

資料2

20150228 感染症検査に関する実態調査 佐多

V.4 (20150228Final)

感染症検査の精度管理に関する実態調査 アンケート結果報告 2015.2.28

地全協会員の皆様、ご協力いただきありがとうございました。

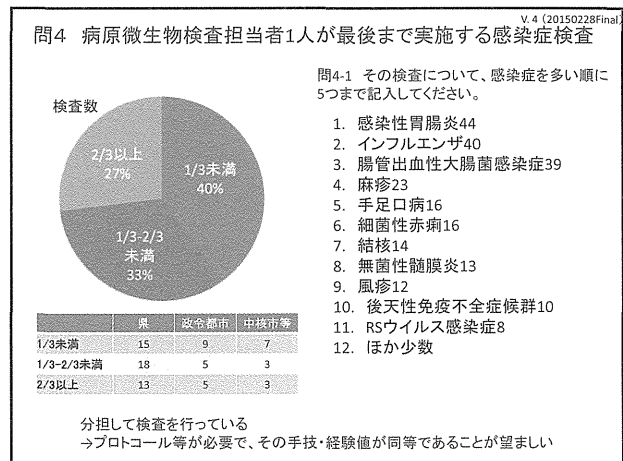
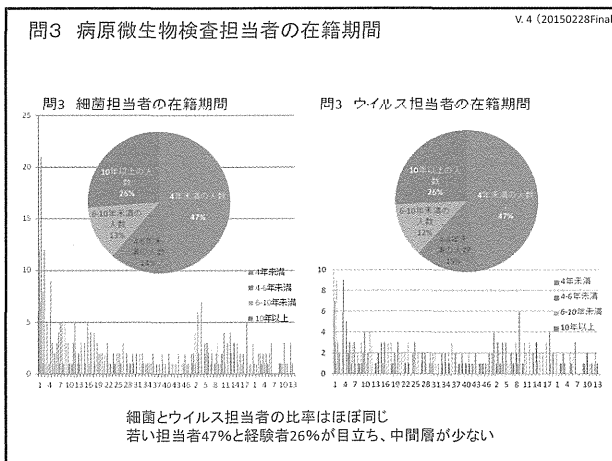
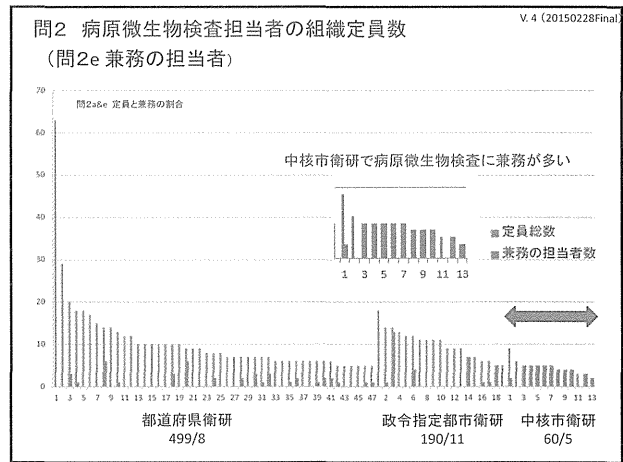
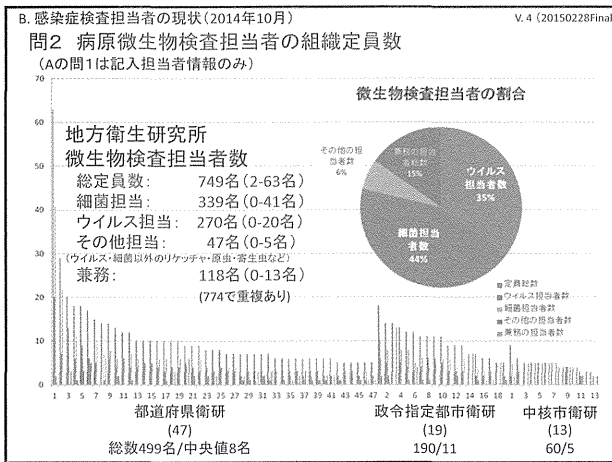
地衛研全国協議会精度管理部会 および
平成26年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続の実施の
ための事業体制の構築に関する研究(H26-健危-一般-001)」班 (精度管理班)

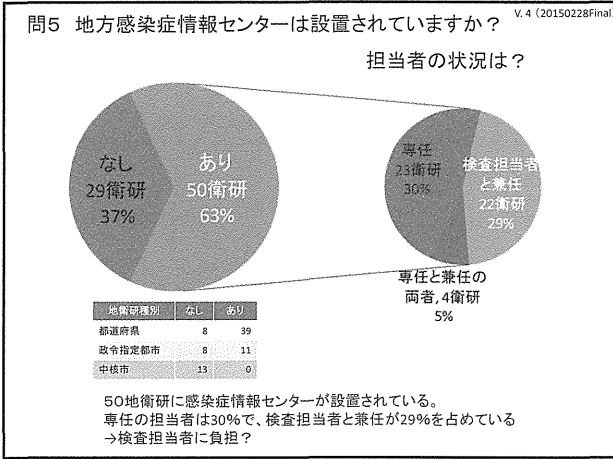
精度管理部会長および研究代表者
佐多徹太郎
(富山県衛生研究所)

V.4 (20150228Final)

感染症検査の精度管理に関する実態調査 アンケート調査の経緯

- 準備: 1)H26年4月「精度管理」研究班が成立
2)5月8日班会議でアンケート調査の実施決定
3)6月20日までにアンケート項目の提出依頼(班員等全員へ)
4)素案2回、回答付き案2回、計4回提示し、研究班から意見聴取
5)10月初旬に完成
- 実施: 平成26年10月8日から10月21日まで
地方衛生研究所ネットワークのinfo@chieiken.gr.jpで配布・依頼
- 集計: 10月21日締切、64件受領。
その後11月中旬までに全79地衛研から回答を得た→回収率(100%)
11月4日の地全協精度管理部会で中間報告(Version 1, 20141031)
11月6日の調特別研究班疫学小班会議でも中間報告(同Version)
12月5日に研究班員と疫学小班にVersion 2 (20141203)を配布
12月16日に調特別研究班で概要説明Version 2 (20141203)
H27年1月9日第二回班会議で供覧Version 3 (20150109)
H27年2月28日最終版Version 4 (20150228)
- 報告書: 研究班員の意見を聴取後、1月9日の班会議で報告し、2月末締切





C. 外部精度管理の対象感染症について (V.4 (20150228Final))

問6 地衛研が検査可能な(している)感染症対象疾患 地衛研のおよそ80%以上ができる感染症を下記にリスト

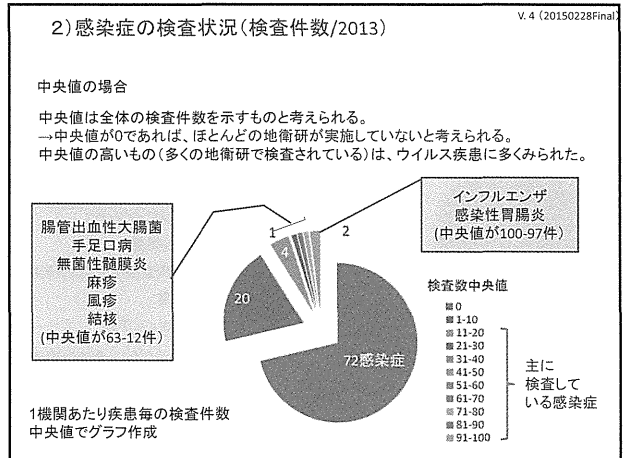
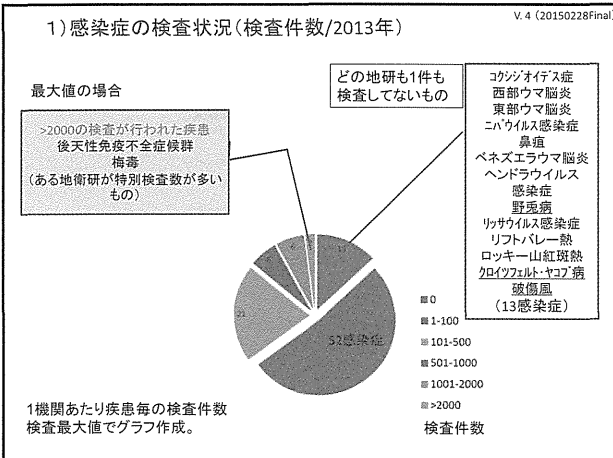
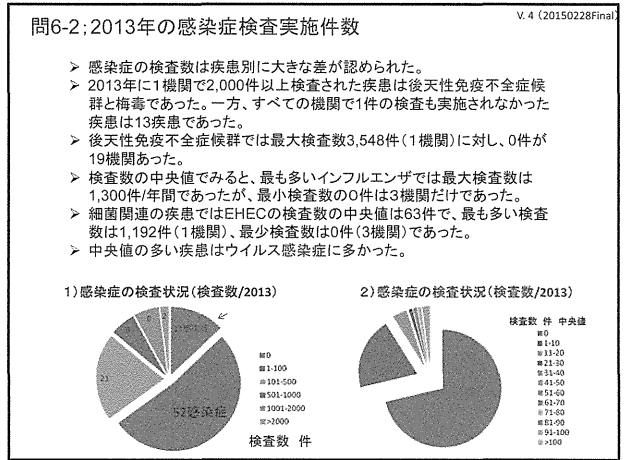
分類	疾病名	全体		1.検査対応		指定都市		中核都市					
		できる	できない	できる	できない	できる	できない	できる	できない				
二類 5疾病	重症呼吸器感染症	81	15	80	38	8	83	16	3	84	7	4	64
	鳥インフルエンザ (H5N1)	72	5	94	45	1	98	18	1	95	8	3	73
三類 5疾病	コレラ	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
	細菌性赤痢	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
	腸管出血性大腸菌感染症	78	1	98	47	0	100	18	1	95	13	0	100
	腸チフス	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
四類 43疾病	パラチフス	61	16	79	38	8	83	16	3	84	7	5	58
	リフトバネ熱	72	6	92	46	1	98	18	1	95	8	4	67
	A型肝炎	70	6	92	45	1	98	18	1	95	7	4	64
	重症熱性血小板減少症候群	71	7	91	46	1	98	17	2	89	8	4	67
五類 18疾病	レジオネラ症	70	7	91	45	1	98	16	2	89	8	4	67
	後天性免疫不全症候群	60	16	79	38	8	83	14	4	78	8	4	67
	先天性風しん症候群	58	16	78	39	6	87	15	3	83	4	7	56
	風しん	72	3	96	47	0	100	17	0	100	8	3	73
20疾病	RSウイルス感染症	63	12	84	45	2	96	16	1	94	2	9	18
	咽頭結核	64	11	85	45	1	98	17	0	100	1	10	9
	A群溶血性レンカ球菌咽頭炎	56	19	75	38	9	81	15	2	88	3	8	27
	急性性髄膜炎	75	1	99	47	0	100	16	0	100	12	1	92
	手足口病	65	10	87	47	0	100	17	0	100	1	10	9
	ヘルパンギーナ	64	11	85	47	0	100	16	1	94	1	10	9
	流行性耳下腺炎	61	13	82	43	3	93	16	1	94	2	9	18
	インフルエンザ(鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザ等感染症を除く)	71	4	95	46	0	100	17	0	100	8	4	67
	急性性血行性髄膜炎	58	16	78	41	5	88	17	0	100	0	11	0
	流行性角結膜炎	61	13	82	43	3	93	17	0	100	1	10	9
(病原体がウイルスであるものに限る)	67	9	88	46	1	98	17	0	100	4	8	33	
指定 感染症	急性性髄膜炎	65	10	87	47	0	100	17	0	100	1	10	9
	中東呼吸器症候群	67	8	89	45	2	96	17	0	100	5	9	45
	鳥インフルエンザ (H7N9)	70	3	96	45	1	98	17	0	100	8	2	80

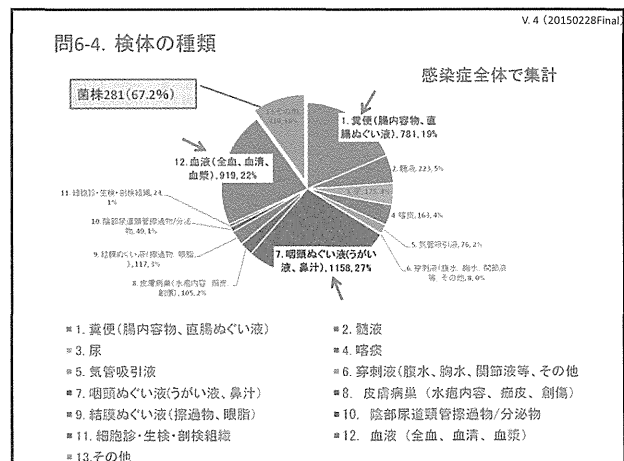
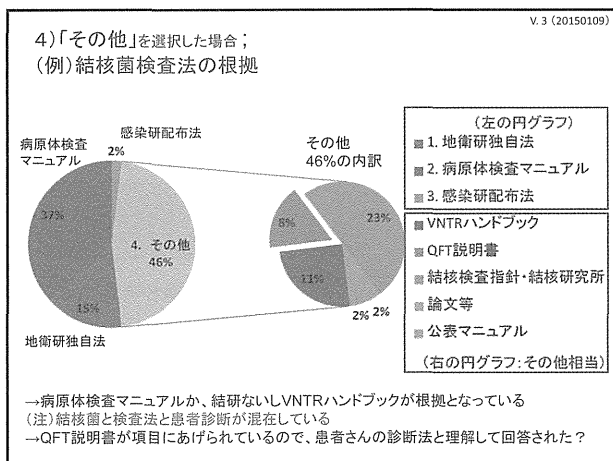
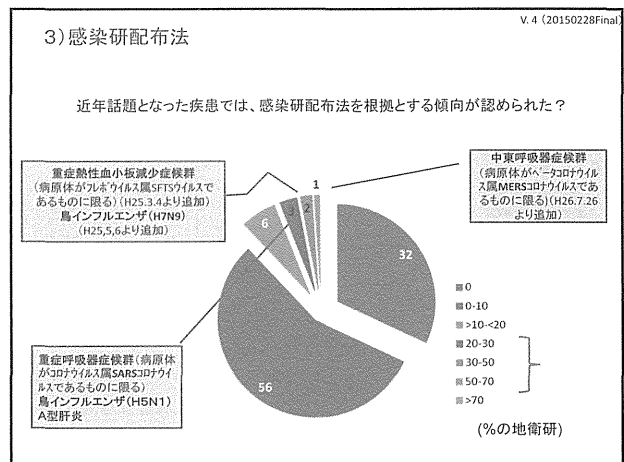
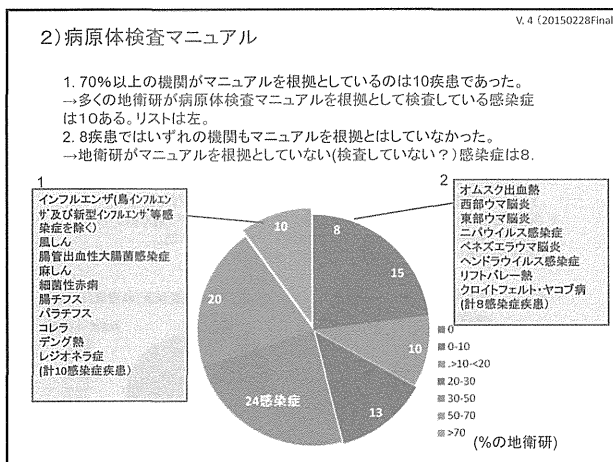
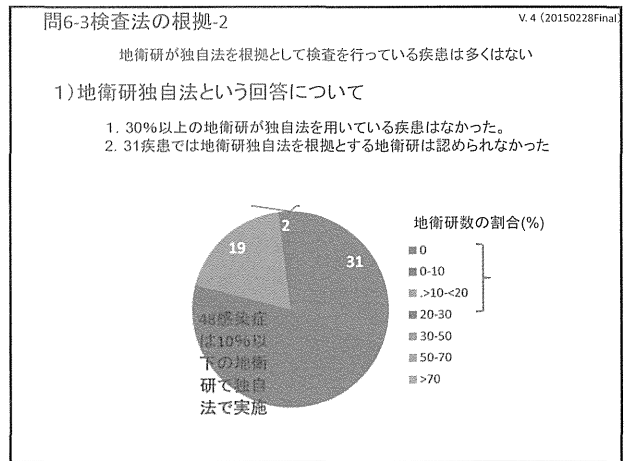
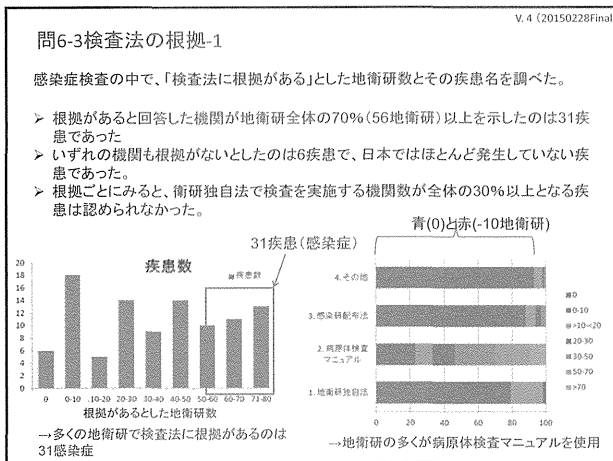
問6 地衛研が検査可能な(している)感染症対象疾患 (V.4 (20150228Final))

