

2024年07月17日 版

愛知県臨床検査標準化ガイドライン

# 「日常微生物検査における標準手順書」

第2版

202X年〇月

愛知県臨床検査標準化協議会

AiCCLS : Aichi Committee for Clinical Laboratory Standardization

## 発刊によせて

愛知県臨床検査標準化協議会

会 長



本書の初版が発行されたのは2006年であり、15年以上が経過したこととなった。この間、臨床検査技師を取り巻く環境は激変した。2014年に検体採取などの業務拡大、2018年に検体検査の精度の確保、2021年にタスクシフト/シェアについて、それぞれ法改正が行われた。その間、感染症領域では、2009年の新型インフルエンザ感染症、2019年の新型コロナウイルス感染症など、世界的なパンデミックが発生し、感染症に対する政府ならびに国民の意識は、これまでになくレベルに達している。

細菌感染症の分野では、世界保健機関（World Health Organization : WHO）が2011年に薬剤耐性菌（antimicrobial resistance : AMR）を取り上げて以降、わが国でもAMRアクションプランが策定され、国を挙げてのAMR対策が実現することとなった。そのことは保険点数にも如実に表れており、各種加算が算定されることとなった。

微生物検査の技術に目を向けると、薬剤感受性測定装置が広く普及し、また質量分析装置の登場、各種遺伝子検査機器の普及により、微生物分野にも迅速化の波が押し寄せる一方で、Gram染色や釣菌に代表されるような用手法の必要性・重要性は全く変化していない。

微生物検査の使命は、感染症を疑う患者から適切に検体を採取、病原微生物を迅速かつ正確に検出し、患者の治療に貢献することである。加えて昨今の医療情勢から、そこに経済性と効率性も求められている。施設によって自動機器の普及状況は様々であることから、各施設に最適化された検査フローの構築が求められる。このような状況を踏まえ、今回の第2版では、各種ガイドラインや成書を参考に、新しい検査法も加えながら、内容を大幅に見直し改訂した。適切な文献が見つからない項目については、本書の作成に携わる先生方に協力を仰ぎ、可能な限り意見を集約し掲載することとした。

本書が、新たに微生物検査業務に携わる方にとって、知識・手技習得の一助となれば幸いである。また、すでに微生物検査業務に携わっている方にとっても、施設の運用を見直す際にご活用いただければ幸いである。

202X年X月

略語一覧集

略語	英	和
ATCC	American Type Culture Collection	-
CAPD	Continuous ambulatory peritoneal dialysis	持続携行式腹膜透析
CFU	Colony Forming Unit	コロニー形成単位
CLSI	The Clinical and Laboratory Standards Institute	(米国) 臨床・検査標準協会
CNS	coagulase negative Staphylococci	コアグラゼ陰性ブドウ球菌
CPE	Carbapenemase-producing Enterobacterales	カルバペネマーゼ産生腸内細菌目細菌
CRE	Carbapenem-Resistant Enterobacterales	カルバペネム耐性腸内細菌目細菌
CV	central venous	中心静脈
EHEC	Enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i>	腸管出血性大腸菌
ESBL	Extended Spectrum $\beta$ -Lactamase	基質特異性拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ
EUCAST	European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing	ヨーロッパ抗菌薬感受性試験法検討委員会
GBS	Group B Streptococci	B 群溶血連鎖球菌
HACEK (群)	<i>Haemophilus</i> 属菌, <i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> , <i>Cardiobacterium hominis</i> , <i>Eikenella corrodens</i> , <i>Kingella kingae</i>	-
IVH	Intravenous Hyperalimentation	中心静脈栄養
MADLI-TOF MS	matrix assisted laser desorption/ionization time of flight mass spectrometry	マトリックス支援レーザー脱離イオン化法
MIC	minimum inhibitory concentration	最小発育阻止濃度
MRSA	Methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i>	メチシリン耐性黄色ブドウ球菌
PCR	Polymerase Chain Reaction	ポリメラーゼ連鎖反応
PICC	Peripherally Inserted Central Venous Catheter	末梢挿入式中心静脈カテーテル
PTCD	Percutaneous transhepatic cholangio drainage	経皮経肝胆道ドレナージ
SOP	standard operating procedures	標準作業手順書
VRE	Vancomycin Resistant Enterococci	バンコマイシン耐性腸球菌

# 目 次

	頁
I. 検査前プロセス	*
1. 一般的注意点	*
2. 検体の肉眼的観察	*
II. 塗抹検査	*
1. Gram 染色	*
2. Gram 染色に併用される塗抹染色	*
3. 報告様式	*
4. 代表的な菌の Gram 染色像	*
5. Gram 染色で間違えやすい菌	*
6. Gram 染色の注意点 (染色不良の原因等も含む)	*
III. 培養検査	*
1. 材料別検査組み合わせ	*
2. 目的別使用培地とその特徴	*
3. 主要な検査材料の分離培養法	*
4. 材料別の培地への塗抹方法	*
5. 画線分離	*
6. 培地における菌量表現	*
IV. 材料別釣菌基準	*
V. 同定検査	*
1. コロニーの Gram 染色所見による同定	*
2. 発育性、培養条件、コロニーの特徴から菌群を推定する同定	*
3. 生化学的性状確認培地による菌種の同定	*
4. 簡易同定キット/自動機器による菌種の同定	*
5. 質量分析による同定	*
6. 塩基配列解析による同定	*
7. 血清学的検査による同定	*
VI. 薬剤感受性試験	*
1. 微量液体希釈法	*
2. ディスク拡散法	*
3. ブレイクポイント	*
VII. 微生物検査室における精度管理	*
1. 検体の管理	*
2. 要員管理	*
3. 資材管理	*
4. 成績管理	*
5. 内部精度管理の実例	*
6. 外部精度管理	*

7. 精度の確保のために設けるべき基準..... \*

# I. 検査前プロセス

## 1. 一般的注意点

微生物検査成績は、検体採取、輸送/保存、検査の3つの過程を経て得られるが、これらのいずれかの部分が欠落していても正しい成績は得られない。検体採取と輸送/保存は検体が検査室に運び込まれる以前の過程であるが、これらの部分で不適切な処置がなされると病原微生物の検出が不可能になることも考えられ、検査成績を誤って解釈する危険性がある。検体採取では常在菌の混入を避け病原体を確実に含む材料を採取することが要求され(表1)、輸送/保存では材料中の微生物の増減を防いだ状態を維持することが要求される。検体採取後は、検査室へ速やかに搬送し、検査および培養を開始する。それが難しい場合には適切な輸送培地を利用し、材料中に含まれる微生物に適した環境条件で輸送・保存を行う(表2)。また、検体は感染性の病原体を含んでいる可能性があるため、バイオハザードを避けるための注意も必要である。

表1. 検体採取、輸送/保存時の一般的注意点<sup>1)</sup>

注意事項	注意内容
検体の採取時期、採取法	発病(発熱等)初期、抗菌薬投与開始前に採取する。患者の状態を考慮し、安全性の高い採取法を選ぶ。患者に十分説明し、最良の検体が採れるよう協力を求める。採取容器は頑強で空気漏れがなく、検査しやすいものを選ぶ。検体量は適量(できるだけ多く)を採取する。
抗菌薬投与中の患者からの採取	24時間以上中止して採取する。中止できない場合は、抗菌薬の血中濃度が最も低いレベルにある時期(次回投与直前)に採取する。
常在菌の混入、消毒薬の混入を避ける	常在菌の混入は検査を煩雑化し、起炎菌の推定を困難にする。採取部位の消毒に用いた消毒薬は検体に混入させない。
検体の乾燥を避ける	乾燥すると多くの微生物は死滅する。微量検体は直接培地に接種する。綿棒などは輸送培地の入った容器に入れる。
嫌気性菌の存在を疑う場合(閉鎖性病巣、悪臭を伴う材料)	嫌気性菌の保存に適した専用容器に採取する。これがない場合は検体容器を材料で満たし、死腔を少なくする。菌の死滅を防ぐために、直ちに検査室に届ける。
検体の室温放置は厳禁	検体は培地の役目をするので、菌が増殖し、成績を誤らせる。複数菌混在例では発育の遅い病原菌の検出が困難になる。
検体保存は冷蔵保存が原則	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> , <i>Neisseria meningitidis</i> 、赤痢アメーバなど低温に弱いものは例外とする。
他施設に輸送して検査する場合	検体を適切な輸送培地に採取し、冷蔵して輸送する。

表 2. 微生物検査材料の採取と保存<sup>1)</sup>

材 料	採取容器	採取量	保存法	備 考
血液	血液培養ボトル ・好気ボトル ・嫌気ボトル	ボトルの種類 によって規定 量は異なる。2 セット、4本の 培養ボトルに 血液を採取す る。	直ちに搬送し培 養装置へ速やか に装填する。やむ を得ない場合は、 室温または 35～ 37℃ ※冷蔵は厳禁	1回の採血において1セット2種類（好気・嫌気 ボトル）の血液培養ボトルに規定量接種する。コン タミネーション鑑別の観点から、2セット目は1 セット目とは異なる部位から採取する。（※同一部 位からの倍量採取は避ける。）採取血液のボトル接 種順は嫌気性菌を考慮し、嫌気ボトル→好気ボトル の順に行う。
脳脊髄液	滅菌スピッツ	1～10 mL	35～37℃	<i>Neisseria meningitidis</i> は低温では死滅しやすい。 本菌検出を目的とする場合は直ちに提出し、速やか に培養を開始することが望ましい。しかし、やむを 得ず保存する場合はふ卵器にて保存する。
穿刺液 （胸水、腹水、関節液、 膿瘍、嚢胞内容液など）	滅菌スピッツ、嫌気性菌が 疑われる場合は専用容器 を追加	5～10 mL	4℃	可能な限り多量に採取することが望ましい。
CAPD 液	滅菌スピッツまたは 血液培養ボトル	50 mL または 5～10 mL	35～37℃	平板培養用（滅菌スピッツ）、増菌培養用（培養ボ トル）培地量の1/5から1/10量をボトルに接種 する。
膿・分泌液（耳・鼻漏、 皮膚、創部、潰瘍部、 生殖器）	滅菌スピッツまたは輸送 培地（保存培地付き綿棒）、 嫌気性菌が疑われる場合 は専用容器を追加	1～10 mL	4℃	乾燥を防ぐことが重要であり、創部は深部より採取 する。
尿（中間尿、導尿、膀 胱尿など）	滅菌スピッツまたは滅菌 した容器	5～10 mL	4℃ 35～37℃	採取方法を十分に説明する（特に女性）。 <i>Neisseria gonorrhoeae</i> 検出を対象とした場合。
胆汁、PTCD 胆汁	滅菌スピッツ、嫌気性菌が 疑われる場合は専用容器 を追加	5～10 mL	4℃	<i>Salmonella</i> Typhi、 <i>Salmonella</i> Paratyphi A が検 出される場合があるので注意する。
糞便	採糞便カップまたは輸送 培地	拇指頭大 （色がついて いること）	15～20℃	海外渡航者は臨床からの情報提供が望ましい。（輸 送培地での採取は菌量不足による未発育の可能性 がある。）
喀痰	喀痰採取容器	2～5 mL	4℃	患者へ採取方法を十分に説明する。（採取前にうが いをし、口腔内を十分に清潔にする。）
咽頭粘液（扁桃周囲膿 など）	輸送培地、嫌気性菌が疑わ れる場合は専用容器を追 加		4℃	扁桃周囲膿瘍が疑われる場合は嫌気性菌検査専用 容器も用いる。
カテーテル先端（血管 カテーテル、シャント チューブなど）	滅菌シャーレまたは滅菌 スピッツなど		4℃	乾燥を防いで直ちに提出する。

