

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）
地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と
継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究
分担研究報告書

地方衛生研究所を対象にした赤痢菌検査の外部精度管理調査

研究協力者	河村 真保	東京都健康安全研究センター
	小西典子	東京都健康安全研究センター
	平井昭彦	東京都健康安全研究センター
	貞升健志	東京都健康安全研究センター
	磯部順子	富山県衛生研究所
	勢戸和子	大阪健康安全基盤研究所
	世良暢之	福岡県保健環境研究所
	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
	山田和弘	愛知県衛生研究所
	泉谷秀昌	国立感染症研究所
	大西 真	国立感染症研究所
研究分担者	滝澤剛則	富山県衛生研究所
	四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
	村上光一	国立感染症研究所
	大石和徳	国立感染症研究所
	松本昌門	愛知県衛生研究所
研究代表者	皆川洋子	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『赤痢菌』の同定」とし、27施設の参加を得た。検査試料は地衛研の保存株から、事前に5か所の地衛研及び国立感染症研究所（感染研）で性状を確認した上で3株（試料1: *Escherichia coli* ボイド9型（+）、試料2: *Shigella sonnei*、試料3: *Shigella flexneri* 2a）を選び、感染研から発送した。検査結果報告書の集計の結果、正答は試料1: 27施設、試料2: 27施設、試料3: 27施設で、全地衛研が正しい同定結果であった。しかし、「根拠とした検査結果」は検査結果報告書の記載例が適切でなかったためか、地衛研によって表記に相違が見られた。検査結果報告書や赤痢菌検査経過記録書から、全体として地衛研では概ね適切に赤痢菌検査が実施されていることがわかった。検査開始は検体到着当日が望ましいが、当日実施していない地衛研が3施設認められた。試料1の血清凝集検査では「陰性」と回答した地衛研が11施設認められた。血清凝集検査について菌液濃度の異なった菌懸濁液を用いる。複数で確認する。赤痢菌は生菌を用いる等の対応が必要である。コロニーを1個のみ釣菌していた地衛研が2か所認められたが、複数個（3から5個）釣菌することが望ましい。遺伝子検査では赤痢菌同定の標的遺伝子を *invE* のみ実施した地衛研が3施設認められた。*invE* はプラスミド上に存在しているため脱落し検査結果が「陰性」となる場合があるので、検査対象（標的遺伝子）には染色体上に存在する *ipaH* を加える必要がある。検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書に単純な誤記、明らかな知識の誤り及び未記入が散見された。提出書類は病原体知識のある複数の職員が確認することが必要である。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も必要である。

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

前研究班で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。赤痢菌の決定は地衛研で行う場合があること、赤痢菌検査の経験がある職員が少なくなったこと、及び他の病原菌に比べ同定が困難である場合が多いことから実施項目を「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」とした。

2. 実施組織

6 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、赤痢菌の免疫血清ボイド 9 型に凝集する *Escherichia coli* 1 株、典型的な赤痢菌 2 株（*Shigella sonnei*、*Shigella flexneri* 2a）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、直接・増菌培養での発育の有無、SS 培地・DHL 培地での発育及びコロニーの形態、O 血清群、生化学的性状、*invE*、*ipaH* 遺伝子を用いた遺伝子検査を挙げた。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、特異的生化学的性状を示さないもの、あるいは遺伝子試験の性状が異常なものを除外し候補株を選抜した。この中から最も典型的と考えられた 5 株を細菌 WG メンバー（感染研、東京都健康安全研究センター、富山県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、愛知県衛生研究所）にプレチェックのために送付した（平成 28 年度本研究班報告書 II-15）。

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」（添付略）を整えた。取扱様式 8 に添付する送付先リストを作成し、BSL2(3)実験室確認書、各参加施設からの誓約書（参加申込書）（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 “カテゴリー-A”」の簡易版作成を行った。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、指定された期日（5 月 15 日）に感染研に集められた。搬送容器は、5 月 18 日に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感染研で準備した搬送容器を使用した。

3 種の試料は 5 月 15 日に輸送用培地に接種し、3 種 1 セットを真空パックに入れ密封したのち、培養を開始した。5 月 19 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後、試料を同日発送した。

4. 実施スケジュール（表 1）

実施時期は 5 月 22 日から 6 月 12 日とし、5 月 15 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 2）。参加にあたっては、規定に沿った菌株搬送容器を準備して指定日に感染研へ送付することとし（別添 3）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。

検査法は各機関の標準作業書に準拠して行うこと。また、あわせて、「赤痢菌検査・診断マニュアル、平成 24 年 6 月改訂」感染研 HP（<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/shigella.pdf>）を参考とすることとした（別紙

6に記載)。検体の発送は、ゆうパックで5月22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、6月12日までに検査結果報告書(別添1別紙4)および検査経過記録書(別添1別紙5)を提出するよう依頼した。また、試料培養時の注意点を記載した赤痢菌検査注意書(別添1別紙6)を作成して送付した。

5. アンケート

赤痢菌検査に日常使用している選択分離培地、確認培地、免疫血清、及び遺伝子検査についてアンケートを作成し、参加施設へ回答を依頼した(別添1別紙5)。

(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. 配付株の選定と輸送

感染研で選択した5株について5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: *Escherichia coli* ボイド9型(+)、試料2: *Shigella sonnei*、試料3: *Shigella flexneri* 2a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27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。これらを感染研総務部調整課研究支援係に提出した。

2. 参加地衛研

平成29年2月27日付けで全81地衛研に参加希望の照会を行ったところ、64地衛研から参加申込があった。参加希望の全地衛研が参加することは細菌WGの規模では困難であるため、全国のブロックごとに参加地衛研数を3~5施設割り振り、抽選で21地衛研を選び、細菌WGの6地衛研を加えた計27地衛研が参加することとした。

3. 同定結果の提出

6月12日までに、全地衛研から依頼の様式で検査結果報告書、赤痢菌検査経過記録書、及びアンケートが提出された。

4. 検査結果報告書のまとめ

結果判定は試料1、2、3何れも全27施設で正しく判定されていた(表2)。根拠とした検査結果では試料1で、0抗原(+)
赤痢菌の(以下同)生化学的性状(-)
赤痢菌遺伝子(-)、0抗原(-)
生化学的性状(-)
赤痢菌遺伝子(-)、生化学的性状(-)
赤痢菌遺伝子(-)等記載が認められた。一方、試料2、3ではほぼ全地衛研が0抗原(+)
生化学的性状(+)
赤痢菌遺伝子(+)と記載していた。また、試料2で群血清(3)4を3(4)とした軽微な誤記や *Shigella sonnei* 相を *Shigella flexneri* 相とした等重大な誤記も認められた。

5. 赤痢菌検査経過記録書のまとめ

検査担当者情報として、5地衛研は1名、10地衛研は2名、11地衛研は3名、1地衛研は4名を記載しており、合計63名の担当と検査経験を表3にまとめた。検査担当者の赤痢菌検査および細菌検査の経験年数については、約7割が赤痢菌検査の経験5年以内と回答していた。

検体は、27地衛研には5月22日の指定日どおりに到着した。検体の状況は全27地衛研で良好であった。検体到着日に検査を開始した地衛研は13か所、翌日が2か所、翌々日が1か所、検査開始日を明らかに誤記した地衛研が1か所あった。

