

3. 赤痢菌検査の外部精度管理調査に関する事前準備調査

研究分担者	村上 光一	国立感染症研究所感染症疫学センター室長
	大石 和徳	国立感染症研究所感染症疫学センター室長
	滝澤 剛則	富山県衛生研究所長
	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所長
研究協力者	泉谷 秀昌、緒方喜久代、大西 真	国立感染症研究所
	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	磯部 順子	富山県衛生研究所
	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
	平井 昭彦、河村 真保、小西 典子、貞升 健志	東京都健康安全研究センター
	青木美耶子、鈴木 匡弘、松本 昌門	愛知県衛生研究所

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、外部精度管理を実施することは重要である。今回、「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」を実施項目とする外部精度管理調査を、平成 29 年度に実施することを決定した。そこで本年度は、外部精度管理実施に先立ち、必要な手順や問題点を予め検証することを目的に研究を進めた。実際には保存により抗原性が変化しやすい赤痢菌に対して、抗原性を維持するための継代培養法を検討し、適切な培養方法を確立した。その成果をもとに、平成 29 年度配布する菌株を選択するため、候補菌株を実際にワーキンググループ内の機関に輸送し、到着後の抗原性の変異や生化学性状の妥当性を検査した。その結果をもとに、平成 29 年度に地衛研に配布する菌株の候補を選択した。これにより、平成 29 年度の精度管理実施の基盤となる部分の準備が完了した。今回、「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」を実施項目とする外部精度管理の実施には、送付菌株の適切な継代等、細菌学的な準備が必要であることが明らかとなった。

A．研究目的

外部精度管理は、信頼性の確保ばかりでなく、地方衛生研究所（地衛研）における検査業務をより一層充実させることとなる。このため、来年度（平成 29 年度）多くの地衛研を対象とした外部精度管理を実施するにあたって、必要な手順や問題点を予め検証することを本年度の研究目的とした。

B．研究方法

1. 実施項目の選定

昨年度（H27 年度）実施された先行研究（佐多班）の検討結果を参考として¹⁾、赤痢等の三類感染症検査に該当する菌種から、研究班内の意見を集約し、細菌小班にて来年度実施対象菌種を選定することとした。

2. ワーキンググループ

細菌小班の下に、複数の地衛研及び国立感染症研究所（感染研）からなるワーキンググループ（WG）

を組織し、検討を行うこととした。

3. 対象地方衛生研究所の選定

佐多班報告書¹⁾を参考にしつつ、細菌 WG 内で素案を提起し、細菌小班、ついで全体会議で、選定方法の了承を受けることとした。

4. 配付候補菌株の選定とその評価

佐多班報告書の記載内容¹⁾を尊重し、もっとも典型的な菌株を対象として調査することとした。菌種決定後は、来年度配布菌株を決定するため、実際に候補菌株を感染研より細菌 WG に郵送し、抗原性、生化学性状、遺伝的性状等の評価を行った。

5. 平成 29 年の細菌 WG 内での役割分担計画

調査を平成 29 年度前半で行う計画であるため（後述）役割ごとに主たる担当機関を定め、効率よい運営を図ることとした。

6 温度管理のための口ガーの使用・不使用の検討

佐多班報告中、試料郵送中の温度が試料に影響を与える可能性が言及され¹⁾、更なる検討を行うか否か、検討をすることとした。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した赤痢菌については、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. 実施項目の選定

佐多班報告書にあるように、細菌性赤痢は三類感染症で、検査結果の社会的影響は大きく、検査精度が求められる。その上、赤痢菌は検査診断(同定)が容易でなく²⁻⁵⁾、地衛研への確認依頼が多い²⁾こと等から、来年度の検査対象菌株を「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」とした。菌種を明らかにしない3菌株を送付し、各菌株が赤痢菌であるか否か、赤痢菌である場合、菌種は何かを回答することを設問として想定した。如上の計画の下、来年度、多数の地衛研を対象に赤痢菌の精度管理を実施するための予備検討を本年度の実施項目とした。

2. 参加施設

希望施設を募り、全国の地方衛生研究所を包括的に評価するため、地域および赤痢菌取り扱い経験の有無等を勘案し、偏りなく対象施設を選ぶこととした。選定条件を表1に示す。

