

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(別添)

細菌の外部精度管理調査（コレラ菌）における輸送中の温度管理記録データについて2

細菌感染症外部精度管理調査・参加担当者 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会および研究班の活動にご協力いただきありがとうございます。

先日10月7日に、試料の輸送中の温度変化を把握するため、温度記録器の同封とデータの回収についてお願いし、データファイルの提出を、10月26日までに、お願いしておりました。ご多忙中申し訳ありませんが、追加で下記のデータを10月30日までにお知らせいただきたく、ご連絡申し上げます。

感染研からの試料発送時から、貴地衛研到着までの日時と温度について、下記の通り、お願いします。

(1) 郵便局のHPにある、個別番号検索 URL

<https://trackings.post.japanpost.jp/services/srv/search/input> にアクセスしていただき、保存してあるゆうパックのお問い合わせ番号を入力してください。

(2) 追跡記録のデータと温度記録のデータを添付ファイルに記入してください。

(3) 記入した回答ファイルを seidokanri2015@iph.pref.osaka.jp までお送りください。

以上です。ご協力感謝致します。

2015年10月23日

「外部精度管理」研究班
佐多徹太郎、磯部順子
富山県衛生研究所
toyamaeiken_do@vanilla.ocn.ne.jp

地衛研	基準	最高	最低	平均
北海道	26.5	28.5	22.1	24.5
埼玉県	26.4	28.2	25.9	27.0
富山県	26.3	28.3	23.0	25.3
大阪府	26.5	30.3	25.3	26.5

基準温度:引受郵便局到着時温度

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅
北海道	2	4.4	+5
富山県	2	3.3	-4または+4
大阪府	3.8	1.2	
埼玉県	1.8	0.5	+2

地衛研	最大温度差
北海道	6.4
富山県	5.3
大阪府	5
埼玉県	2.3

ブロック	記号	枝番号(ランダム)
北海道・東北・新潟	A	1～12
関東・甲・信・静	B	1～20
東海・北陸	C	1～7
近畿	D	1～13
中国・四国	E	1～11
九州	F	1～11

表5 本調査での輸送中温度変化概要(10月1日発送分)

地衛研	基準	最高	最低	平均	機関到着	開封
北海道	25.7	25.7	16.8	21.3	16.8	17.8
札幌市	25.9	25.9	16.8	ND	17.2	17.2
函館市*	25.7	26.6	16.2	24.2	18.4	18.5
青森県	25.6	25.6	17.9	22.3	22.1	約22.3
秋田県	25.6	25.6	18.4	21.6	20.1	20.1
岩手県	ND	20.2	15.9	19.4	16.05	16.0
宮城県	25.9	25.9	13.1	21.0	18.6	19.0
仙台市	約25.4	26.3	16.9	24.5	約19.4	約21.6
山形県	ND	ND	ND	ND	ND	20.1
福島県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
新潟県	25.9	26.1	21.6	24.6	25.4	25.4
新潟市**	24.93	25.11	20.34	24.05	24.8	24.8
茨城県	24.4	26.5	22.0	24.0	23.6	23.6
栃木県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
宇都宮市	25.6	25.6	20.3	23.3	21.5	22.9
埼玉県	22.4	28.5	19.4	24.2	21.8	24.7
さいたま市	25.7	25.7	14.4	20.0	23.2	23.2
千葉市	25.4	?	?	?	23.3	23.5 or 23.9
東京都	26.0	26.9	20.3	23.7	21.8	22.5
足立区	25.6	26.5	19.8	25.3	20.5	21.8
杉並区	25.5	26.5	20.0	23.284	20.0	20.0
神奈川県	23.7	25.9	20.0	24.2	22.9	23.1
横浜市	25.8	26.2	22.0	23.65	25.3	26.2
川崎市**	ND	ND	ND	ND	ND	ND
相模原市	約25.4	25.5	20.4	23.4	ND	23.3
山梨県	25.8	25.8	23.0	24.4	23.4	24.3
長野県	25.2	25.2	18.4	21.6	20.4	20.5
長野市	25.3	27.6	18.1	23.2	21.4	25.2
静岡市	26.0	28.0	22.0	25.2	23.5	26.0
浜松市	ND	ND	ND	ND	ND	24.4
富山県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
石川県	25.6	26.4	21.4	23.7	24.4	23.5
福井県	25.8	25.9	20.8	24.3	21.2	23.6
愛知県	25.0	25.5	20.5	23.9	23.5	23.5
名古屋市	ND	27.3	24.3	26.2	24.7	25.1
岐阜県	25.3	25.5	20.6	23.3	22.8	23.2
岐阜市	25.6	26.7	18.9	25.1	22.9	23.3
沖縄県***	24	29.0	5.5	24.5	29	25.0

基準温度: 引受郵便局到着時温度

ND: データ無し

?: データが読み取れず

* 到着後10℃以下(冷蔵庫内)で保存(検査日10/5)

** 到着後4℃で保存(検査日10/5)

*** 日通航空利用

岩手県: 到着後25℃で保存(検査日10/6)

仙台市: 到着後室温で保存(検査日10/5)

山形県: 到着後室温で保存(検査日10/6)

茨城県: 到着後NDで保存(検査日10/5)

仙台市: 到着後25℃(室温)で保存(検査日10/5)

岐阜市: 到着後24℃で保存(検査日10/6)

沖縄県: 到着後25℃で保存(検査日10/5)

表6 本調査での輸送中温度変化概要(10月2日発送分)