## 2. 検体の肉眼的観察

表3に従い検体の外観を観察する。乾燥していないか、採取容器が適切かについても点検する。

表3. 検体の外観観察<sup>2)</sup>

材 料	注意内容
液体材料 (尿、脳脊髄液、穿刺液など)	色調、混濁、臭気、血液混入の有無、量
喀痰	膿性部分の有無、臭気、血液混入の有無
糞便	性状(水様、タール、白色など)
膿、分泌物	色調、臭気、血液混入の有無、量

## II. 塗抹検査

### 1. Gram 染色

原理・染色方法等について、表 4 に示す。

なお、染色法はメーカーごとに異なるため、今回は一般的な方法を示している。

表 4. Gram 染色

原 理	細胞壁の構造（ペプチドグルカン層の厚み）の違いに基づき染め分ける。
目 的	細菌・真菌の有無や菌量の確認ができる。また、菌属、菌種の推定が可能な場合がある。検査材料においては白血球および貪食の有無なども観察でき、喀痰では顕微鏡的な検体品質評価が可能である。
標 本	検体の塗抹は厚すぎても薄すぎてもよくなく、黒紙を下に敷いた時に少し曇るぐらいが最適とされている。
固 定	<b>患者検体を用いる場合はアルコール固定が推奨されている。</b> アルコール固定は自然乾燥後、アルコールを垂らして捨てた後、乾燥させる。 火災固定の場合はピンセットで持って 3 回火をくぐらせる。
染 色 方 法	<b>Bartholomew &amp; Mittwer の変法・バーミー法</b>
① 前染色	クリスタル紫溶液
② 水 洗	スライドガラスの裏側から水道水で洗浄する
③ 媒 染	ヨウ素・水酸化ナトリウム溶液 (アルコール不溶性の色素複合体を形成し細胞内に沈着させる)
④ 水 洗	スライドガラスの裏側から水道水で洗浄する
⑤ 脱 色	アセトン・エタノール混合液（細胞から脂質などを溶出させる） グラム陽性菌：ペプチドグリカン層が厚く密であり色素複合体が溶出しにくい。 グラム陰性菌：単層のペプチドグリカン、リポ蛋白、リン脂質とリポ多糖体からなる細胞壁に脂質を多く含む外膜からなるため、薄い細胞壁が破壊され色素複合体が溶出しやすい。
⑥ 水 洗	スライドガラスの裏側から水道水で洗浄する
⑦ 後染色	パイクフェル液
⑧ 水 洗	スライドガラスの裏側から水道水で洗浄する

## 2. Gram 染色に併用される塗抹染色

代表的な染色法について表 5 に示す。

表 5. Gram 染色に併用される塗抹染色

主な方法	材 料	目的とする微生物
Ziehl-Neelsen 染色 蛍光染色	喀痰など	抗酸菌
Kinyoun 染色	喀痰など	<i>Nocardia</i> 属菌
Gimenez 染色	喀痰、肺胞洗浄液など	<i>Legionella</i> 属菌
墨汁法	脳脊髄液、喀痰など	<i>Cryptococcus</i> の莢膜
Grocott 染色 ファンギフローラ Y 染色	喀痰、肺胞洗浄液など	真菌
Moller 染色 Wiltz 染色		有芽胞菌
Hiss 染色		有莢膜菌
Neisser 染色		<i>Corynebacterium diphtheriae</i> (咽頭偽膜)
薄層塗抹標本	糞便	ジアルジア、赤痢アメーバ、 寄生虫卵など
蔗糖遠心浮遊法	糞便	<i>Cryptosporidium</i> のオーシスト
10% KOH 法	皮膚、頭皮など	皮膚糸状菌の菌糸、孢子

## 3. 報告様式

### 1) 報告様式

報告例を以下に示す

- ・グラム陽性球菌
- ・グラム陽性桿菌
- ・グラム陰性球菌
- ・グラム陰性桿菌
- ・酵母様真菌
- ・その他（短桿菌、小桿菌、らせん菌、彎曲桿菌など）

### 2) 菌量表現

菌量および生体細胞数表現については、独自の結果判定基準による表現が慣例的に各臨床微生物検査室で運用されていると考えられる。本手順書では、一例として Clinical Microbiology Procedures Handbook 4th edition : 2016 の結果判定基準を表 6 に示す<sup>2)</sup>。

表 6. 菌量および生体細胞数表現

表 現	細菌数 (鏡検倍率：1000 倍)	生体細胞数 (鏡検倍率：100 倍)
-	認めず	認めず
1+	<1/1 視野	<1/1 視野
2+	1~5/1 視野	1~9/1 視野
3+	6~30/1 視野	10~25/1 視野
4+	> 30/1 視野	> 25/1 視野

#### 4. 代表的な菌の Gram 染色像

細菌は、Gram 染色の染色性によりグラム陽性（紫色）、グラム陰性（赤色）に染め分けられ、形態などから細菌を推定できる（表 7~11）（図 1）。

表 7. グラム陽性球菌の染色像

集塊状		<i>Staphylococcus</i> spp.	
		<i>Micrococcus</i> spp.	
		<i>Aerococcus</i> spp.	
		<i>Anaerococcus</i> spp.	
		<i>Peptostreptococcus</i> spp.	
		<i>Rothia</i> spp.	
		<i>Fingoldia magna</i>	
連鎖状	長い連鎖	<i>Streptococcus</i> spp.	
	短い連鎖	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	ランセット型
		<i>Enterococcus</i> spp.	

表 8. グラム陰性球菌の染色像

規則的	<i>Neisseria</i> spp.	腎臓型の双球菌 <i>N. meningitidis</i> と <i>N. gonorrhoeae</i> は 好中球の細胞質内に存在
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	
	<i>Kingella</i> spp.	
不規則	<i>Veillonella</i> spp.	きわめて小さい菌体 不規則に固まって配列

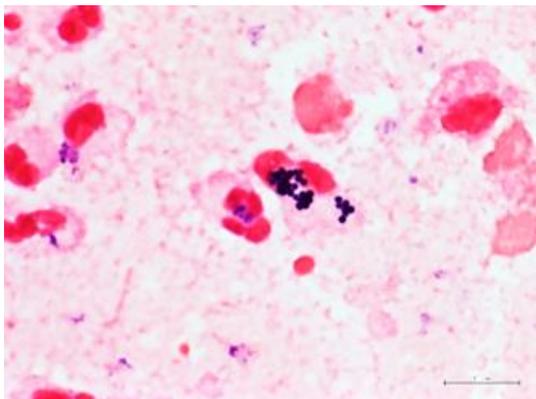
表 9. グラム陽性桿菌の染色像

大型	直線状	連鎖形成あり	<i>Lactobacillus</i> spp.	無芽胞。時にコイル状のものもある
		連鎖形成なし	<i>Bacillus</i> spp.	時に有芽胞
			<i>Clostridium</i> spp.	芽胞の形、位置は菌種の推定に有用
	分岐状		<i>Actinomyces</i> spp.	時にグラム陰性に染色
			<i>Nocardia</i> spp.	時にグラム陰性に染色
小型	直線状		<i>Listeria</i> spp.	時に連鎖
	棍棒状	V字	<i>Corynebacterium</i> spp.	
			<i>Arcanobacterium</i> spp.	
	Y字		<i>Lactobacillus</i> spp.	
			<i>Bifidobacterium</i> spp.	
			<i>Eggerthella</i> spp.	

表 10. グラム陰性桿菌の染色像

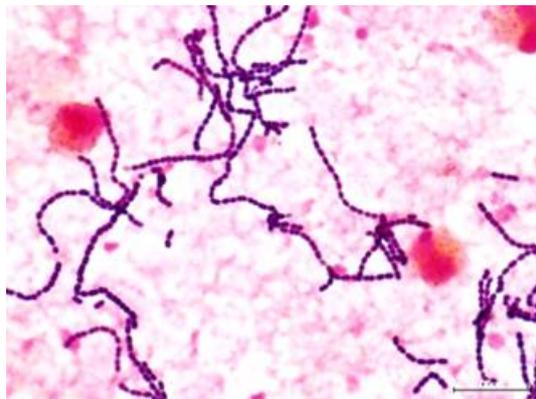
直線性	紡錘形		<i>Capnocytophaga</i> spp.	太い
			<i>Fusobacterium</i> spp.	<i>F. nucleatum</i> は細い
	濃、短、辺縁が丸い		腸内細菌目細菌	
	淡～濃、中～長、細い		<i>Pseudomonas</i> spp.	
	短桿菌		HACEK	
			<i>Pasteurella multocida</i>	
			<i>Bordetella pertussis</i>	
		<i>Acinetobacter</i> spp.		
難染性・長短不同		<i>Bacteroides</i> spp.	継代培養すると桿菌となる	
湾曲	らせん状	<i>Campylobacter</i> spp.	染色性が弱い	
		<i>Helicobacter</i> spp.	染色性が弱い	
	湾曲	<i>Vibrio</i> spp.		
		<i>Aeromonas</i> spp.		
フィラメント状		<i>Proteus</i> spp.		
		<i>Morganella</i> spp.		
		<i>Providencia</i> spp.		