3. ワーキンググループ

4機関の地衛研(東京都健康安全研究センター、富山県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、愛知県衛生研究所)と感染研の研究協力者等からなる細菌WGを組織し、配付菌株の選定、実施計画の立案等を行うこととした。本年度の事前検討のための送付試料の準備及び発送は、感染研・感染症疫学センターが担当することとした。検討結果の評価は、細菌WGの中で行い、細菌小班の総評を受けることとした。

4. 配付候補菌株の選定

佐多班報告書の記載「もっとも典型的な赤痢菌を対象として調査するのが望ましい」に従い、配付する試験菌株(以下、配布菌株)は、典型的な性状を示す赤痢菌株(2株、内訳は *Shigella flexneri* 及び *Shigella sonnei* 各1株)及び赤痢菌と性状が類似した大腸菌株(1株)とすることとした。配布菌株選別にあたり、赤痢菌株に関しては、同一菌種から複数の菌株を候補として試験し(一次候補菌株)その中から赤痢菌4株(*S. flexneri* 及び *S. sonnei* 各2株)を選び(二次候補菌株)さらに来年度の菌株配布時に、二次候補菌株の中から最も状態のよい赤痢菌2株(*S. flexneri* 及び *S. sonnei* 各1株)並びに赤痢菌に性状が類似した大腸菌株を送付株とすることとした。

一次候補菌株は、感染研・感染症疫学センターで選択し、二次候補菌株は、細菌WGで行う試験

の結果で評価・選択することとした。

菌株選定のための確認項目として、*Salmonella-Shigella* 寒天培地上での発育、血清型決定にともなう抗原の状態、*invE* 及び *ipaH* の保有に加え、非運動性、乳糖及び白糖からの酸の非産生、リジン脱炭酸試験陰性の項目を挙げた。これらの性状が明瞭であること、特にR集落形成が顕著でないことを重視した。このような条件に鑑み、*S. sonnei* 3菌株及び *S. flexneri* 3菌株を一次候補菌株として選定した。

5. 一次候補菌株の評価と二次候補菌株の選定

表2-1に示すT9(*S. flexneri*)、16-52(*S. flexneri*)、C(*S. flexneri*)、T12(*S. sonnei*)、A(*S. sonnei*)及びB(*S. sonnei*)菌株を一次候補菌株とした。大腸菌はT10(大腸菌)を選択した。これら菌株を、先ず抗血清への凝集に関して検討したところ、表2-1に示すようにT9、A、B及びC菌株に非特異凝集が認められた。特に、A菌株では、抗血清DIへの凝集が全くみとめられなかったため、この時点でA菌株を候補から除外した。ついで、表2-1に示す問題(非特異凝集)があった菌株(但しA株を除く)を、pH7.8のリン酸緩衝液で作成したNutrient Broth No.2(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)(含:0.8%の胆汁酸塩)(以下、pH7.8胆汁酸塩ブイオン)にて継代培養した。なお胆汁酸塩は、Bile salts No.3(Thermo Fisher Scientific)を用いた。その結果、抗原性について非特異凝集に改善が認められた(表2-2)。以上の結果から、T9(*S. flexneri*)、16-52(*S. flexneri*)、B(*S. sonnei*)及びT12(*S. sonnei*)を二次候補菌株とした。なお、これらの菌株の生化学性状等を検討した結果、特に問題は認められず、いずれも典型的赤痢菌の性状を示した。

6. 細菌WGによる二次候補菌株の評価

二次候補菌株及びT10(大腸菌)を細菌WGに送付し、実際に同定作業を行い問題点等を検討した。配布する菌株を準備するにあたり、下記の操作を行った。-80にて保管している菌株をNutrient Broth No.2にて培養し(約16時間、35)、これをpH7.8胆汁酸塩ブイオンにて培養(4時間、35)、培地最表面から一白金耳の菌液を採取し、pH7.8胆汁酸塩ブイオンに接種し、培養(一晚、35)、翌日、当該培地最表面から一白金耳の菌液を採取し、pH7.8胆汁酸塩ブイオンに接種し、培養(4時間、35)、培地最表面から一白金耳の菌液を採取し、pH7.8胆汁酸塩ブイオンに接種・培養(一晚、35)、これを遠心分離し、菌体をマイクロバンク(Pro-Lab Diagnostics, Richmond Hill, Ontario, Canada)にて、-80で保存した。ただしT-10に関しては胆汁酸塩を含まないpH7.8のリン酸緩衝液で作

