

平成 30 年度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）
病原微生物検査体制の維持・強化に必要な地方衛生研究所における人材育成及び
地域における精度管理に関する協力体制構築に向けた研究
分担研究報告書

赤痢菌検査におけるコンピテンシー作成

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
	鈴木 淳	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
	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
	村上光一	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
	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：前研究班で実施した外部精度管理試行のフィードバックとして、また本研究班の目的である人材育成の一環として赤痢菌検査におけるコンピテンシーを作成した。赤痢菌検査の手順に基づいて検査担当者、検査区分責任者及び部門管理者それぞれに求められる 7 のコンピテンシー、各コンピテンシーに 2 から 8 を含む計 33 のサブコンピテンシーを作成した。来年度は作成したコンピテンシーを用いた研修会を実施しその実用性の評価等を行う予定である。

A. 研究目的

平成 28 年 4 月改正感染症法施行に伴い地方衛生研究所（地衛研）では「病原体検査の質」を確保する必要性が生じた。そこで前研究班では外部精度管理体制構築のため、赤痢菌検査の外部精度管理試行を実施した。

本研究班では前研究班活動を引き継ぎ人材育成の一環として病原体検査レベルの底上げ及び均一化を図るために、今年度は検査担当者に求められるコンピテンシーを赤痢菌検査をモデルとして作成した。

B. 研究方法

1. 対象とした三類感染症

前研究班では、赤痢菌の同定は地衛研が行う場合があること、赤痢菌検査の経験がある地衛研職員が少なくなったこと、及び他の病原菌に比べ誤同定が多いことから、外部精度管理試行は赤痢菌を対象とした。そこで本研究班では、コンピテンシーは「三類感染症検査に係る『赤痢菌』」を対象として作成することとした。

2. 実施組織

6 か所の地衛研と国立感染症研究所（感染研）の研

研究協力者からなるワーキンググループ（細菌小班WG）を立ち上げた。また赤痢菌検査のコンピテンシー作成などの実務は4か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細菌小班コアメンバーが担った。細菌小班コアメンバーで検討した内容は細菌小班WGに諮り、最終稿とした。

3. 赤痢菌検査におけるコンピテンシー作成過程

平成30年6月1日に開催した第1回全体会議において細菌小班WGで検討を行い、コンピテンシーの対象を三類感染症の赤痢菌とすることとした。細菌小班コアメンバーから提出された素案を基にしてコンピテンシー及びサブコンピテンシー案を作成した。作成案を平成10月26日に細菌小班コアメンバーに送付した。後日、提出された意見を基に加筆、削除など修正を行った。平成30年12月5日に修正案を作成し、コアメンバーに送付した。その後、提出された意見を基に加筆、削除などを行い、最終稿とした。

C. 研究結果

赤痢菌検査におけるコンピテンシー及びサブコンピテンシー

赤痢菌検査の各手順（図1）に基づいて7のコンピテンシーを挙げた（表1）。そして、7のコンピテンシーそれぞれについて、検査担当者、検査区分責任者及び部門管理者に求められる2から8のサブコンピテンシーをあげた（表2）。

（なお、サブコンピテンシーを挙げるにあたり、前

研究班で試行した外部精度管理で認められた誤りやすい点などを参考にした。）

D. 考察

前研究班で実施した外部精度管理試行のフィードバックとして、また本研究班の目的である人材育成の一環として、本研究班では赤痢菌検査におけるコンピテンシーを作成した。

検査担当者はこれらコンピテンシーをマスターすることで、前研究班で行った外部精度管理試行の試料2,3の赤痢菌を陽性と正しく判定できるのみならず、試料1の赤痢菌血清に凝集する大腸菌も赤痢菌陰性と正しく判定できるようになることが期待される。

来年度は本コンピテンシーを用いた研修会を行い、その実用性の検証等を行う予定である。

E. 結論

三類感染症検査に係る赤痢菌検査のコンピテンシーを作成した。今後は、その実用性について研修会を通して評価を行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