*Staphylococcus aureus*



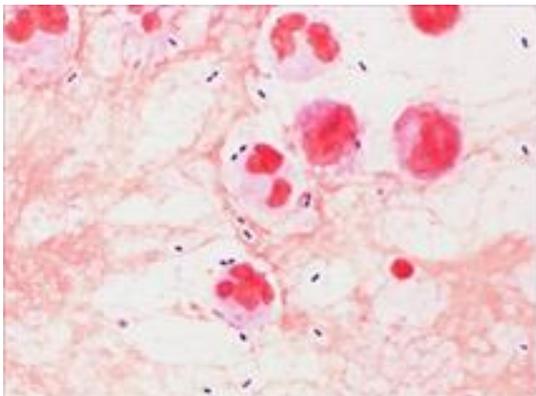
直径約 1.0  $\mu\text{m}$  の球状を示し、ブドウ状に不規則に配列するグラム陽性球菌

$\beta$ -hemolytic streptococci



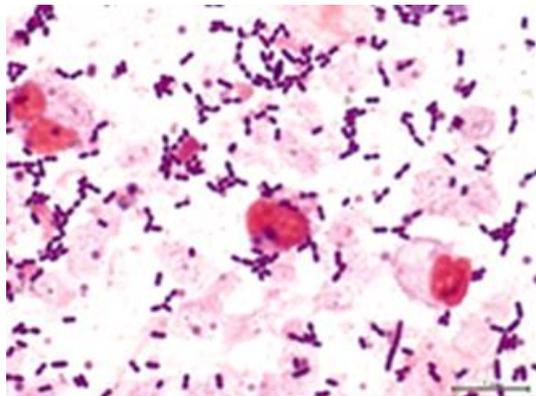
直径約 1.0  $\mu\text{m}$  の球形または卵円形で連鎖状に配列するグラム陽性球菌

*Streptococcus pneumoniae*



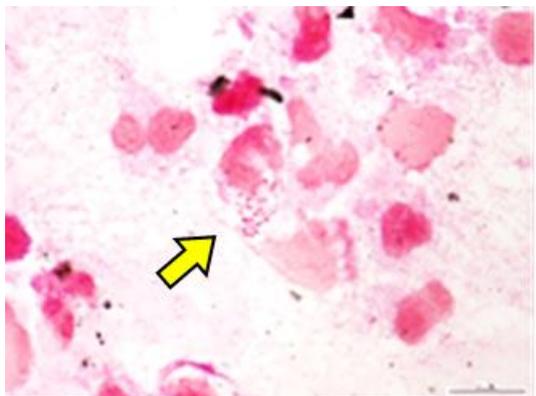
連鎖は短く、双球菌状で遠位端がやや尖ったランセット状を示すグラム陽性球菌。莢膜を有し、菌体の周りが染色されず抜けて観察される。

*Enterococcus* spp.



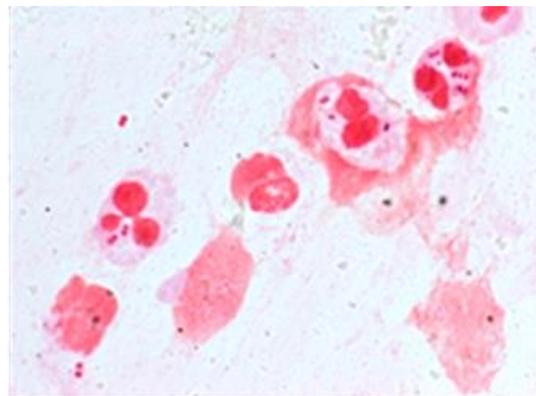
やや楕円形で、2 連または短連鎖のグラム陽性球菌。

*Neisseria gonorrhoeae*



直径約 1  $\mu\text{m}$  で腎形またはソラマメ状の球菌で 2 個の菌が向かい合ったグラム陰性球菌

*Moraxella catarrhalis*



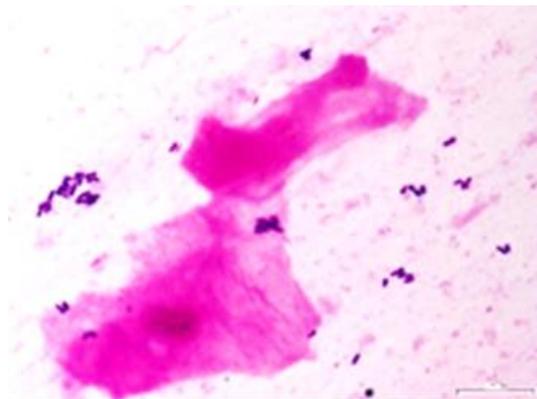
直径 1  $\mu\text{m}$  前後で不規則な集塊を形成するグラム陰性の双球菌

*Clostridium perfringens*



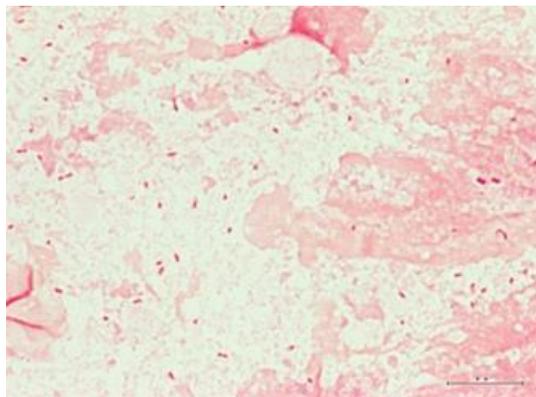
グラム陽性で、大きさは  $0.6 \sim 2.4 \times 1.3 \sim 19.0 \mu\text{m}$  の大型の桿菌である。菌体はまっすぐで両端は鈍円である。芽胞は中央または偏在性に位置する。

*Corynebacterium* spp.



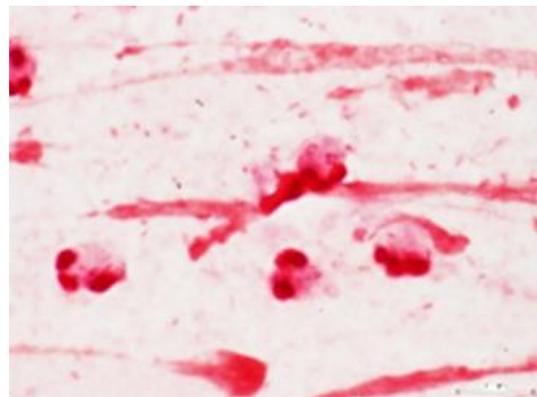
菌の配列（松葉状、柵状、V.W.Y 状など）が特徴的なグラム陽性桿菌。

*Haemophilus influenzae*



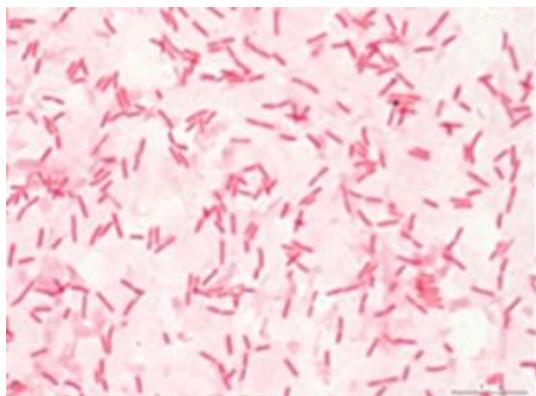
$0.3 \sim 0.5 \times 0.5 \sim 1 \mu\text{m}$  のグラム陰性桿菌または小さな球桿菌。

*Pseudomonas aeruginosa*



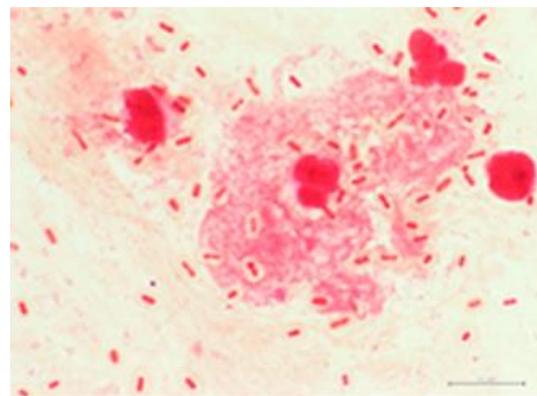
大きさが  $1.3 \sim 3.0 \times 0.5 \sim 0.8 \mu\text{m}$  のグラム陰性桿菌。大腸菌より菌の幅が狭く小さく観察される。

*Escherichia coli*



中等大グラム陰性桿菌で、 $2 \sim 6 \times 1.1 \sim 1.5 \mu\text{m}$  の大きさで球短桿菌状の場合もある。

*Klebsiella pneumoniae*



大腸菌に比べ、やや大型のグラム陰性桿菌。ムコイド株の場合菌体の周囲に莢膜が赤く染まったり、抜けて見えたりする事がある。

図 1. 代表的な染色像 (×1000)

## 5. Gram 染色で間違えやすい菌

*Gardnerella vaginalis* や *Clostridium* spp.、*Propionibacterium* (*Cutibacterium*) spp.、*Acinetobacter* spp.等、元々染色性が不安定な菌種が存在する。そのほか、形状が類似している菌種について表 11 に示す。

表 11. Gram 染色で間違えやすい菌

	特 徴	類似の菌種
グラム陽性菌	双球菌	<i>Enterococcus</i> spp.、 <i>S. pneumoniae</i>
	球桿菌 または短桿菌	<i>L. monocytogenes</i> 、 <i>Corynebacterium</i> spp. <i>Arcanobacterium</i> spp.、 <i>Cutibacterium</i> spp.
	桿菌	<i>Lactobacillus</i> spp.、 <i>Bacillus</i> spp.、 <i>Clostridium</i> spp.
	分岐した桿菌	<i>Bifidobacterium</i> spp. <i>Nocardia</i> spp.、 <i>Actinomyces</i> spp.、 <i>Mycobacterium</i> spp.
グラム陰性菌	球菌	<i>M. catarrhalis</i> 、 <i>Acinetobacter</i> spp.
	小さな球桿菌	<i>H. influenzae</i> 、 <i>Brucella</i> spp.、 <i>Pasteurella</i> spp.、 <i>Prevotella</i> spp.
	らせん桿菌	<i>Campylobacter</i> spp.、 <i>Helicobacter</i> spp.
	太い桿菌、莢膜	<i>K. pneumoniae</i> 、 <i>P. aeruginosa</i>

