

令和5 年度富山県病原体等検査の精度管理調査(2023 年度)
－腸管出血性大腸菌, サルモネラ属菌, 赤痢菌, カンピロバクターの検査－

木全 恵子 磯部 順子 金谷 潤一 齋藤 和輝
池田 佳歩 前西 絵美 大石 和徳

Quality Control of the Bacterial Testing of Pathogen in Toyama Prefecture in 2023
-Test of Enterohemorrhagic *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella*, and *Campylobacter*-

Keiko KIMATA, Junko ISOBE, Jun-ichi KANATANI, Kazuki SAITO,
Kaho IKEDA, Emi MAENISHI, and Kazunori OISHI

目的：本県では、富山県病原体等検査業務管理要綱に基づき、県内の病原体等検査施設に対する検査水準の維持、向上を目的として精度管理調査を平成 28 年度（2016 年度）より実施している。令和 5 年度（2023 年度）の調査は、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、赤痢菌、カンピロバクターを対象項目とした。検査用試料は、衛生研究所で培地に上述の菌いずれか1 種類を接種し、各検査施設に配布した。結果は、各々の報告書から集計・解析した。

材料と方法：県内 6 機関を対象とし、2023 年 12 月 5 日～2024 年 1 月 19 日に実施した。

配布試料を便検体とみなし、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属菌、赤痢菌、カンピロバクターのいずれかを疑う菌を分離・同定することとした。市販のカジトン培地（栄研化学）に表 1 の菌を接種して配布した。

表 1 配布試料と接種菌名

試料名	接種菌名
A	腸管出血性大腸菌 O111 : HNM (Hg8) VT1,2
B	腸管出血性大腸菌 O165 : HNM (Hg25) VT2

検査法は各機関の検査実施標準作業書（SOP）等に準拠して行い、検査終了後は、検体は SOP に従い、滅菌廃棄した。

結果：全ての機関が、試料 A を大腸菌 O111 (VT1,2)、試料 B を大腸菌 O165 (VT2) と正しく回答した。

各機関が、今回の分離培養に用いた培地の種類を表 2 に示した。上記の 4 種類の腸内細菌の分離について、選択性の異なる培地を複数組み合わせ

て使用していた。

以下の通り、提出された記録から詳細を解析した結果を示す。

表 2 各参加機関で使用した培地

機関	培地
A	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 mCCDA培地 SS寒天培地 スキロー寒天培地
B	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-SMAC寒天培地 DHL寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 SSB寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 SS寒天培地 (サブリメント非添加) TSA寒天培地 CCDA培地
C	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 SS寒天培地 (サブリメント非添加) CT-SMAC寒天培地 CCDA培地
D	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-SMAC寒天培地 DHL寒天培地 CT-RMAC寒天培地 SS-SB寒天培地 CT-SBMAC寒天培地 SS寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 マッコンキー寒天培地 クロモアガーO157寒天培地 RMAC寒天培地 mCCDA培地 SBMAC寒天培地
E	クロモアガーサルモネラ寒天培地 クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 クロモアガーO157寒天培地 SS-SB寒天培地 BDキャンピロバクター血液寒天培地 CT-SMAC寒天培地 mCCDA培地
F	クロモアガーサルモネラ寒天培地 CT-クロモアガーSTEC寒天培地 DHL寒天培地 mCCDA培地 SS寒天培地

(1) 腸管出血性大腸菌（EHEC）

使用培地：使用した培地名と分離されたコロニーの色調を表 3-1 に示す。各機関で使用した選択分離培地の組み合わせは異なっていたが、酵素基質培地であるクロモアガーSTEC 寒天培地は全ての機関で使用されていた。クロモアガーSTEC 寒天

培地は、腸管出血性大腸菌を分離するための選択分離培地で、EHECの血清型や糖の代謝能に関わらず、コロニーが藤色～紫色を呈するため汎用性が高い。

セフェキシム・亜テル酸塩 (CT) またはクロモアガーSTEC寒天培地付属のサプリメントは夾雑菌の発育を抑制し、EHECの選択性を高める添加剤である。今回の調査では、全ての参加機関が、CTを添加した培地を使用した (CT-SMAC寒天培地：4 機関、CT-RMAC寒天培地：1 機関、CT-SBMAC寒天培地：1 機関、CT添加クロモアガーSTEC寒天培地：3 機関)。また、3 機関が付属のサプリメントを添加したクロモアガーSTEC寒天培地を使用した。