地衛研	基準	最高	最低	平均	機関到着	開封
群馬県*	26.1	26.1	17.3	22.9	17.3	19.0
静岡県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
滋賀県	25.6	27.8	18.6	22.7	23.4	24.4
京都市	25.9	27.3	20.2	24.9	24.2	24.4
大阪府	ND	25.1	22.2	23.5	ND	ND
大阪市	ND	?	?	?	21.8	21.8
堺市	ND	28.2	8.4	23.5	約23.7	21.0
東大阪市	25.9	26.8	20.5	25.3	24.8	25.4
兵庫県	25.8	29.1	18.1	25.1	21.5	21.5
神戸市**	ND	26.5	25.7	26.1	ND	26.5
姫路市	25.5	25.5	21.6	24.3	24.8	24.4
尼崎市	ND	ND	ND	ND	ND	ND
奈良県	25.8	27.4	18.1	23.5	21.2	26.1
和歌山県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
和歌山市	25.9	27.4	16.9	24.6	25.8	24.7
鳥取県***	25.9	30.8	17.0	24.3	23.8	23.8
島根県	25.9	27.9	16.5	25.0	22.7	23.3
岡山県	25.4	26.5	18.2	23.9	22.1	22.2
岡山市	25~28	28.0	17.2	23.7	約23	約23
広島県	25.4	26.9	17.3	24.3	23.1	22.3
広島市	25.7	28.7	16.1	25.0	18.6	19.1
山口県	25.3	26.3	15.0	21.3	21.1	21.1
徳島県	25.6	?	?	25.3	24.2	25.6
香川県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
愛媛県	25.7	27.2	19.5	23.3	24.2	24.3
高知県	ND	ND	ND	ND	ND	23.5
福岡県	25.5	26.6	17.9	21.1	21.5	24.9
福岡市	25.5	27.0	17.6	24.0	21.0	22.6
北九州市****	25.8	28.4	18.2	23.9	22.7	22.6
佐賀県	25.6	29.6	17.9	25.0	24.0	24.2
長崎県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分県	25.6	29.5	16.4	24.8	23.1	25.5
熊本県	25.8	28.0	17.8	22.4	24.3	23.9
熊本市	25.8	27.0	18.2	24.0	24.3	25.2
宮崎県	25.6	27.1	17.7	24.0	26.0	25.3
鹿児島県****	ND	ND	ND	ND	ND	ND

基準温度:引受郵便局到着時温度

ND:データ無し

?:データが読み取れず

* 到着後4°Cで保存(検査日10/14)

** 到着後7°Cで保存(検査日10/5)

*** 到着後4°Cで保存(検査日10/7)

**** 到着後4°Cで保存(検査日10/5)

静岡県:到着後NDで保存(検査日10/21)

大阪市:到着後25.3°Cで保存(検査日10/7)

東大阪市:到着後20°Cで保存(検査日10/6)

尼崎市:到着後常温で保存(検査日10/6)

広島市:到着後25°Cで保存(検査日10/6)

山口県:到着後25°Cで保存(検査日10/6)

表7 本調査での輸送中温度変化(基準との比較)

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅
沖縄県	5.0	18.5	-19
宮城県	0.0	12.8	-13
さいたま市	0.0	11.3	-12
山口県	1.0	10.3	-11
大分県	3.9	9.2	-10
広島市	3.0	9.6	
島根県	2.0	9.4	
函館市*	0.9	9.5	
札幌市	0.0	9.1	-9
和歌山市	1.5	9	
鳥取県**	4.9	8.9	
広島県	1.5	8.1	
仙台市	0.9	8.5	
北海道	0.0	8.9	
群馬県***	0.0	8.8	-8~-11
岡山市	3~0	7.8~10.8	
佐賀県	4.0	7.7	
兵庫県	3.3	7.7	
熊本県	2.2	8.0	-8
北九州市****	2.6	7.6	
長野市	2.3	7.2	
福岡市	1.5	7.9	
宮崎県	1.5	7.9	
奈良県	1.6	7.7	
熊本市	1.2	7.6	
福岡県	1.1	7.6	
岡山県	1.1	7.2	
青森県	0.0	7.7	
秋田県	0.0	7.2	
滋賀県	2.2	7.0	
埼玉県	6.1	3.0	
愛媛県	2.0	6.2	
岐阜市	1.1	6.7	
長野県	0.0	6.8	

* 保存中振れ幅 -16: 検査日10/5

** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7

*** 保存中振れ幅 -23: 検査日10/14

**** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅 ±
京都市	1.4	5.6	-6
足立区	0.9	5.8	
東京都	0.9	5.7	
杉並区	1.0	5.5	
東大阪市	0.9	5.4	
宇都宮市	0.0	5.3	
相模原市	0.1	5.0	-5
福井県	0.1	5.0	
岐阜県	0.2	4.7	
愛知県	0.5	4.5	
石川県	0.8	4.2	
新潟市*****	0.18	4.59	
新潟県	0.2	4.3	-4
静岡市	2.0	4.0	
神奈川県	2.2	3.7	
横浜市	0.4	3.8	
姫路市	0.0	3.9	±3または-3
茨城県	2.1	2.4	
山梨県	0.0	2.8	ND
岩手県	ND	ND	
山形県	ND	ND	
福島県	ND	ND	
栃木県	ND	ND	
千葉市	ND	ND	
川崎市	ND	ND	
浜松市	ND	ND	
富山県	ND	ND	
名古屋市	ND	ND	
静岡県	ND	ND	
大阪府	ND	ND	
大阪市	ND	ND	
堺市	ND	ND	
神戸市	ND	ND	
尼崎市	ND	ND	
和歌山県	ND	ND	
徳島県	ND	ND	
香川県	ND	ND	
高知県	ND	ND	
長崎県	ND	ND	
鹿児島県	ND	ND	

***** 保存中振れ幅 -21: 検査日10/5

ND: データ無し

表8 本調査での輸送中温度変化(最大温度差)