保管条件については、直ぐに検査を開始した地衛研は13か所、冷蔵庫保管は11か所、室温保管が3か所であった。

分離培養検査に使用した選択分離培地は、25地衛研でSSが使われており、SS+DHLが最も多く16か所(59.3%)、SS+DHL+BTB及びSS+DHL+マッコンキーが各2ヶ所であった。残りはSSに各種培地を加え2から4種類の分離培地を使用していた。また、1か所は普通寒天を使用していた(表4)。

釣菌したコロニー数の記載は1~12個で、2か所はコロニーを1個のみ釣菌していた(データ未

掲載)。しかし、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。

生化学的性状検査の検査項目ではブドウ糖発酵
試験、乳糖及び白糖発酵試験、ブドウ糖からのガ
ス産生試験、リジン脱炭酸試験、インドール産生
性試験、及び運動性試験は 27 か所全てが実施し
ていた。一方、クエン酸利用試験(23 施設)、VP
(アセトイン産生性)試験(21 施設)、酢酸ナト
リウム利用試験(20 施設)、オルニチンデカルボ
キシラーゼ試験(18 施設)、アルギニンジヒドラ
ーゼ試験(16 施設)及びウレアーゼ試験(15 施
設)は半数以上の地衛研が実施していた(表 5-1、
5-2)。

検査項目に対する検査結果(表 6-1,6-2)では、
試料 1、*Escherichia coli* は実施した全ての地衛
研でブドウ糖発酵陽性、乳糖及び白糖発酵、リジ
ン脱炭酸、運動性、VP、クエン酸利用、アルギニ
ンジヒドラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、
マロン酸利用試験、ウレアーゼ試験陰性であった。
一方、インドール陰性、酢酸ナトリウム利用試験
陰性、及び粘液酸利用試験陰性がそれぞれ 1 か所
認められたが、全て誤記であった。乳糖、白糖発
酵試験陽性の 1 か所は糖代謝培地を用い 1 週間観
察した結果であった。ブドウ糖からのガス産生陽
性と回答した施設(1 か所)は確認したが「誤記
ではない。」との回答を得た。試料 2 *Shigella*
sonnei は実施した全ての地衛研でブドウ糖発酵、
オルニチンデカルボキシラーゼ陽性、乳糖及び白
糖発酵、白糖発酵、リジンデカルボキシラーゼ、
インドール、運動性、VP、クエン酸利用試験、ア
ルギニンジヒドラーゼ、マロン酸・酢酸ナトリウ
ム・粘液酸利用試験、及びウレアーゼ陰性であっ
た。一方、乳糖発酵陽性と回答した施設は糖代謝
培地を用い、1 週間観察した結果であった。確認
したところ、ブドウ糖からのガス産生陽性は誤記
であった。試料 3 *Shigella flexneri* 2a は実施
した全ての地衛研でブドウ糖発酵陽性、乳糖及び
白糖発酵、乳糖発酵、白糖発酵、リジンデカルボ
キシラーゼ、インドール産生性試験、運動性、VP、
クエン酸利用試験、アルギニンジヒドラーゼ、オ

ルニチンデカルボキシラーゼ、マロン酸、酢酸ナ
トリウム、粘液酸利用試験、及びウレアーゼ陰性
であった。一方、ブドウ糖からのガス産生陽性 1
か所は該当地衛研に確認したが「誤記ではない。」
との回答を得た。

使用した培地を表 7-1,7-2 にまとめた。ブドウ
糖の検査は TSI が 26 か所、糖代謝確認培地が 1
か所であった。乳糖及び白糖は糖代謝確認培地が
それぞれ 6 及び 4 ヶ所で、その他は主に市販同定
キットが使用されていた。ブドウ糖からのガス産
生については 20 か所が TSI、7 か所は糖代謝確認
培地であった。リジン脱炭酸は 24 か所が LIM、残
りはメラー培地等を使用していた。インドール産
生性は全て LIM、運動性は 17 か所が LIM、7 か所
が SIM、3 か所が半流動培地を使用していた。ア
ルギニンジヒドラーゼ、オルニチンデカルボキシ
ラーゼ、マロン酸、ウレアーゼは市販の同定キッ
トが最も多く使用されていた。また、粘液酸利用
試験については培地が市販されていないので自
家調製であった。その他の培地として CLIG、クリ
ステンゼンクエン酸塩培地がそれぞれ 4 及び 3 ヶ
所で使用されていた。

血清凝集反応は 26 か所の地衛研が試料 1 から 3
について、1 か所は試料 2、3 の赤痢菌のみ実施し
ていた(表 8)。試料 1 は 15 か所がボイド 9 型陽
性と報告したが、残りの 11 か所は陰性と報告し
た。その内訳は 7 か所が複数の多価血清に凝集す
る非特異凝集のため、4 か所は凝集が認められな
かったため陰性としていた。試料 2 は 27 か所全
てが陽性と報告していた。その内訳はソソネ I 相
と記入が 20、I+II 相が 5 か所、II 相が 2 か所
であった。試料 3 も 27 か所全てが陽性と報告し
ていた。その内訳は *Shigella flexneri* 2a 等菌型
記入が 6 か所、B 多価 II 型(3)4 等血清型記入が
19 か所、うち 2 か所は血清型の誤記、1 か所は群
血清の記入がなかった。菌型と血清型記入は 2 か
所であった。

全 27 か所の地衛研が赤痢菌同定のため遺伝子
検査を実施していた(表 9)。ipaH は 24 か所が検
査していた。試料 1 及び 3 は 24 か所全てがそれ

ぞれ陰性及び陽性であったが、試料 2 では 23 か所が陽性で 1 か所は陰性であったが誤記であると確認した。invE は 25 か所が検査していた。検査を実施した全ての地衛研が試料 1 は陰性、試料 2、3 は陽性と報告していた。また、ipaH、invE 何れも検査していたのは 22 か所、ipaH のみは 2 か所、invE のみは 3 か所であった。試料 2 に関して 2 か所からソネ 11 相の場合、invE が陰性と報告していた。

遺伝子検査に使用した遺伝子増幅装置については PCR が 25 か所で、機種は Veriti、GeneAmp PCR System 9700 等現サーモフィッシャーサイエンティフィック社製が 13 か所、TaKaRa 社が 9 か所、バイオラド社が 2 か所、ASTECC 社が 1 か所であった。残りはリアルタイム PCR、LAMP がそれぞれ 1 か所であった。電気泳動装置は 24 ヶ所から回答があり、さまざまなタイプの Mupid が 19 ヶ所で最も多く、E-gel が 2 か所、キャピラリー電気泳動装置等その他のアガロース電気泳動装置が 3 か所で使用されていた。

6. アンケートのまとめ

アンケートは、全 27 か所から回答を得たが、1 か所は免疫血清の項目の記入がなかった。

日常赤痢菌検査に使用している培地や試薬について尋ねた。選択分離培地では SS、DHL 寒天培地が最も多く 24 か所で使用されていた。そのほかマッコンキー寒天培地 (5 か所)、BTB 乳糖寒天培地 (3)、SSB 寒天培地 (2) を使用していた。記載様式の不備で何種類の分離培地を用いているかは不明であった (表 10)。

生化学的性状確認培地では TSI、LIM は 27 か所全てで使用していた。以下、クエン酸利用試験 (21 か所)、VP 試験 (19)、SIM (18)、簡易同定キット (17、うち必要に応じて使用が 2 か所) 及び酢酸ナトリウム利用試験 (15) を半数以上の地衛研が使用していた (表 11)。