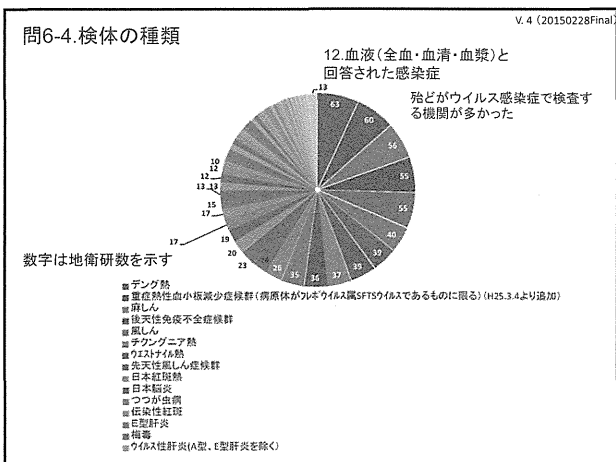
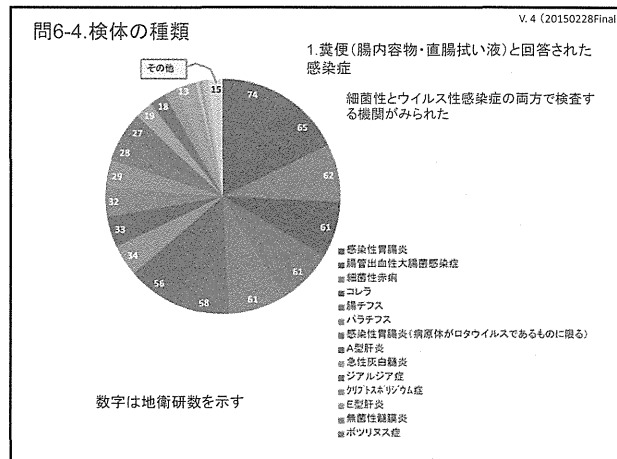
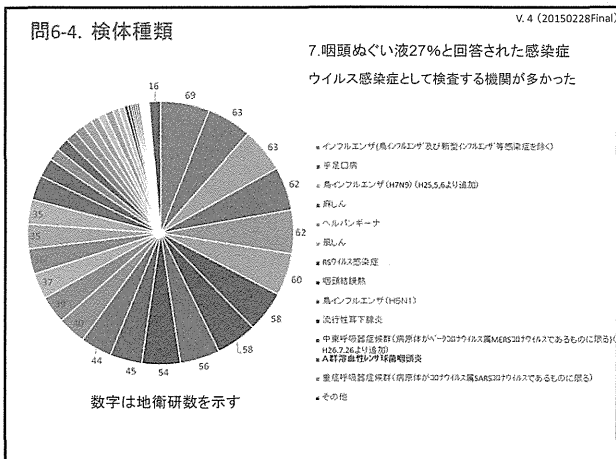
地衛研のおよそ80%以上ができる感染症を「順に」下記にリスト

ワイルス	できる	できない	%	細菌	できる	できない	%
1 感染性胃腸炎	75	1	99	1 コレラ	78	1	99
2 鳥インフルエンザ (H7N9)	70	3	96	2 細菌性赤痢	78	1	99
3 風しん	72	3	96	3 腸管出血性大腸菌感染症	78	1	99
4 麻疹	72	3	96	4 腸チフス	78	1	99
5 インフルエンザ(鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザ等感染症を除く)	71	4	95	5 パラチフス	78	1	99
6 鳥インフルエンザ (H5N1)	72	5	94	6 レジオネラ症	70	7	91
7 A型肝炎	72	6	92	7 A群溶血性レンカ球菌咽頭炎	56	19	75
8 重症熱性血小板減少症候群	70	6	92				
9 デング熱	71	7	91				
10 中東呼吸器症候群	67	8	89				

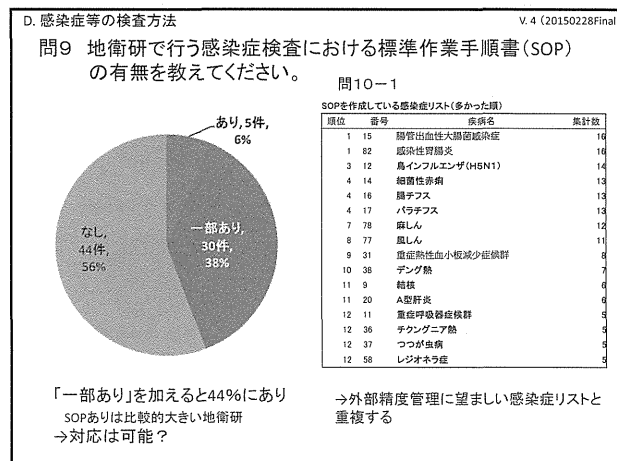
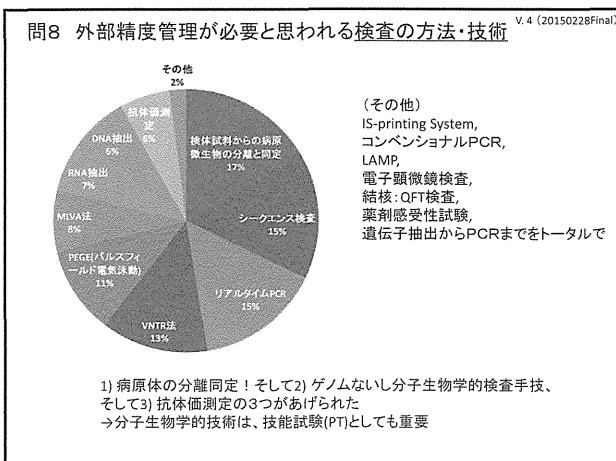
→外部精度管理の対象感染症とならう

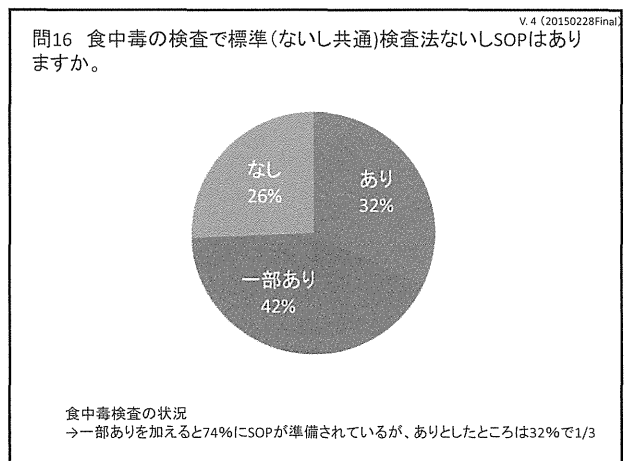
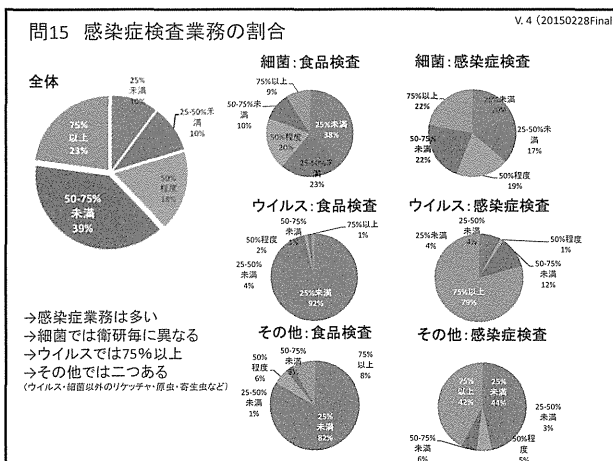
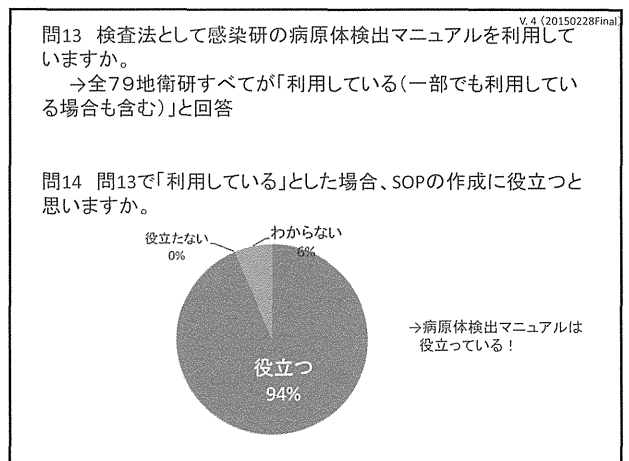
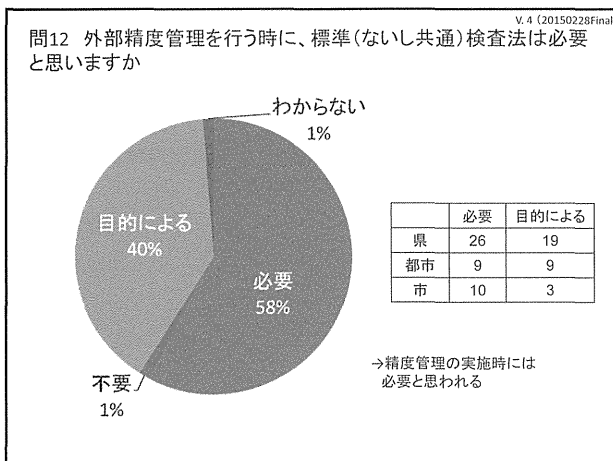
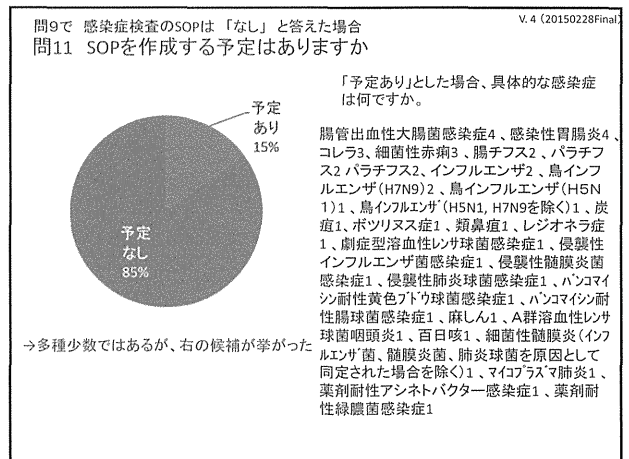
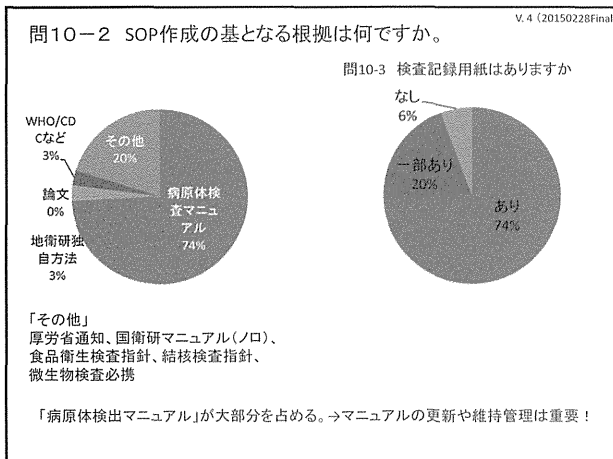