## 6. Gram 染色の注意点（染色不良の原因等も含む）

### 1) 検出限界

- (1) 菌数が少ない（臨床材料中の菌数が約  $10^4$  CFU/mL 以下）と検出は困難である。
- (2) Gram 染色で検出不可能：ウイルス、リケッチア、クラミジア、マイコプラズマ
- (3) Gram 染色で困難：抗酸菌、レジオネラ菌、*Pneumocystis jirovecii*（旧名：カリニ原虫）

### 2) アーチファクト

クリスタル紫の結晶成分は針状や斑点状、放射状に確認されることがある。針状や放射状結晶は *Nocardia* spp. や *Actinomyces* spp. と、斑点状は *Staphylococcus* spp. などグラム陽性球菌と誤判定する場合がありますので注意する（図 2）。

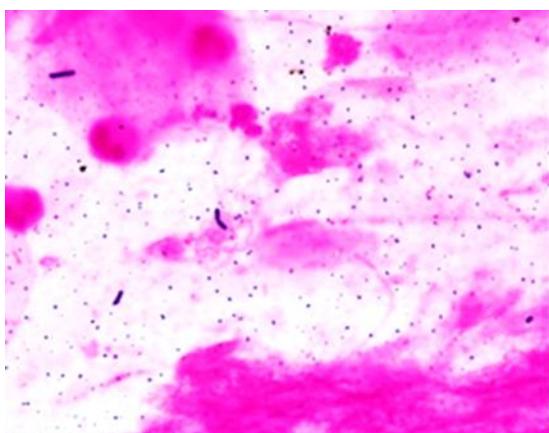


図 2. アーチファクト（全域に存在する青い斑点）（×1000）

### 3) 抗菌薬の影響

細胞壁に損傷を与える作用機序を持つ抗菌薬の投与後では、菌形態がフィラメント状やバルジ状に変化することがあり、またグラム不定に染色されることもある（図 3）。

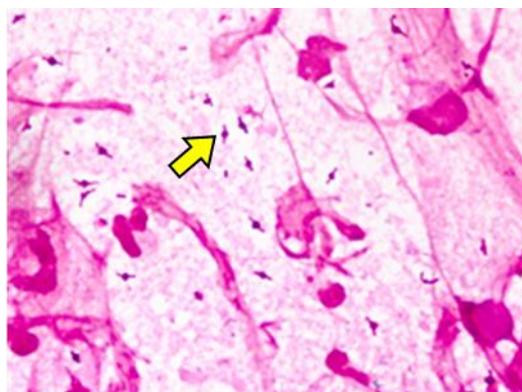


図 3.  $\beta$  ラクタム系薬投与後の腸内細菌目細菌（×1000）

#### 4) 脱色不足

膿汁や喀痰などでは、標本中への脱色液の浸透が悪く脱色されにくい場合があり、脱色が不十分だと陰性菌が陽性に染まることもある（図4）。

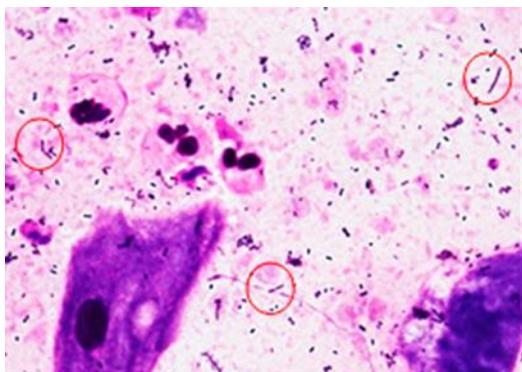


図4. 脱色不足（陰性菌が陽性に染まる）（×1000）

#### 5) 検体の鮮度

古い材料では菌数は変化し、生体細胞の変性や破壊が進むので鏡検時に判定が困難となる。また、陽性菌が陰性に染まることやコッコイドフォーム（球状菌）へと変化する菌種があるため、出来るだけ新鮮な培養菌や検査材料で行う（図5）。

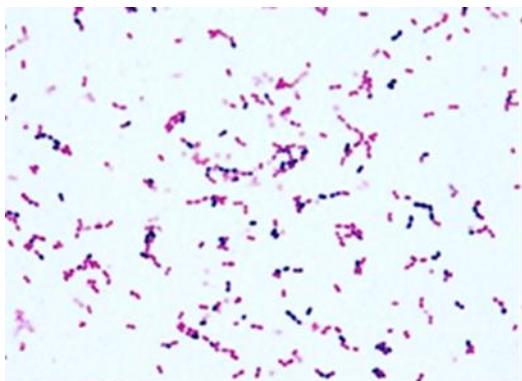


図5. 自己融解が進み陰性にも染まる肺炎球菌（×1000）

#### 6) 精度管理

- (1) 染色液、手技などにより成績がばらつきやすいため、染色液の精度管理は必須である。
- (2) 判定結果に技師間差が生じやすい検査であるため、技師間での目合わせを行う。

### Ⅲ. 培養検査

#### 1. 材料別検査組み合わせ

検査材料毎の検査組み合わせ例を表 12 に示す。

表 12. 検査材料毎の検査組み合わせ例

	該当する材料	Gram 染色	好気 培養	微好気 培養	嫌気 培養	増菌 培養
口腔・気道 呼吸器系	喀痰	◎	◎		○	
	咽頭粘液、鼻腔粘液		◎			
	経気管吸引痰、扁桃周囲膿	◎	◎		○	
消化器系	糞便、腸液	○	◎	◎	○	○
	胆汁	◎	◎		◎	
泌尿器・ 生殖器系	尿、カテーテル尿、膀胱穿刺尿、 腎尿、前立腺分泌物、婦人性器 分泌物	◎	◎		○	
穿刺液	血液					◎
	髄液	◎	◎	○	○	◎
	胸水、腹水、CAPD 液 心嚢液、関節液	◎	◎		◎	◎
膿・分泌物	耳漏	◎	◎		○	
	眼脂	◎	◎		○	○
	皮膚	◎	◎		○	
	褥瘡、創部膿	◎	◎		○	
	膿瘍、外科ドレーン	◎	◎		◎	
カテーテル (血管内)	IVH カテーテル、CV カテーテル CV ポート、PICC	○	◎		○	◎

◎：常時実施 ○：依頼もしくは追加実施

## 2. 目的別使用培地とその特徴

培養の目的ごとの使用培地とその特徴について 表 13 に示す。

表 13. 培養の目的ごとの使用培地とその特徴

対 象	培地名 (略称)	特徴および注意点	
全般	ヒツジ血液寒天培地 (BA)	分離培地としてはヒツジ血液寒天培地が最も望ましい。 メーカーにより菌の発育性、集落の大きさ、溶血性などに差があるため、自施設で使用している製品の特徴を把握しておく。炭酸ガス培養が望ましい。	
	チョコレート寒天培地 (CHO)	血液寒天培地同様、メーカーにより菌の発育に差があるので注意する。炭酸ガス培養が望ましい。	
グラム陰性桿菌	BTB 乳糖寒天培地	(EA)	
	マッコンキー寒天培地		一部のグラム陽性球菌も発育する。 ドリガルスキー改良培地とも呼ばれる。
	DHL 寒天培地		グラム陽性球菌は発育しない。 Proteus 属の遊走を阻止する。 SS 寒天培地ほどの強い選択性はないが、SS 寒天培地で抑制されることがある 一部の <i>Shigella</i> , <i>Salmonella</i> 属も発育する。 Proteus 属の遊走を阻止する。
グラム陽性菌	PEA 寒天培地 (PEA)	グラム陰性桿菌の発育が阻止されるため、グラム陽性菌の分離に適している。レンサ球菌の分離を目的に使用する時は、本培地に血液を 5% 加えた血液寒天にするとよい。	
	CA 加血液寒天培地	大部分のグラム陰性桿菌の発育が阻止されるため、グラム陽性菌の分離に適している。血液が含まれているため、溶血性の確認も可能。	
<i>Neisseria</i> spp.	サイアーマーチン寒天培地 (TH)	35℃炭酸ガス培養 48 時間。グラム陰性球菌の培養に適しており、特に淋菌・髄膜炎菌の分離に適する。	
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	GC 寒天培地	35℃炭酸ガス培養 48 時間。髄膜炎菌も発育するが、淋菌の成績が良い。	
<i>Shigella</i> spp. <i>Salmonella</i> spp.	SS 寒天培地 (SS)	大腸菌を強く抑制し、目的菌の検出率が高い。	
<i>Salmonella</i> spp.	各種サルモネラ増菌培地	各種培地の規定時間培養後、分離培地に移植する。	
<i>Vibrio</i> spp.	TCBS 寒天培地	菌種の白糖分解能により、コロニーの色が異なる。(黄色または緑色・青色)	
	アルカリペプトン水	<i>Vibrio</i> 属の増菌培地。6~8 時間培養後、表層部を分離培地に移植する。	
腸管出血性大腸菌	クロモアガー-STEC	EHEC 株は藤色のコロニーを形成する。	
<i>Bordetella pertussis</i>	ボルデージャング寒天培地	3~7 日で発育する。	
	ボルデテラ CFDN 寒天培地		
	チャコール寒天培地		
<i>Corynebacterium</i>	荒川培地	24~72 時間で発育する。	