使用する免疫血清は赤痢菌免疫血清「生研」1 号セットは 25 ヶ所、2 号セットは 4 か所、3 号セットは 2 か所であった。1 か所は回答がなかった (表 12)。

遺伝子検査では 25 か所が日常検査で実施していた (表 13)。未実施の 1 か所から今回の外部精度管理を受けて今後実施する予定との記載があった。実施している 25 か所では PCR が 23 か所、リアルタイム PCR、LAMP が各 1 か所であった。標的遺伝子は ipaH & invE が 20 ヶ所、ipaH のみ、invE のみがそれぞれ 2 か所、ipaH & invE & virA が 1 か所であった。プライマーに関しては市販のプライマー (全て TaKaRa 社) が 20 ヶ所、その他 5 か所は病原体検出マニュアル及び学術論文から塩基配列を引用していた。

D. 考察

細菌性赤痢患者の届出数は最近では年間 150 名前後で推移し、腸管出血性大腸菌感染症 (年間 4,000 前後) に比べると発生件数はかなり少ない。しかしながら、細菌性赤痢は三類感染症に属し、食品関係従事者の場合、就業制限がかかり社会的影響が大きい。また、届出基準には臨床症状に加え、便からの分離・同定による病原体の検出が明記されている。地衛研では医療機関、保健所等から赤痢菌の最終同定を求められることがあるが、地衛研では赤痢菌検査数が減少し、検査経験がない若しくは少ない職員が増えている。加えて、赤痢菌は他の病原菌に比べ誤同定が多いことが報告されている (参考文献 1)。このようなことから、本研究班の細菌 WG では地衛研に対して赤痢菌の外部精度管理試行を実施することとした。その際、留意すべき赤痢菌検査の 5 つのポイントを挙げ (表 14)、これらのポイントを確認することが出来る試料菌株を細菌 WG で「B. 研究方法 3. 配付株の選定と輸送」で記載したとおり準備した。

検査結果報告書の「判定結果」が全ての地衛研から正しく報告されていたことから赤痢菌の検査について、地衛研では適切に実施されていることが明らかとなった。また、「根拠とした検査結果」では試料 1 のボイド 9 型に凝集する *Escherichia coli* で結果記載例が不十分であったため、検査結果報告書の結果表記に相違が認められた。この項目は 0 抗原 (凝集が認められれば

+、非特異凝集または凝集が認められない場合 -)、生化学的性状 (赤痢菌に性状が一致すれば+、一致しなければ -)、赤痢菌遺伝子 (陽性ならば+、陰性ならば -) とカッコ内の+または - のみ を付けて選択とする等、統一した回答を得るためには今後、記入欄や記載例に工夫が必要である。また、「根拠とした検査結果」に菌型、血清型を記入した地衛研で軽微な誤記及び重大な誤記が1及び2か所に認められた。これらの記載ミスは病原菌の基礎知識を持った職員ならば容易に指摘できる。今後、各地衛研においては病原菌の知識を持った複数の職員での検査結果のチェック体制を確立することが急務である。

赤痢菌検査経過報告書の「担当者情報」から、検査担当者の約7割、検査区分責任者も8名中6名が赤痢菌検査経験なしあるいは5年以内であり、前述したとおり赤痢菌検査経験がない若しくは少ない職員が増えている現状が明らかとなった。このため、国立保健医療科学院の細菌研修受講、ブロック内での連携関係の強化等を実施し対策に努める必要がある。また、ブロック単位での希少病原体の研修会も必要となるであろう。

検査開始日時について23か所(85.2%)は到着当日に実施していた。残り2か所は翌日、1か所は翌々日に実施していた(1か所は記入不備)。多忙な日常業務の中で外部精度管理試行を実施したことも当日着手出来なかった一因と考えられるが、実際の赤痢菌検査の際には速やかな検査着手が望まれる。また、保管場所ではSOPで指定された室温保管が3か所あったが、このうち1か所では検査を翌日開始していた。可能ならば当日検査開始が冷蔵保管が望ましい。

分離培養検査では25か所(92.6%)でSS培地に加え各種分離培地を併用していた。ソンネ菌検査の場合には病原プラスミド脱落のないソンネ1相菌を検査することが重要である。SS培地は1相菌を選択することが出来るので赤痢菌検査の場合SS培地の使用が望ましい。生化学的性状検査の実施状況では20ヶ所で酢酸ナトリウム利用試験を実施していた。本試験は粘液酸試験と共に

赤痢菌と大腸菌鑑別に必須の検査である。粘液酸試験は培地が市販されていないため自作する必要があるが、酢酸ナトリウム利用試験は日本ベクトン・ディッキンソン(日本BD)から生培地、粉末培地共が市販されているので容易に使用できる。

各地衛研の試料1から3の生化学的性状検査結果のまとめから乳糖、白糖の検査結果が2か所の地衛研は陽性と報告された。これは使用培地がTSIの場合には翌日判定のため陰性となるが、陽性となった地衛研は単糖代謝確認培地を用い1週間観察したため、遅分解で陽性となったと考えられる。通常の赤痢菌検査では短期間で結果を出す必要があるためTSIを用いることが望ましい。また、軽微な誤記(陽性、陰性の誤り)が4か所で認められた。また、「ブドウ糖からのガス産生」で明らかに赤痢菌の性状を誤って認識していると思われる誤記が1か所に認められた。当該地衛研はTSI培地を用いてブドウ糖からのガス産生を検査していた。培地が古い場合、亀裂が入りガス産生陽性と見誤ったことも考えられる。しかし、病原菌の基礎知識を持った職員ならば容易に指摘できる。今後、病原菌の知識を持った複数の職員での検査結果のチェック体制を確立することが望まれる。

使用した培地では運動性の確認にLIMが17か所、SIMが7か所、半流動培地が3か所であった。運動性の確認は赤痢菌と大腸菌鑑別で重要な項目である。経験的にLIMよりもSIMを用いた方が運動性を確認しやすい。また、今回は培養温度について回答を求めなかったが、30℃培養を行うと運動性を確認しやすい場合があるので37℃と併用することも一助となる。また、アルギニンジヒドラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、マロン酸利用、及びウレアーゼの検査に市販の同定キットが最も多く使用されていた。年間の検査件数が少ない赤痢菌検査の場合、同定キットを使用することは粉末培地等を購入するより経済的である。しかし、同定キットは運動性の確認が出来ないため、必ず運動性を確認する培地を併用する必

要がある。釣菌するコロニー数では2ヶ所は1個のみであった。コロニーによって性状が異なる場合は多々あるので1平板あたり3から5コロニーを釣菌することが望ましい。

血清凝集試験では試料1で11か所が複数の多価血清に凝集するため、または凝集が認められなかったため陰性と報告した。これらの地衛研は、1) 菌液濃度の異なった懸濁液で行う、2) 複数の職員で確認する、3) 赤痢菌の凝集反応は生菌で行うに留意して再度検査を行ってほしい。今後は実習を含めた研修会の実施も必要であると思われる。

遺伝子検査では3か所が *invE* のみの実施であった。*invE* は病原プラスミド上に存在し、継代培養等で脱落する可能性があることが知られている。事実、試料2で2か所からソンネⅡ相の場合、*invE* が陰性と報告していた。赤痢菌同定PCRのプライマーセットは1種類の場合には *ipaH* を用いることが望ましい。加えて、前述のとおりSS培地でソンネⅠ相菌を選択することも重要となる。