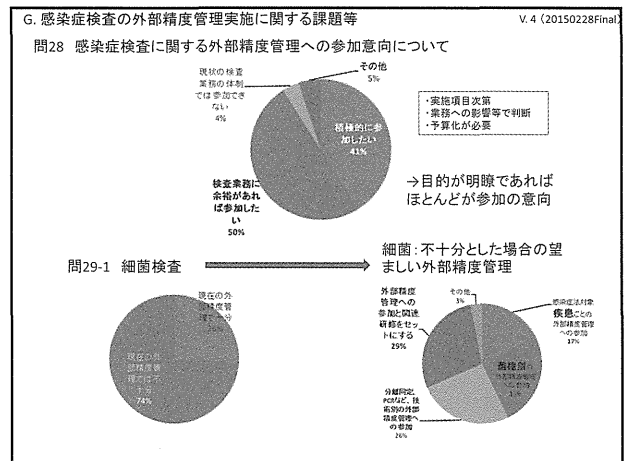
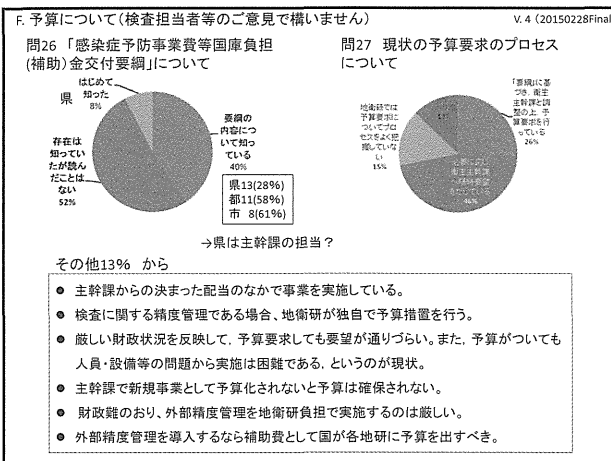
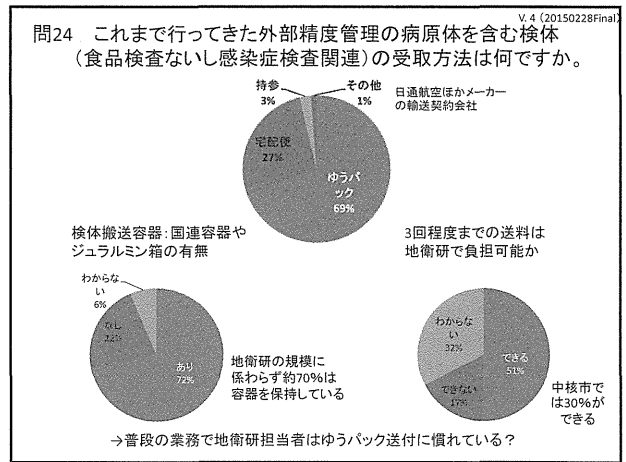
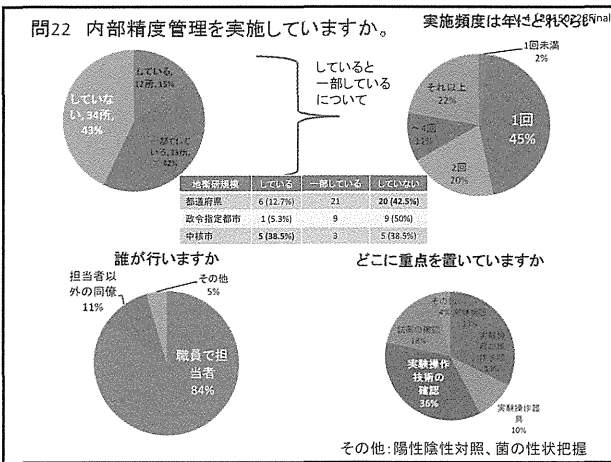
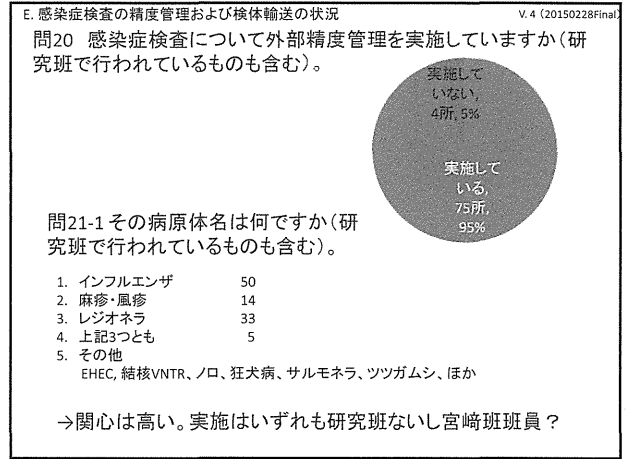
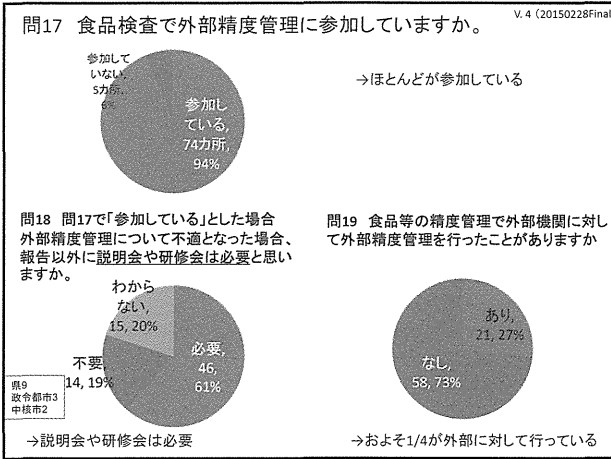


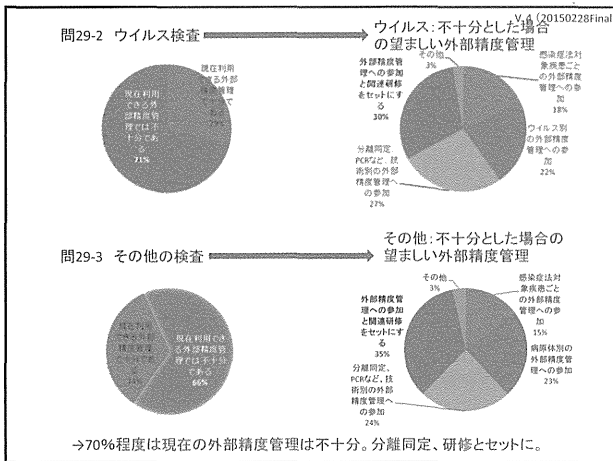


- 問7 地衛研の検査担当者が外部精度管理を行うことが「望ましい」と考える感染症 V.4 (20150228Final)
1. 麻疹37
 2. インフルエンザ35
 3. 腸管出血性大腸菌感染症・腸チフス・鳥インフルエンザ33
 4. 鳥インフルエンザH5N1・感染性胃腸炎31
 5. 風疹27
 6. レジオネラ23
 7. 細菌性赤痢22
 8. コレラ・パラチフス21
 9. 結核20
 10. SFTS/MERS18
 11. デング熱16
 12. ロタウイルス11、ほか
- 話題となっている感染症も含まれているが、検査を担当して必要性を感じたものとして、外部精度管理の対象感染症となろう。問6の結果とも重複。







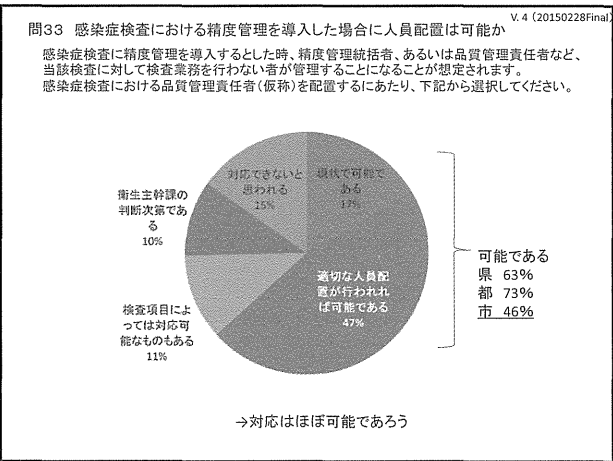


- 問30 地衛研が感染症に関する外部精度管理に参加する場合の意義として、いろいろ考えられますが、どんな意義が考えられるか記入してください。 V.4 (20150228Final)
- 1) 感染症検査に関するレベルが把握できる: 55+3
 - 2) 検査手技の改善が必要な点を把握できる: 56+4
 - 3) 検査法の理解や改善を試みることで人材育成に役立つ: 45+3
 - 4) 設備や機器の維持管理や内部精度管理に役立つ: 34+1
 - 5) 感染症検査の品質向上の努力をほかに示すことができる: 26+3
 - 6) 問題解決や精度管理に関する研修もあるとさらに検査の品質向上に役立つ: 28+2
 - 7) その他(当方で勝手に再分類)
 1. 地衛研や感染研担当者等との情報交換
 2. 新たな検査法の経験や導入
 3. 検査精度の向上のための予算獲得、人員配置、異動への配慮等の施策に役立つ
 4. 機器の買い換えに役立つ
 5. 検査結果の信頼性向上
 6. など。

- 問31 感染症に関する外部精度管理を地衛研に導入する場合の問題点として、検査担当者として、どんな問題があるか記入してください。 V.4 (20150228Final)
- 1) 現在、感染症検査の標準検査法がはっきりしていない: 40
 - 2) SOPができた場合に検査実施の限界になってしまうことがあり得る: 34
 - 3) 外部精度管理の検体が適切な状態で入手できるか不安がある: 12
 - 4) 現在の体制や人員では対応できない: 30
 - 5) その他(当方で勝手に再分類)
 1. 外部精度管理を実施するときの方法を統一して行う
 2. 目的とゴールを明かに
 3. 検査の独自の工夫を妨げないようにする
 4. 結果が信頼性確保につながるようにする
 5. 予算的な問題がある
 6. 検体配布・輸送の問題で検査に限界がある
 7. 陽性対照は配布してほしい
 8. など

- 問32 地衛研全国協議会(地全協)が感染症の精度管理を実施する場合の利点や問題点について記入してください。 V.4 (20150228Final)
- <利点>
- 感染症の検査技術や品質の向上になる、平均化・標準化・統一化ができる、相互の比較ができ、地衛研の精度レベルがわかる、違いが明かになる
 - 定期的に必要な精度管理ができる、必要に応じた、また実施頻度に応じた精度管理ができる
 - 地全協の基盤を利用できる、関係者による改善指導が受けられる、意見集約しやすい
 - 予算要求の説明が楽になる
 - 地衛研の担当する(希少)病原体についての精度管理が可能となる
 - 陽性対照サンプルの配布により検査体制の充実につながる
 - 必要な備品が整備・整備・設置できる
 - 各地衛研の検査法を見直しできる
 - 地衛研の検査体制の強化につながる

- 問32 地衛研全国協議会(地全協)が感染症の精度管理を実施する場合の利点や問題点について記入してください。 V.4 (20150228Final)
- <問題・心配な点>
- 予算化が必要だが、できるかどうか不安
 - 精度管理実施母体機関に外注すべき、地衛研では担当の負担大きい、また担当できる地衛研は限られる、感染研が行うべき
 - 精度管理の具体的方法(試料調整、送付、解析、まとめ方法、評価基準、標準検査法)がない、具体的改善指示や技術伝承に役立てられるか不安
 - 創意工夫が必要な感染症の検査に精度管理は適さないのではないか
 - 検査法の硬直化につながるかも
 - 研修はどうするのか
 - 試料となる病原体輸送が難しく、また実施できる病原体は限られる
 - 検査ができて参加できる地衛研が限定されてしまう(精度管理する意味がなくなる)
 - 検査技術の統一は難しい
 - 日程調整が必要(ほかの精度管理があるので重ならないようにする)
 - 参加するためには前年度に予算要求をしなければならぬ、予算の負担が増える
 - 地衛研は任意団体なので人員や予算の増加にはつながらない
 - 業務がふえるので人間的にできるか不安
 - 担当者の異動で一律には比較できない



V.4 (20150228Final)

問32 地衛研全国協議会(地全協)が感染症の精度管理を実施する場合の利点や問題点について記入してください。

問34 外部精度管理調査全体についてご意見があれば記入してください(自由記載)。主にものに絞りました。

- 精度管理に関するシステムを作って対応すべき(標準検査法、研修、研修後の精度管理等)
- 陽性対照サンプルの配布はありがたい
- 精度管理の実施に関する具体的な問題点を解決する必要がある
- 検査や研究業務に支障をきたさないように配慮する必要がある
- 年度初めに精度管理に関する概要や日程等を提示してもらうことが大事
- 検査結果が与える影響によっては検査の信頼性確保として精度管理は重要
- SOPが作成しづらい状況がある(検査法の改定、リアルタイムPCRの導入等)
- 地衛研の規模に違いがあり一律に効果が期待できないので、具体的対処法を検討すべき。
- 精度管理を実施する部署として専門機関がほしい。
- 地衛研で普段検査をしない病原体を対象にしてほしい(検査手技の確認や整備につながる)。
- 検査実績のない病原体の精度管理には参加しても意味がない
- 感染症検査は地衛研、レファレンスセンター、そして感染研とで役割分担すべき
- 問題となっているトピックス的な病原体について精度管理を行い、研修を行うべき。
- 検査法の標準化と研修が必要で、毎年定期的に実施すべき
- VNTR, MLVAなどの遺伝子解析に関する精度管理が必要になってきている
- アンケートの還元と今後についての説明会が必要
- 病原体、症候、あるいは技術毎の精度管理がほしい
- 独自に開発し実施している検査やウイルス検査はGLPや精度管理になじまない
- 地衛研に最低必要な検査レベルや能力(予算、人員、検査機器など)を示して欲しい

V.4 (20150228Final)

感染症検査はGLPや精度管理になじまない？-1
以後番号の計3枚のスライドは寄せられたご意見です。

- 独自に開発し実施している検査やウイルス検査はGLPや精度管理になじまない
- 手順が明らかな化学反応などは精度管理に適しているが、ウイルス分離など個々の工夫など重要な検査方法では精度管理は適さないことが、実施主体で充分理解されていることが、重要である。
- ウイルス検査は、まず、ウイルスそのものが変異していくものが多く、また、新興・再興ウイルスが次々に登場してくる。また、PCR酵素等の試薬や器具等も日進月歩で改良されている。このようなことを鑑みると、ウイルス検査については、GLP等の精度管理システムは馴染まないと考えている。

V.4 (20150228Final)

感染症検査はGLPや精度管理になじまない？-2

- 食品検査の精度管理は、規格基準等に基づいた検査であり、検査結果により、適、不適の判断をすることが目的となる。感染症検査は、迅速にしかも正確な検査結果を求められる場合が多く、その目的は患者の診断・治療に役立つとともに、公衆衛生上では感染拡大防止の観点から、その感染源や原因を特定することである。従って、感染症の精度管理は、検体の状況、疫学情報(行動調査、臨床症状など)から、総合的に判定しない検証するような内容が理想である。
- 感染症の精度管理を実施する場合の管理ポイントは、食品検査のそれとは異なってもよい。実際には病原体検出マニュアル等にある検査法に従って実施することはもちろんであるが、必ずしも示された検査法が絶対ではないことがあるので、このような状況を踏まえた精度管理にする工夫ができるかどうか。
- 菌の分離は、絶対必要であるが、分離できなかったときの対応についても考察できるような精度管理に発展していけば、よいと思います。

V.4 (20150228Final)

◆「感染症検査の標準作業手順書」という点について？ 佐多

感染症検査は、?あらゆる手段で検出することを最優先?

→患者由来検体(人の検体で食品といったモノの検査ではない)

→患者の治療に役立つ診断目的

- 規格基準?にもとづいたSOPでは患者の診断には不十分?
- 患者の状態によってはSOPを逸脱しても検査を進めるべき?

→感染症法では感染拡大防止を目的

- 通常は、罰則・処分目的ではない
- 法にもとづく患者隔離等はある→品質良い検査は重要→精度管理?
- 分離して病原体の性状把握は必須→疫学、治療、予防目的

→検査が病原体の遺伝子検出にシフトしている

- 手技や試薬・機器の進歩 →保守管理が必要
- 迅速性・半定量性・塩基配列確認(リアルタイムPCR)

→検査は、迅速・正確・再現・普遍性そして対照(陰性、陽性)が必要

- 検査法は日進月歩
- 病原体検査マニュアルの随時更新(新規追加や見直しもある)

V.4 (20150228Final)

「感染症検査の標準作業手順書」? -私見佐多-

1. いわゆる食品検査の公定法に類似したような標準作業手順書(全国レベル)どこでも誰でも同じ結果が得られることを目標
 - 検査結果に信頼性が確保される
 - 人の行動制限に係わる場合(法的な制限等)は信頼性が重要
 - 指定ないし一種、二種感染症の検査では必要か。説明がしやすい。
2. 外部精度管理のときに用いる標準作業手順書?(使用目的限定)(全国レベル、問題点の把握に役立つ)
 - 通常の病原体検査として全国一律に用いることを目的としない。
 - 個々の検査施設の全国レベルでの比較、問題点の把握に役立てる
 - 検査法として種々の標準作業手順書を用いることがあり得る
3. 各施設の各部署で用いる標準作業手順書?(プロトコル?)
 - (個々の施設レベル、検査の分担、施設の検査の信頼性担保、結果を得る)
 - 複数の担当者が同じように作業でき、同じ結果が得られることを担保する
 - 検査プロトコルとはほぼ同義
 - より良い検査法につねに改善できる(創意工夫可)
 - 検査結果に一定レベルは必要(他施設の結果比較でも同じ以上)
 - 外部精度管理としては技能試験が適当か?