特になし

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

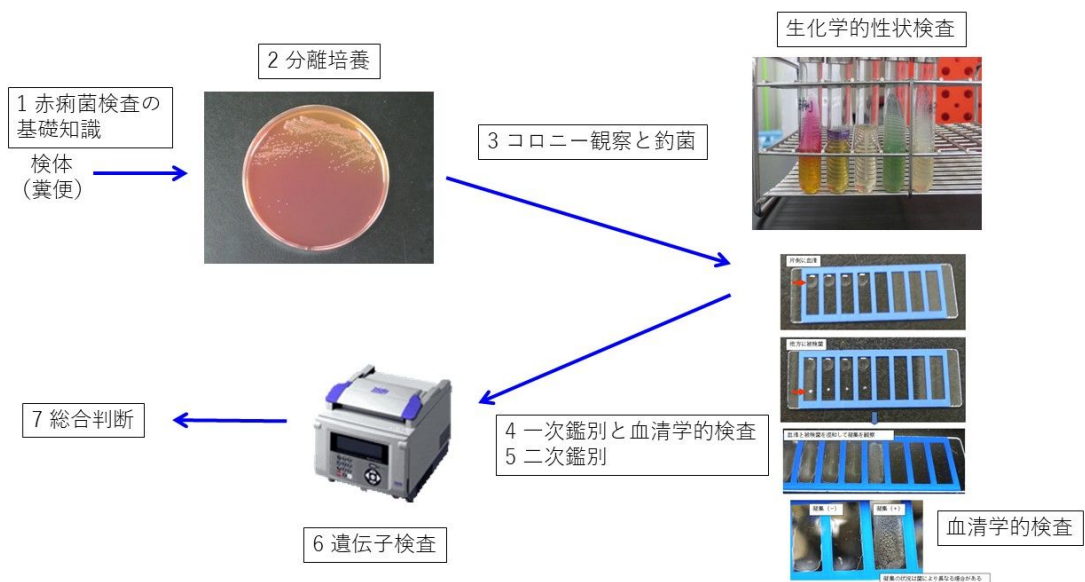


図1 赤痢菌検査の手順とコンピテンシー
□はコンピテンシーを示す。

表1 コンピテンシーとサブコンピテンシー

コンピテンシー	サブコンピテンシー
1 赤痢菌検査の基礎知識	6
2 分離培養	5
3 コロニー観察と釣菌	4
4 一次鑑別と血清学的検査	5
5 二次鑑別	3
6 遺伝子検査	8
7 総合判断	2
計	33

表2 赤痢菌検査における検査担当者、検査区分責任者及び部門管理者に求められるコンピテンシー（1から7）及びサブコンピテンシー

1 赤痢菌検査の基礎知識（1）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
1-1 細菌性赤痢とは	細菌性赤痢の定義、臨床症状、届出基準等を理解している。	同左	同左
1-2 患者発生状況	最近では我が国で年間100名から150名の患者発生が認められる。また、今なお保育園等での集団事例、食中毒の発生が散見される。		
1-3 赤痢菌菌種の検出頻度	我が国の患者から検出される血清型はB群（フレキシネリ）とD群（ソンネ）が90%以上で、A群（志賀菌）、C群（ボイド）は非常に稀である。		
1-4 地方衛生研究所における赤痢菌検査の重要性	・三類感染症であり、届出基準に便からの分離・同定による病原体の検出が記載されている。また、食品関係業務に従事する人の場合、就業制限がかかり、社会的影響が大きい。 ・地衛研では赤痢菌検査数が減少し、検査経験がない職員が増えている。 ・赤痢菌は他の病原菌に比べ、誤同定が多い。		

1 赤痢菌検査の基礎知識（2）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
1-5 赤痢菌検査のポイント	・赤痢菌と大腸菌を鑑別する生化学的性状（培地）を知っているか。 ・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。 ・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。 ・<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。	・検査担当者の5項目 ・赤痢菌の血清に凝集しない新血清型赤痢菌があることを知っているか。 ・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。	同左
1-6 赤痢菌の分子疫学解析	食中毒等集団事例から検出された場合、必要に応じて各施設でPFGE解析を行うとともに、赤痢菌を国立感染症研究所 細菌第一部に送付してMLVA解析を依頼する。	同左	同左

2 分離培養（1）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
2-1選択性の強い分離培地への塗抹	検体をSS分離培地等赤痢菌分離に適切な選択性の強い分離培地へ塗抹する。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
2-2選択性の弱い分離培地への塗抹	選択分離培地で非発育の場合を想定して選択性の強い培地への塗抹と並行してDHL培地等適切な選択性の弱い選択培地へ塗抹する。		
2-3培養温度と培養時間	ソネ菌の場合、長時間培養するとSS分離培地で色調による鑑別が困難になることから、適切な培養温度（37℃）で、必要な時間（18時間以上）培養する		