地衛研	最大温度差
沖縄県	23.5
鳥取県*	13.8
大分県	13.1
宮城県	12.8
広島市	12.6
佐賀県	11.7
島根県	11.4
さいたま市	11.3
山口県	
兵庫県	11.0
岡山市	10.8~13.8
和歌山市	10.5
函館市**	10.4
熊本県	10.2
北九州市***	
広島県	9.6
長野市	9.5
仙台市	9.4
福岡市	
宮崎県	
奈良県	9.3
滋賀県	9.2
札幌市	9.1
埼玉県	
北海道	8.9
群馬県****	8.8
熊本市	
福岡県	8.7
岡山県	8.3
愛媛県	8.2
岐阜市	7.8
青森県	7.7
秋田県	7.2
京都市	7.0
長野県	6.8
足立区	6.7

* 保存中26.8(検査日10/7)

** 保存中16.6(検査日10/5)

*** 保存中24.4(検査日10/7)

**** 保存中22.1(検査日10/14)

地衛研	最大温度差
東京都	6.6
杉並区	6.5
東大阪市	6.3
静岡市	6.0
神奈川県	5.9
宇都宮市	5.3
相模原市	5.1
福井県	
愛知県	5.0
石川県	
岐阜県	4.9
新潟市*****	4.77
新潟県	4.5
茨城県	
横浜市	4.2
姫路市	3.9
山梨県	2.8
岩手県	ND
山形県	
福島県	
栃木県	
千葉市	
川崎市	
浜松市	
富山県	
名古屋市	
静岡県	
大阪府	
大阪市	
堺市	
神戸市	
尼崎市	
和歌山県	
徳島県	
香川県	
高知県	
長崎県	
鹿児島県	

***** 保存中21.11(検査日10/5)

ND: データ無し

6. 全国の地方衛生研究所を対象にしたコレラ菌検査の外部精度管理調査

研究協力者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
	森本 洋、清水 俊一	北海道立衛生研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
	太田 嘉	横浜市衛生研究所
	磯部 順子、佐多 徹太郎	富山県衛生研究所
	望月 利洋	兵庫県立健康生活科学研究所
	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
	荒川 英二、緒方 喜久代、大西 真	国立感染症研究所
研究分担者	山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所
	岡野 素彦	北海道立衛生研究所

研究要旨 地方衛生研究所（地衛研）で実施する細菌検査の信頼性確保のため、外部精度管理調査を実施し、検査能力の実態を把握するとともに、継続的な実施に必要な手順や問題点を検証した。実施項目は「三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定」とし、74施設の参加を得た。検査試料は国立感染症研究所（感染研）の保存株から、事前に4箇所の地衛研で性状を確認した上で3株（試料1: *Vibrio cholerae* O1 稲葉型 コレラ毒素（CT）陽性、試料2: *V. cholerae* O1 小川型 CT陰性、試料3: *V. cholerae* O139 CT陽性）を選び、感染研から発送した。検査報告書の集計の結果、正答は試料1: 72施設、試料2: 66施設、試料3: 74施設で、試料2では正しい同定結果（O1抗原陽性、CTまたはCT遺伝子陰性）であったが「コレラ菌陽性」と判定した施設が7施設あった。検査経過記録書や事後アンケートから、全体として地衛研では概ね適切にコレラ菌検査が実施されていることがわかった。特に、届出基準のひとつであるCT産生あるいはCT遺伝子の確認については、74施設で一致した結果が得られていた。試料1および2ではO1抗原陰性と判定した施設が3箇所あり、原因については、使用した免疫血清やラテックスの劣化、凝集反応に供した菌株が不適切（ラフ型）等の要因が考えられた。血清凝集反応で判定不能の場合、特にCT産生あるいはCT遺伝子陽性の場合には、PCR法によるO1抗原あるいはO139抗原の確認を実施すべきであると考えられた。大規模な外部精度管理調査を実施するにあたって、配付株の選定には検体の保存条件を考慮する必要がある。また、検査経過記録書やアンケート等については、多様な回答を想定し記入しやすい様式を作成することが課題である。参加施設から提出される各種文書のとりまとめには、集計に至るまでの事務作業に相当の時間が必要であり、未記入や記載ミスと考えられる回答を提出元に確認するなど、実施結果の集計や解析には専従の担当者をおくことが望ましい。

A. 研究目的

地方衛生研究所（地衛研）で実施する細菌検査の信頼性確保に向けて、外部精度管理を実施して地衛研の検査能力の実態を把握するとともに、外部精度管理を大規模に実施するにあたって必要な手順や問題点を検証した。

B. 研究方法

1. 実施項目

昨年度実施したアンケートの結果、多くの地衛研が三類感染症の検査を実施していた。防疫対象となるコレラ菌の決定は地衛研における検査によって行うと明記されていることから（昭和 63 年 9 月 28 日健医発第 1133 号）、実施項目を「三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定」とした。

2. 実施組織

4 箇所の地衛研と国立感染症研究所（感染研）の研究協力者からなるワーキンググループ（細菌 WG）を立ち上げ、配付株の選定、実施計画の立案、検査結果やアンケートの集計などの実務を担った。細菌 WG で検討した内容や文書は細菌小班に諮った上で関係者に送付した。検査試料（検体）の準備と発送は、感染研が担当した。

3. 配付株の選定と輸送

配付する試験菌株は、典型的なコレラ菌株（血清群 O1）、コレラ菌と類似しているがコレラ毒素（CT）遺伝子を保有せずコレラ菌と同定できない株、血清群 O1 以外で重要となる血清群 O139 の株で CT 産生株の各 1 株ずつとすることが細菌 WG で決定された。

