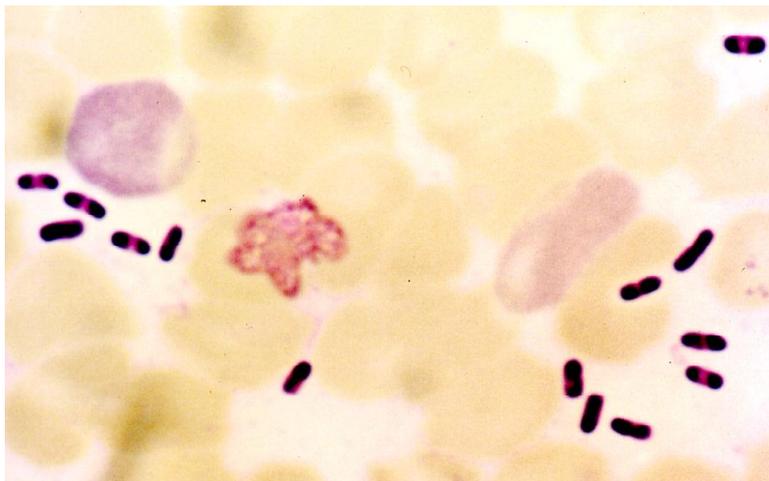


図1. ペスト菌のギムザ染色  
ペスト菌のギムザ染色（ペスト菌感染マウスの脾臓スタンプ）  
（800 x ; 安全ピン状の両端染色像が特徴的）

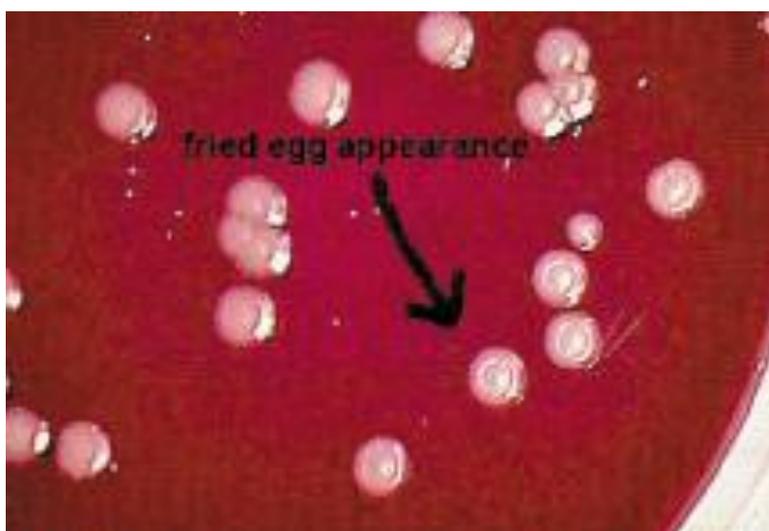


図2. ペスト菌の集落（CDC ホームページ：Plague, Lab & professionals より）  
個々の集落はやや持ち上がった中心部と辺縁が分葉形で  
波状のハンマーで潰した銅貨のように見える。（4 x）

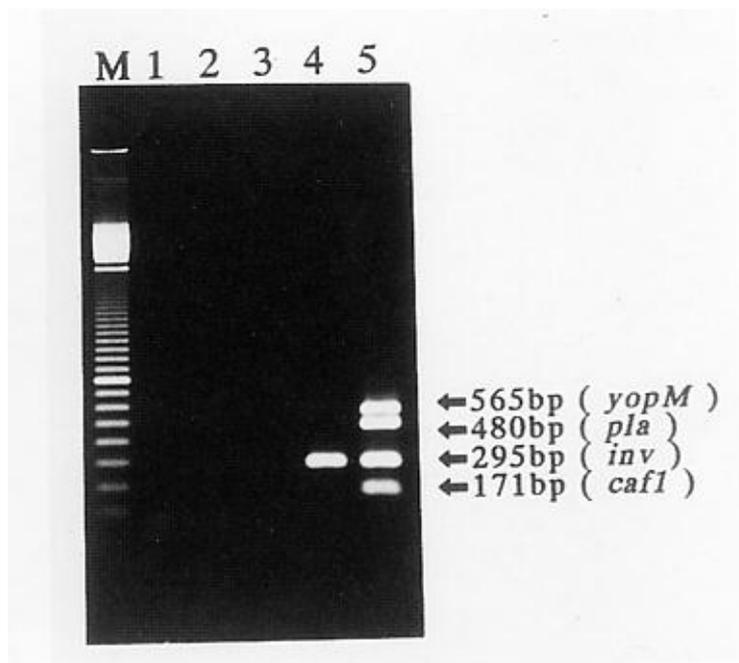


図3. マルチプレックス PCR 法によるペスト菌の検出

Lanes 1, enteropathogenic *Escherichia coli*                      2, *Salmonella typhimurium*;  
 3, *Yersinia enterocolitica*                                      4, *Yersinia pseudotuberculosis*  
 5, *Yersinia pestis*    M, DNA markers (100-bp ladder)



図4. ウェスタンブロット法によるペストの診断

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

## 5. 治療の参考 (抗菌薬) <sup>1, 2, 3, 12, 13)</sup>

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パルフロキサシンとストレプトマイシンだけである。スパルフロキサシンは、2002年3月にペストの治療にも認定された抗菌薬で、今まで、ペストに対して最も効果があるとされていたストレプトマイシンと同等またはそれ以上に高い効力が見込まれ、副作用も少なく、使い易いのが特徴である。ストレプトマイシンは、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両抗菌薬ともにまだ確立されていない。又、妊婦に対する安全性はスパロフロキサシンは確立されていないが、ストレプトマイシンは治療上の有益性が危険性を上回ると判断されたる場合にだけ投与ができる。

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。

### (A) 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。

### (B) 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。

### (C) 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。

### (D) ニューキノロン <sup>12, 13)</sup>

*in vitro*系のマウスモデルでは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すが、人の治療に使ったデータの蓄積がないため、FDA等で認可されているニューキノロン薬はない。我々のマウスモデル実験では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。

## 6. 予防の参考 (抗菌薬・ワクチン: WHOおよびCDC提唱)

### (A) 抗菌薬 <sup>1, 2, 3)</sup>

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。

### (B) ワクチン (ホルマリン処理死菌ワクチン) <sup>14, 15, 16, 17, 18)</sup>

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カ月以内と短い。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。

## 問い合わせ先

国立感染症研究所 細菌第一部 高橋英之 [hideyuki@nih.go.jp](mailto: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