<i>diphtheriae</i>	レフレル培地	
<i>Legionella</i> spp.	B- CYE 寒天培地	3～7 日で発育。
	WYO 寒天培地	<i>Legionella</i> 属は各種一般細菌用培地には全く発育しない。
<i>Campylobacter jejuni/coli</i>	CCDA 培地	42℃微好気培養 48 時間。高湿度環境が望ましい。
	スキロー培地	
<i>Campylobacter fetus</i>	CCDA 培地	35℃微好気培養 3～5 日で発育する。
	スキロー培地	
嫌気性菌	ブルセラ寒天培地 (BRU)	嫌気性菌全般の非選択培地。 35℃嫌気培養 48 時間 (発育不良時は 96 時間まで延長) 同じ嫌気性菌全般の非選択培地である ABCM 寒天培地や GAM 寒天培地は、 <i>Prevotella</i> 属や <i>Porphyromonas</i> 属の 発育が劣る。
	アネロコロンビア寒天培地	
	PV 加ブルセラ寒天培地 (PV-BRU)	35℃嫌気培養 48 時間。 嫌気性 Gram 陰性桿菌の選択分離培地。 口腔・歯科領域からの材料の分離に適する。
	PEA 加ブルセラ寒天培地 (PEA-BRU)	35℃嫌気培養 48 時間。 グラム陽性菌用の選択分離培地であり、嫌気培養の際に好 気性菌が混在している材料からの分離に適する。
<i>Bacteroides fragilis</i> group	BBE 寒天培地 (BBE)	35℃嫌気培養 48 時間で褐色集落を形成する。
<i>Clostridioides difficile</i>	CCMA 寒天培地	35℃嫌気培養 48 時間で発育する。
	CCFA 寒天培地	
嫌気性菌増菌培地	HK 半流動培地	7～10 日間培養。
	ABCM 半流動培地	嫌気度が最も高いのは培地底部であるため、 底部に届くピペットを使用する。
	GAM 半流動培地	
真菌	サブロー寒天培地	25℃好気培養 (最大 1 ヶ月)
	ポテトデキストロース寒天培地	
<i>Candida</i> spp.	各種カンジダ用寒天培地	各種培地により特徴が異なる。
抗酸菌	小川培地	固形培地でコロニーを生成するため複数菌の存在を確認 しうる。コロニー性状は菌種同定の際の重要な情報にな る。培養 8 週後に最終報告する。
	Middlebrook 7H11 寒天培地	抗酸菌用の平板培地。炭酸ガス培養をすることで菌の増殖 が早く、1～2 週間でコロニーの形成を認める。検出感度 も小川培地より優れているが、小川培地に比べ雑菌の影響 を受けやすい。
	Middlebrook 7H9 液体培地	迅速性・感度に優れた液体培地。 自動機器による培養に用いられる。 培養日数でおよその菌量の推測が可能。
GBS	各種 GBS スクリーニング培地	各種培地により特徴が異なる。
MRSA	各種 MRSA スクリーニング培地	
VRE	各種 VRE スクリーニング培地	
ESBL	各種 ESBL スクリーニング培地	
CPE、CRE	各種 CPE・CRE スクリーニング培地	

注：特別な表記のないものについては 35℃好気培養とする。

### 3. 主要な検査材料の分離培養法

各検査材料の主要な分離培養法について表 14 に示す。

表 14. 各検査材料の主要な分離培養法

検査材料	培地	増菌	嫌気培養	注意点	特殊菌の検査 (検査依頼が必要な微生物)
喀痰	BA CHO EA			肺炎膿症が疑われる場合は嫌気培地を追加する	<i>Bordetella pertussis</i> <i>Mycoplasma pneumoniae</i> <i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycobacterium</i> spp. <i>Nocardia</i> spp. 真菌
咽頭粘液	BA CHO			扁桃炎など上気道炎の検査、MRSA 検索には選択培地を併用する	<i>Corynebacterium diphtheriae</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
鼻腔粘液	BA CHO			MRSA 検索には選択培地を併用する	<i>Bordetella pertussis</i>
胸水 (膿胸)	BA CHO	○	BRU	淡黄色で混濁が弱い場合、嫌気用分離平板培地を省略できる。嫌気性菌複合感染が疑われる場合 PEA-BRU、PV-BRU を併用する	<i>Legionella pneumophila</i> <i>Mycobacterium</i> spp.
膿瘍 ・扁桃周囲 ・副鼻腔 ・頸部など	BA CHO EA	○	BRU	嫌気性菌複合感染が疑われる場合 PEA-BRU、PV-BRU を併用する	
眼脂	BA CHO	○		嫌気性菌感染が疑われる場合 BRU を併用する	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Chlamydia trachomatis</i>
耳漏	BA CHO EA			嫌気性菌感染が疑われる場合 BRU を併用する	<i>Mycobacterium</i> spp.
尿 泌尿器材料 生殖器分泌液	BA CHO EA			BA、CHO は炭酸ガス培養を推奨 嫌気性菌感染が疑われる場合 BRU を併用する 生殖器分泌物は TH を追加する	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Salmonella</i> spp. 膿トリコモナス
膺 (GBS)	BA CHO	○		GBS 検索する場合、選択分離培地の利用が望ましい 増菌培地も市販されている	
糞便	BA EA SS TCBS スキロー STEC	○		サルモネラ増菌培地、アルカリペプトン水	<i>Clostridioides difficile</i>

胆汁	BA CHO EA PEA	○	BRU	嫌気性菌複合感染が疑われる場合 PEA-BRU、PV-BRU、BBEを併用 する	ランブル鞭毛虫
腹水	BA CHO EA PEA	○	BRU	淡黄色で混濁が弱い場合は嫌気用 分離平板培地を省略できる。 嫌気性菌複合感染が疑われる場合 PEA-BRU、PV-BRU、BBEを併用 する	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycoplasma hominis</i>
膿瘍 ・腹腔内 ・肛門周囲 ・皮下など	BA CHO EA PEA	○	BRU	嫌気性菌複合感染が疑われる場合 PEA-BRU、PV-BRU、BBEを併用 する	<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Mycoplasma hominis</i>
皮膚 創部膿	BA EA PEA	○		膿瘍からの材料では嫌気用分離培 地（BRU）を追加する	<i>Mycobacterium</i> spp.
脳脊髄液	BA CHO	○		脳膿瘍が疑われる場合は嫌気用分 離培地（BRU）を追加する	
血液	専用 ボトル				<i>Mycobacterium</i> spp.
CAPD液	BA CHO EA	○	BRU	血液培養ボトルを併用してもよい	<i>Mycobacterium</i> spp. 真菌
穿刺液 関節液など	BA CHO EA	○	BRU	嫌気性菌複合感染が疑われる場合 PEA-BRU、PV-BRUを併用する	
血管 カテーテル	BA CHO	○		7日間は観察する	

#### 4. 材料別の培地への塗抹方法

##### 1) カテーテル

###### (1) 細断法

カテーテルを細かく切って（約 5 mm）ブイヨン（TSB : Trypticase soy broth または MH : Mueller Hinton）へ浸し、ボルテックスミキサーなどを用いてよく攪拌、ブイヨンを平板培地と増菌培地へ接種する。

###### (2) Maki らの方法

カテーテルを滅菌ピンセットでつまんで培地上を計 4 回、回転させながら接種する。

###### (3) Cleri らの方法

カテーテルを TSB 2 mL の入った滅菌試験管に入れ、カテーテルの内径にあうサイズの注射器でカテーテルの内容を 3 回洗浄する。洗浄後の TSB を原液として 100 倍希釈し、そのうちの 100  $\mu$ L を平板培地に接種する。

##### 2) 綿棒の検体

培地上を転がすようにして、綿棒についた検体をまんべんなく塗り付ける。もしくはブイヨン（TSB または MH）へ懸濁し、接種する。

##### 3) 尿

定量培養が推奨される。

##### 4) 膿検体、分泌物、穿刺液

必要に応じて遠心集菌する。嫌気臭があれば、医師から嫌気培養の依頼がなくても嫌気培養を追加する（ただし安全キャビネットを利用している場合、臭いが分かりにくい）。

##### 5) 喀痰

蛋白溶解剤を利用し、均質化させてから接種する（Gram 染色には均質化させた検体は使用しない）。必要に応じて滅菌生理食塩水で洗浄し、喀痰外側に付着した常在菌を除去する。

## 5. 画線分離

滅菌白金耳等で採った試料を寒天培地に塗りつけ、画線を長くすることで白金耳に付いた菌量を希釈し、単独集落ができるように塗抹する方法のこと。

### 1) 画線分離の目的

複数の細菌が混在する試料から、それぞれ単独の細菌を分離すること。

### 2) 画線分離の方法

(1) 定量白金耳画線培養法（尿検体）の一例（図 6）

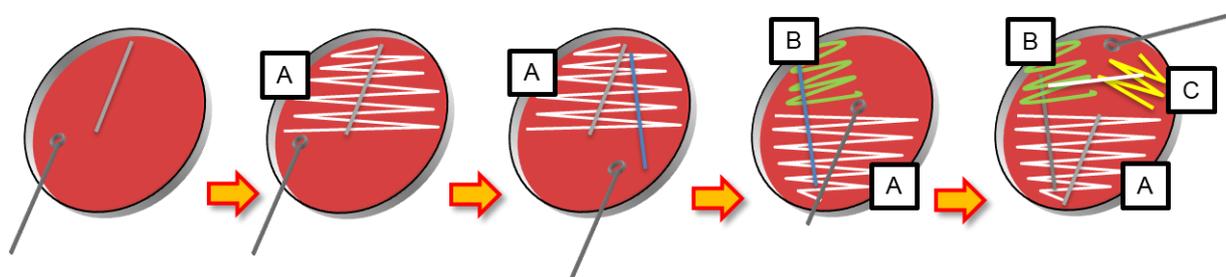


図 6 定量白金耳画線培養法（尿検体）の一例。検体を定量白金耳で直線塗布し、A 区画へ画線塗抹する。新しい白金耳を使用して B 区画まで直線的に横切り、B 区画へ画線塗抹する。再度新しい白金耳を使用して C 区画まで直線的に横切り、C 区画へ画線塗抹する。

菌量の判定方法を表 15 に示す。

表 15. 菌量の判定方法

培地への菌の発育	1 $\mu\text{L}$ 定量白金耳	10 $\mu\text{L}$ 定量白金耳
1 colony	$10^3$ CFU/mL	$10^2$ CFU/mL
以下、半定量値の目安		
A 区画	$10^5$ CFU/mL	$10^4$ CFU/mL
B 区画	$10^6$ CFU/mL	$10^5$ CFU/mL
C 区画	$10^7$ CFU/mL	$10^6$ CFU/mL