V.4 (20150228Final)

そして? -3

- 健康被害拡大防止のための法に基づく措置(食中毒の行政処分含む)や治療法等、その後の対応に与える検査結果の影響が大きいもの及び撲滅を目指している感染症については、特に、当該検査に係る信頼性確保は必須であり、そのシステムの構成要素として外部精度管理は重要であると思われる。
- 精度管理「事業」の実施により、検査精度の不備が指摘され、そのことにより本庁の主幹課に対し、検査精度向上のための予算獲得・確保や人員配置、異動への配慮などを要求する材料とするなど、施策につなげられるような事業として展開できれば、大きな意義が得られると考えます。つまり、所属内で完結・解決することにも一定の意義はありますが、厚生労働省の理解を得た上で、地衛研を所管する主幹課にも必要性を認知してもらい、「事業」として通知・実施していただくことにより、広く欠け繋がる精度管理「事業」を実施することができるのではないのでしょうか。随分以前に同じような精度管理事業を行なった記憶があります。その際、検査技術の向上に寄与したと思われたものの、その後、継続されていません。そのことが本事業の遂行の難しさを物語っているようにも感じます。今後、継続的な実施を考えると、その時の総括を生かされると良いと思います。

資料3

アンケート調査に関する資料

1. アンケート依頼メール文 2014.10.8

投稿者 info@chieiken.gr.jp

投稿日時 2014/10/08 14:10:21

標題 [FWD:info@chieiken.gr.jp]感染症検査の精度管理に関する実態調査（アンケート依頼）

平成 26 年(2014 年)10 月 8 日

各地方衛生研究所所長 様

「感染症検査の精度管理に関する実態調査」についてのお願い（依頼）

地衛研全国協議会の活動に関して平素よりご協力いただきありがとうございます。

本年度の理事会・総務委員会、臨時総会等でご報告させていただきました精度管理部会および精度管理研究班の活動のうち、感染症検査の精度管理に関する実態調査アンケートの準備が整いましたので、アンケート調査にご協力のほど、お願い致します。

ご多忙の折、回答期限までの期間が短く恐縮しておりますが、平成 26 年 10 月 21 日(火曜日)までに e-mail にてご回答いただけますようよろしくお願い致します。

本調査等については、地衛研全国協議会のホームページの会員専用の項の中に発表スライドが掲載されておりますので、ご参照下さるようお願い致します。

なお、当該アンケートの結果につきましては、とりまとめた上で、精度管理部会および当該研究班での議論の後、研究報告書にまとめるとともに、臨時総会等でご報告する予定です。

また、ご記入に当たって何か不明な点がございましたら、下記までご連絡ください。

地衛研全国協議会精度管理部会長

平成 26 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）「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实施のための事業体制の構築に関する研究（H26-健危-一般-001）」班 研究代表者

佐多徹太郎（富山県衛生研究所所長）

電話 0766-56-5506

E-mail toyamaeiken_do@vanilla.ocn.ne.jp

このメールには添付書類が付属されています。

下記の URL をクリックして「開く」か「保存」を選択してください。

(ご使用のメールソフトによっては、URL をダブルクリックする必要がある場合があります。)

[感染症精度管理調査](xlsx 120KB)

<https://www.chieiken.gr.jp/app/document?docid=141008000001&p=TADTQNV0.xlsx>

[依頼文](docx 14KB)

<https://www.chieiken.gr.jp/app/document?docid=141008000002&p=F9P8QQPY.docx>

このメールに関してのお問い合わせは
こちらまでお願いします。

富山県衛生研究所（所長室）

toyamaeiken_do@vanilla.ocn.ne.jp

TEL:0766-56-5506

FAX:0766-56-7326

2. アンケート調査票についてのお問い合わせのあった件について 20141016

お世話になっております。

当方の事前の検討が不十分で回答に悩まれている方もおられるのではないかと思います。これまでお問い合わせいただいた内容について下記の通りにまとめましたので、回答されるときにご参考いただけると幸いです。よろしく申し上げます。

富山県衛生研究所 佐多徹太郎

問2.

1. 「休暇中の職員も含む」とありますが、育休中の職員をカウントする場合、臨時補助職員は定員に含めるのかどうか。（ほか類似のお問い合わせがありました。）

→種々の場合があり得ることを想定し、定員のみ、お聞きすることに致しました。ですので、この質問の場合は育休職員の定員が臨時補助員で補填され、定員数の変化はないと考えられますので、その定員数をお答えください。

2. 検査担当者数ですが、ウイルス検査とその他検査（リケッチア）を1名が担当している場合、それぞれに0.5名で兼務総数は1名となるのでしょうか。

→検査担当者は専任の担当者を想定していますので、兼任している場合は、専任のところに記入せずに兼任の担当者として記入してください。

問4. 「検査数」とは、検体数、患者数、事例数のいずれを単位としてカウントすれば宜しいでしょうか。

→検査の検体数を知りたいと考えておりますので、受付検体数をご回答ください。

問6.

1. 昨年（2013年）とは、年度ではなく、1～12月で宜しいでしょうか。
→そうです。感染症情報は1月から12月でまとめられておりますので、ご質問のように、1～12月の検査数でお願い致します。
2. 検査検体の種類、多くの疾患で複数の種類の検体を検査しますが、その場合、検体名をすべてその他に記載するのでしょうか。
→おもな検体を知りたかったので、まず4の選択肢の中から選んでください。次の5にその他の検体を直接記入するようになっていきますので、検体の種類番号(次のシートの選択肢リストにあります)や検体名等を直接追記してください。適切な選択肢ではなかったと思います。すみません。
3. 検査可能とはSOPにもとづく検査をさすのでしょうか。
→地衛研ではどんな検査を行っているか、あるいは行えるかどうかを知りたいと考えました。ですのでSOPの有無にかかわらず、検査ができれば検査対応可と考えて回答ください。
4. 感染症の検査には、感染症が対象であるものの、一般の依頼検査があるが、どこまでを検査数として回答するべきか？
→レジオネラの浴用水検査や給食等従事者の業態者検便などの依頼検査は、環境や水、食品衛生法などに関連するものと考えられ、感染症法関連ではありません。今回は「感染症検査の対象」としていただきますので、除きます。一方、ここでの食品検査とは収去検査や依頼検査等をいい、食中毒等の感染源検査は含みません。
5. 「検査法は掌握していて、試薬（プライマー類や市販の検査キットなど）が調達できれば検査ができる」という場合は検査可能としてよろしいですか。
→はい。いつもやってなくとも、検査経験があり、検査試薬等が再度入手できれば、検査対応が可能ということであれば、対応可能を選択してください

問9

- 「地衛研で行う感染症検査」には、食中毒検査も含めての検査でしょうか。
→ご承知のとおり、食中毒は食品衛生法および感染症法ともに関係しております。なるべく簡単に表現したいと考えて、食品検査と感染症検査とに分け、感染症検査には感染症検査と食中毒検査を含めました。なお、食品衛生法に書かれてある従業員の検便検査は感染症検査には含めないとしています。

問15、17

1. 「食品検査」には、食中毒における便検体や嘔吐物からの病原体検出を含めなくていいか。
→はい、そのとおりです。感染症法に関わるヒト由来の検体は感染症検査に含めるように考えました。
2. 食品を取り扱う業者の従業員の検便検査は、食品検査か感染症検査のどちらですか。
→食品を取り扱う業者の従業員の検便検査は、食品衛生法に定められているもので、感染症の検査には含めないと考えております。

3. 検査総数については食品の理化学的検査や環境分野の検査も含むのでしょうか。

→検査総数についてですが、病原微生物の検査に限らせていただいています。食品や環境検体での微生物検査については、おそらく食品衛生法等の関連検査と思われますので、おおまかには食品等検査になるかと思います

問20

「感染症検査について外部精度管理を実施【している】」とありますが、地衛研が主体となって保健所向けに実施している業務と認識して、宜しいでしょうか。

レファレンスセンター等が実施している外部精度管理を【受けて】いますが、対象とされているものが文脈によって様々に解釈できます。

文脈から判断できるのもありますが、明確な定義を教えてくださいたく存じます。

→「地衛研が、ほかの実施主体による外部精度管理を、受けて、実施している」ものです。つまり、感染症検査の外部精度管理については研究班や地域保健事業の支部ブロックでの外部精度管理をさしています。地衛研が主体となって実施しているものではありません。

問25 国連容器やジュラルミン箱は「十分」ありますか？という設問の「十分」とは？

→通常業務に影響を来さない程度に「十分」あるかという質問でした。

問30, 31については、回答案が選択できません。

→記入で回答をお願いします。設問の下にたとえばとしていくつか考えられる回答案を記載していますが、これにこだわらずに回答をお願いします。もちろん、同意見であれば、その旨ご回答ください。

2. ウイルス検査に関する精度管理に関する技術的支援

研究分担者 木村博一 国立感染症研究所感染症疫学センター第6室長
研究協力者 小澤邦壽 塚越博之 小林美保 群馬県衛生環境研究所
貞升健志 東京都安全健康研究センター
柴田伸一郎 名古屋市衛生研究所
藤井理津志 岸本寿男 岡山県環境保健センター
佐多徹太郎 富山県衛生研究所
宮崎義継 駒瀬勝啓 野田雅博 国立感染症研究所

研究要旨 地方衛生研究所(地研)におけるウイルス検査精度管理を試行的に行うため、ノロウイルス(NoV)の模擬検体を用いた定量リアルタイム PCR 法に関する外部精度管理を行った。模擬検体には、常法で検量線作成に用いる NoV キャプシド遺伝子挿入プラスミドと同一のベクターを用いた。また、各機関における測定機器、測定条件および試薬管理状況などに関する詳細なアンケート調査も行った。本研究においては、便宜上、各機関から得られた定量データをべき乗変換し、カットオフ値(基準値)を平均値 $\pm 1SD$ (標準偏差)とした。その結果、得られた定量値の3データ全てにおいて、基準値の範囲外となった機関数は10機関、2データが基準値外となったのは2機関、1データが基準値外となったのは8機関であった。なお、機器や試薬などについては、多くの機関において、同等の性能を有する機器あるいは試薬を使用していたことが示唆された。以上のことから、さらに本研究を発展させ、地研におけるウイルス検査精度の確保・改善に資する詳細な検討と技術支援を行う必要がある。

A. 研究目的

地方衛生研究所(地研)は、各自治体における科学的・技術的中核機関として位置づけられている。したがって、健康危機管理にかかわる各法律(感染症法や食品衛生法など)に定める自治体行政検査に高い精度が求められることは言うまでもない。

近年、病原微生物の検出・同定検査には遺伝子学的手法が幅広く取り入れられている。その中でも、リアルタイム(RT-)PCR法は、病原体を高感度・特異的に検出可能なだけでなく、臨床検体中に含まれる病原体のゲノムを定量化することもできる。このようなことから、インフルエンザや感染性胃腸炎(ウイルス性胃腸炎)などの検査診断のため、本法は日常的に各地研で実施されていることが推定される。特に、ノロウイルス感染症の検査診断には、大部分の地研が本法を用いている。

いうまでもなく、これらの検査診断における外部

精度管理は、各機関における検査精度の確保・向上のためだけではなく、地研全体での検査水準の確認および確保のためにも必要であると思われる。しかしながら、地研において、継続的かつ実務的な外部精度管理は、ほとんど行われていないのが実情であると思われる。このような背景から、地研におけるウイルス検査診断に関する外部精度管理の一環および地方衛生研究所全国協議会として外部精度管理を行う場合の課題を抽出する目的でノロウイルスの定量リアルタイム PCR 法に関する外部精度管理を行った。

B. 研究方法

地方衛生研究所全国協議会加盟機関(80機関)を対象として、NoV ウイルス検査診断に関する精度管理を実施した。参加の形態は任意とし、本研究の参加案内は、地全協のメーリングリストを用いた。まず、

精度管理を行うにあたり、地衛研精度管理研究班による外部精度管理（ウイルス検査）実施要領と外部精度管理（ウイルス検査）実施手順を作成した（別添資料 1 および 2）。また、測定時の詳細なデータ記入ファイルも作成した。

次に、模擬検体試料として、2つの試料（試料 A および B）を作成した。模擬検体として使用した試料は、すでに各地研に配布してある NoV リアルタイム PCR 法に汎用されている標準曲線作成用の NoV キャプシド遺伝子挿入プラスミドと同一である。配布試料 2 種類のうち、試料 A は、NoV GI と NoV GII の混合試料とし、NoV GI の理論値は 2.5×10^3 copies/ μ l、NoV GII の理論値は 2.5×10^4 copies/ μ l であった。また、試料 B は NoV GII のみを含んでおり、理論値は 7.5×10^4 copies/ μ l であった [1]。模擬検体および標準曲線の各プロット測定を各々 3 重測定とし、定量結果（コピー数）および Ct 値および測定機器、使用試薬、反応容量、標準曲線などのデータを回収した。

最初、得られた実測値データを基盤にデータ解析を行った。しかし、実測値が正規分布をなさないため、べき乗変換後を行い、正規分布化後、常法による統計解析を行った。統計解析後、今回の解析データは、定量値の基準値として、平均値 $\pm 1SD$ （標準偏差）以内の範囲を採用した。また、同法における同一研究員（A 衛生研究所ウイルス検査担当 4 年目）を対象とした定量値の日差変動（3 日間）に関する試験も行った。さらに、精度管理実施後、各試薬の管理状況や機器定期点検の実情などに関する詳細なアンケート調査も実施した。

C. 研究結果

参加希望機関は 66 機関であったが、模擬検体作成数を考慮し、参加機関を 59 機関として精度管理を行った。参加機関の所属自治体の内訳は、都道府県 37 機関、政令指定都市 8 機関、中核市 11 機関および特別区 3 機関であった。

次に、試料 A の平均値 $\pm 1SD$ は、GI では 3.29 ± 0.44 copies/ μ l、試料 A の GII では 4.40 ± 0.46 copies/ μ l、試料 B の GII では 4.67 ± 0.42 copies/ μ l であることがわかった（図 1 および表 1）。さらに、今回基準値とした、べき乗変換後の定量値が、平均値 $\pm 1SD$ の範囲外であった機関は、試料 A の GI では 14 機関、試料 A の GII では 15 機関であった。試料 B の GII 定量値では 11 機関であった。3 データとも基準値外となっ

た機関の数は、10 機関、2 データが基準値の範囲外となったのは 3 機関、1 データのみが基準値外となったのは 8 機関であった。なお、同一研究員による定量値の日差変動に関する変動係数 (CV) は 2~6% と良好であり、標準曲線の相関係数も高かった ($R^2=0.992$ 以上)。

次に、今回の反応容量を 20 μ l で反応を行っている機関は、34 機関 (57.6%) と最も多く、その中で、試料添加量は 2 μ l としている機関が 30 機関と最も多かった。また、反応容量を 25 μ l としている機関が 17 機関 (28.8%)、27.778 μ l が 1 機関 (1.6%)、35 μ l が 1 機関 (1.6%)、50 μ l が 6 機関 (10.2%) であった（表 2）。測定機器は、7500FAST (Applied Biosystems[®]) を使用している機関が 16 機関 (27.1%)、7500 (Applied Biosystems[®]) を使用している機関が 20 機関 (33.9%) で多かった（表 3）。測定試薬は、TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems[®]) を使用している機関を使用している機関が 45 機関 (76.3%) と最も多かった（表 4）。