菌株選定のための確認項目として、O 血清群および血清型決定性状、CT 産生性の 2 項目に加え、*Vibrio cholerae* の同定の鍵となる性状：Vibrio 選択培地での増殖、白糖の分解、リジン脱炭酸試験陽性、無塩ブイヨンでの発育の 4 項目を挙げた。これらの性状が明瞭であること、特に選択培地での発育の悪い（遅い）ものや、コロニー形態が異常なもの、VP 試験（*V. cholerae* の生物型を決める重要な性状）の性状に基づいて保存株のなかから 17 の候補株を選抜した。この中から最も典型的と考

えられた 8 株を細菌 WG メンバー（北海道衛研、埼玉県衛研、富山県衛研、大阪府公衛研）にプレチェックのために送付した。

感染研の病原体等の分与等に関する取扱い要領に則り、研究・検査依頼として取扱様式 8「特定病原体等分与（譲渡）申請書」を整えた（感染研__資料 1）。取扱様式 8 に添付する送付先リストを作成し、各参加施設からの参加申込書および誓約書（別添 1 別紙 3）を添付することとした。

病原体輸送に関する手続きを国立感染症研究所バイオセーフティ管理室と協議し、輸送容器の事前確認、「国立感染症研究所での病原体等輸送に関わるチェックシート輸送分類”カテゴリ-A”」の簡易版作成（感染研__資料 2）を行った。搬送用容器は事前に参加施設に配付した資料「菌株搬送容器の準備」（別添 1 別紙 1）および「菌株搬送容器発送チェックシート」（別添 1 別紙 2）に基づいて参加施設で用意され、地域別に指定された期日（9 月 24 日、9 月 25 日、9 月 28 日）に感染研に集められた。搬送容器は、9 月 29 日、9 月 30 日の 2 日間でバイオセーフティ管理室員立会いのもと事前確認を行い、必要な表示等を確認し、感染研の規定に沿っていない搬送容器に関しては規定に沿うように手直しをした。

3 種の試料は 9 月 30 日、10 月 1 日に輸送用培地に接種し、3 種 1 セットを 2 次容器に入れ密封したのち、培養を開始した。それぞれ 10 月 1 日、2 日に 3 次容器におさめ、バイオセーフティ管理室員とともにチェックシートをもとに確認作業を行いながら適切に搬送準備が整えられていることを確認した。

4. 実施スケジュール（表 1）

実施案内に先立ち、コレラ菌検査・診断マニュアル（マニュアル）を作成して、感染研ホームページに掲載した（7 月 1 日付け、9 月 1 日に修正版掲載）。実施時期は 10 月とし、8 月 17 日に地衛研代表メーリングリストを使って実施案内を送付した（別添 1）。参加にあたっては、規定に沿った菌株搬送容器と温度管理のためのロガーを準備して指定日に感染研へ送付することとし、四種病

原体に関する各種基準（厚生労働省令）を遵守するよう誓約を求めた。検体の発送は、1施設は航空便で10月2日に、他はゆうパックで10月5日に到着するよう指定した。検体受領後はすみやかに検査を実施し、10月26日までに検査結果報告書および検査経過記録書を提出するよう依頼した（別添2）。また、検査手順書を作成して送付したが、異なる方法を実施した場合は各施設の手順書の添付を依頼した。

5. 事後アンケート

検査結果報告書および検査経過記録書の集計結果を参考に、A. 使用した培地や試薬の準備状況、B. 詳細な検査手順や内容、C. 赤痢菌検査の実施状況について事後アンケートを作成し、参加施設へ回答を依頼した（別添4）。C. 赤痢菌検査の実施状況については、磯部らの分担報告書にまとめた。

6. 感染症検査体制アンケート

感染症法の改正に伴い、感染症検査においても業務管理体制が求められることから、内部精度管理の現状を把握するためのアンケートを実施した（別添6）

（倫理面への配慮）

本研究で使用したコレラ菌については、すでに患者情報が連結不可能匿名化されており、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針の対象とされない。

C. 研究結果

1. 配付株の選定と輸送

感染研で選択した8株について4施設の細菌WGメンバーが実施した検査の結果をもとに、3株を試験株として選択した。3株は試料1: *V. cholera* O1 稲葉型 CT 陽性株、試料2: *V. cholera* O1 小川型 CT 陰性株、試料3: *V. cholera* O139 CT 陽性株とした。

取扱様式8「特定病原体等分与（譲渡）申請書」はゆうパックを利用した73施設を1枚に集約すること、参加施設の誓約書を添付することで、通常求められる「フロア図・ラボ配置図」は添付しないこととした。航空便で送付する1施設に関す

る取扱様式8と合わせて、感染研総務部調整課研究支援係に提出した。

2. 参加施設

9月4日までに74施設から「参加申込書及び誓約書」が提出された。内訳は、都道府県44施設、指定都市20施設、中核市など10施設であった。

3. 同定結果の提出

10月31日までに、全施設から依頼の様式で検査結果報告書および検査経過記録書が提出された。5施設は検査のフロー図や自施設の手順書を添付していた。

4. 検査結果報告書のまとめ

正答は試料1で72施設、試料2で66施設、試料3で74施設であった（表1）。試料1で正答でなかった2施設は、ともにCT遺伝子陽性であったが、O1抗原およびO139抗原が陰性であった。試料2では、正しい同定結果（O1抗原陽性、CTまたはCT遺伝子陰性）であったが「コレラ菌陽性」と判定した施設が7施設あった。また、1施設はO1抗原陰性であった。

5. 検査経過記録書のまとめ

検査担当者情報として、24施設は1名、23施設は2名、27施設は3名を記載しており、合計151名の担当と検査経験を表3aにまとめた。コレラ菌検査および細菌検査の経験年数については、記載欄にトレーニングも含むと注釈をつけたが、約3割がコレラ菌検査の経験なしと回答していた。