## (2) 通常白金耳塗抹法

一定の画線をすれば、発育したコロニーの量でおおよその菌量を推定することが可能である。培地に塗布した順序で4分画し、どの範囲まで菌が発育したかで判定を行う。この方法は定量法ではないため、大まかな菌数の参考にするのが望ましい。通常白金耳塗抹法の一例を図7に示す。

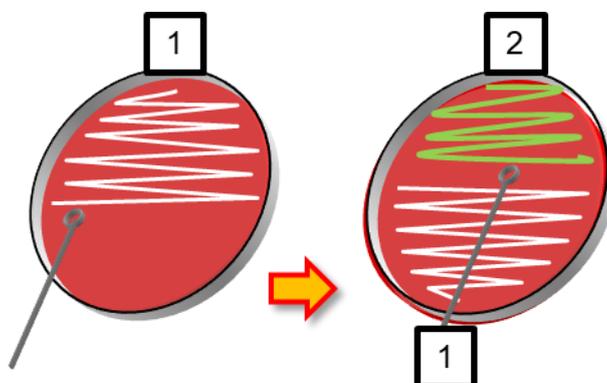


図7 通常白金耳塗抹法の一例。①から培地の半分まで画線塗抹する。培地を180度回転し、②から培地の残り半分に画線塗抹する。

## 6. 培地における菌量表現

培地における菌量表現については、独自の判定基準による表現が慣例的に各臨床微生物検査室で運用されていると考えられる。本手順書では、一例として Clinical Microbiology Procedures Handbook 4th edition の結果判定基準を表16に示す<sup>2)</sup>。

表16 培地における菌量表現

菌量表現	培地発育状態
-	未発育
1+	1/3 未満
2+	1/3 以上 2/3 未満
3+	2/3 以上
4+	培地全面

#### IV. 材料別釣菌基準

特に目的菌の依頼がない場合の釣菌基準を表 17～24 に示す。ここに記載した「釣菌基準」とは、起炎菌の可能性のあるコロニーが分離培地上において、記載量以上の菌の発育を認めた場合に釣菌（同定）すべき目安である<sup>1) 3) 4)</sup>。以下に、釣菌基準についての注意点を述べる。

- 当手順書における釣菌基準は、「Ⅲ. 培養検査」の「4. 培地における菌量表現」で記載した菌量表記に準拠し作成している。異なる菌量表現を用いている臨床微生物検査室においては適宜変換し利用されたい<sup>4)</sup>。

- 釣菌基準は、すべての施設・患者に絶対的に適応できるものではなく、患者情報、依頼内容、検体の品質、Gram 染色ならびに他の検査結果などを考慮し、適宜変更すべきものである。

- 1 つの材料で複数の菌が釣菌基準を満たした場合、病原性の強いもの、Gram 染色にて貪食を認めるもの、菌量の多いもの、薬剤耐性傾向の強いと思われるものから優先して釣菌する（ただし 1+以上で釣菌する菌種は全て釣菌する）。釣菌基準については、予め臨床と取り決めをしておくのが望ましい。

- 特に記載のない場合、釣菌対象となった菌について薬剤感受性試験も実施する。ただし、臨床との取り決めにより、薬剤感受性試験を省略する場合もある。

- 「明らかな優位」とは、起炎菌となることは通常少ないが、単独発育もしくは菌量が他の検出菌と比べて明らかに多い場合に釣菌すべきであることを示す。

- 「菌量報告のみ」とは、詳細な菌名同定ならびに薬剤感受性試験を通常必要とせず、属名ならびに菌量のみを報告を行うことを指す。ただし、臨床からの依頼があった場合には、詳細な菌名同定ならびに薬剤感受性試験を実施することもある。

- 常在菌の混入が避けられない材料（呼吸器・消化器など）で釣菌対象菌を認めなかった場合、または釣菌基準を満たさない場合、「常在細菌叢」「Normal flora」「口腔内常在菌のみ」「腸管病原菌陰性」などと報告する。ただし、上記にて報告する場合は、釣菌基準について予め臨床に説明しておく。

- 感染対策を目的とした耐性菌検索を実施する場合は、釣菌基準を満たさなくても目的の耐性菌、もしくは耐性菌の可能性のあるものを優先して釣菌する。

表 17. 血液、脳脊髄液、関節液、体腔液、羊水、子宮内容物、カテーテル先端などの無菌材料

菌名	外来一般患者、入院・免疫抑制など（共通）
全ての菌種	発育を認めた場合すべて (増菌培養も考慮)

直ちに医師に報告し、同定・薬剤感受性試験を実施する。

表 18. 呼吸器材料：喀痰・鼻腔・咽頭・耳漏・気管支洗浄液

菌名	外来一般患者	入院・免疫抑制など
β溶血性連鎖球菌（GBS <sup>*1</sup> 除く）	1+以上	1+以上
<i>S. pneumoniae</i>		
<i>H. influenzae</i>		
<i>M. catarrhalis</i>		
<i>B. pertussis</i>	2+以上	1+以上
<i>S. aureus</i>		
<i>K. pneumoniae</i>	明らかな優位または貪食像あり	明らかな優位または貪食像あり
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>Enterococcus</i> spp.		
ブドウ糖発酵グラム陰性桿菌		
ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌		
<i>H. influenzae</i> 以外の <i>Haemophilus</i> spp.		
CNS		
<i>Corynebacterium</i> spp.	明らかな優位 (菌量報告のみ)	明らかな優位 (菌量報告のみ)
GBS		
<i>Candida</i> spp.	1+以上 (菌量報告のみ)	
糸状菌		
<i>Cryptococcus</i> spp.	貪食像がある場合は誤嚥性肺炎を疑い コメント報告を行う	
口腔内常在菌		

表 19. 消化器材料：糞便（食中毒関連下痢症）外来一般

菌名	外来一般患者、入院・免疫抑制など（共通）
EHEC	発育を認めた場合すべて（増菌培養も考慮）
<i>Salmonella</i> spp.	
<i>Shigella</i> spp.	
<i>Campylobacter</i> spp.	
<i>Vibrio</i> spp.	
<i>Yersinia</i> spp.	
<i>Aeromonas</i> spp.	
<i>Plesiomonas</i> spp.	

表 20. 消化器材料：糞便（抗菌薬関連下痢症）

菌名	一般	小児・免疫抑制など
<i>Clostridioides difficile</i>	1+以上	1+以上
MRSA	2+以上	
<i>K. oxytoca</i>	明らかな優位	明らかな優位
上記以外		

表 21. 消化器材料：胆汁等

菌名	一般	小児・免疫抑制など
<i>S. aureus</i>	2+以上	2+以上
<i>Enterococcus</i> spp.		
β溶血性連鎖球菌		
ブドウ糖発酵グラム陰性桿菌		
<i>P. aeruginosa</i>		
ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌		
嫌気性菌	2+以上（菌量報告のみ）	
<i>Candida</i> spp.		
上記以外	明らかな優位	明らかな優位

表 22. 泌尿器・生殖器材料：尿

菌名	中間尿	採尿カテーテル
<i>N. gonorrhoeae</i>	1+以上	1+以上
<i>S. aureus</i>	男性：10 <sup>3</sup> CFU/mL 以上 女性：10 <sup>5</sup> CFU/mL 以上	10 <sup>2</sup> CFU/mL 以上
<i>S. saprophyticus</i>		
<i>Enterococcus</i> spp.		
β溶血性連鎖球菌		
ブドウ糖発酵グラム陰性桿菌		
<i>P. aeruginosa</i>		
ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌		
<i>Aerococcus</i> spp.		
<i>Corynebacterium</i> spp.		
<i>Candida</i> spp.		
上記以外	10 <sup>5</sup> CFU/mL 以上かつ他に菌なし	

表 23. 泌尿器・生殖器材料：膣・頸管分泌物

菌名	一般	小児・免疫抑制など
β溶血性連鎖球菌	1+以上	1+以上
<i>N. gonorrhoeae</i>		
<i>S. aureus</i>	2+以上	2+以上
<i>Enterococcus</i> spp.		
ブドウ糖発酵グラム陰性桿菌		
<i>P. aeruginosa</i>		
ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌		
<i>Haemophilus</i> spp.		
嫌気性菌		
<i>Mycoplasma hominis</i>	2+以上（菌量報告のみ）	1+以上（菌量報告のみ）
<i>Candida</i> spp.		
上記以外	明らかな優位	2+以上

表 24. 皮膚・膿材料（動物咬傷含む）

菌名	一般	小児・免疫抑制など
<i>S. aureus</i>	1+以上	1+以上
β溶血性連鎖球菌		
<i>P. aeruginosa</i>		
<i>Pasteurella multocida</i>		
<i>Capnocytophaga canimorsus</i>		
<i>S. lugdunensis</i>	2+以上	2+以上
<i>Streptococcus</i> spp.		
<i>Enterococcus</i> spp.		
ブドウ糖発酵グラム陰性桿菌		
ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌		
嫌気性菌		
<i>Candida</i> spp.	2+以上（菌量報告のみ）	
CNS（ <i>S. lugdunensis</i> 以外）	常在細菌叢	常在細菌叢
上記以外	明らかな優位	明らかな優位

## V. 同定検査

培養によって得られたコロニー（菌）を、さまざまな手法を用いて属・種まで決定する検査である。臨床微生物検査において、すべての菌に対して正確に菌種レベルまで同定することは不可能であるため、検査材料の種類、常在菌叢の有無、患者の病態、臨床的意義、菌数、菌種による同定技術の差異、迅速性、所要時間、経済性などを考慮して、どのレベルまで同定する必要があるのか判断することが重要である。代表的な同定法は以下の通り。

### 1. コロニーの Gram 染色所見による同定

培養によって分離されたコロニーの Gram 染色性と形態から、グラム陽性球菌、グラム陰性桿菌など、染色所見レベルで同定する。Gram 染色のみでの菌名同定はなかなか難しいが、*Campylobacter* 属のように特徴的な所見を有する菌などは Gram 染色所見だけでも推測可能な場合がある。