さらに、追加アンケートの結果から、各機関における試薬（プライマーやプローブ）および標準曲線作成用のプラスミドなどの保存条件は多様であった。

D. 考察

本研究で NoV 遺伝子挿入プラスミドの模擬検体を使用して、リアルタイム PCR 法の外部精度管理を実施した。その結果、NoV 遺伝子定量値が基準値の範囲外となったのが、データにより異なるが最大で 15 機関（約 25%）であった。

今回用いた方法の感度、特異性および標的遺伝子の増幅効率（ほぼ 100%）の高さは既報により明らかになっており、今回の結果からも適切な試薬管理のもとで、一定期間の経験を有する技術者であれば、数%の変動係数の範囲内で、 $10^1 \sim 10^8$ copies/ μ l の NoV 遺伝子の定量ができると思われる。

一方、今回得られたデータの最大幅は、べき乗変換値に換算にして 2Log_{10} 以上、実測値に換算して数百倍の差が見られた。この原因として考えられることを以下に若干考察する。まず、理論値および中央値より、高い定量値に関しては、標準曲線作成用のプラスミドの劣化が考えられる。すなわち、標準プラスミドの劣化により、標準曲線上の各定量値の Ct 値が全体的に増加し、配布試料の定量値を過大評価したことが考えられる。実際のデータからも定量値

が中央値より有意に高い値を示したデータは、標準曲線の各 Ct 値も増加していた。参考値として、今回各機関で用いられた測定機器においては、適切な標準曲線、相関係数 $R^2=0.99$ 以上の値が得られた場合には、 10^3 copies/ μ l で Ct 値が概ね 30 サイクル、 10^4 copies/ μ l では、約 26 サイクル後半が目安となる。

次に、配布試料定量値が過小評価された原因として、配布試料の混和不足、ピペットなどの器具の精度の問題、測定機器のメンテナンスの問題、配布試料の劣化などが考えられる。しかし、不明な点も多いことから今後さらなる検討が必要であると思われる。

また、精度管理に参加した地研を対象として追加のアンケートを実施したところ、54 機関より回答を得ることが出来た。その結果、54 機関中 49 機関では、3 年以上前に購入した測定機器を使用していた。また、使用機器は、54 機関中 41 機関で何らかの形で保守点検を行っており、17 機関は保守点検を毎年行っていることがわかった。その他、陽性コントロールとして使用しているプラスミド、プライマーおよびプローブなどの保存・管理状況は機関によってかなり異なることがわかった。また、いくつかの機関から、「今回の精度管理により、日常検査を見直すきっかけとなった」などの意見も得られた。本研究が各機関の検査精度向上に寄与する良い機会であったと考えられる。

地研における微生物検査は、予算・定員などの検査資源が年々削減されており、職員の技術水準と検査精度の維持が困難となっている。さらに、地研の重要度に関する地方自治体の認識にも差があり、地方分権推進により、各地研間の人的資源・技術力に大きな格差が生じている可能性もある。したがって、今後もこのような状況が続けば、検査精度を十分に担保した行政検査が各自治体で行うことが困難になる可能性がある。今後、このような状態を改善するための取り組みとともに、地研における微生物検査の外部精度管理を継続的に実施できるような体制整備が必要不可欠であると思われる。

F. 参考文献

1. ノロウイルスの検出法について，食安監発第 1105001 号.

G. 研究発表

なし。

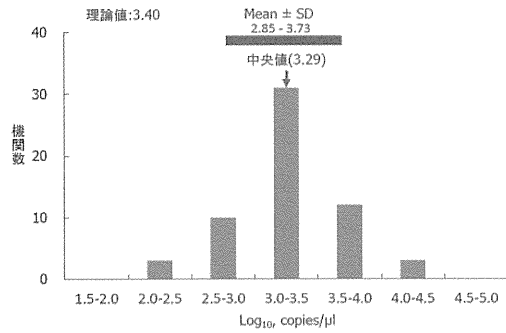
H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

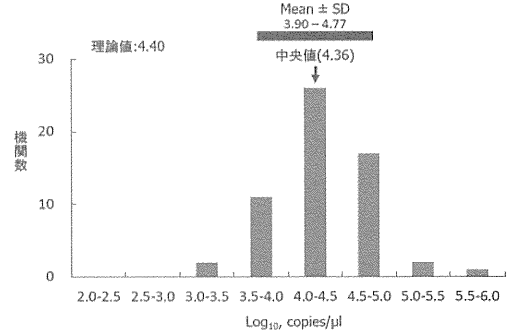
謝辞

本研究にご協力いただきました各衛生研究所に感謝します。

試料A GI定量値の分布(べき乗変換, Log₁₀)



試料A GII定量値の分布(べき乗変換, Log₁₀)



試料B GII定量値(べき乗変換, Log₁₀)

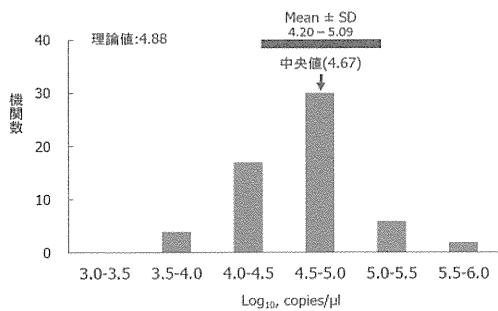


図1

試料AおよびBのGI・GII定量値の分布

表1. 図1および図2のデータのまとめ

	試料A GI	試料A GII	試料B GII
理論値	3.40	4.40	4.88
平均値	3.29	4.32	4.67
中央値	3.29	4.36	4.67
標準偏差	0.44	0.46	0.42
最小-最大 (最小-最大)	2.40-4.49	3.16-5.64	3.75-5.93
平均値±1SD	2.85 - 3.73	3.90 - 4.77	4.20 - 5.09
平均値+1SD以上の機関数	8	7	6
平均値-1SD以下の機関数	6	8	5

表3. 各機関における使用機器

	機関数
7500Fast (Applied Biosystems [®])	16
7500 (Applied Biosystems [®])	20
7900HT Fast (Applied Biosystems [®])	9
SnapOne Plus (Applied Biosystems [®])	4
7300 (Applied Biosystems [®])	4
7000 (Applied Biosystems [®])	2
LightCycler [®] 96 システム (Roche [®])	1
LightCycler [®] 480 システム (Roche [®])	1
ViiA [™] 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems [®])	1
CFX96 Touch [™] Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad [®])	1

表2. 各機関における反応系

総量(μl)	試料添加量	機関数
20	1	1
	1.5	1
	2	30
	5	2
25	2	1
	2.5	11
	5	5
27.778	2.778	1
35	4	1
50	2	1
	5	5

表4. 各機関における使用試薬

試薬名	使用機関数
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems [®])	45
TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems [®])	2
TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems [®])	1
ProxiEx [™] Taq (Perfect Real Time or Probe qPCR) (Invitrogen [®])	3
Quantitect Probe PCR Kit (Qiagen [®])	2
EagleTaq Master Mix with ROX (Roche [®])	1
FastStart Universal Probe Master (Roche) (Roche [®])	1
FastStart Essential DNA Probe Master (Roche [®])	1
RealTime PCR Master Mix (TOYOBO [®])	1
TEBUNDERBOLD Probe qPCR Mix (TOYOBO [®])	1

地方衛生研究所精度管理研究班および精度管理部会による
平成26年度外部精度管理（ウイルス検査）追加アンケートの結果について
（アンケート調査、精度管理参加機関59機関のうち、54機関において実施）

平成27年3月9日

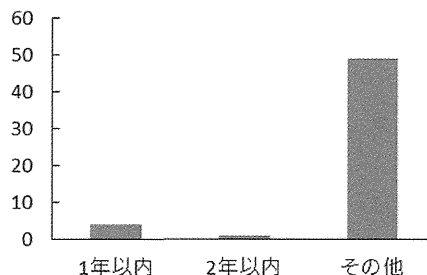
測定機器（ノロウイルスの検査に使用しているリアルタイムPCR）

別添

Q1 購入日

- ① 1年以内 (4)
- ② 2年以内 (1)
- ③ その他* (49)

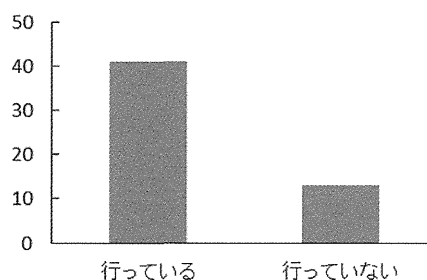
* 平成21年度購入と回答した機関は22機関



Q2 メンテナンス

- ① 行っている* (41)
- ② 行っていない (13)

* 1年に1回メンテナンスを行っていると回答した機関は17機関

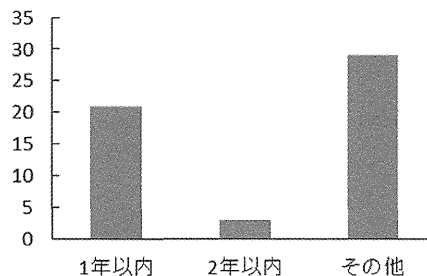


標準曲線用コントロールプラスミドについて

Q3 作成年月日

- ① 1年以内 (21)
- ② 2年以内 (3)
- ③ その他* (30)

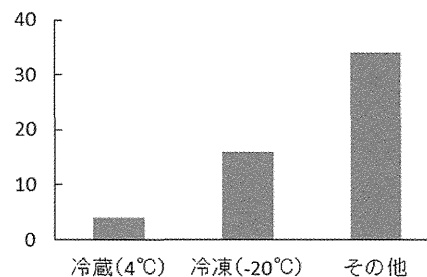
* 不明と回答した機関は16機関



Q4 保存状態

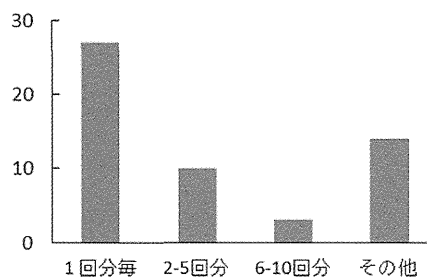
- ① 冷蔵(4℃) (4)
- ② 冷凍(-20℃) (16)
- ③ その他* (34)

* -80℃に保存と回答した機関は31機関



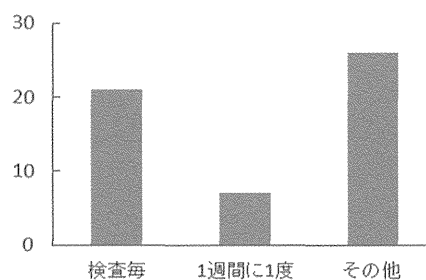
Q5 管理方法

- ① 1回分毎に分けて (27)
- ② 2-5回分に分けて保存 (10)
- ③ 6-10回分程度に分けて保存 (3)
- ④ その他 (14)



Q6 希釈方法

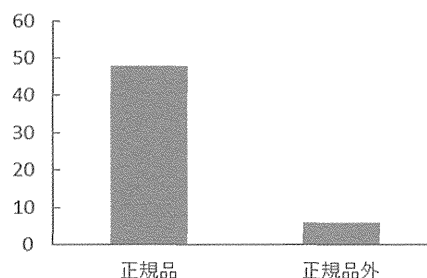
- ① 検査毎に希釈 (21)
- ② 1週間に1度程度 (7)
- ③ その他 (26)



コントロール・試料測定プレート

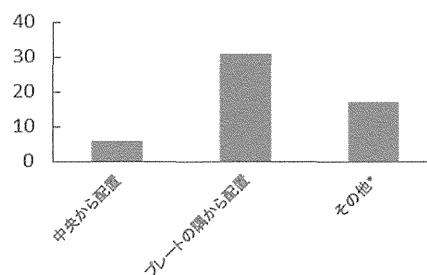
Q7 反応プレートメーカー

- ① 正規品 (48)
- ② 正規品外 (6)



Q8 測定ウェルの位置

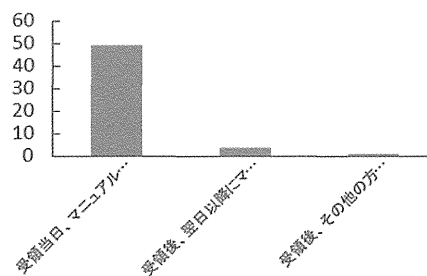
- ① 中央から配置 (6)
- ② プレートの隅 (1A など)から配置 (31)
- ③ その他 (17)



送付試料について

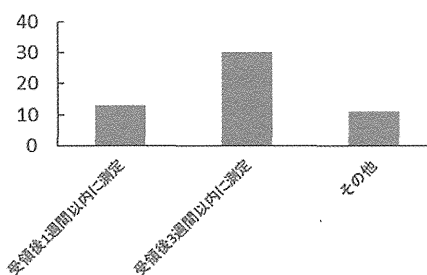
Q9 保存状態

- ① 受領当日、マニュアルに従い凍結保存 (49)
- ② 受領後、翌日以降にマニュアルに従い凍結保存 (4)
- ③ 受領後、その他の方法で保存 (1)



Q10 測定日

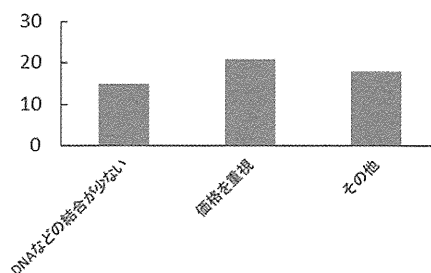
- ① 受領後1週間以内に測定 (13)
- ② 受領後3週間以内に測定 (30)
- ③ その他 (11)



リアルタイム PCR で使用しているチップ、希釈容器

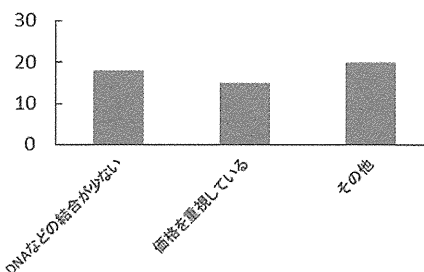
Q11 チップ

- ① DNA などの結合が少ない商品を使用している (15)
- ② DNA の結合よりも価格を重視している (21)
- ③ その他 (17)



Q12 希釈用チューブ

- ① DNA などの結合が少ない商品を使用している (18)
- ② DNA の結合よりも価格を重視している (15)
- ③ その他 (19)

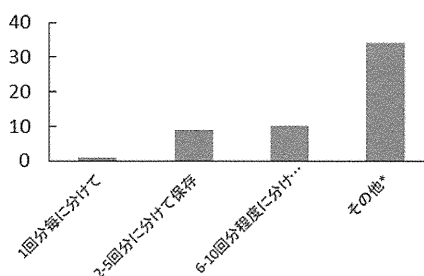


反応試薬

Q13 プライマー管理方法

- ① 1 回分毎に分けて (1)
- ② 2-5 回分に分けて保存 (9)
- ③ 6-10 回分程度に分けて保存 (10)
- ④ その他* (34)