使用している赤痢菌免疫血清についてのアンケート集計から大半の地衛研ではAからDまでの多価血清に各多価血清の因子血清を加えたフルセットの1号セットを使用していた。1か所では2号セットのみ使用していた。2号セットはAからDまでの多価血清に我が国で検出される赤痢菌の大部分を占めるB(フレキシネル)とD(ソンネ)の因子血清のみを備えたセットである。1号セットは定価132,000円と高価であるが、2号セットは定価56,280円と半額以下で購入ができる。我が国でA(志賀菌)、C(ボイド菌)がほとんど検出されないことからそれぞれの地衛研の予算状況等を考慮に入れた対応が必要である。

遺伝子検査のアンケートではこれまで赤痢菌検査に遺伝子検査を実施していなかった1ヶ所の地衛研から以下のコメントがあった。「現行の標準作業書では血清型別試験の結果で判定を行うこととされており、遺伝子検査まで記載していません。今回、血清型別試験で非特異的凝集(乳白色の背景に凝集塊を観察)が疑われたため、PCR

を実施し判定を行いました。新血清型赤痢をはじめ、今後は遺伝子検査が必要と思われるので、標準作業書の改定を行う予定です。ただしPCRでは腸管侵入性大腸菌(EIEC)と赤痢菌の鑑別はできないので、酢酸ナトリウム利用試験など、生化学的性状試験に関しても標準作業書改定の際には検討したいと考えています。」標準作業書の不備に気づき、改定を行うこととなったことは今回の赤痢菌外部精度管理試行のひとつの大きな成果と言える。

今回の精度管理試行の結果を基にして、細菌検査の外部精度管理を実施するために、全体のプロセスを検体の選択、検体の作製と送付、結果の解析と評価の3段階分けた外部精度管理プロトコル案を作成した(図1)。

最後に参加地衛研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『赤痢菌』の同定について外部精度管理調査を実施し、27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、赤痢菌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。

赤痢菌同定には0抗原検査、生化学的性状、遺伝子検査結果を総合的に判断すべきである。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

関連発表なし

2. 学会発表

1) 松本昌門、皆川洋子 「地方衛生研究所に対する外部精度管理調査の試行について」第54回日本細菌学会中部支部総会 名古屋市 2017.10.13

2) 松本昌門 「赤痢菌検査と精度管理」平成 29
年度希少感染症診断技術研修会 東京都
2018.2.28

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

参考文献

1) ISAR 編集委員会等 ミニ特集 赤痢菌の検査
法の問題点と解決策 病原微生物検出情報
(IASR) 24(9):208-214, 2003.

添付資料

図 1 外部精度管理プロトコール案

別添 1 実施時送付書類書式等

別紙 1 菌株発送容器の準備

別紙 2 病原体等輸送チェックリスト(簡易版)

別紙 3 参加申込書(誓約書)書式

付) BSL2(3)実験室確認書 記載例

(赤痢菌送付に合わせたもの)

別紙 4 検査結果報告書

別紙 5 検査経過記録書

付) アンケート

別紙 6 赤痢菌検査注意書

別添 2 実施案内(2017年5月15日)

別添 3 菌株搬送容器送付案内(2017年5月8日)

表 1~14

図1 外部精度管理プロトコル案

図1 外部精度管理プロトコル案

検体の選択

- 臨床分離または保存株から複数の候補株を選ぶ。
- 選択分離培地で発育状況、色調、コロニーの大きさや形状の確認
- 生化学的性状確認試験で性状の確認
- 血清凝集試験でO、H抗原凝集の確認
- 病原菌可定用遺伝子検査での確認。
- 毒素産生菌の場合には遺伝子検査と毒素産生性試験を行い毒素遺伝子、産生性の確認



検体の作製と送付

- 検体を平板培地で一夜培養する。非病原菌を加える時は同様に培養する。
- 平板培地に発育した菌体を生理食塩水等で適切に希釈する。
- 非病原菌を加える時は検体と非病原菌を希釈した後、適切な割合で混合する。
- 希釈した検体を適量輸送用培地に加える。
- 検体をジュラルミン製四次容器に梱包し、ゆうパックで送付。
- 当日発送しない場合は冷蔵保管する。
- 作成した検体を選択分離培地に塗抹し、性状等確認(作成当日と送付先到着日1から3日後まで検査)



結果の解析と評価

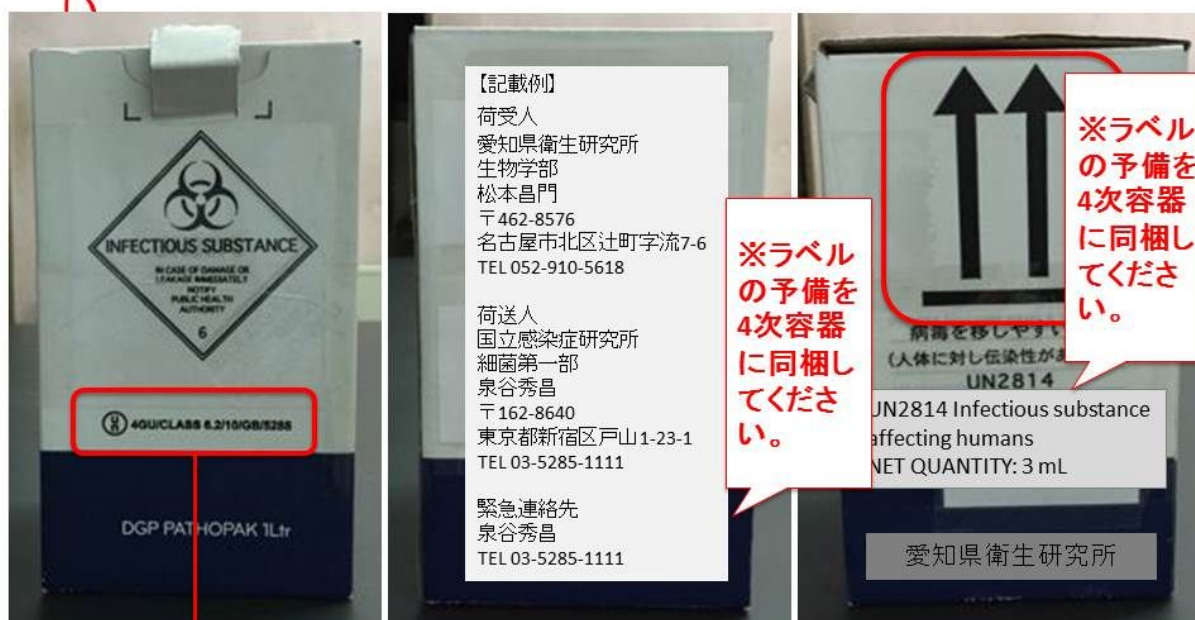
- 検査結果報告書、検査経過報告書等を検体と同時に送付し、期日までに回答を得る。
- 解析は、検査成績(菌名等)と選択分離培地での性状。生化学的性状確認試験、血清凝集試験、遺伝子検査での結果。毒素産生菌の場合には遺伝子検査と毒素産生性試験の結果を確認する。
- 報告書の作成、報告会の開催を行い、参加者に結果の還元を行う。