検体は、航空便で発送した1施設を含む73施設には指定日どおりに届いたが、ゆうパックで発送した1施設で指定日より早く10月2日に届いていた。検体の状況は72施設では良好であったが、2施設で一部不良とされ、「四次容器の蓋の留め金がコードバンド等で結束されていなかった」「チューブが二次容器内に横倒しの状態で入れられており、3本中2本のチューブのフタの内側に凝固水がついていた（チューブ外への漏れはなかった）」との記載があった。検体到着日に検査を開始した施設は61か所で、1週間以上保管後に開始した施設が2か所みられた（表3b）。保管期間の長短はあるが、17施設で検体を冷蔵庫に保管

していた。

送付試料が純培養であることの確認は、1～5種類の培地を使用して全施設で実施されていた。検査手順書で例示した食塩加普通寒天（NA）培地が最も多く44施設で使われていたが、22施設ではTCBSなど選択分離培地のみを記載していた（表3c）。検査に使用した選択分離培地は、全施設でTCBSが使われており、クロモアガーVibrioやビブリオ寒天などを併用した施設も43か所あった。釣菌したコロニー数の記載は1～16個であったが、記載様式の不備で平板あたりか検体あたりかの区別がつかなかった。

分離菌性状検査について、主な検査項目と使用培地を表3dにまとめた。オキシダーゼ試験は市販品（ろ紙またはディスク）を使用して全施設で実施されていた。その他に、ブドウ糖からのガス産生、マンニト、アルギニン、オルニチン、簡易同定キットを用いた性状検査のほか、O/129ディスク感受性、ポリミキシンB感受性、ヒツジ赤血球溶血性などが実施されていた。

血清凝集反応は、コレラ菌免疫血清（免疫血清、デンカ生研）とビブリオコレラ免疫血清O139“Bengal”（O139血清、デンカ生研）を使用した施設が45施設、これにコレラ菌AD（ラテックス、デンカ生研）を併用した施設が26施設、ラテックスとO139血清を使用した施設が3施設あった。

CTの検査には、71施設でPCR法によるCT遺伝子検査が、35施設でRPLA法によるCT産生性試験が行われていた。PCRプライマーは、マニュアルに記載されたプライマーが46施設、市販プライマーが23施設、小林らのプライマーが4施設、自施設のプライマーが1施設で使用されており、3施設は2種類のプライマーを併用していた。

その他の遺伝子検査として、マニュアルに記載の*V. cholerae*同定のためのPCR (housekeeping gene である *atpA* 遺伝子を標的としている) を実施した施設は33施設あった。また49施設では、PCR法によるO1抗原、O139抗原の確認を実施していた。

遺伝子検査に使用した機器類の記載欄には、遺

伝子増幅装置は63施設で記入があり、Applied Biosystems (32施設)、Takara (13施設)、BIO-RAD (11施設) の製品が多く使われていた。リアルタイムPCR法は3施設で実施されていた。電気泳動装置は57施設で記入があり、さまざまなタイプのMupidが41施設で最も多く、E-gelが6施設、その他のアガロース電気泳動装置が4施設、自動解析装置が5施設で使用されていた。

6. 事後アンケートのまとめ

事後アンケートは、12月28日までに70施設の協力が得られた。

今回の精度管理調査で使用した培地や試薬について、日常からの準備状況を尋ねた（表4）。多くの地衛研で、選択分離培地ではTCBS、性状確認培地ではVP試験や耐塩性試験、オキシダーゼ試験、血清凝集反応用の免疫血清やO139血清、CT遺伝子検査用のプライマーを日常検査で使用していた。精度管理用に、マニュアルに記載された各種プライマーを準備した施設もあった。培地や試薬について、自由記載欄に12件の意見が寄せられた。

実際の検査手順や検査内容についてのアンケート結果を表5にまとめた。

安全キャビネットは、試料の開封や培地への接種、テンプレート作製に使用した施設が多かったが、30施設では使用していなかった（表5a）。

O1抗原の型別について、検査内容の詳細を集計した（表5b）。試料1は、免疫血清で稲葉型と判定した施設が64施設あり、56施設は生菌で、8施設は加熱死菌で判定していた。このうち35施設はラテックスも実施しており、28施設では稲葉型と判定されたが7施設は判定不能であった。2施設は免疫血清、ラテックスともに彦島型と判定していた。血清凝集反応でO1抗原陽性と判定できなかった施設が4施設あり、このうち2施設はPCR法でO1抗原陽性と判定したが、2施設はPCR法未実施で「O1抗原陰性」と報告していた。試料2は、免疫血清またはラテックスにより69施設で小川型と判定された。免疫血清の判定は、56施設は生菌で、12施設は加熱死菌で行われていた。

免疫血清で小川型と判定されたもののラテックスでは判定不能となった施設は 2 施設あった。1 施設は、免疫血清、ラテックスともに判定不能であった。なお、血清凝集反応で彦島型あるいは判定不能と判定した施設には試料の再送付を含めて再検査を依頼し、5 施設から生菌を用いた凝集反応で良好な結果を得たと報告された。

試料 1 および 2 について生物型別を実施した施設は 31 施設 (44.3%) で、29 施設でどちらもエルトール型と判定されていた (表 5c)。判定の根拠となった試験項目は、ヘモリシン遺伝子の鑑別が 24 施設と最も多く、ついで VP 試験が 14 施設であった。ファージ感受性試験を実施した施設はなかった。VP 試験やニワトリ赤血球凝集性を実施したが判定不能となった施設が 2 施設あった。

RPLA 法で CT 産生性試験を実施した施設に毒素産生の培地を尋ねたところ、CAYE 培地または CAYE-L 培地が最も多く 16 施設で使用されていた。寒天培地発育菌から実施した施設もみられた。