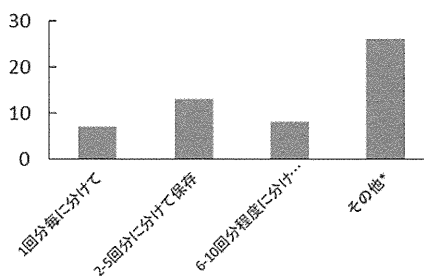
* 小分け保存無しは 3 機関、
20-200 μ l で保存 19 機関



Q14 プローブ管理方法

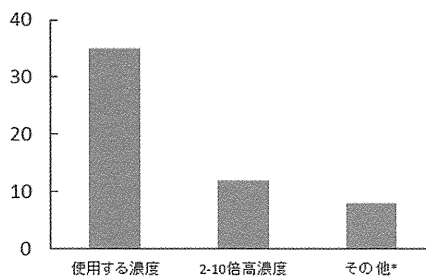
- ① 1 回分毎に分けて (7)
- ② 2-5 回分に分けて保存 (13)
- ③ 6-10 回分程度に分けて保存 (8)
- ④ その他 * (26)

* 小分け保存無しは 5 機関
20-200 μ l で保存は 12 機関



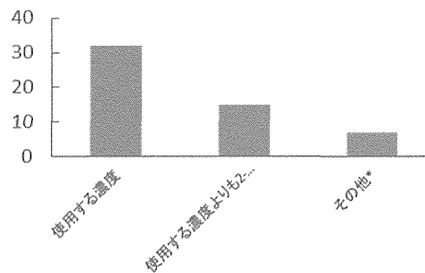
Q15 プライマー保存濃度

- ① 使用する濃度 (34)
- ② 使用する濃度よりも 2-10 倍高濃度 (12)
- ③ その他 (8)



Q16 プローブ保存濃度

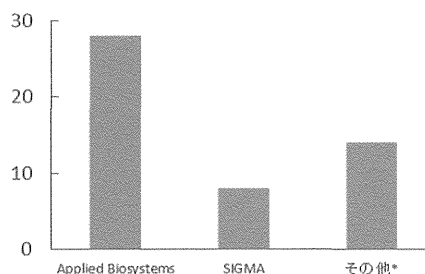
- ① 使用する濃度 (31)
- ② 使用する濃度よりも 2-10 倍高濃度 (14)
- ③ その他 (8)



Q17 プライマー製造メーカー

- ① Applied Biosystems (28)
- ② SIGMA (8)
- ③ その他 (14)

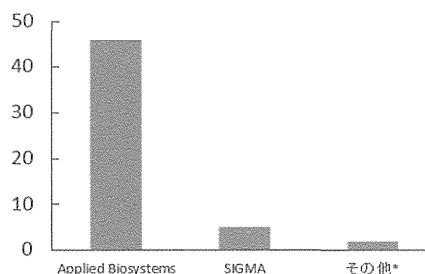
※①+②が 3 機関、①+③が 1 機関



Q18 プローブ製造メーカー

- ① Applied Biosystems (46)
- ② SIGMA (5)
- ③ その他 (2)

※②+③が 1 機関



その他意見（自由記載）

1. 3 測定値とも基準値外で、低い値になりましたが、このような結果になった原因についての明確なトラブルシューティングには至りませんでした。
2. 普段実施している方法で、精密性・正確性ともに良好な結果が得られた。
3. 理論値にほぼ同等の結果でしたので安心しました。プラスミド DNA は環状構造で、チューブへの吸着もあるため検体の 1 本鎖との相関を低コピー数でみるのは望ましくないのではないかと考えています。患者検体に対しては安定して検出できる濃度の Ct 値が毎回ぶれないことで検査の信頼性を確保しています。食品は低コピーなので、プラスミドでも安定して 10 コピーとかでて欲しいですが、構造が違うので完全一致は無理と思って評価しています。
4. 試料 A の G1 定量値は基準値内ではあったものの、集計データより低い値であった。試薬の管理等見直しをしていきたい。
5. 当研究所の定量結果は、試料 A、B のいずれの定量値も基準値を 1SD 以上下回っていた。原因の一つとして、ピペットの精度異常でコントロールの段階希釈時に正しく希釈できず、想定よりも濃い濃度のコントロールを用いたことで相対的に試料の定量値が下がったことが考えられた。そのため、段階希釈に使用したピペットを蒸留水と天秤を用いて簡易的に精度測定をしたところ、P1000

で 450ul 測った平均が 440mg、P200 で 50ul 測った平均が 50mg であった。従って、これらのピペットを用いて段階希釈をしたことでコントロールの濃度が高くなったとは考えにくい。実施手順において、 $10^7 \sim 10^1$ コピー/well となるようにコントロールを調整し、検査を行うよう指示されていたが、当所では $10^7 \sim 10^1$ コピー/ul のコントロールを 2.5ul/well 入れて検査を行った。PC の濃度を $10^7 \sim 10^1$ コピー/well とした研究所と、 $10^7 \sim 10^1$ コピー/ul とした研究所で結果に差があったか知りたい。

6. コントロールプラスミドの Ct 値が非常に大きいのが普段から気になっていたが、今回の結果から、おそらく検量線が正しく立てられていないのではないかと想像できた。もう少し詳細な解析結果を待って、今後の検査に反映させたい。
7. 検量線のバラツキがなく測定精度に問題を感じていなかったが、今回基準値とのズレを指摘され、見直すきっかけになったのは良かった。ただ、何に問題が考えられるか解析結果のパラメータだけでは分かりにくく、全体総評などで説明が欲しかった。
8. 当所では、試料 A の GI の定量値が低値となり、B 判定となったことから、その原因究明を行った。その結果、検査担当者が感染症疫学センターから送付された標準曲線用コントロールプラスミドの GI の 10^8 を 10^7 に希釈する際、添付文書に記載のあった $50 \mu\text{l}/\text{tube}$ をそのまま信じて、DEPC water $450 \mu\text{l}$ を直接 tube に分注し、混和後、小分け分注保存していることが判明した。実際の tube の中には、少なくとも $65 \mu\text{l}$ 以上のプラスミドが入っていたことから、実際の標準コントロールの値としては、 1.3×10^7 の 10 倍希釈列であるところを、 1.0×10^7 の 10 倍希釈列として計算したことが、GI の定量値の低値の原因であった。標準曲線用コントロールプラスミドの希釈ミスが判明し、今後は、正確な定量値が算出できることが期待されることから、今回の精度管理への参加は非常に意義のあるものであったと考える。
9. 手技や検体等保存条件の検証のために、検量線作製のコントロールプラスミドは統一して配布して欲しい。
10. 他機関に比べ 1 オーダー高く出ているとの結果を受け、理由を検討した結果考えられる原因と対策について

① チップや希釈用チューブについて

DNA 吸着の少ない商品を使用していないことで、低濃度のコントロールの Ct 値が高く出て、そのために Std 曲線の傾きが大きくなり、検体の結果が本来よりも高いコピー数として出ている。

上記の対応策として、low retention のチップと DNA LoBind チューブを使用することとします。

② コントロールプラスミドの希釈について

当所では DDW または DEPC 水を使用していますが、Takara の EASY Dilution により結果が向上するか検討する予定としています。他機関であまり有効でなかったとの情報もあり、今回のアンケートにもその旨を尋ねる項目がなかったことから、先生も希釈に用いる溶液に関してはあまり関係がないとお考えなのでしょうか。以上の検討事項を、精度管理に用いた検体の残量で再測定し、対策の判定を行いたいと思います。

その他懸案事項

● 陽性コントロールプラスミドの保存方法について

希釈済みのコントロールプラスミドを凍結融解しながら使用すると、特に 3 乗以下で結果にバラつきが出るように思われるので、当所では 7 乗を 1 回分ずつ凍結保存しているものを毎回希釈して用いています。このことについては当所の方法で良いように思いますが、毎回希釈に時間を要するので、保存方法

によっては希釈済みのものを凍結融解して使用できるならそのようにしたいと考えています。

● 同一 Quantity sample の Ct 値のずれについて

低濃度の希釈コントロールプラスミドで同一のものを apply しているのに、Ct 値が大きくずれることが有ります。何が原因で同一のものが大きくずれるのか、ご助言頂ければ幸いです。

また、GI 及び GII 陽性コントロールの Ct 値が、同一 Quantity で GI の Ct 値の方が 3 ずつ大きくでる（1 オーダー分の差が出る）ことがあり、このことにも疑問を抱いています。こちらの方も何かご助言頂ければ幸いです。

11. 結果に関しては、値が大きく外れる事がなくて安心しましたが、本所の反応系について考えるうえで、他の衛研の反応系について、例えばサンプルアプライ量や反応液の量等の情報についてもフィードバックがあると参考になります。
12. すべてにおいて高値となり結果で D 判定でしたが、感染研から、アドバイスをいただき、新しい陽性コントロールを入手したので調整して陽性コントロールの Ct 値が正しい値で得られるようお願いしたい。また、保管温度も-80℃にしました。検査精度を担保する貴重な機会であり、来年度以降も実施する場合には、参加を希望します。
13. 検査精度を向上させるため、結果を元に想定される問題点やトラブルシューティングについても頂けますようご検討お願いいたします。
14. 今回は A 判定でしたが、検査方法（PCR のプログラムやウェルの配置、検体数）、試薬の種類、保管方法など課題があると感じました。今後、検査レベルの維持・向上のためにも改善していく必要があると思います。感染研の先生方が推奨される方法等をご教授いただければ幸いです。
15. "このような外部精度管理の機会を与えていただきありがとうございます。検査方法を確認する良い機会だと思いますので、今後とも外部精度管理の実施を希望いたします。スタンダードコントロールを用いて、日常的に行っている検査であります。実際に外部評価を受けるのは初めてでした。今回の結果報告に安堵しつつも、今後も適切な検査結果を報告できるように努力したいと思えます。
16. スタンダードを含め、正確かつ精密に検査ができたのでよかったです。
17. 定量値が外れてしまった原因を究明し、改善していく。
18. 判定結果は判断できたが、べき乗変換を行ったのち定量値の分布が中央値でなかった場合に、どこが不備で結果に反映したかの判断ができない。当所は中央値よりやや低かったが、改善すべき点が不明である。インフルエンザウイルスの外部精度管理のときのようにトラブルシューティングのような解説がほしい。
19. G1、G2 共に高い値にずれている事から、原因の 1 つとして、コントロール値の低下が考えられる。保存方法（-30℃保存）に問題が考えられるため-80℃保存に変更する。
20. 2・3 回目の測定の際にプラスミド濃度を間違えてコントロールを作成し、検量線を検証しないまま測定しました。後日、データ整理の際にズレに気がりましたが、再検するには検体量が不足、ズレたコントロールのまま 3 回測定した結果を報告しました。申し訳ありません。今後気をつけます。
21. 精度管理実施時に偶然、ヒートリッドドアカバーが故障し、温度上昇しなくなったため、修理を行った。毎年のメーカーメンテナンスは実施していないが、修理後メンテナンスを実施し、精度管理検体を検査した。

ウイルス精度管理研究小班追加コメント

1. 定量 PCR 用標準物質の使用条件、保存・管理状態がまちまちであることがわかったので、使用・保存・管理法の改善をはかる必要があると思われる。
2. 精度管理を行う担当者に負担がかかった可能性もある。標準物質の保管や使用方法の違いが結果に与える影響もデータとして収集しておくことが今後の発展につながると考えられる。
3. 次年度研究にて、NoV 定量 PCR 法全般におけるトラブルシュートを作成する必要があると思われる。
4. 定量 PCR 法では微量のサンプルを扱うことからピペットの使用法・管理方法・点検方法について、メーカーを交えて検討を行う必要があると思われる。
5. リアルタイム PCR 法における定量値の取り扱いなどについて、定量値の持つ意味が周知したほうが良いと思われる。
6. 定量 PCR 用標準物質の取り扱い法や希釈法についてのマニュアルをつけて配布するとよいかと思えます。
7. 各機関の現有定量 PCR 用標準物質も同時にリアルタイム PCR にかけて、各自の保管状況の良否を判断することも必要。

平成26年11月4日

地衛研精度管理研究班による 平成26年度外部精度管理（ウイルス検査）実施要領

1. 目的

本事業は、各地方衛生研究所(以下、地研)の微生物検査の技術的水準を維持・向上させるために、外部精度管理の手法を導入し、全国的な仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築およびその妥当性の評価を目的とする「地衛研精度管理研究班」の研究として、外部精度管理の導入に向けて種々の課題の抽出と整理を行うことを目的とする。今回、当該目的で適切に作製された試料を用いて、予め決められた検査法で実施し、検査結果とその解析および検査経過から検査実施上の問題点、データの精度に関する実態を把握することにより、近い将来、地研における感染症の病原微生物検査の信頼性確保および向上を図ることも目的としている。

2. 実施主体

外部精度管理の実施は、平成26年度厚生労働科学研究班（健康安全・危機管理対策総合研究事業）における「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实施のための事業の体制の構築に関する研究」（略称「地衛研精度管理研究班」）に基づいて、ウイルス小班が主体となって実施する。なお、本研究班は地方衛生研究所全国協議会精度管理部会と国立感染症研究所の関連部から研究分担者ないし研究協力者で構成されている。

3. 今回の検査項目

ノロウイルス(NoV)遺伝子定量(リアルタイム RT-PCR 法)

4. 配付試料の概要

試料到着時期：平成26年11月上旬

試料名：NoV 遺伝子挿入プラスミド

量：50 μ L

個数：2バイアル（試料Aおよび試料B）

備考：試料AおよびBとも T₁₀E₁緩衝液（Tris10mM/EDTA1mM）に溶解凍結

5. 試料の検査

1) 試料の保存及び検査方法

試料はマイナス 80℃で保存し、検査方法は別添資料2の精度管理実施手順に準じて行う。

2) 試料名

NoV 遺伝子挿入プラスミド

留意点

- ① 検査は、日常の当該項目の検査担当者とする。
- ② 検査は、送付試料から3検体をそれぞれ検査する（計3回測定）。
- ③ 標準曲線を別添1および2を参照し作成する。

6. 地衛研精度管理研究班による精度管理報告書等の提出

各機関は、検査・データ解析終了後、以下の資料を作成し提出すること。

1) 地衛研精度管理研究班による精度管理報告書の電子データの提出（印刷物及び電子データ両方提出）。

電子メールにて、別途送付したエクセルファイルに、各機関における測定値、測定条件、測定試薬、標準曲線作成に用いた Ct 値、相関係数および測定装置等の必要事項を入力する（入力項目については別添資料3参照）。

2) 検量線印刷物の PDF ファイルの提出

標準曲線の図を A4 サイズに形式を揃え、PDF ファイルにして提出する。

(検量線の原本は各機関で保存すること)

なお、精度管理報告書及び測定ファイルの様式の変更をしないこと。

7. 地衛研精度管理研究班による精度管理報告書の提出期限および送付先
平成26月12月10日(水)必着

8. 研究班員

研究代表者 富山県衛生研究所	佐多徹太郎
群馬県衛生環境研究所	小澤邦壽 塚越博之 小林美保
岡山県環境保健センター	岸本壽男 藤井理津志
東京都健康安全研究センター	貞升健志
名古屋市衛生研究所	柴田伸一郎
国立感染症研究所真菌部	宮崎義継
国立感染症研究所ウイルス第三部	駒瀬勝啓
国立感染症研究所感染症疫学センター	野田雅博 木村博一