別紙1 菌株発送容器の準備

1. 地研名を記載した二次容器に、一次容器を包むための吸収材（ペーパータオルなど）とエアクッションとを入れます。

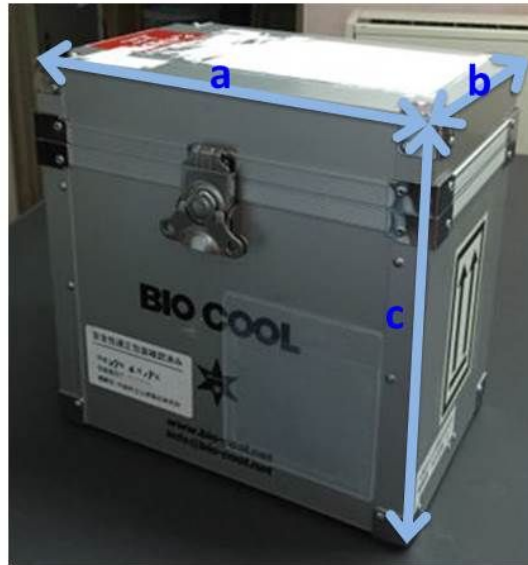
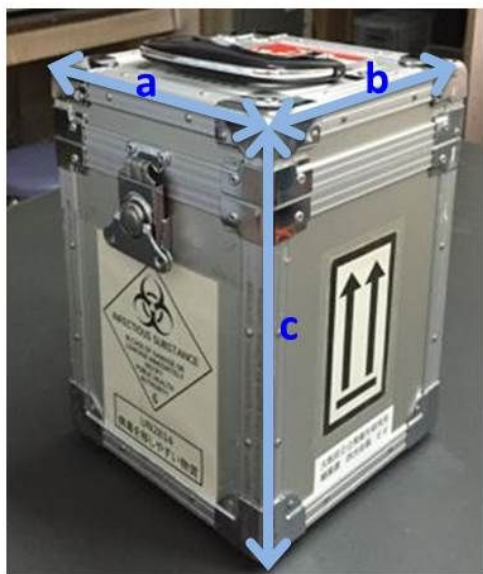


2. 三次容器には国連規格容器を使用し、①感染性物質であること、UN2814、内容量（3 mL）、②荷受人（地研名）、荷送人（感染研）、緊急連絡先（感染研）、③天地無用マークを表示します。（四次容器と同じ表示）。**※ラベル①と②は予備を各1枚4次容器に同梱してください。**



国連マークをラベルで隠さないようにしてください

3. 菌株搬送容器(四次容器)には、ゆうパック 80サイズ(三辺の計が 80cm以内)までの大きさのものを使用します。



$$a + b + c = 80 \text{ cm 以内}$$

4. 菌株搬送容器の1面に感染性物質であることを表示します。



5. 菌株搬送容器の別の1面に荷受人、荷送人、緊急連絡先を明示します。荷送人、緊急連絡先は下記のとおりにしてください。



荷受人【記載例】
愛知県衛生研究所
生物学部
松本昌門（← 貴機関担当者等のお名前）
〒462-8576
名古屋市北区辻町字流7-6
TEL 052-910-5654

荷送人
国立感染症研究所
細菌第一部
泉谷秀昌
〒162-8640
東京都新宿区戸山1-23-1
TEL 03-5285-1111

緊急連絡先
泉谷秀昌
TEL 03-5285-1111

6. 菌株搬送容器に内容量（3 mL）、OVERPACK、天地無用マークの表示をしてください。



OVERPACK

UN2814 Infectious substance
affecting humans
NET QUANTITY: 3 mL

7. 三次容器と菌株搬送容器の間にクッション材を入れます。



今回は小型温度記録装置は入れません。

隙間にはクッション材を入れてください。

8. ゆうパック送り状に宛先、差出人などを記載して、菌株搬送容器に貼り付けます。

© 大切なお荷物を、しっかりと丁寧にお届けします。

ゆうパック 日本郵便

（ゆうパック専用）
集荷お申込み先 0800-0800-111（無料）
お問い合わせ先 0800-0800-222（無料）
（携帯電話ご利用のお客様） 0570-0800-222
配達状況お問い合わせ http://www.post.japanpost.jp

① 1回限り有効
② 1回限り有効
次回同じ住所へ送る場合、この「依頼主」をお持ちください。一度の条件で準備を切り引きます。有効期間は1年間です。
●この「依頼主」は、お問い合わせや損害賠償の請求の際に必要です。大切に保管してください。
●損害賠償の限度額は原則として30万円です。
●特に補償が必要な場合はセキュリティゆうパックをご利用ください。
●危険品・荷重のお取扱いはできません。
●その他取扱いはゆうパック約款によります。

取扱所
担当

〒162-8640
東京都新宿区戸山1-23-1
国立感染症研究所
細菌第一部
泉谷 秀昌 様

〒03-5285-1111

郵便事業株式会社 〒100-8798 東京都千代田区霞が関1-3-2
運送料一万円未満（印紙税は非課税）
記載された個人情報等は運送業務の遂行のために使用いたします。

お問い合わせ番号 6401-0404-3154

配達希望日 5月15日
配達予定日 年 月 日

配達希望時間帯
午前中 12時～14時 14時～16時 16時～18時 18時～20時 20時～21時 希望しない

品名 危険物, 病原体
品名は必ず記載してください。
（ごわれもの） なまもの（） ビン類 逆さま厳禁 下積み厳禁

（依頼主）

JP 日本郵便

a 6 4 0 1 0 4 0 4 3 1 5 4 a

9. 準備が整った菌株搬送容器を紙袋に入れて封をし、元払いで送ってください。



【送り先】

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所 細菌第一部

泉谷 秀昌 先生

TEL 03-5285-1111

【配達希望日】

5月15日を記載する

【品名】

菌株搬送空容器(精度管理参加)

付録 適当な大きさに印刷してお使いください。



UN2814
病毒を移しやすい物質

荷送人 国立感染症研究所細菌第一部

泉谷 秀昌

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

TEL 03-5285-1111

緊急連絡先 泉谷 秀昌

TEL 03-5285-1111

OVERPACK

UN2814 Infectious substance
affecting humans

NET QUANTITY: 3 mL

菌株搬送容器発送チェックシート

二次容器（ねじ蓋プラスチック容器）

- 三次容器とセットになった国連規格容器を使用している。
- 二次容器に地研名を記載している。
- 二次容器にエアクッションと吸収材（ペーパータオルなど）を入れている。

三次容器（紙箱）

- 二次容器とセットになった国連規格容器を使用している。
- 三次容器に感染性物質であることを表記している。
- 三次容器に荷受人（地研） 荷送人（感染研） 緊急連絡先（感染研） 天地無用マークを表記している。
- 三次容器に内容量（3mL）を記載している。
- 三次容器に二次容器を入れている。

菌株搬送容器（四次容器；ジュラルミンケース）

- 菌株搬送容器に感染性物質であることを表記している。
- 菌株搬送容器に荷受人（地研） 荷送人（感染研） 緊急連絡先（感染研） 天地無用マークを表記している。
- 菌株搬送容器に内容量（3mL）を記載し、OVERPACK と表記している。
- 菌株搬送容器に三次容器を入れている。
- 菌株搬送容器に、別紙 1 1.及び 2.で指定した予備のラベル 3 枚を入れている。
- 菌株搬送容器に記入済みのゆうパック送り状を貼っている。
- 菌株搬送容器を紙袋に入れて封をしている。