一方、全ての機関でCT非添加の培地も使用された (DHL寒天培地：6 機関、付属のサプリメント非添加のクロモアガーSTEC寒天培地：2 機関、クロモアガーO157寒天培地：2 機関、CT非添加SMAC寒天培地、RMAC寒天培地、SBMAC寒天培地：各1 機関)。検体Bの大腸菌はCT感受性で、サプリメントやCTを含まない培地でのみコロニーの生育が認められた。

作製した培地について、3 機関が陽性コントロールとしてEHEC保存株を培養し、培地の性能を確認していた。また、分離培地の培養温度は未記載の1 機関を除き35℃～36℃であった。

性状確認試験：全ての機関で性状確認試験に用いられた培地は、TSI、LIM、VP、MR、シモンズのクエン酸培地、およびCLIG (MUGのβグルクロニダーゼ産生性を含む) であった (表3-2)。その他に性状確認試験として、SIM培地による硫化水素産生性・インドール・運動性確認試験 (1 機関)、ソルビトール代謝試験 (3機関)、酢酸ナトリウム培地による酢酸代謝試験 (1機関)、アピ20Eによる菌種同定試験 (1機関)、メラー培地によるリジン脱炭酸試験 (1機関) を実施していた。また、確認培地および添加試薬について、確認培地の性能試験 (陽性コントロール EHEC, 1 機関)、調製したVP試薬の性能試験 (陽性コントロール菌 セレウス菌, 1 機関) が実施されていた。

生化学性状試験では、おおむね生化学性状は一致していたが、ガス産生性および運動性の有無について不一致がみられた (表3-2)。

遺伝子検査：6 機関の遺伝子検査法は、リアルタイムPCR (4 機関)、コンベンショナルPCR (1 機関)、LAMP法 (1 機関) であった。どの機関もペロ毒素を型別するプライマーを使用し、型別ま

で実施した。全ての機関で陽性・陰性対照について同様の試験を実施しており、結果はすべて正しかった。

血清型別試験：大腸菌のO群別について、すべての機関が正しく回答した。

検体Aの大腸菌O111は生菌による試し凝集が見づらいため、判定しにくいという指摘があった。大腸菌の菌体の周囲に形成された莢膜様物質はO群免疫血清との凝集反応を阻害するため、生菌による試し凝集が検出されない場合がある。このため、大腸菌のO群別は、菌体の周囲に形成された莢膜様物質を不活化した加熱死菌を用いて最終判定を行う。全ての機関は加熱死菌を用いてO群別の最終判定を行った。

(2) サルモネラ属菌および赤痢菌

サルモネラ属菌および赤痢菌の分離培養には全機関が複数の選択性の異なる培地 (DHL寒天培地、SS寒天培地・SS-SB寒天培地 (栄研化学)、SSB寒天培地 (日水製薬・島津ダイアグノスティクス)、マッコンキー寒天培地、およびクロモアガーサルモネラ培地等) を併用していた (表4)。2 機関はサルモネラ属菌および赤痢菌について、保存株を用いた分離培地の性能確認を行っていた。赤痢菌のコロニーは、クロモアガーサルモネラ培地を除く上記の培地で、乳糖非代謝性を示す半透明の色調を示す。また、サルモネラ属菌のコロニーは、マッコンキー寒天培地を除く上記の培地で硫化水素産生性の黒変を示す。選択性が強いSS寒天培地では一部のサルモネラ属菌や赤痢菌の発育が阻害されることがある。このため、参加機関では、SS寒天培地に比べて選択性がやや弱いSS-SB寒天培地、SSB寒天培地、選択性が弱いDHL寒天培地・マッコンキー寒天培地など、複数の選択分離培地が使用されていた。また、サルモネラ属菌には硫化水素産生性が弱い菌も存在する。このため、硫化水素産生性を指標とする上記の培地以外に、酵素基質培地クロモアガーサルモネラ培地を全ての機関が使用していた。クロモアガーサルモネラ培地では、サルモネラ属菌は藤色を呈する。

参加機関は全て、検体Aおよび検体Bではこれらの培地でサルモネラ属菌および赤痢菌が疑われるコロニーの生育は認められず、サルモネラ属菌および赤痢菌は陰性と回答していた。しかし、結果の記載に関して、各機関でばらつきがみられた。機関Aは用いた培地全てでサルモネラ属菌