9. 解析データ送付先・問い合わせ先

国立感染症研究所感染症疫学センター 木村博一
〒208-0011 東京都武蔵村山市学園4-7-1
国立感染症研究所感染症疫学センター第6室
E-mail: kimhiro@nih.go.jp, TEL: 042-848-7133 (直通)

地衛研精度管理研究班による
平成 26 年度外部精度管理（ウイルス検査）実施手順

【精度管理内容】

地衛研精度管理研究班による平成 26 年度外部精度管理（ウイルス検査）実施要領に基づき、NoV 遺伝子挿入プラスミドを使用し、リアルタイム RT-PCR 法により、NoV キャプシド遺伝子検出・定量を実施する。

【操作法】

リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス（NoV）の標準検査法（別添 2）と以下の手順により配布物質の定量を行う。

1 必要な器具と試薬

1) 測定機器

リアルタイム PCR 装置（例：ABI7500 Fast Real-Time PCR System）

2) 試薬

TaqMan[®] Universal PCR Master Mix（ABI, Cat.No. 4304437）、TaqMan プローブ、プライマー、DDW および関連試薬

2 反応プレートの準備

1) 表 1 のとおり、NoVGI および GII 検出反応液を各々調製する。

表 1. 反応液の調製

試薬	GI	GII
DDW	5.2 μl	5.8 μl
TaqMan [®] Universal PCR Master Mix	10.0 μl	10.0 μl
Primer (20pmol/μl)	COG1F	COG2F
	COG1R	COG2R
TaqMan probe (4pmol/μl)	RING1-TP(a) ^{注3)}	RING2AL-TP ^{注5)}
	RING1-TP(b) ^{注4)}	
計	18.0 μl	18.0 μl

注3) : RING1-TP(a) : 5'-FAM-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-TMRA-3'

注4) : RING1-TP(b) : 5'-FAM-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-TMRA-3'

注5) : RING2AL-TP : 5'-FAM -TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT-TMRA-3'

2) プレート（Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate）のウェルに 18μl ずつ反応液を入れる。コントロール DNA は 3 ウェル、試料（試料 A および試料 B）、陰性コントロール（NTC:No template control）も同様に 3 ウェルずつ使用する。

- 3) 配布した DNA 2 μ l を各々3 ウェルに加える。
- 4) コントロール DNA のノロウイルス GI および GII を別々に 2 μ l あたりで 10⁷ から 10¹ コピーまで 10 倍階段希釈し、2 μ l を 3 ウェルに加える。コントロール DNA は、10⁷ から 10¹ コピーを使用する。
- 5) NTC として DDW 2 μ l を 3 ウェルに加える。
- 6) MicroAmp Optical Adhesive Film によりプレートを密閉する。
- 7) ウェルの壁についている反応液を遠心して落とす。なお、遠心機がない場合はプレートを軽く叩いたり、振り下ろしたりする。
- 8) 反応条件(50°C 2 分、95°C 10 分を 1 回、次いで 95°C 15 秒、56°C 1 分を 45 回、25°C で保存)を設定する。
- 9) ランを開始する。
- 10) ラン終了後、データ解析を行う。
- 11) Amplification Plot 画面を表示させ、baseline および threshold Line を設定する。
- 12) Standard Curve を表示させる。相関係数(R²)が 0.990~1 であることを確認する。
- 13) Report 画面を表示させ、下の画面のウェルをハイライト選択し、解析データを表示させる。
- 14) Real-time PCR の結果から、配布したサンプルに含まれている DNA のコピー数を算出する。
- 15) 得られたデータを期日までに実施要領に基づきファイルを電子メールで送付する。

3. 研究班員・解析データ送付先*・問い合わせ先*

小班担当者は、下記のウイルス小班員です。実施については、感染研・木村までお問い合わせください。

研究代表者 富山県衛生研究所	佐多徹太郎
群馬県衛生環境研究所	小澤邦寿 塚越博之 小林美保
岡山県環境保健センター	岸本壽男 藤井理津志
東京都健康安全研究センター	貞升健志
名古屋市衛生研究所	柴田伸一郎
国立感染症研究所真菌部	宮崎義継
国立感染症研究所ウイルス第三部	駒瀬勝啓
国立感染症研究所感染症疫学センター	野田雅博
国立感染症研究所感染症疫学センター	木村博一*

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所感染症疫学センター第 6 室

E-mail:kimhiro@nih.go.jp

TEL: 042-848-7133 (直通)

<参考>

表 2. ノロウイルスのプライマーとプローブの塩基配列

Primer	塩基配列 [5'→3']	Sense
COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	+
COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	-
COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	+
ALPF	TTT GAG TCC ATG TAC AAG TGG ATG CG	+
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-

Probe	塩基配列 [5'→3']	Sense
RING1-TP(a)	AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA	+
RING1-TP(b)	AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA	+
RING2-TP	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	+
RING2AL-TP	TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT	+
RING2-Plate	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CTB GCT CCC	+

IUB CODES

R = A or G B = C,G or T

Y = C or T D = A,G or T

K = G or T H = A,C or T

M = A or C V = A,C or G

S = G or C

W = A or T

N = A or G or C or T

3. 地方衛生研究所への細菌検査に関する外部精度管理導入に関する技術的支援

研究分担者	石岡大成	国立感染症研究所
研究協力者	森本 洋、清水俊一	北海道立衛生研究所
	井上伸子	群馬県衛生環境研究所
	尾畑浩魅、甲斐明美	東京都健康安全研究センター
	太田 嘉、森田昌弘	横浜市衛生研究所
	清水美和子、磯部順子	富山県衛生研究所
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	野村恭晴、調 恒明	山口県環境保健センター
	仙波敬子、四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
	岡元冬樹、世良暢之	福岡県保健環境研究所
	蒲池一成、大石和徳	国立感染症研究所

研究要旨 地方自治体における感染症の公的検査機関である地方衛生研究所の、細菌検査に関する検査精度の把握および維持・向上を目的として、外部精度管理の導入について検討を行った。平成26年度は、まず、本年度の細菌検査に関する地衛研外部精度管理の方針を検討するための細菌小班を設置した。細菌小班での検討の結果、対象とする細菌は、地方衛生研究所において検査頻度の高いサルモネラ属菌（2種類の血清型）を対象病原細菌とすることに決定した。また、検査試料については、ヒト糞便にサルモネラ属菌を一定量添加し、キャリーブレイア培地入り臨床検体輸送用スワブに浸漬させて封入した。これらの検査試料は、ゆうパックを利用して国立感染症研究所村山庁舎から検査協力11機関に国際連合規格容器を用いて発送した。精度管理の結果は、サルモネラ属菌陽性試料から2血清型とも検出され、かつ、サルモネラ属菌陰性試料からサルモネラ属菌がされなかった機関は8機関であった。また、サルモネラ属菌が1血清型のみ検出され、かつ、サルモネラ属菌陰性試料からサルモネラ属菌がされなかった機関は3機関であった。サルモネラ属菌陽性試料からサルモネラ属菌が1血清型も検出されなかった機関またはサルモネラ属菌陰性試料からサルモネラ属菌が検出された機関はなかった。サルモネラの検査における使用培地などについては、機関ごとに特徴があり、今回の結果の差違は増菌培養の有無によることが示唆された。したがって、感染症の細菌検査を実施する場合においても、食品の細菌検査同様に検体別の標準検査作業書を作成して検査に対応するべきであることが考えられた。

A. 研究目的

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下、感染症法）の一部改正および公衆衛生の向上の観点からも、地方衛生研究所（以下、地衛研）における病原体検出の技術水準の維持は不可欠である。しかしながら、近年の日本経済の成長鈍化と税収の低下から、地方自治体における予算および定員は年々削減されており、このことは地衛研においても同様である。したがって、地衛研における微生物検査の分野においては、年々高度化する検査技術や検査機器の進歩および新技術へ対応するために、多大なる努力を払っているが、一部の地衛研においては必要最低限の検査レベルの維持確保も困難な状態に陥っている。さらには、食品に関する細菌検査においては、規格基準等詳細に規定された検査法が存在するものの、感染症の分野では、明確な精度管理のシステムは存在しない。

そこで、これらの問題に対応するためには全国規模での検査水準の維持・向上を図る必要がある。そのためには地衛研および国立感染症研究所（以下、感染研）が連携してこれらのことに対応する必要がある。本分担研究では、細菌性の病原体検査に関する技術水準の維持および向上を図るために、精度管理の実施方法等について検討し、模擬精度管理を実施することにより問題点および解決法について考察した。

B. 研究方法

1. 関係機関：細菌検査に係わる地衛研外部精度管理を実施する上で、検討するための細菌小班を結成した。構成機関は、山口県保健環境研究所を班長とし、班員は北海道立衛生研究所、横浜市衛生研究所、富山県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所および感染研の7機関（10名）であった。

2. 外部精度管理対象機関：平成26年度の地衛研外部精度管理への参加機関は、本研究班に属する機関および他に希望する機関とした。すなわち、細菌小班を構成する6機関、群馬県衛生環境研究所、東京都健康安全研究センター、名古屋市衛生研究所、岡山県環境保健センターおよび愛媛県立衛生環境研究所の計11機関であった。

3. 精度管理実施要領の作成：細菌小班でのディスカッションにより、平成26年度に実施する外部精度管理対象病原細菌をサルモネラ属菌と決定した。そこでサルモネラ属菌を検出するための外部精度管理に関する要領を作成した。

4. 精度管理実施手順書の作成：細菌小班で決定したサルモネラ属菌検出に関する検査実施手順書を細菌小班で作成した。この手順書は、標準的な実験室（P2レベル）に適応するようにまとめられた。

5. 精度管理実施時期：平成26年12月から平成27年1月まで

6. 試料の調整：胃腸炎患者^{1, 2)}を想定して、サルモネラ属菌をヒト由来の糞便に添加した。サルモネラ属菌は、A食肉衛生検査所から分与された *Salmonella Cerro*（以下、SC）および *S. Infantis*（以下、SI）を供試した。一般的にサルモネラ属菌は硫化水素産生性であるが、今回は硫化水素産生性のサルモネラと硫化水素非産生性のサルモネラの重複感染性胃腸炎を想定して、SIについては硫化水素非産生性の株を使用した³⁾。便への添加量は、それぞれ便1gあたり10万CFUとした。また、ヒトの糞便については、地衛研において一般的な食中毒検査において種々の病原体が培養法により検出されなかったものを選択し、さらには、添加回収率が良好な便を選択した。

7. 送付用容器：固形培地（キャリーブレイ）であることから輸送上安全であること、細身のス

ティックタイプであることから取り扱いが容易で保存場所をとらないこと、普段多くの地衛研で取り扱っていることなどの理由から輸送用一次容器としてシードスワブ $\gamma 1$ 号を選択した。付属の綿棒に SC および SI を添加した便サンプルを浸漬し、その綿棒一次容器の管壁に触れないようにキャリーブリア培地に突き刺し密封した。これらの試料は、発送まで 4°C の条件下に保存した。これらの操作は、すべて感染研村山庁舎感染症疫学センター細菌検査室で実施された。

8. 発送手段：感染研から地衛研または地衛研から感染研へ病原体を含む検体を送付する場合は、コスト面などから一般的にゆうパック（チルド）を利用している。したがって、今回もゆうパック（チルド）を利用して感染研村山庁舎から検査協力 11 機関に国際連合格格容器を用いて発送した。なお、発送日は平成 16 年 12 月 5 日が 7 機関、12 月 8 日が 4 機関であった。

9. 検証：検査協力 11 機関に送付した試料（陽性試料 1 本、陰性試料 1 本）について、精度管理実施要領（別添 1）および精度管理実施手順書（別添 2）に従って検証を行った。

C. 研究結果

精度管理実施要領および精度管理実施手順書の策定

細菌小班におけるディスカッションにより、精度管理実施要領（別添 1）を策定し、また、標準的な実験室レベルで検査対応可能な精度管理実施手順書（別添 2）を策定した。別添 2 の補助的様式として、検査結果報告書（別添 3）、検査経過記録書（別添 4）、検体管理簿（別添 5）を作成した。他の分担研究で実施されているアンケートの結果から、感染症に関する細菌検査に関しては、試験検査およびその結果の信頼性を確保するためのシステムである GLP (Good Laboratory Practice) が導入されている地衛研は少ない。このことを考慮して上記手順書および

様式を作成したが、精度管理を実施する上で自施設のシステムが構築されている場合は、今回作成した様式の使用について、実施対象地衛研の判断にゆだねることとした。

送付試料の検証

送付試料（試料 1 および試料 2）を平成 26 年 12 月 5 日および 8 日に参加対象地衛研にゆうパック（チルド）で送付した。そのため、感染研村山庁舎感染症疫学センター細菌検査室において平成 26 年 12 月 9 日から実施した。検査法については、精度管理実施手順書にしたがって実施した。なお、本精度管理の検査フローチャートを別添 7 に示した。この中から、増菌培地はセレナイトシスチン培地（ニッスイ）を使用し、選択分離培地は DHL 寒天培地（ニッスイ）、SS 寒天培地（ニッスイ）、CHROMagar サルモネラ（CHROMagar）、ES サルモネラ寒天培地 II（関東化学）の計 4 種の平板を使用した。また、生化学性状試験は TSI 寒天培地（ニッスイ）、LIM 寒天培地（ニッスイ）、シモンズクエン酸塩寒天培地（栄研化学）、マロン酸塩寒天培地（栄研化学）、VP 半流動培地（栄研化学）を選択し、市販の同定キットは使用しなかった。試料 1 および試料 2 とともに直接平板に塗布し、スワブの残余便をセレナイトシスチン培地に懸濁した。増菌培地は $42\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、選択平板は $36\pm 1^{\circ}\text{C}$ で 24

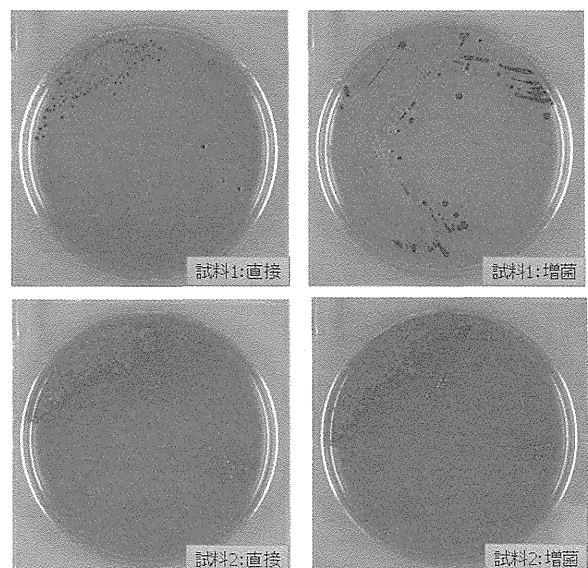


図1 検証試験における各培地の発育状況 (DHL)

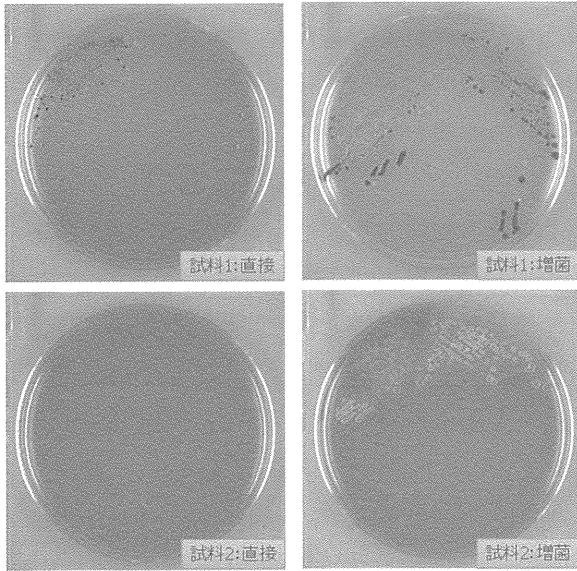


図2 検証試験における各培地の発育状況 (SS)