発送

- 感染研への到着日は、5月15日を指定している。
- 品名に「菌株搬送空容器（精度管理参加）」と記入している。

参加申込書及び誓約書

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

厚生労働科学研究「精度管理研究」班

研究代表者 皆川 洋子 様

(検体発送担当：国立感染症研究所 細菌第一部 大西 真 様)

平成 29 年 2 月 27 日 付けでご案内いただいた「細菌感染症検査における外部精度管理」について、参加条件を了承し、参加を申し込みます。実施にあたっては、特定病原体四種に応じた施設基準、保管、使用、運搬、滅菌等の基準(厚生労働省令)を遵守いたします。

施設名 _____

所属部課名 _____

実施担当者 _____

住所 _____

電話番号 _____

メールアドレス _____

特定病原体移動責任者 _____

申込書送付先： 細菌小班外部精度管理調査事務局(愛知県衛生研究所) E-mail : eiseiken@pref.aichi.lg.jp

付) BSL2(3)実験室確認書 記載例 (赤痢菌送付に合わせたもの)

BSL2-(3)実験室確認書

(分与様式5に添付)

2017年 4月21日

BSL2-(3)実験室確認書

実験室名: 安全実験室 (BSL2)

上記 実験室はBSL2-(3)実験室としての設備および運営の要件を満たしています。

なお、以下に該当する場合、

- (1) 特定病原体等の場合、所持許可 (二種)を得ている、又は届出(三種)をしている (或いは受領後届出予定)
- (2) 監視伝染病病原体の場合、所持許可 (重点管理、又は要管理)を得ている、又は届出をしている
- (3) 遺伝子組換え生物の場合、実験承認を得ている

ことを確認しています。 今回(1)~(3)には該当しません。

バイオセーフティ管理者: 松本 昌門

(またはそれに該当する方)

所属・役職: 愛知県衛生研究所・生物学部長

注: WHO コラボレーションセンターを除く、検査研究依頼時に依頼先施設に作成を依頼する。

別紙 4 検査結果報告書

地衛研精度管理研究班による平成 29 年度外部精度管理細菌検査報告書

平成 年 月 日

機関名

代表者氏名

検査責任者氏名

検査担当者氏名

住所 〒

TEL 番号

FAX 番号

連絡先 E mail

「地衛研精度管理研究班」による平成 29 年度外部精度管理細菌検査結果について、以下のとおり報告します。

		該当する結果を で囲み、必要な情報を記載下さい		
		結果 根拠とした検査結果 (血清型、生化学的性状、遺伝子等)		
例示		陽性	・	陰性 0 抗原(+)、生化学的性状(+), 赤痢菌遺伝子(+)
赤痢菌の 同定結果	試料 1	陽性	・	陰性
	試料 2	陽性	・	陰性
	試料 3	陽性	・	陰性

なお、報告の詳細は別添の「H29 赤痢菌検査経過書」に記載願います。

細菌感染症検査の精度管理 検査記録書 (H29 年三類感染症赤痢菌疑いの検査)

本検査記録書は、今後の外部精度管理調査の結果の解析等の基礎データ作成のために使用いたしますので、実施した内容について、できる限り正確にご記入願います。

- 緑のセル: クリックすると選択肢が表示されます。表示された選択肢リストより該当するものを選択してください。
- ピンクのセル: 緑色のセルで「その他」を選択した場合のみ具体的に記述してください。
- 紫のセル: ご自由に記述してください。

担当者情報

赤痢菌精度管理検査担当者

1
2
3

氏名

担当

赤痢菌検査 細菌検査
経験年数 経験年数
(トレーニングも含む)

検体受付情報

受取日時

月 日 時 分

開封日時

月 日 時 分

検体保管場所

その他




検体の状況

不良の状況

ご協力ありがとうございました。

細菌感染症検査の精度管理 検査記録書 (H29 年三類感染症赤痢菌疑いの検査)




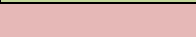
本検査記録書は、今後の外部精度管理調査の結果の解析等の基礎データ作成のために使用いたしますので、実施した内容について、できる限り正確にご記入願います。

-  緑のセル: クリックすると選択肢が表示されます。表示された選択肢リストより該当するものを選択してください。
-  ピンクのセル: 緑色のセルで「その他」を選択した場合のみ具体的に記述してください。
-  紫のセル: ご自由に記述してください。

検査 開始日時 月 日 時 分

分離培養検査




検査に使用した選択分離培地

1		2		3		4	
							






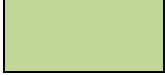














検体番号

生化学的性状検査

釣菌したコロニー数

	1	2	3
			

実施した検査項目を記載してください

	検査項目	使用した培地	結果			
			検体番号 1	2	3	
1	ブドウ糖発酵試験					
2	乳糖及び白糖発酵試験					
3	乳糖発酵試験					
4	白糖発酵試験					

5	ブドウ糖からのガス産生試験					
6	リジン脱炭酸試験					
7	インドール産生性試験					
8	運動性試験					
9	VP(アセトイン産生性)試験					
10	クエン酸利用試験					
11	アルギニンジヒドラーゼ試験					
12	オルニチンデカルボキシラーゼ試験					
13	マロン酸利用試験					
14	酢酸ナトリウム利用試験					
15	粘液酸					
16	ウレアーゼ試験					
17	その他					
18	血清凝集試験					

血清凝集試験

血清型または凝集した血清

血清型または凝集した血清

遺伝子検出試験

実施した検査項目を記載してください

1	PCR 法による赤痢菌遺伝子検査		使用プライマー	検体番号		
				1	2	3
2	増幅した遺伝子	増幅した遺伝子名1	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>
		市販プライマーのメーカー名				
		その他のプライマーの参考文献				
2	増幅した遺伝子	増幅した遺伝子名2	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>
		市販プライマーのメーカー名				
		その他のプライマーの参考文献				
2	増幅した遺伝子	増幅した遺伝子名3	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>
		市販プライマーのメーカー名				
		その他のプライマーの参考文献				
3	使用した機器名					
4	電気泳動装置機器名					
5	その他 (リアルタイム PCR 装置等) ご協力ありがとうございました。					

付) 平成 29 年度赤痢菌外部精度管理アンケート

検査結果報告書、検査経過記録書と重複する内容もありますが、ご回答くださいますようお願いいたします。

緑のセル: クリックすると選択肢が表示されます。表示された選択肢リストより該当するものを選択してください。選択肢が読めない場合は、「データ」> データの入力規則 > データの入力規則を選択するとそのセルの選択肢を見ることができます。

紫のセル: ご自由に記述してください。

地研名	
回答者氏名	
連絡先 e-mail	

A. 日常使用している培地や試薬についてお答えください。

選択分離培地	SS 寒天	
	SSB 寒天	
	DHL 寒天	
	マッコンキー寒天	
	BTB 乳糖寒天	
	その他	

性状確認培地	TSI	
	LIM	
	SIM	
	VP	
	クエン酸利用試験	
	マロン酸利用試験	
	酢酸ナトリウム利用試験	
	ウレアーゼ試験	

単糖代謝確認培地	
アミノ酸脱炭酸培地	
粘液酸塩からの酸産生確認用培地	
簡易同定キット	
その他	

血清凝集反应用試薬	赤痢菌免疫血清「生研」1号セット	
	赤痢菌免疫血清「生研」2号セット	
	赤痢菌免疫血清「生研」3号セット	
	セットではなく単品血清のみ	
	その他	