検査項目ごとに、陽性対照および陰性対照の使用状況を質問した (表 5d)。コロニー観察や生化学的性状試験、血清凝集反応で対照を使用した施設は少なかった。コレラ菌免疫血清では、10 施設が陰性対照に生理食塩水を使用したと回答していた。PCR 法では 74.3~89.4%の施設で対照を使用しており、陽性対照は *V. cholerae* O1 または O139 の CT 陽性株あるいはその DNA 抽出液が、陰性対照には滅菌水が多く使用されていた。コレラ菌 AD、市販の CT 遺伝子検出用プライマー、RPLA 法による CT 産生性試験では、試薬に添付の対照が使用されていた。

コレラ菌の判定を行政に報告する場合に必要と考えられる検査項目については、陽性判定の場合は 48 とおり、陰性判定は未記入の 1 施設を除いて 49 とおりの回答があった。陽性判定には、血清凝集反応、CT 遺伝子の確認、TCBS でのコロニー観察をあげる施設が多く、陰性判定でも同様であった (表 5f)。一方で、陽性判定に血清凝集反応または PCR による O1 抗原、O139 抗原の確認

のどちらも選択しなかった施設が 2 施設、CT 遺伝子の確認または CT 産生性の確認を選択しなかった施設が 1 施設みられた。

コレラ菌の保存培地については、67 施設から回答があり、このうち 17 施設では複数の方法で保存していた。保存培地は、スキムミルクまたはマイクロバンクで凍結保存、あるいはカジトン培地で室温保存がよく使われていた (表 5g)。

自由記載欄には、血清凝集反応や耐塩性試験などで判定に迷った点などが記載されていた。マニュアルや培地等への質問には、個別に回答した (表 5h)。特に PCR 法については、使用する Taq polymerase によって増幅条件が異なる場合があり、マニュアルの改訂を予定している。

7. 感染症検査体制アンケートの結果 (別添 6)

検査に関する部門責任者など、多くの機関で体制は整っていないかった。安全キャビネットは 1 機関を除き設置されていたが、その使用方法は菌株によると回答したところが多かった。微量分注器などの校正については、半数以上で実施されておらず、予算がないことがその理由であった。フランシスなどの機器類は、日常点検は概ね実施されていたが、その結果を記録している機関は 10~30% 程度であった。培地については、使用時に記載する機関が多かった。また、陽性コントロールは遺伝子検査ではほぼ用いられていたが、培養検査では用いられていない状況であった。機器類の管理、試薬の管理等、食品 GLP と重なる部分についてはよく実施されている傾向であった。改正感染症法が施行される平成 28 年 4 月以降、これらの検査体制がどのように変化するのか調査し、その結果を共有すべきであると思われる。

D. 考察

コレラの届出には、*V. cholerae* の分離・同定に加えて、O1 または O139 抗原の検出および CT 産生または CT 遺伝子の確認が必須である。今回の外部精度管理調査により、コレラの原因となるコレラ菌の検査について、地衛研では概ね適切に実施されていることがわかった。

特に CT 産生あるいは CT 遺伝子の確認については、74 施設で一致した結果が得られていた。CT の検出に使用された VET-RPLA (デンカ生研) の添付文書には、コレラ菌毒素産生培地として Syncase 培地 (Finkelstein, 1966) が記載されているが、RPLA 法を実施した約半数の施設では CAYE 培地や CAYE-L 培地を使用しており、AKI 培地も使用されていた。これは、エルトール型のコレラ菌は Syncase 培地では毒素産生能が低いとの報告 (Iwanaga, 1985、松本, 1991) によるものと推察される。毒素産生用に工夫されていない一般的な培地を使用した施設でも CT 産生性が確認されており、今回送付した検体の判定については、培地による影響は少ないと推察された。PCR 法においても、少なくとも 4 種類の CT 遺伝子検出用プライマーが使われていたが判定は一致しており、CT の判定に関わる検査に問題はないと考えられた。

O1 抗原の検出については、一部の施設で陰性となった。コレラ菌の O1 抗原は抗原因子 (A, B, C) の有無によって小川型 (AB(C))、稲葉型 (AC)、彦島型 (ABC) に区別される。免疫血清の添付書類には、混合血清に凝集した場合、小川型、稲葉型の単味血清で型別し、単味血清に凝集しない場合は判定保留とすること、生菌で凝集陰性の場合には加熱死菌で再試験することが記載されている。また、ラテックスの添付文書によると、感作ラテックス a および b が陽性の場合を小川型、a および c が陽性の場合を稲葉型、すべて陽性の場合を彦島型と判定し、対照ラテックスに凝集した場合は非特異凝集となる。試料 1 は稲葉型、試料 2 は小川型の株を送付したが、事後アンケートの集計から血清凝集反応で 2 株とも正しく型別されたのは、70 施設中 63 施設であった。試料 2 は、1 施設で判定不能であったが、CT 遺伝子陰性であったため精査の必要がないと判断されていた。試料 1 では、2 施設で彦島型、4 施設で判定不能と判定されたが、この 6 施設は試料 2 では小川型と正しく型別できていた。免疫血清で稲葉型と判定できたがラテックスでは判定不能となった施設も 7 施

設あり、自由記載欄に感作ラテックス b に遅れて凝集したため判定に迷ったと記載した施設もみられた。「稲葉型」と判定されなかった原因については、使用した免疫血清やラテックスの劣化、凝集反応に供した菌株が不適切 (ラフ型) 等の要因が考えられたが、同じロットの免疫血清であっても、混合血清や小川型単味血清に比べ稲葉型単味血清は凝集が弱い可能性も推察された。また、1 施設は検査開始まで検体を冷蔵庫に保管していたが、検査結果への影響は判断できなかった (詳細は森本らの分担報告書)。