表 3-1 腸管出血性大腸菌検査 使用培地およびコロニー色調

機関	培地	培養温度	培養時間	コロニー色調	
				検体A	検体B
A	CT-クロモアガーSTEC寒天培地	35℃	22.1時間	藤色	生育なし
	DHL寒天培地			赤	赤
B	CT-SMAC寒天培地	36℃	19.8時間	ピンク	生育なし
	クロモアガーSTEC寒天培地			藤色	生育なし
	クロモアガーSTEC寒天培地（サプリメント非添加）			藤色	藤色
	DHL寒天培地			ピンク	ピンク
	TSA寒天培地			白	白
C	CT-SMAC寒天培地	35℃	20.2時間	ピンク	生育なし
	CT-クロモアガーSTEC寒天培地			紫	生育なし
	クロモアガーSTEC寒天培地（サプリメント非添加）			紫	紫
	DHL寒天培地			赤	赤
D	CT-SMAC寒天培地	35℃	24時間	ピンク	生育なし
	CT-RMAC寒天培地			ピンク	生育なし
	CT-SBMAC寒天培地			透明	生育なし
	クロモアガーSTEC寒天培地			紫	生育なし
	クロモアガーO157寒天培地			紫	青
	RMAC寒天培地			ピンク	透明
	SBMAC寒天培地			透明	透明
	DHL寒天培地			ピンク	ピンク
	マッコンギー寒天培地			ピンク	ピンク
E	CT-SMAC寒天培地	不明	24時間	ピンク	生育なし
	クロモアガーSTEC寒天培地			藤色～紫	生育なし
	クロモアガーO157寒天培地			藤色～青紫	青
	DHL寒天培地			赤ピンク	赤
F	CT-クロモアガーSTEC寒天培地	35℃	20.3時間	藤色	生育なし
	DHL寒天培地			ピンク	ピンク
検体Bでコロニーの生育がみられなかった培地					

と赤痢菌の陽性コントロール株の培養を行った。機関 A は、クロモアガーサルネラ培地上で赤痢菌のコロニーが白色を呈すること、検体 A・B のクロモアガーサルモネラ培地では当該コロニーが生育しなかったことを確認し、赤痢菌「陰性」と回答した。機関 F は、サルモネラ属菌の判定は DHL 寒天培地、クロモアガーサルモネラ培地、SS 寒天培地の培養結果を、赤痢菌の判定は DHL 寒天培地、SS 寒天培地の培養結果の結果から行ったことを記載していた。その他の機関はサルモネラ属菌・赤痢菌の培養結果を全てひとつにとりまとめて「陰性」と記載していた。通常クロモアガーサルモネラ培地のコロニーでは赤痢菌の判定は行わない（上述の機関 A のように陽性コントロールを併用する場合を除く）ため、結果を記載する場合は、サルモネラ属菌と赤痢菌それぞれについて判定の根拠となった分離平板の種類を記載するべきである。

(3) カンピロバクター

全機関が mCCDA 培地もしくは CCDA 培地を使用し、約 48 時間前後の微好気培養を行って

た（表 5）が、2 機関は微好気培養に使用したアネロパックの Lot および使用期限の記録があった。また、2 機関は上記の選択分離培地のほかにスキロー寒天培地もしくは BD キャンピロバクター血液寒天培地を併用していた。今回の 2 検体ではカンピロバクターが疑われるコロニーの生育は認められず、カンピロバクターは陰性と回答されており、全ての機関の結果は正しかった。

考察：本年度は複数の菌種を検査項目とする精度管理調査を行った。全ての機関は、それぞれの菌種について分離培地の選択性を考慮した検査を行っていた。参加した機関は、サルモネラ属菌では硫化水素産生を指標とする寒天培地と酵素基質培地、赤痢菌では選択剤の強さを考慮した培地を組み合わせ使用していた。また、EHEC では選択剤 CT 感受性の株の可能性を考慮し、検査には CT 等の選択剤を含まない培地を使用していた。

今回の精度管理では分離した EHEC の菌株の生化学性状について、運動性やガス産生性などの結果にばらつきがみられた。これらの表現型は、同じ菌株でもコロニーごとに異なることがある。ま

表 3-2 腸管出血性大腸菌検査 分離株の生化学性状

機関	TSI	LIM	SIM	シモンズ クエン酸培地	VP	MR	CLIG	MUG	ソルビトール	その他
<u>検体A O111 : HNM (Hg8) VT1,2</u>										
A	A/AG	- + + _w		-	-	+	-/AG	+	+	
B	A/AG	- + -		-	-	+	-/AG	+		酢酸ナトリウム培地試験
C	A/AG	- + + _w		-	-	+	-/AG	+		
D	A/AG	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	
E	A/AG ^{*1}	- + -	- + -	-	-	+	-/A ガス不明 ^{*2}	+		API 20E E.coli 86.2%
F	A/AG	- + +		-	-	+	-/AG	+	+	メラーリジン培地使用
<u>検体B O165 : HNM (Hg25) VT2</u>										
A	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	
B	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+		酢酸ナトリウム培地試験
C	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+		
D	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	
E	A/A-	- + -	- + -	-	-	+	-/A ガス不明 ^{*2}	+		API 20E E.coli 99.1%
F	A/A-	- + -		-	-	+	-/A-	+	+	メラーリジン培地使用
未実施										