成した Nutrient Broth No.2 (以下、pH 7.8 普通ブイヨン) を用い、同様の操作を行った。

この赤痢菌保存菌株から、必要に応じ pH 7.8 普通ブイヨンに培養した菌株を、さらに pH 7.8 のリン酸緩衝液で作成した普通寒天 (日水製薬、東京) (含: 0.3% の胆汁酸塩) に接種し、これを配布試料とした。T10 菌株については、冷凍菌株を pH 7.8 普通ブイヨンにて培養し、pH 7.8 のリン酸緩衝液で作成した普通寒天に接種し、これを送付検体とした。

結果を表 3-1 から 3-5 に示す。二次候補菌株の生化学性状等に関しては概ね問題は認められなかった。菌株 T-12 及び B において発育が認められない機関が見られた。そのため、後日、菌株 T-12 及び B について、細菌 WG に再送し、発育を確認した。

7. 温度管理のための口ガーの使用・不使用の検討

昨年度佐多班の研究で十分な結果が得られたため、昨年度報告書の内容で十分対応可能であることから、来年度、当該項目は実施しないこととした。

8. 平成 29 年の組織作りと役割分担

効率的な事業推進を図るために、役割ごとに主たる担当機関を定めることとしたが (表 4) 事務負担が主たる担当機関に過度に集中しないよう細菌 WG 内で配慮することとした。

9. 日程

試料の地衛研への配布は、平成 29 年 5 月末から 6 月初頭が望ましく、参加施設の募集は平成 28 年度中から行うことが必要であるとの結論に達した。

D. 考察

1. 赤痢菌の選定

赤痢菌は伊藤らの報告にもあるように、同定が比較的難しく、赤痢菌以外の菌種が赤痢菌と誤って同定されることが頻出される。特に市販の菌種同定用のキットを用いるとこの傾向が顕著であるとされる³⁾。このため、赤痢菌の検査は地衛研に期待される部分が大きく、地衛研にとって重要な検査項目となっている。

2. 菌株の選択

赤痢菌は、長期保存により抗原性が変化することが経験的に知られている。比較的 pH の高い液体培地で培養することで、保存菌株中の抗原性を維持している細胞が選択されることが経験的に知られており、今回、その技術を応用した。また、胆汁酸塩の濃度が比較的高い平板培地で培養された菌株 (特に *S. sonnei*) は、細胞侵入性に関するプラスミドの脱落が起き難いことが経験的に知られており、今回、当該プラスミドの脱落

を防止する目的で、胆汁酸塩を培地に添加した。

配布菌株に関しては、-80 の保存であっても抗原性の変化が認められたが、比較的高い pH の液体培地を用いた培養及び胆汁酸塩を含む培地の選択により、比較的良好な結果を得ることができた。

E. 結論

三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定について、来年度、地衛研を対象に外部精度管理調査を実施するため、4 施設の地衛研及び感染研からなる細菌 WG にて、対象地衛研の選定方法、菌株の選定、スケジュール等の素案を作成し、細菌小班の承認を得た。大規模な外部精度管理調査を実施するにあたって、配付株の配布には、継代培養法を工夫し、保存条件を考慮する必要があることをはじめ、十分な準備が必要であることが明らかとなった。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と考えられた。

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

参考文献

1. 佐多徹太郎ら. 2015. 地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施のための事業体制の構築に関する研究. 厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業) 平成 27 年度 総括・分担研究報告書.
2. 伊藤健一郎, 山下和予, 吉川昌江, 野地元子, 齊藤剛仁, 岡部信彦, 淳 寺, 廣瀬健二, 渡辺治雄. 2005. 赤痢菌同定の問題点: アンケート調査結果. IASR 26:94-96.
3. 宮本豊一, 相楽裕子. 2002. 赤痢菌同定検査の問題点と現場からの提案. IASR 24:213-214.
4. 甲斐明美, 河村真保, 横山敬子, 高橋正樹. 2002. 赤痢菌同定の問題点 - 東京都. IASR 24:211-212.
5. 久高潤, 中村正治, 系数清正, 平良勝也, 安里龍二, 安富祖忠章, 比嘉政昭, 上原真理子, トーマ・クラウディア. 2002. 赤痢菌の同定に関する問題事例 - 沖縄県. IASR 24:208-209.