### 2. 発育性、培養条件、コロニーの特徴から菌群を推定する同定

培養によって分離されたコロニーの形状と培地の変化、培養条件から、腸内細菌目細菌、嫌気性菌、真菌など、菌群レベルで同定する。

### 3. 生化学的性状確認培地による菌種の同定

培養によって分離された集落の形状と培地の変化、集落形成菌の Gram 染色性と形態などから適切な確認培地を選び、確認培養と性状確認を実施する。確認培地では、終末代謝産物による培地 pH の変化（pH 指示薬の変色）などを観察・確認し、それぞれの性状をデータベースと比較して菌種を同定する。

### 4. 簡易同定キット/自動機器による菌種の同定

菌種同定の簡易・迅速化を目的としたもので、ブドウ球菌用、連鎖球菌・腸球菌用、*Haemophilus* 属・*Neisseria* 属用、腸内細菌目細菌用、ブドウ糖非発酵グラム陰性桿菌用および嫌気性菌用などの多種類のキットが市販されている。基本的な原理は、各種生化学反応基質に対する菌体酵素の代謝反応を呈色反応で確認するというもので、全反応（項目）をコンパクトな 1 枚のプレート（パネル）で実施できるようにした微量テスト法である。自動機器も複数販売されている。

### 5. 質量分析による同定

微生物の成分を、質量分析を用いて同定する方法として、MALDI-TOF MS がある。被検菌の成分を、質量分析計を用いて測定し、得られたマススペクトルパターンを、データベースと比較して菌種を同定する。MALDI-TOF MS の同定精度は、従来法と比較して同等あるいはそれ以上とされており<sup>5),6)</sup>、従来よりも高精度に菌種同定が可能である。また、データベースは毎年更新されるため、同定可能な

菌種は年々増える傾向にある。しかし、16S rRNA の塩基配列が類似する菌種（赤痢菌と大腸菌、肺炎球菌と緑色連鎖球菌など）は MALDI-TOF MS では鑑別できない場合もあることに留意すべきである。

## 6. 塩基配列解析による同定

培養によって分離された集落の細菌 DNA や、無菌的な臨床検体中の細菌 DNA の塩基配列を解析することで、菌種名を同定する方法。菌種ごとに異なる配列を持つハウスキーピング遺伝子（16S rRNA, *rpoB*, *gyrB* 等）をターゲットとして PCR 法による増幅を行い、シーケンス解析で解読した塩基配列をデータベースと照合することで種類の特定を行う。以前は高価な検査であったが、サーマルサイクラーなどの機器を保有していれば自施設にて増幅を行い、シーケンス解析は外注で比較的安価に実施することも可能である。

## 7. 血清学的検査による同定

同一の菌種に属する分離株を抗原構造の違いによって群別する検査で、菌体を構成するリポ多糖、莢膜多糖、鞭毛蛋白質などが対象になる。

*Salmonella* 属や *Shigella* 属などの細菌では、O 抗原（菌体抗原）、H 抗原（鞭毛抗原）などの型別が重要で、特異抗体との反応を用いて血清型（serovar）を決定する。一般的な方法では各種診断用免疫血清を用い、免疫血清と被検菌（抗原）を混和したときに生じる凝集反応を利用している。

## VI. 薬剤感受性試験

検体から単離され、治療対象と目される病原微生物に対し有効（または無効）な抗微生物薬を調べる検査である。in vitro での薬剤感受性試験を大別すると希釈法とディスク拡散法に分けられ、希釈法はさらに微量液体希釈法と寒天平板希釈法に分けられる。かつてはディスク拡散法による薬剤感受性試験が臨床検査の主流であったが、現在は自動化された微量液体希釈法の利用が進んでおり、2023 年度愛知県臨床検査精度管理調査のメロペネムの薬剤感受性試験においては、59/60 (98.3%) の施設が微量液体希釈法を、1/60 (1.7%) の施設がディスク拡散法を用いて回答している<sup>7)</sup>。

### 1. 微量液体希釈法

ウェルプレートに、測定対象となる複数種類の抗微生物薬を液体培地に溶解し、その 2 倍希釈系列（例：128, 64, 32, … 2 µg/mL）を作製する。単離した病原微生物を定められた菌量に調整しこれに接種する。定められた条件で培養した後、菌の発育がみられない最小希釈濃度を MIC 値として読み取る。

### 2. ディスク拡散法

定められた菌量を試験用寒天培地表面に接種する。その上に一定濃度の抗微生物薬を含む濾紙（ディスク）を置き、定められた条件で培養した後、形成された発育阻止円直径を測定する。

### 3. ブレイクポイント

in vitro の薬剤感受性試験結果（MIC 値や阻止円直径）より、測定した抗微生物薬が臨床的に有効かどうかを判定するために設定された基準。CLSI、EUCAST、日本化学療法学会などが定めており、わが国では CLSI の基準が最も利用されている<sup>8) 9) 10)</sup>。CLSI のブレイクポイントは感性 (susceptible: S)、中間 (intermediate: I)、用量依存的感性 (susceptible dose dependent: SDD)、耐性 (resistant: R) の 4 種類に区分されている<sup>8)</sup>。

## VII. 微生物検査室における精度管理

微生物検査室における精度管理において重要な管理要素を「検体」、「要員」、「資材」、「成績」に大別し、その管理内容と方法について以下に記す。

### 1. 検体の管理

#### 1) 適切な採取方法および容器

- (1) 検体採取のタイミングは適切か（最も菌量の多い時期か、抗菌薬投与前か）。
- (2) 汚染のない方法で採取されているか。
- (3) 採取容器は適切であるか。
- (4) これらの内容がマニュアル化されており定期的な見直し及び職員への教育がなされていることが望ましい。

#### 2) 搬送・保存方法

- (1) 原則、検体採取後は直ちに検査室へ提出する。
- (2) 保存が必要な場合の条件は遵守されているか。
- (3) 搬送時においては汚染、個人情報保護への配慮がなされた専用容器を用いる。

#### 3) 検体の“質”の判定

- (1) 喀痰検体においては肉眼的（Miller & Jones 分類）および顕微鏡的（Geckler 分類）評価による検体の質の判定がなされ、診断価値のある検体を用いる。
- (2) 糞便検体においてはその外見（固形便、泥状便、タール便、白色便、水様便、粘血便などを観察、記録が望まれる。特に *Clostridioides difficile* のトキシン検査においては Bristol Stool Scale による便検体評価が推奨されている。

#### 4) 不適切検体の判断と処置

感染症診療において不適切検体への判断が施設内で周知・遵守されているか。またその際の処置へのルール化が望ましい。

## 2. 要員管理

### 1) 統一された日常検査法の確立と遵守

- (1) SOP が整備され、すべてのスタッフが適切で質の担保された検査を実施できる体制の確立が望ましい。
- (2) 上記、SOP は定期的に見直され常に最新版が閲覧性の良い条件で全スタッフに供給できる環境整備が望ましい。

### 2) スタッフ教育

- (1) 職員の教育にあたり、その力量を客観評価できるツールを配備し定期的な力量の評価を実施する。
- (2) 新規配属されたスタッフにおいては、その教育計画の策定および定期的な評価を実施する。
- (3) 特に塗抹鏡検検査においては技師間差を是正するための教育も定期的になされることが望ましい。
- (4) これらの教育はすべてその記録を残すことが望ましい。

### 3. 資材管理

#### 1) 培地の品質管理と記録

(1) 各医療機関で管理を要する生培地について、以下の内容管理・記録が推奨される。

- ① 色調、乾燥、容量、破損、汚染の有無を肉眼的にチェック。
- ② 有効期限およびロット番号の管理。
- ③ 管理用菌株などを用いて発育性、溶血性、選択性を管理。
- ④ メーカー発行の試験成績書を保管。

(2) 自家製培地については以下の内容の確認・記録が推奨される。

- ① メーカー指定の調製方法で作成。
- ② 適切な温度、湿度で保管。
- ③ 管理用菌株などを用いて発育性、溶血性、選択性を管理。

#### 2) 温度管理

培地保管および培養の品質に影響を及ぼす冷蔵庫、ふ卵器等の温度管理機器については点検・保守などのルール作成、実施、記録の管理が要求される。

- (1) 温度のチェックを毎日2回以上実施し、実数値を記録。
- (2) 日常点検および定期点検・保守の実施と記録。
- (3) 定期的（半年に1回程度）に標準温度計を用い、各温度管理機器の表示温度を検証。

#### 3) 同定キット・抗血清など

- (1) 精度管理用菌株や陽性・陰性対照などを用いて各種精度を確認。
- (2) 適切な保存条件で管理。

#### 4) 自動同定機器

- (1) 精度管理用菌株を用いて同定検査の精度を確認。
- (2) 日常点検および定期点検の実施と記録。
- (3) 定期保守の遵守。
- (4) CLSI 基準に基づいた判定情報の更新。

#### 5) 薬剤感受性検査用ディスク・ウェルプレート（パネル）

精度管理用菌株を規定の濃度に調製し、測定した MIC 値が許容レンジ内に収まっているか否かを管理する。薬剤感受性検査に用いる代表的な精度管理用菌株を表 25 に示す<sup>8)</sup>。

表 25. 薬剤感受性検査用の精度管理用菌株

菌株名	ディスク拡散法	微量液体希釈法
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	○	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213		○
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212		○
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	○	○
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	○	○
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	○	○
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49247	○	○
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766	○	○
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	○	○
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	○	○
<i>Campylobacter jejuni</i> ATCC 33560		○

○：適応あり

#### 4. 成績管理

検査担当者および管理者などの他者とのチェックにより成績確認を実施する。

##### 1) 検体

- (1) 検体受付時に検査材料、依頼項目、患者属性などの整合性に注意する。
- (2) 培養時の患者間違い防止や適切な培養（選択分離培地の使用や培養条件）のため、手順のルール化が望ましい。
- (3) コンタミネーション防止のため 清潔操作を遵守する。

##### 2) 結果判定と報告

- (1) 判定基準（釣菌、薬剤感受性パターン、薬剤耐性菌の判定フロー）のマニュアル化。
- (2) システム上でのイレギュラー成績に対するアラート表示で見落としを防止する。
- (3) 各種検査の結果判定と最終結果報告を別のスタッフで行う。

##### 3) ダブルチェックが有用な事例

- (1) 抗酸菌塗抹検査での陽性結果の判定
- (2) 遭遇がまれな多剤耐性菌の結果判定
- (3) 特異的な Gram 染色形態を示した細菌の塗抹検査の結果判定
- (4) 保健所への届出を要する感染症に該当する結果に遭遇した場合