*1 : DHL寒天培地由来コロニーではA/A-

*2 : ガスの産生性について未記載

た、後述のとおり、培養条件や接種方法によってもその表現型が異なることがある。

大腸菌の運動性は培地の種類や培養温度等によって変化することがある（国立感染症研究所ではクレイギー管を入れた半流動培地等で30℃、最大72時間まで培養し、運動性を判定している）。また、大腸菌の運動性はLIMやSIM培地の高層部分で判定するが、古い培地では運動性が観察されないことがある。

大腸菌のガス産生性はTSI・CLIGの高層部分で判定するが、①培地が古い、②接種した菌量が少ない、③高層部分の底まで白金線で刺して植えていないなどの原因でガス産生性が見づらい、観察できない場合がある。このため、これらの表現型の試験では、接種や培養条件に留意し、培養条件を記録しておくことが重要である。また、運動性やガス産生性を確認する性状試験培地（LIM, TSI, CLIG）はできる限り新しい培地を使用するのが望ましい。

菌培養時に、培地の性能、培養条件等を確認するため、陽性対照を置くことが望まれる。本調査では、各菌種の分離培養について陽性対照の記載

があったのは2～3機関であった。特にEHECではCT感受性株などで、菌の発育が認められなかった場合に培地性能を保証するため、陽性コントロールを置くことが望ましい。

検体Aで使用したEHEC O111は生菌による試し凝集が困難な菌株であった。上記の試し凝集が困難なEHECが疑われるコロニーの場合、PCR等によるベロ毒素遺伝子検出スクリーニングが、コロニーのEHEC同定で有効な手段となる。

精度管理調査は、正しく結果を出すことも重要であるが、検査の過程の判断根拠や記録など、ルーチン業務の中では気が付かない点を再認識する機会でもある。本調査では、培養温度が未記載の機関があったが、後日、使用したふ卵器や温度が確認できるよう記録は必要である。また今回の調査では、EHEC同定およびベロ毒素遺伝子検査を行った際の準拠となったSOPについてSOP No.等を記載していたのは3機関であった。3類感染症の診断に係る検査において、準拠となったSOPの記録、SOPと異なる手順を行った場合の記録および検査部門責任者への報告は検査ノートに記録しておくことは重要である。

表 4 サルモネラ属菌・赤痢菌検査

機関	培地	培養温度	培養時間	検体A			検体B		
				コロニーの色	サルモネラ属菌判定	赤痢菌判定	コロニーの色	サルモネラ属菌判定	赤痢菌判定
A	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	22.1時間	水色	陰性	陰性	水色	陰性	陰性
	DHL寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
B	クロモアガーサルモネラ寒天培地	36℃	19.8時間	青	陰性	陰性 ^{*1}	青	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SSB寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
C	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	20.2時間	水色	陰性	陰性 ^{*1}	水色	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
	SS寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
D	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	24時間	青	陰性	陰性 ^{*1}	青	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS-SB寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	マッコンキー寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
E	クロモアガーサルモネラ寒天培地	不明	24時間	水色	陰性	陰性 ^{*1}	水色	陰性	陰性 ^{*1}
	DHL寒天培地			赤ピンク	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
	SS-SB寒天培地			赤	陰性	陰性	赤	陰性	陰性
F	クロモアガーサルモネラ寒天培地	35℃	20.3時間	青	陰性	— ^{*2}	青	陰性	— ^{*2}
	DHL寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性
	SS寒天培地			ピンク	陰性	陰性	ピンク	陰性	陰性

*¹ 供試したサルモネラ属菌・赤痢菌の各培地の結果を取りまとめて「サルモネラ属菌・赤痢菌 陰性」と記載

*² 赤痢菌判定の対象ではないことを明記

表 5 カンピロバクター検査

機関	培地（培養温度）	検体A		検体B	
		コロニー	判定	コロニー	判定
A	mCCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
	スキロー寒天培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
B	CCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
C	CCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
D	mCCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
E	BDキャンピロバクター血液寒天培地（不明）	白コロニー	陰性	白コロニー	陰性
	mCCDA培地（不明）	生育なし	陰性	生育なし	陰性
F	mCCDA培地（42℃）	生育なし	陰性	生育なし	陰性