PCR 法による赤痢菌遺伝子検査

PCR 法による遺伝子検査	
標的遺伝子名1	
標的遺伝子名2	
標的遺伝子名3	

プライマー	市販プライマーのメーカー名	その他のプライマーの参考文献
プライマー	市販プライマーのメーカー名	その他のプライマーの参考文献
プライマー	市販プライマーのメーカー名	その他のプライマーの参考文献

質問 A について、追加事項、ご意見などを自由にご記入下さい

ご協力ありがとうございました。

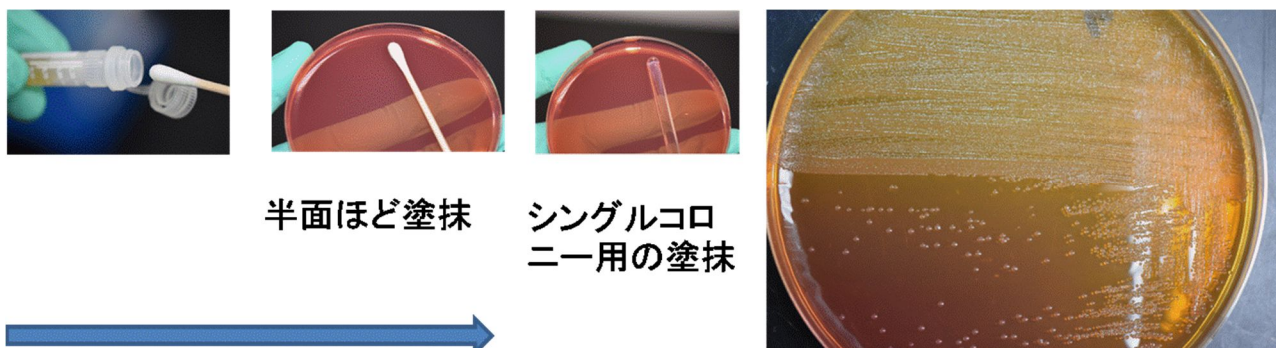
地衛研精度管理研究班による平成 29 年度外部精度管理細菌検査
検体処理注意書き

精度管理内容

地衛研精度管理研究班による平成 29 年度外部精度管理細菌検査については、模擬臨床検体（分離株）から赤痢菌の同定を実施することとする。

なお、検査法は各機関の標準作業書に準拠して行うこと。また、あわせて、「赤痢菌検査・診断マニュアル、平成 24 年 6 月改訂」感染研 HP (<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/shigella.pdf>) を参考とされたい。

但し、送付検体（チューブ）の菌株を発育させる際には、以下の方法に準拠すること。チューブ内の発育菌量は少ないので、滅菌綿棒にて、チューブの培地表面から菌を十分採材する。寒天平板培地の半面に、当該綿棒で検体を十分に塗抹する。その後、白金耳等にて単独集落の形成を目的に塗抹する。SS 寒天培及び他の寒天平板培地を使用すること。



以上

別添 2 事前連絡先確認(2017年4月17日付電子メール文)及び実施案内(2017年5月15日)

2017年4月17日

昨年度試行参加が内定している地方衛生研究所全国協議会会員各位
(細菌検査部門管理者様)

このお知らせは、平成29年3月22日付にて、下記の赤痢菌精度管理試行へのご参加が内定している会員(地研)に送信しています。

今後の連絡を確実にを行うため、担当者連絡先(氏名・電子メール及び電話)及び菌株等送付先住所(確実に郵送されるよう必要な場合は部署等も明記してください)を確認させていただきたいので、添付ファイル形式により、4月24日(月)までに電子メールにて返信をお願いします。

記

1. 実施項目: 三類感染症検査に係る「赤痢菌」の同定

赤痢菌を含む試験菌株3種類程度をお送りする予定。

2. 実施時期: 平成29年4月 参加申し込み案内

平成29年5月中旬～下旬頃検体配付(参加施設に到着予定)

平成29年6月末 結果提出締切り(予定)

3. 参加条件:

(1) 検体(四種病原体)は国立感染症研究所(感染研)からゆうパックで送ります。参加施設は、「菌株搬送容器」を後日連絡する指定日に到着するよう発払いにて送付いただきます。

(2) 配付検体は特定病原体を含む試料ですので、その取扱いや保管等については、あらかじめ参加申込書の中で誓約し提出していただきます。

(3) 締切日までに検査結果を送付いただくほか、実施に関連したアンケート調査に回答していただきます。

愛知県衛生研究所 松本昌門、皆川洋子

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

TEL:052-910-5604(直通), 5618(代表)

FAX:052-913-3641

平成29年5月15日

各衛生研究所長 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会
厚生労働科学研究「精度管理研究」班
研究代表者 皆川 洋子（愛知県衛生研究所長）

細菌感染症検査における外部精度管理の実施について（ご案内の2）

地方衛生研究所全国協議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。

さて、平成29年2月27日付けでご案内しました標記の件について、参加の申込をいただきまして、ありがとうございました。

つきましては、実施に当たり、下記の書類を送付いたしますので、締切日（平成29年6月12日）までにご回答くださるよう、お願い致します。

記

1. 実施項目：三類感染症検査に係る「赤痢菌」の同定
2. 実施時期：平成29年5月19日検体配布（参加施設に22日到着予定）
平成29年6月12日結果提出締切り
3. 送付書類： 検査結果報告書（別紙4）
H29赤痢菌検査経過記録書（アンケートシート有）（別紙5）
赤痢菌検査注意書（別紙6）

4. 結果の送付：平成29年6月12日締切り

検査結果報告書（別紙4） H29赤痢菌検査経過記録書（別紙5）を下記メールアドレスへ送信してください。

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

5. 問い合わせ先：研究代表者 皆川洋子

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

別添 3 菌株搬送容器送付案内

平成 29 年 5 月 8 日

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
厚生労働科学研究「精度管理研究」班
研究代表者 皆川洋子
(愛知県衛生研究所長)

細菌感染症検査における外部精度管理用菌株搬送用容器の感染研への送付について

地方衛生研究所全国協議会および研究班の活動にご協力ありがとうございます。

さて、平成 29 年 2 月 27 日付けで参加希望の照会を致しましたところ、ご参加の申込をいただきありがとうございました。つきましては、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を参考にして菌株搬送容器を 5 月 15 日(月)に感染研に到着するよう送付お願いします。感染研からの搬送状況確認のために、送付する容器に貼り付けた送付状(郵パック伝票)の番号を必ず記録しておいてください。なお、ご都合の悪い機関については、ご連絡ください。調整させていただきます。

併せて別紙 3 参加申込書及び誓約書を愛知県衛生研究所まで電子メールでの送付よろしく申し上げます。

記

送付書類

- 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

送付及び問い合わせ先：研究代表者 皆川洋子(愛知衛研)
eiseiken@pref.aichi.lg.jp

表1 実施スケジュール

日 時	内 容
平成 29 年 1 月 11 日	平成 29 年度実施計画案作成
2 月 27 日	参加希望地衛研案内
3 月 13 日	参加地衛研選考
4 月 17 日 4 月 17 日以降	参加地衛研内定案内 参加地衛研へ BSL2 実験室確認書発送
5 月 8 日 15 日 19 日 22 日	菌株搬送用空容器の感染研への送付案内 外部精度管理実施案内 感染研から試料発送 地衛研への試料到着
6 月 12 日まで	検査結果回収
10 月 24 日	細菌コア WG 会議
11 月 17 日	正解の送付
平成 30 年 2 月 28 日	希少感染症技術診断研修会で報告