(5) その他、結果の手入力が多く誤報告リスクの高い作業

## 5. 内部精度管理の実例

### 1) 染色の管理

(1) Gram 染色の場合はグラム陽性球菌およびグラム陰性桿菌を、抗酸菌染色の場合は非結核性抗酸菌（陽性対照）およびグラム陰性桿菌（陰性対照）を用い、適当な濃度に菌液を調整後スライドグラスに塗布し、固定を行う。これを複数枚作成し保管する。

(2) 染色実施時に精度管理標本を染色鏡検し染色性の良・不良および担当者を記録する。

(3) 顕微鏡の日常点検も同時に実施し記録を残す。

### 2) 塗抹標本による技師間差是正

#### (1) 準備

①精度管理担当者は、日常検体より管理用標本を準備する。

②標本の選定には、明確な精度管理の意図を反映することが望ましい（貪食の有無や特徴的な形態を把握して菌名を推定させることを意図した塗抹標本など）

#### (2) 鏡検

全技師が個別に鏡検し結果を精度管理担当者に提出する。

#### (3) 評価と是正

①精度管理担当者は結果をまとめ検討会を実施する。

②技師間差が確認される場合には再度全員が鏡検し技師間差の是正をはかり、教育実施記録を残す。

### 3) 業務における技師間差是正

#### (1) 準備

日常業務において、手技、判定、各種判断に技師間差が生じそうな事例を収集する（菌量の少ない抗酸菌陽性塗抹標本の鏡検、*Shigella* 属菌の検出など）。

#### (2) 実施

不定期に、手技、判定、各種判断についてテストし回答を回収する。

#### (3) 評価と是正

結果をまとめ検討会を実施する。正回答を周知徹底し実施記録を残す。

### 4) 精度管理用菌株を用いた同定・薬剤感受性試験の精度管理方法

### (1) 菌株

必要な精度管理菌株を購入し、培地に大量に純培養した後、マイクロバンクなどを用いて凍結保存する。購入した微生物株のオリジナルからの継代回数 (n) を確認し、復元 (継代回数 n + 1 回目) して得られた培養物を, n + 1 世代目として数える。これを凍結保存し再度復元培養した菌株は n + 2 世代目ということになる。培地性能試験や適合性試験に用いる微生物株については、継代回数 5 回を超えて使用しない。したがって、検査室の運用ルールに応じた継代回数の精度管理菌株を購入することが必要となる (例: 継代回数 3 回以内と記載されている菌株製品では、製品の復元、凍結保存、再復元培養の時点で継代回数 5 回以内となる)。

### (2) 実施

- ① 同定および薬剤感受性試験試薬のロット変更時に実施する。
- ② 対象の精度管理用菌株を培養し、各種試薬を用いて検査を実施する。

### (3) 評価

管理許容幅と比較し乖離がないことを確認、記録する。認められた場合は原因追及および是正を行う (各種試薬の使用期限の確認、冷蔵庫、冷凍庫、ふ卵器の温度管理、自動分析機の状態の確認、手技の確認)。

## 6. 外部精度管理<sup>11)</sup>

検査室の測定値の信頼性に関する現状の評価を主たる目的とし、共通の試料を各施設に配付して測定結果を求め、全体および個々の検査室の実行能力を第三者が評価し、必要に応じて是正措置を行う。現在、国内で行われている主な外部精度管理調査としては、日臨技臨床検査精度管理調査、日本衛生検査所協会精度管理調査、都道府県単位での精度管理調査、試薬・機器メーカーなどによりそれぞれ年 1 回実施されている。これらの外部精度管理調査は施設間差を客観的に評価し技術水準を一定に保つという役割がある一方で、同時に全体の標準化を推進する役割もある。検査室ごとの測定値の単なる適合 or 不適合という評価を行うだけではなく、問題を認めた検査室は検査プロセスの改善をはかり、信頼性が保証された検査プロセスを維持し継続することが重要となる。

## 7. 精度の確保のために設けるべき基準

医療法令により、医療機関が検体検査を実施する場合にはその精度を適正に管理することが求められている。検査室が検査精度確保のために設けるべき基準を以下に記す。

- 1) 精度の確保に係る責任者の設置 (医師または臨床検査技師)
- 2) 精度の確保に係る各種標準作業書および日誌等の作成
  - (1) 検査機器保守管理標準作業書
  - (2) 測定標準作業書

- (3) 試薬管理台帳
- (4) 検査機器保守管理作業日誌
- (5) 測定作業日誌
- (6) 統計学的精度管理台帳
- (7) 外部精度管理台帳

3) 検体検査の精度の確保のために管理者の努めるべき事項<sup>12)</sup>

- (1) 内部精度管理の実施
- (2) 外部精度管理調査の受検
- (3) 適切な研修の実施

以下に各種標準作業書・日誌等に記載すべき事項について記す。

①検査機器保守管理標準作業書

医療機器の添付文書、取扱説明書等をもって代替可能とする。

②測定標準作業書

検査項目ごとに、「定義」、「臨床的意義」、「測定方法及び測定原理」、「検査手順（フロー等）」及び「基準範囲及び判定基準」並びに以下の事項について、可能な限り多くのものを盛り込むことが望ましい。

- ③性能特性（測定感度、測定内変動等）
- ④検査室の環境条件
- ⑤検査材料（検体量、採取条件等）
- ⑥試薬、機器、器具及び消耗品
- ⑦管理試料及び標準物質の取扱方法
- ⑧検査の変動要因
- ⑨測定上の注意事項
- ⑩異常値を示した検体の取扱方法
- ⑪精度管理の方法及び評価基準
- ⑫参考文献等
- ⑬試薬管理台帳

記入すべき事項としては、以下のものが考えられる。

- i) 試薬の有効期限
- ii) 保管されている試薬の在庫

⑭検査機器保守管理作業日誌

保守管理を行う担当者が記入すべき事項としては、以下のものが考えられる。

- i) 点検日時及び点検実施者名

ii) 各検査機器における保守管理上確認すべき内容

⑮上記確認すべき事項について特に付記すべき内容

⑯業者による定期保守点検を受けた場合はその作業内容、点検を行った業者名等

⑰測定作業日誌

記入すべき事項としては、以下のものが考えられる。

i) 検査項目ごとの実施件数

ii) 実施件数の内、検査エラー又は検査不具合の発生件数

iii) 統計学的精度管理台帳

⑱内部精度管理を実施した場合、以下のものが考えられる。

i) 実施日及び実施検査項目

ii) 実施者名

iii) 実施結果（検査エラー値が出た場合の考察等含む）

iv) 外部精度管理台帳

外部精度管理調査を受検した場合、受検日（受検申込日、実施団体からの結果報告日等）及び外部精度管理調査実施主体名等を記載する。または実施結果（外部精度管理調査実施主体が作成する報告書）をもって代替可能とする。

## VIII. 参考文献

- 1) 小栗豊子: 臨床微生物検査ハンドブック第5版; 三輪書店,東京,2018
- 2) Leber AL (ed) . “Clinical microbiology procedures handbook, 4th ed”. ASM Press, Washington, DC, 2016
- 3) 堀井俊伸, 犬塚和久: 微生物検査ナビ第2版; 栄研化学株式会社, 東京,2016
- 4) 青木眞: レジデントのための感染症診療マニュアル第4版; 医学書院, 東京,2020
- 5) Piseth S, et al.: “Ongoing Revolution in Bacteriology: Routine Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry,” Clin Infect Dis, 2009; 49: 543–551.
- 6) Bizzini A, et al.: “Performance of matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for identification of bacterial strains routinely isolated in a clinical microbiology laboratory”, J Clin Microbiol, 2010; 48: 1549-54.
- 7) 愛知県臨床検査技師会. 2023 年度愛知県臨床検査精度管理調査総括集 微生物検査部門; 2023. 215-225.
- 8) Clinical and Laboratory Standards Institute: Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; 34th Informational Supplement. Document M100-S34, Wayne, PA, 2024.
- 9) European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters, version 11.0, 2021.
- 10) 日本化学療法学会 : 委員会報告・ガイドライン一覧 .  
<http://www.chemotherapy.or.jp/guideline/index.html> (2021年5月1日アクセス)
- 11) 奥住捷子: 「臨床微生物検査の外部精度管理」, モダンメディア, 2006; 59: 278–285
- 12) 厚生労働省 『医療法改正等の経緯と検体検査の精度の確保に係る基準について』  
<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/000402691.pdf> (2021年5月1日アクセス)

## ガイドライン作成委員会

作成委員長	坂梨 大輔	(愛知医科大学病院)
作成委員	原 祐樹	(日本赤十字社愛知医療センター名古屋第二病院)
作成委員	河内 誠	(JA 愛知厚生連 江南厚生病院)
作成委員	永田 悠起	(JA 愛知厚生連 豊田厚生病院)
作成委員	細田 卓也	(藤田医科大学岡崎医療センター)
作成委員	長田 ゆかり	(名古屋大学医学部附属病院)
作成委員	西尾 美津留	(小牧市民病院)
作成委員	池戸 政博	(名鉄病院)
作成委員	太田 晃成	(碧南市民病院)
作成委員	杉浦 康行	(JA 愛知厚生連安城更生病院)
作成委員	加藤 雄大	(JA 愛知厚生連豊田厚生病院)
作成委員	三谷 有生	(日本海員掖済会名古屋掖済会病院)
作成委員	稲垣 薫乃	(藤田医科大学病院)
作成委員	松尾 由佳	(独立行政法人国立病院機構名古屋医療センター)

問い合わせ先

愛知県臨床検査標準化協議会事務局

〒450 - 0002

名古屋市中村区名駅五丁目 16 番 17 号

花車ビル南館 1 階

公益社団法人 愛知県臨床検査技師会事務所

Tel 052 - 581 - 1013

Fax 052 - 586 - 5680

愛知県臨床検査標準化ガイドライン  
「日常微生物検査における標準手順書」  
第 2 版

発行 ××××年×月

発行所 愛知県臨床検査標準化協議会

発行者 AiCCLS 会長名

編集者 内田一豊・笹木優賢・坂梨大輔