届出に小川型、稲葉型の型別は必要ないが、免疫血清では単味血清に凝集しない場合は判定保留となり、届出基準を満たすことができない。本調査では、49 施設が PCR 法による O1 抗原および O139 抗原の確認を実施しており、試料 1 では血清凝集反応で判定陰性の 2 施設も PCR 法により O1 抗原陽性と報告していた。免疫血清やラテックスについては使用期限内のものを常備するのは困難との意見も寄せられており、血清凝集反応で判定不能の場合、特に CT あるいは CT 遺伝子陽性の場合には、PCR 法を実施すべきであると考えられた。

本調査は、医療機関や検査機関で分離されたコレラ菌疑い株の検査を想定して実施したが、分離株として搬入された場合、純培養であるかどうかの確認は必須である。検査経過記録書によると全施設で純培養の確認が実施されていたが、選択分離培地のみを記載した施設があったが、コレラ菌の選択分離培地は、塩類の含有量が多く pH が高い (pH 8.4~9.0) ことから、*Vibrio* 属菌以外のほとんどの菌は発育が抑制される。したがって、純培養の確認には非選択培地の使用が望ましい。また、*Vibrio* 属菌の鑑別性状である耐塩性試験において、*V. cholerae* は食塩濃度 0%での発育確認が必須であり、本調査では多くの施設で 0~10%の 3~6 段階の濃度で実施していた。0%で発育陰性であった場合に接種ミスを否定するためにも、0%に加えて少なくとも 1%または 3%を実施する方が良いと考えられた。

配付株の選定にあたっては VP 試験の性状も確認項目とし、陽性株を送付したが、試料 1 および 2 について生物型別を実施した 31 施設のうち、2 施設で判定不能であった。また、エルトール型と判定できた施設でも、陽性判定まで時間がかかったと記載した施設があった。いずれの施設も、市販 VP 半流動培地が使用されていたが、培地の食塩濃度については回答を求めておらず不明である。前述のように、コレラ菌は食塩濃度 0% で発育可能であるが、生化学的性状試験では食塩濃度 1~2% が望ましい。市販生培地を使用する場合は、高濃度の滅菌食塩水を加えるとよい。

行政への報告に必要な検査項目について、わずかではあるが O1 抗原および O139 抗原の検出や CT 産生または CT 遺伝子の確認をあげない施設があった。質問の意図が正しく伝わらなかった可能性もあるが、本調査担当者の約 3 割にコレラ菌検査の経験がなかったことから、地衛研職員が参加する研修等の機会に、コレラの届出基準や「コレラ菌検査・診断マニュアル」を周知する必要がある。

対照（株）の使用状況について、PCR 法では陽性対照、陰性対照の使用率が高かったものの 100% ではなかった。血清型別においても、使用している免疫血清やラテックスの内部精度管理に对照株が必要である。陽性対照株の入手が困難との意見もあり、コレラ菌だけでなく「病原体等検査の業務管理要領」が適用される範囲については、国立保健医療科学院の細菌研修等を通して提供してもらうよう国に要望すべきである。その際、適切な菌株保存方法についても指定していただきたい。コレラ菌の保存方法についての回答から、同じ保存培地であっても保存温度や保存期間は施設によって異なっていた。保存設備の有無など施設によって事情は異なるが、できる範囲で最適な方法が望まれる。

本研究班で地衛研の 9 割以上が参加する大規模な外部精度管理調査を実施することができ、今後の参考となる反省点が明らかになった。まず、配布株の選定にあたっては、検体の保存条件を考慮

したプレチェックが必要であった。検体の発送に関しては、地衛研から表示などの体裁を整えた菌株搬送容器を送ることで発送元の負担を軽減し、少なくとも感染研細菌第一部からの発送は可能であることが検証できた。参加施設から提出された各種文書のとりまとめに関しては、送信された添付ファイル名の重複や異なるファイル形式での提出、未提出施設の確認と督促などに対応が必要であり、集計に至るまでの事務作業にある程度時間を要した。また、検査経過記録書や事後アンケートは様式を統一したが、施設によっては回答にふさわしい選択肢のない場合があり、未記入や記載ミスと考えられる回答もみられた。多様な回答を想定し、記入しやすい様式を作成することは今後の課題であるが、受領直後に内容を確認して不明な点を提出元に問い合わせるなど、集計と解析を担当する専従者の必要性を感じた。

参加施設のご協力に感謝するとともに、本調査結果が検査能力の向上につながることを期待したい。

E. 結論

三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定について外部精度管理調査を実施し、74 施設の地衛研で概ね適切に検査が行われていることがわかった。今後も、コレラの届出基準を正しく理解し、地衛研で正確に判定できるよう準備しておくことが大切である。

コレラ菌の同定に必要な O1 抗原の検出について、血清凝集反応で判定不能の場合は PCR 法を実施すべきである。

大規模な外部精度管理調査を実施するにあたって、配付株の選定には検体の保存条件を考慮する必要がある。また、実施結果の集計や解析は専従者が担当することが望ましい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 コレラ菌外部精度管理調査実施スケジュール

日付	実施内容・送付文書など
7月1日	コレラ菌検査・診断マニュアルを感染研ホームページに掲載
7月14日	ワーキンググループ会議
8月17日	地衛研代表メーリングリストに実施案内等(別添1)を送付 ・実施案内 ・別紙1 菌株搬送容器の準備 ・別紙2 菌株搬送容器発送チェックシート ・別紙3 参加申込書及び誓約書
8月26日	参加申し込み締め切り
9月1日	コレラ菌検査・診断マニュアル 修正版を感染研ホームページに掲載
9月2日	参加施設へ実施案内等(別添2)を送付 ・検査手順書 ・検査結果報告書 ・検査経過記録書 ・感染症検査体制アンケート
9月9日	菌株搬送容器の感染研への送付日を連絡(別添3)
10月1, 2日	検査試料を感染研から発送
10月2, 5日	参加施設に検査試料が到着
10月23日	試料輸送中の温度管理記録データの提出を依頼
10月26日	検査結果報告書、検査経過記録書および感染症検査体制アンケート 提出締め切り
10月30日	温度管理記録データ提出締め切り
12月18日	結果報告書のまとめ(別添4)を送付 事後アンケート(別添5)を依頼
12月25日	事後アンケート提出締め切り