表1. 平成29年度 地域別対象及び参加施設数

地域(対象施設数)	人口 (万人)	参加施設数			計
		赤痢菌を扱った経験			
		あり	数回	なし	
北海道・東北・新潟 (11)	1,686	1	1	1	3
関東甲信静 (28)	4,944	2	1	2	5
東海・北陸 (8)	1,260	1	1	1	3
近畿 (15)	2,276	1	1	2	4
中国・四国 (11)	1,170	1	1	1	3
九州 (12)	1,323	1	1	1	3
計	12,659	7	6	8	21

表2-1. 一時候補菌株と凝集する抗血清

菌株 / 抗血清	A多価	A1多価	B多価	C多価	C1多価	C2多価	C3多価	D多価	D I	D II	PCR 検査
T9 (<i>S. flexneri</i>)	-	-	+	+	+	+	-	-	未実施	未実施	<i>invE, ipaH</i> 陽性
16-52 (<i>S. flexneri</i>)	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	未実施	<i>invE, ipaH</i> 陽性
C (<i>S. flexneri</i>)	+	+	+	-	-	-	-	-	未実施	未実施	<i>invE</i> 陰性
T12 (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	<i>invE, ipaH</i> 陽性
A (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	<i>invE</i> 陰性
B (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	<i>invE, ipaH</i> 陽性
T10 (大腸菌)	-	-	-	-	+	-	-	-	未実施	未実施	<i>invE</i> 陰性

表2-2. 一時候補菌株のうち表2-1に示す問題があった菌株を pH 7.8 のリン酸緩衝液で作成した普通ブイヨン(含:0.8%の胆汁酸塩)にて継代培養した時の抗血清との凝集(但しA株を除く)

	A多価	A1多価	B多価	C多価	C1多価	C2多価	C3多価	D多価	D I	D II	PCR 検査
T9 (<i>S. flexneri</i>)	±	±	++	-	-	-	-	-	未実施	未実施	<i>invE, ipaH</i> 陽性
C (<i>S. flexneri</i>)	±	-	++	-	-	-	-	-	未実施	未実施	<i>invE</i> 陰性
16-52 (<i>S. flexneri</i>)	-	-	++	-	-	-	-	-	未実施	未実施	<i>invE, ipaH</i> 陽性
B (<i>S. sonnei</i>)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	<i>invE, ipaH</i> 陽性

表 3-1. 検討結果全体のまとめ（ワーキンググループに菌株を送付し、評価を得た結果）

No.	菌種	発育菌株数	遺伝子検出菌株数		非特異的 血清凝集反応
			<i>invE</i>	<i>ipaH</i>	
T9	<i>S. flexneri</i> 2a	5	5	5	0
T16-52	<i>S. flexneri</i> 2a	5	5	5	0
T12	<i>S. sonnei</i>	1	1	1	0
B	<i>S. sonnei</i>	3	3	3	0
T10	非赤痢菌	5	0	0	5

表 3-2. T9 株 *Shigella flexneri* 2a 検討結果

地方衛生研究所 所在地都道府県等	分離平板接種	分離平板発育	集落	血清凝集反応	<i>invE</i>	<i>ipaH</i>	非典型的性状	同定結果
東京都	直接	有	SS寒天：R型あり DHL寒天：R型、1コロニーのみ発育	B多価+++ フレキシネリ型 +++ (3)4群 +++	陽性	陽性	特になし	<i>S. flexneri</i> 2a
富山県	直接/増菌	有	小型・S型 (BTB, MacConkey, DHL, SS, SSB, SSSB)	ルネリ, (3)4	陽性	陽性	マンニット+	<i>S. flexneri</i> 2a
愛知県	直接	有	白色集落	複数種類血清に凝集, B多価が最も強く凝集	陽性	陽性	白糖遲分解	<i>S. flexneri</i> 2a
大阪府	増菌	有	SS; 白大小濃淡あり, DHL; 白や不正円	B多価, 11, (3)4	陽性	陽性	特になし	<i>S. flexneri</i> 2a
国立感染症研究所細菌第一部	直接	有	小集落有	B, 11, (3), 4	陽性	陽性	特になし	<i>S. flexneri</i> 2a