2 分離培養（2）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
2-4増菌培地の選択	必要に応じ、セレナイト培地等適切な増菌培地を選択し、適切な培養温度（37℃）で、必要な時間培養（18時間以内）する。 以下、直接培養の手順に従い、サブコンピテンシー「選択分離培地への塗抹」へ進む。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
2-5記録	検査結果を記録する。		

3 コロニー観察と釣菌

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
3-1赤痢菌が疑われるコロニーの判定	選択分離培地上に発育したコロニーを観察し、赤痢菌が疑われる白色若しくはピンク色コロニーの有無を判定する。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
3-2コロニーの釣菌と確認培地への接種	赤痢菌疑いコロニーをコロニー以外を触らないように純培養で5個以上釣菌し、適切な確認培地（TSI、LIM、VP、シモンズクエン酸、トリプトソイ斜面各培地等）に接種する		
3-3培養温度と培養時間	適切な培養温度（37℃）で、必要な時間（18時間～24時間）培養する。		
3-4記録	検査結果を記録する。		

4 一次鑑別と血清学的検査（1）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
4-1 確認培地の生化学的性状の判定	確認培地の生化学的性状を判定する。また、コンタミがないかどうか確認する。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業書通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
4-2 赤痢菌免疫血清と陰性対照の選択	血清学的検査のため、適切な赤痢菌免疫血清と陰性対照（生理食塩水等）を選択する。		
4-3 スライド凝集反応と判定	適切な操作（加熱菌の使用、適切な濃度の菌懸濁液、懸濁液と抗血清を1分間十分混和させる等）でスライド凝集反応を実施し、判定する。		

4 一次鑑別と血清学的検査（2）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
4-4 赤痢菌の判定	生化学的性状及び血清学的検査の結果から赤痢菌か否かを判定する。赤痢菌の場合は菌種と血清型を判定し、成績書に判定結果、菌種と血清型を正しく記載する。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業書通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
4-5 記録	検査結果を記録する。		

5 二次鑑別

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
5-1 追加の生化学的性状試験	一次鑑別及び血清学的検査の結果から赤痢菌か否かを判定できない場合等必要に応じ、酢酸ナトリウム、クリステンゼン・クエン酸、粘液酸培地等追加の生化学的性状試験を行う。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業書通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
5-2 培養温度と培養時間、結果判定	適切な培養温度（37℃）で、必要な時間（1日～2日）培養し、結果の判定を行う。		
5-3 記録	検査結果を記録する。		

6 遺伝子検査（1）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
6-1 遺伝子検査の必要性	一次鑑別と血清学的検査結果から赤痢菌か否か判定できない場合等必要に応じ、PCR検査を実施する。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業書通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
6-2 テンプレート調整	トリプトソイ斜面培地に発育した菌から熱抽出等でテンプレートを調整する。		
6-3 赤痢菌同定用プライマーと増幅条件	赤痢菌同定用プライマー（ <i>ipaH</i> 、 <i>invE</i> ）と増幅条件を選択する。		
6-4 陽性対照と陰性対照	適切な陽性対照と陰性対照を選択する。		

6 遺伝子検査（2）

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
6-5 PCR反応液の調製と増幅	PCR反応液を調製し、テンプレートを加え、PCR装置を用いてPCR産物を増幅させる。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業書通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
6-6 電気泳動の実施と判定	適切な条件で電気泳動を実施し、増幅産物の有無とサイズを確認して、判定を行う。		
6-7 トラブルシューティング	非特異反応が起きた場合あるいは陽性対照が陰性となった場合等、必要な解決法を判断する。		
6-8 記録	検査結果を記録する。		

7 総合判断

サブコンピテンシー	検査担当者	検査区分責任者	部門管理者
7-1 最終判断	一次鑑別と血清学的検査、二次鑑別及び遺伝子検査の結果より、赤痢菌か否かを判定し、赤痢菌の場合は菌種と血清型を判定する。	・検査担当者に適切に指導ができる。 ・標準作業書通りに検査を実施していることを確認する。	記録書等が誤記、記入漏れ等がなく適切に記入されていることを確認する。
7-2 成績書	赤痢菌検査結果（陰性、陽性）、菌種、血清型を成績書に正しく記載する。		