表2 検査結果報告書の集計

試料	判定結果	根拠とした検査結果	施設数
1. <i>Escherichia coli</i> ボイド9型(+)	陽性		0
	陰性	0 抗原(+)、生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-) 0 抗原(-)、生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-) 生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-)等	27
2. <i>Shigella sonnei</i>	陽性	0 抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)	27
	陰性		0
3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	陽性	0 抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)	27
	陰性		0

表3 担当者の内訳と検査経験

担当	記載数	細菌検査の経験			赤痢菌検査の経験		
		なし	5 年以内	6 年以上	なし	5 年以内	6 年以上
検査担当者	53	1	31	21	11	28	14
検査区分責任者	8	1	2	5	2	4	2
その他	2		2		2		
合計	63	2	35	26	15	32	16

表 4 分離培養検査に使用した培地

使用培地	施設数
SS+DHL	16
SS+DHL+BTB	2
SS+DHL+マッコンキー	2
SS+BTB	1
SSB+DHL	1
SS+DHL+SSS	1
SS+DHL+SSSB	1
SS+DHL+白糖加 SS	1
SS+DHL+BTB+SSK	1
普通寒天	1
計	27

表 5-1 生化学的性状検査(1)

検査項目	実施	未実施
ブドウ糖発酵試験	27	0
乳糖及び白糖発酵試験	27	0
ブドウ糖からのガス産生試験	27	0
リジン脱炭酸試験	27	0
インドール産生性試験	27	0
運動性試験	27	0
クエン酸利用試験	23	4
V P (アセトイン産生性) 試験	21	6
酢酸ナトリウム利用試験	20	7

表 5-2 生化学的性状検査(2)

検査項目	実施	未実施
オルニチンデカルボキシラーゼ試験	18	9
アルギニンジヒドラーゼ試験	16	11
ウレアーゼ試験	15	12
白糖発酵試験	12	15
マロン酸利用試験	12	15
乳糖発酵試験	7	20
粘液酸	6	21
その他	14	13

表 6-1 試料 1 から 3 の検査結果 (1)

検査項目	1.		2.		3.	
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Shigella flexneri 2a</i>	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
ブドウ糖	26	0	27	0	27	0
乳糖及び白糖	0	27	0	27	0	27
乳糖	1	5	1	6	0	7
白糖	1	10	0	12	0	12
ブドウ糖からのガス産生	1	25	1*	26	1	26
リジン	0	26	0	27	0	27
インドール	26	1*	0	27	0	27
運動性	0	27	0	27	0	27

* : 誤記

表 6-2 試料 1 から 3 の検査結果 (2)

検査項目	1.		2.		3.	
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Shigella flexneri</i>	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
V P	0	20	0	21	0	21
クエン酸	0	22	0	23	0	23
アルギニン	0	15	0	16	0	16
オルニチン	0	17	18	0	0	18
マロン酸	0	11	0	12	0	12
酢酸ナトリウム	18	1*	0	20	0	20
粘液酸	5	1*	0	6	0	6
ウレアーゼ	0	14	0	15	0	15

* : 誤記

表 7-1 使用した培地 (1)

検査項目	TSI	単糖代謝	その他	
ブドウ糖	26	1		
乳糖及び白糖	27			
乳糖		6	1	
白糖		4	8	
ブドウ糖からのガス産生	20	7		
検査項目	LIM	SIM	その他 (培地名)	
リジン脱炭酸	24		3	メラー培地、リジン脱炭酸
インドール	27			
運動性	17	7	3	半流動培地

表 7-2 使用した培地 (2)

検査項目	培地等
VP 試験	VP 培地 (17) 市販キット (4)
クエン酸	シモンズ (18) シモンズ+クリステンゼン (4) 市販キット (1)
アルギニンジヒドラーゼ	市販キット (10) メラー培地 (6)
オルニチンデカルボキシラーゼ	市販キット (11) メラー培地 (7)
マロン酸	市販キット (8) マロン酸 (4)
酢酸ナトリウム	酢酸ナトリウム (18) 酢ナト加シモンズ (2)
粘液酸	自家調製 (3) K-P 粘液酸培地 (1)
ウレアーゼ	市販キット (12) ウレアーゼプロス (1) Urea 培地 (1)
その他	CLIG 培地 (4) クリステンゼン (3) 等

表 8 血清凝集試験

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i> (ボイド 9 型)		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
血清凝集	15	11	27	0	27	0

表 9 赤痢菌遺伝子検査

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i> (ボイド 9 型)		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
<i>ipaH</i>	0	24	23	1*	24	0
<i>invE</i>	0	25	25	0	25	0

* : 誤記

表 10 日常使用している選択分離培地

選択分離培地	使用している	使用していない
SS 寒天	24	3
DHL 寒天	24	3
マッコンキー寒天	5	22
BTB 乳糖寒天	3	24
SSB 寒天	2	25

表 11 日常使用している確認培地

生化学的性状確認培地	使用している	使用していない
TSI	27	0
LIM	27	0
クエン酸利用試験	21	6
VP	19	8
SIM	18	9
簡易同定キット	17 (2)	11
酢酸ナトリウム利用試験	15	12
単糖代謝確認培地	12	15
アミノ酸脱炭酸培地	9	18
マロン酸利用試験	6	21
粘液酸塩からの酸産生	5	22
ウレアーゼ試験	5	22

(再掲): 必要に応じて使用

表 12 日常使用している免疫血清

血清凝集反应用試薬	使用している	使用していない
赤痢菌免疫血清「生研」1号セット	25	1
赤痢菌免疫血清「生研」2号セット	4	22
赤痢菌免疫血清「生研」3号セット	2	24
セットではなく単品血清のみ	0	26

表 13 日常実施している遺伝子検査

	実施している	実施していない
遺伝子検査	25 (PCR:23, Real time PCR:1, LAMP:1)	2
標的遺伝子(25)		
<i>ipaH</i> & <i>invE</i>	20	
<i>ipaH</i>	2	
<i>invE</i>	2	
<i>ipaH</i> & <i>invE</i> & <i>virA</i>	1	
プライマー (25)		
市販プライマー	20 (TaKaRa)	
その他	5 (病原体検出マニュアル、学術論文等)	

表 14 赤痢菌検査のポイント

		ポイント
1	血清型別試験	赤痢菌の血清に凝集する大腸菌があることを知っているか。 多価と因子血清を検査できる免疫抗血清を備えているか。
2	生化学的性状試験	赤痢菌と大腸菌と鑑別する生化学的性状（培地）を知っているか。
3	運動性の確認	運動性がないことが赤痢菌の絶対的な性状であることを認識して、運動性の確認に適した培地を使用しているか。
4	遺伝子検査	<i>invE</i> はプラスミド上に存在し、脱落する可能性を知っているか。 <i>ipaH</i> を検出しているか。
5	類似菌との鑑別	類似菌として <i>E. coli</i> 、 <i>Morganella morganii</i> 、 <i>Plesiomonas shigelloides</i> を認識しているか。