表 2 検査結果報告書のまとめ

	試料	判定結果	検査内容	施設数
1	V. cholerae O1 CT陽性	陽性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	72
		陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陽性	2
2	V. cholerae O1 CT陰性	陰性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陰性	66
		陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陰性	1
		陽性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陰性	7
3	V. cholerae O139 CT陽性	陽性	O139抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	74

表 3 検査経過記録書のまとめ

a. 検査担当者情報

担当	記載数	コレラ菌検査の経験			細菌検査の経験		
		なし	5年未満	6年以上	なし	5年未満	6年以上
検査担当者	133	42	54	37	1	61	71
検査区分責任者	11	1	6	4	1	1	9
検査部門責任者	5	4	0	1	3	0	2
その他	2	2	0	0	0	1	1
合計	151	49	60	42	5	63	83

b. 検査開始日と検体の保管温度

試料到着日	検査開始日	施設数	検査開始までの検体保管場所(施設数)
10月2日	10月2日	1	冷蔵庫(1)
	10月5日	1	常温(1)
10月5日	10月5日(すぐに検査開始)	44	
	10月5日(数時間保管)	16	冷蔵庫(13), 安全キャビネット(1), 検査室(1), 室温(1)
	10月6日	8	冷蔵庫(1), 検査室(4), 管理区域内(1), 鍵付き保管庫(1), 指定菌株保管場所(1)
	10月7日	2	冷蔵庫(1), 検査室(1)
	10月14日	1	冷蔵庫(1)
	10月21日	1	SOPの指定場所(1)

c. 純培養であることを確認した培地

使用培地数	培地名	施設数
1	食塩加NA	31
	食塩加TSA	4
	食塩加HI	1
	NA	1
	TSA	2
	TCBS	14
	クロモアガーVibrio	2
2	食塩加NA+血液寒天	1
	食塩加NA+TCBS	3
	食塩加TSA+TCBS	1
	食塩加HI+TCBS	1
	TCBS+クロモアガーVibrio	3
3	食塩加NA+TCBS+クロモアガーVibrio	4
	食塩加NA+TCBS+ビブリオ寒天	1
	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天	3
4	食塩加NA+TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天	1
5	食塩加NA+TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天+PMT	1

NA:普通寒天, TSA:トリプトソイ寒天, HI:ハートインフュージョン寒天

d. 検査に使用した選択分離培地

使用培地数	培地名	施設数
1	TCBS	21
2	TCBS+クロモアガーVibrio	22
	TCBS+ビブリオ寒天	8
	TCBS+X-VP	2
	TCBS+PMT	1
3	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天	17
4	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天+PMT	2
	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天+X-VP	1

e. 分離菌性状検査の実施状況と使用培地

検査項目	使用培地(使用施設数)					未実施
ブドウ糖	TSI	(72)	単糖代謝確認培地	(2)		
乳糖	TSI	(68)	単糖代謝確認培地	(5)		1
白糖	TSI	(69)	単糖代謝確認培地	(5)		
運動性	LIM	(66)	SIM	(5)	半流動培地	(3)
インドール	LIM	(67)	SIM	(5)	市販キット	(2)
リジン脱炭酸	LIM	(71)	メラーのアミノ酸培地	(2)	その他	(1)
VP試験	VP半流動培地	(64)	簡易同定キット	(1)	その他	(7)
耐塩性試験	食塩濃度(%)	0	(2)			
		0, 3, 8	(1)			
		0, 3, 7, 10	(2)			
		0, 3, 8, 10	(7)			
		0, 3, 6, 8, 10	(60)			
		0, 3, 7, 8, 10	(1)			
		0, 1, 3, 6, 8, 10	(1)			

表4 使用した培地・試薬などの準備状況(事後アンケートの集計)

培地・試薬	日常検査で 使用している	精度管理用に 準備した	実施(使用) していない	未記入
選択分離培地				
TCBS	69	1		
クロモアガーVibrio	34	7	28	1
ビブリオ寒天	19	7	44	
PMT	3	2	65	
X-VP	3	1	66	
性状確認培地				
VP試験	61	6	3	
耐塩性試験	61	9		
オキシダーゼ試験	69	1		
単糖代謝確認培地	41	5	24	
アミノ酸脱炭酸培地	46	5	19	
簡易同定キット	33		37	
その他の性状試験				
O/129ディスク感受性	7		63	
ニワトリ赤血球凝集性	1	2	67	
ヒツジ赤血球溶血性	2	1	67	
ポリミキシンB感受性	2	1	67	
血清凝集反应用試薬				
コレラ菌免疫血清 混合	68	2		
コレラ菌免疫血清 稲葉型	67	2	1	
コレラ菌免疫血清 小川型	67	2	1	
ビブリオコレラ免疫血清O139	65	5		
コレラ菌AD (ラテックスキット)	37	1	32	
PCR法によるCT遺伝子検査				
検出マニュアルのプライマー	33	17	20	
市販プライマーセット	28	3	38	1
その他(自家合成)	9		56	5
RPLAによるCT産生性の確認				
VET-RPLA	31	2	37	
その他の遺伝子検査				
<i>V. cholerae</i> 確認用プライマー	16	17	37	
O1抗原, O139抗原の確認用 プライマー	30	18	22	
生物型確認用プライマー	11	15	44	