表 3-3. T16-52 株 *Shigella flexneri* 2a 検討結果

地方衛生研究所 所在都道府県等	分離 平板 接種	分離 平板 発育	集落	血清凝集反 応	<i>invE</i>	<i>ipaH</i>	非典型的 性状	同定結果
東京都	直接	有	SS寒天：発育 ++, S型集落 DHL寒天：発育 ++, S型集落	B多価+++ フレキシネ リ型+++ (3)4群 +++	陽性	陽性	特になし	<i>S.</i> <i>flexneri</i> 2a
富山県	直接	有	均一・S型 (BTB, MacConkey, DHL, SS)、大小 混在・S型 (SSB, SSSB)	フリネリ , (3)4	陽性	陽性	マンニッ ト+	<i>S.</i> <i>flexneri</i> 2a
愛知県	直接	有	白色集落	複数種類血 清凝集, B多 価が最も強 く凝集した	陽性	陽性	特になし	<i>S.</i> <i>flexneri</i> 2a
大阪府	増菌	有	SS; 白ほぼ均 一、DHL; 白とや やピンクの大き め集落	B多価, II, (3)4	陽性	陽性	特になし	<i>S.</i> <i>flexneri</i> 2a
国立感染症研究所 細菌第一部	直接	有	小集落有	B, II, 3, 4	陽性	陽性		<i>S.</i> <i>flexneri</i> 2a

表 3-4. T12 株 *Shigella sonnei* 検討結果

地方衛生研究所 所在都道府県等	分離平 板接種	分離 平板 発育	集落	血清凝集 反応	<i>invE</i>	<i>ipaH</i>	非典 型的 性状	同定結果
東京都	TSB	無						
富山県	直接/ 増菌	無						
愛知県	直接/ 増菌	無						
大阪府	増菌 (TSB)	有	SS; ピンク, 密集部では赤、 DHL; ピンク中 ~大	D多価、 D II	陰性	陽性	特に なし	<i>S.</i> <i>sonnei</i> (II相)
大阪府	再試験 (TSA)	有	SS釣菌株	D多価、 D I	陽性	陽性	特に なし	<i>S.</i> <i>sonnei</i> (I相)
国立感染症研究 所細菌第一部	直接/ 増菌	無						

表 3-5. B 株 *Shigella sonnei* 検討結果

地方衛生研究所 所在都道府 県等	分離平板接 種	分離平板 発育	集落	血清凝集 反応	inv E	ipa H	非典 型的 性状	同定結果
東京都	TSB	直接：無 増菌：有	SS寒天：発育 +++，やや小さめ のS型集落 DHL寒天：発育 +++，大小混在の 集落，R型あり	D多価+++ 相+ 相++	陽性	陽性	特になし	<i>S. sonnei</i>
富山県	直接/一度液 体培地で増 菌して	無						
愛知県	直接	有	白色集落 S型、R型集落混 在	ソネD多 価に凝集 した	陽性	陽性	特になし	<i>S. sonnei</i> (I相) コリ シン型 6
大阪府	TSB	有	SS; 白ぼぼ均 一、DHL; ピンク と白微小集落	D多価、DI	陽性	陽性	特になし	<i>S. sonnei</i> (I相)
国立感染症研 究所細菌第一 部	直接、増菌	無						

表 4. 平成 29 年の役割分担

役割	主たる担当	備考
配布菌株の調整	国立感染症研究所・感染症疫学センター	配布菌株の調整、国立感染症研究所細菌第一部への配布菌株の送付
菌株の発送及びそれに付帯する事務	国立感染症研究所・細菌第一部	地方衛生研究所への配布菌株の送付、それに伴う所内手続き
検査要領等の作成	富山県衛生研究所及び国立感染症研究所・感染症疫学センター	検査要領の作成とそれに伴う事務
成績（菌種同定）の集計	国立感染症研究所・細菌第一部・感染症疫学センター	菌種同定成績の集計、解析、報告書の当該部分の作成
付帯質問の作成、成績の集計	愛知県衛生研究所	菌発育の有無、使用培地、検査法等に関する質問作成、その地衛研への送付、成績の解析、報告書の当該部分の作成
平成29年度報告書作成	富山県衛生研究所	報告書の作成、その他関連する事務
地衛研等との折衝、連絡	愛知県衛生研究所	参加希望の把握、地衛研への事務連絡、成績返却等及びそれに伴う事務
不測の作業・事務	愛知県衛生研究所	上記に含まれない事、突発的な事務等