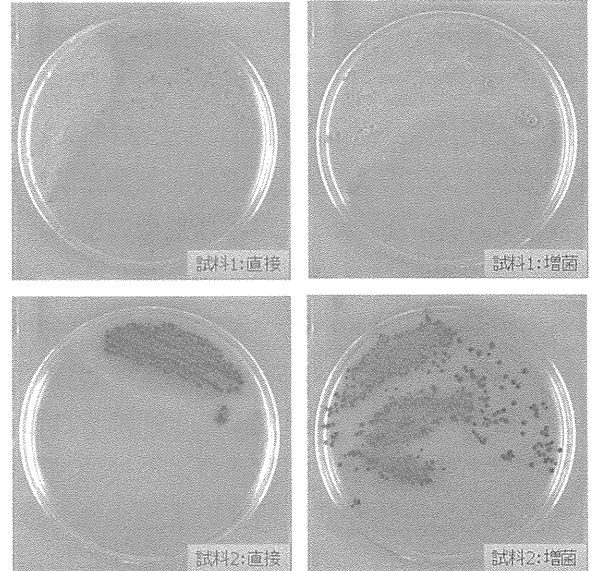


図3 検証試験における各培地の発育状況 (ESサルモネラII)

時間培養した。増菌培養については、その後同様に選択平板で培養した。

それぞれの平板における発育状況を図 1～4 に示した。選択平板が DHL の場合、試料 1 では直接塗抹ではほぼ黒色コロニーのみの発育であったが、増菌した方は黒色コロニーのみならず、乳白色コロニーも多数観察され、明らかに複数の細菌の発育が観察された。一方、試料 2 については、直接塗抹および増菌培養ともほぼ同様レベルで赤色コロニーのみが観察された (図 1)。選択平板が SS の場合、試料 1 では直接塗抹および増菌培養とも黒色コロニーのみならず乳白色コロニーも観察された。一方、試料 2 については、直接塗抹ではほとんど細菌の発育は観察されず、増菌培養では赤色コロニーのみの発育が観察された (図 2)。選択平板が ES サルモネラ寒天培地 II の場合、試料 1 では直接塗抹および増菌培養ともに大小様々なピンク色のコロニーのみが観察された。一方、試料 2 については、黒～黒紫色のコロニーのみが観察され、試料 1 および 2 とも、増菌培養した方が平板での発育が優位であった (図 3)。選択平板が CHROMaga サルモネラの場合、試料 1 では直接塗抹および増菌培養ともに単一で藤色のコロニ

一のみが観察された。一方、試料 2 については、青～緑青色のコロニーのみが観察された (図 4)。これらの結果から、すべての種類の選択平板において試料 1 がサルモネラ属菌陽性であり、試料 2 は陰性であることが推測された。また、DHL、SS、ES サルモネラ II の平板においては、単一でない複数のサルモネラ属菌の存在も示唆された。

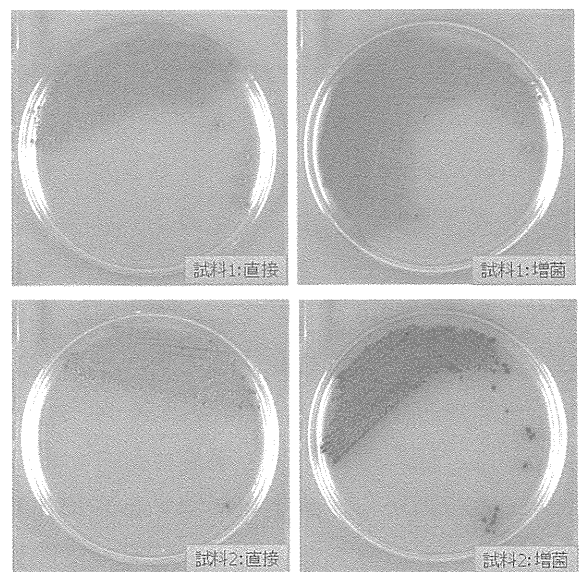


図4 検証試験における各培地の発育状況 (CHROMagar Salmonella)

そこで、1 枚のシャーレから 3～5 コロニーを TSI、LIM、シモンズクエン酸塩培地、マロン酸

塩培地、VP 半流動培地に移植し生化学性状試験を実施したところ、試料 1 から得られたコロニーは、硫化水素産生性以外すべてサルモネラ属菌の性状を示した。そこで、市販免疫血清（デンカ生研）を利用して O 群型別を実施したところ、硫化水素産生株は O18 群、硫化水素非産生株は O7 群であった。続いて H 血清型別（1 相および 2 相）を実施したところ、O18 群については Z₄, Z₂₃ : 1, 5、O7 群については r : 1, 5 を示した（相誘導は濾紙法で実施）。また、O18 については、免疫血清 O6 にも凝集を示した。以上のことから、試料 1 から検出されたサルモネラは、SC および SI（硫化水素非産生株）と同定が可能であった。

外部精度管理の結果

検査対象 11 機関すべてが精度管理に参加し、結果の回答を送付した。送付された結果を表 1 および表 2 に示した。各機関とも試料 1 からサ

表1 各試料からのサルモネラ属菌検出結果

	試料 1	試料 2
陽性機関数	11	0
陰性機関数	0	11
計	11	11

表2 試料1から検出されたサルモネラの血清型

分離血清型	分離機関数
<i>Salmonella</i> Cerro*のみ	3
<i>Salmonella</i> Infantis のみ	0
<i>Salmonella</i> Cerro* および Infantis	8
計	11

ルモネラを検出し、試料 2 はサルモネラ属菌陰性と回答した（表 1）。しかしながら、試料 1 に添加されていた SC および SI を両方とも記載していた機関は 8 機関、SC のみの記載していた機関が 3 機関、SI のみと回答した機関は無かった。また、この 2 つ以外の血清型を記載した機関はなかった（表 2）。

使用培地状況

精度管理を実施する上で、使用する培地の種類、ロット、培養温度および培養時間は、サルモネラの発育に大きく影響する⁵⁾。そこで各機関が、今回の精度管理で実際に使用した培地について報告書に記載してもらった。それらを取りまとめた表が表 3～5 である。増菌培地については、セレナイトシスチン培地を単独で使用するか、TT ハーナ培地と RV 系培地を併用する組

表3 増菌培地の使用状況

増菌培地	メーカー	使用機関
TTハーナ	栄研化学	2
RV培地	栄研化学	1
RV Enrichment	OXOID	2
セレナイトシスチン	ニッスイ	2
セレナイトシスチン	Difco	1

表4 選択分離培地の使用状況

選択平板	メーカー	機関数	選択平板	メーカー	機関数
SS	栄研化学	3	クロモアガー*1	CHROMagar	7
SS	ニッスイ	2	XLD	栄研化学	1
SSS	ニッスイ	1	ESサルモネラII	栄研化学	1
DHL	栄研化学	2	SMID*2	シスメックス	1
DHL	ニッスイ	3	BGA	OXOID	1
MLOB	ニッスイ	3			
MLOB	OXOID	1			
XLT4	Difco	1			

*1, 一部生培地 *2, 生培地

み合わせパターンが多かった。また、11 機関のうち 5 機関が増菌培地を使用せず、直接塗抹のみでの検査対応であった。

選択分離培地に関しては、表 4 左欄に示したように、サルモネラ属菌を硫化水素の産生性をもって鑑別する培地では、SS 培地に白桃を添加した SSS や XLT4 などの培地を使用している機関もあったが、多くは従来用いられている DHL、SS、MLCB などが使用していることが確認された。一方、硫化水素産生性によらない酵素基質培地では、従来から推奨されている CHROMaga サルモネラを使用している機関が多かった。しかしながら、粉末からの CHROMaga サルモネラ培地作成方法は少し技術が必要なことや、最近 CHROMaga サルモネラと同等以上の酵素基質培地が発売されていることから、CHROMaga サルモネラ以外の培地を選択している機関も認められた。

表 5 には、サルモネラ属菌の生化学性状試験を実施するために、各機関で選択・使用した培

表5 性状試験培地の使用状況

培地名	メーカー	使用機関
TSI 培地	栄研化学	5
	ニッスイ	4
	極東製薬	1
	スギヤマゲン*	1
LIM 培地	栄研化学	4
	ニッスイ	5
	極東製薬	1
	スギヤマゲン*	1
シモンズクエン酸塩培地	栄研化学	3
	ニッスイ	1
	Difco	1
マロン酸塩培地	栄研化学	4
VP半流動培地	栄研化学	5
SIM 培地	栄研化学	2
リジン脱炭酸試験用培地	栄研化学	1
酢酸ナトリウム培地	栄研化学	1
Urea 培地	BD	1
Motility Sulfide Medium	Difco	1
ジョルダンD酒石酸塩培地	栄研化学	1

*, 生培地

地を示した。生化学性状試験のみならず、増菌培地および選択平板においても、二大国産メーカーの培地が多く使われていた。また、TSI 培地および LIM 培地のような培地についても、生培地で検査対応している機関も認められた。

考察

感染症法の一部改正が行われることにより、平成 27 年度からは、地方自治体における病原体の検査機関である地衛研は、あらゆる病原体の検査に対応しなくなればならなくなった。そのため、各地衛研では様々な病原体の検査を実施するための予算措置、人員確保が必須であるが、現状はかなり厳しいものと考えられる。今回の外部精度管理を実施した結果、すべての機関から試料 1 はサルモネラ属菌陽性、試料 2 は陰性である回答が得られたことは、地衛研の細菌検査に関する精度は確保されていると言えることはできると思われる。しかしながら、3 機関において、試料 1 が硫化水素産生株 (SC) と非産生株 (SI) との混合であったことを見落としか、検査手技上のトラブルで検出できなかった。検証試験においては、SC と SI は明瞭に発育培地上で区別できたことから、この原因は、増菌培養の有無によるものと考えられた。一部の機関においては、報告書の記載に齟齬が認められたため、実際には増菌培養を実施していない機関は 6 機関であったことが推察される。つまり半分以上の機関が感染症のサルモネラの検査では増菌培養の工程を省略している可能性が示唆された。

また、地衛研によっては、試料到着の翌週から検査を実施しているので、一週間のタイムラグが結果を左右することが考えられる。ここでは省略したが、第二週目の検証実験では、直接塗抹した平板の発育状態は、送付直後のものと比較してあまり良くない。この場合、明確に発育するまでにさらに 1 日を要した。したがって、

冷蔵保存といえども、試料送付から検査までのタイムラグが大きければ大きいほど、通常の検査工程に関しても何かしらの工夫や変更が必要となることが示唆された。

今回の精度管理を実施するにあたり、試料作製上の問題や候補菌種、輸送容器および送付方法など様々な問題が散見されたが、これらに関することは他の分担研究で論じているのでここでは省略する。今後継続して外部精度管理を実施するためには、地衛研と感染研とのさらなる協力関係が必要であると考えられた。

D. 結論

地方衛生研究所全国協議会と感染研が密に連絡を取り合いながら、細菌性感染症に関する外部精度管理を導入していくことは重要である。しかしながら、全国 70 以上の地衛研に同時に同一条件で臨床検体を送付することは現状の体制では難しい。このことに関する考察は他の分担研究に譲るとしても、まずは、精度のしっかりした試料を作成することが必要であり、そのためには素性のはっきりした菌株の収集も重要であることが示唆された。

参考文献

1. Murakami K, Ishihara T, Horikawa K et al. Features of Salmonella serovars among food handlers in Kyushu, Japan. *New Microbiol.* 2007. 30,155-159.
2. 小花光夫、相楽裕子、青木知信 他、『感染性腸炎の細菌の動向』－1996～2000年における感染性腸炎研究会の調査成績より－. *感染症誌.* 2002. 76,355-368.
3. Yamasaki S, Hara K, Izumiya H, et al. Lysine decarboxylase-negative Salmonella enterica serovar enteritidis: antibiotic susceptibility, phage and PFGE typing. 2007. *J Vet Med Sci.* 69,813-818.
4. Dusch H, Altwegg M. Evaluation of five new plating media for isolation of Salmonella species. *J Clin Microbiol.* 1995. 33,802-804.

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産の出願・登録状況

なし

別添 1

地衛研精度管理研究班による 平成 26 年度外部精度管理（細菌検査）実施要領

1 目的

本外部精度管理事業は、各地方衛生研究所（以下、地衛研）における微生物検査の技術的水準の維持・向上のために、外部精度管理の手法による全国的な仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築およびその妥当性を評価することを目的とする「地衛研精度管理研究班」の研究として、外部精度管理の導入に向けて種々の課題の抽出と整理を行うことを目的とするものである。したがって、本外部精度管理は、当該目的で適切に作製された試料を用いて、予め決められた検査法または各機関における標準作業手順書に従って実施し、検査経過および検査結果から検査実施上の問題点、検査法などの実態を把握することにより、検査技術の改善・向上を図るとともに、地衛研における感染症の病原微生物検査の信頼性確保および向上を図ることが可能であると考えられる。

2 実施主体

今回の外部精度管理の実施は、平成 26 年度厚生労働科学研究班（健康安全・危機管理対策総合研究事業）における「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实施のための事業の体制の構築に関する研究」に基づいて、本研究班（いわゆる「地衛研精度管理研究班」）が主体となって実施する。なお、本研究班は地方衛生研究所全国協議会精度管理部会と国立感染症研究所の関連部から研究分担者ないし研究協力者が構成されている。

3. 平成 26 年度の検査項目

サルモネラ属菌の検出（定性）

4. 配付試料の概要

試料送付：発送予定日 平成 26 年 12 月 5 日（金）

到着予定日 平成 26 年 12 月 8 日（月）着日指定

ゆうパック チルド指定

送付試料：模擬臨床検体（糞便）

内容量：シードスワブ 1 本（1 試料あたり）

個数：シードスワブ 2 本

5. 配布試料の検査

1) 試料

サルモネラ属菌添加または非添加模擬臨床試料

2) 検査方法

本検査については、日常業務において専ら細菌検査を担当している職員が実施するものとする。また、検査方法については、別添試料 2 の「地衛研精度管理研究班」による平成 26 年度外部精度管理手順書に準じて行うか、参加機関で日常行っている検査方法に従って実施するものとする。

る。

3) 配布試料の保管方法および廃棄方法

検査終了までの配布試料の保管は、冷蔵保存とする。また、検査終了後の保管期間および廃棄については、検査実施機関で日常実施している方法または蒸気滅菌等適切な方法で処理するものとする。

6. 結果報告書および検査経過記録書の提出

検査終了後は、以下の書類を作成または記入して提出するものとする。

1) 「地方衛生研究所精度管理研究班」による平成 26 年度外部精度管理結果報告書
(様式 1)

実施機関名、責任者名、検査担当者名、検査結果などの必要事項を様式 1 に記入。

2) 検査経過記録書 (様式 2)

配布試料受領、検査開始日、検査終了日、検査手順の概略などの必要事項を様式 2 または、検査実施機関で使用している様式に記入するものとする。検査手順の概略については、実施した検査手順および検査結果判定の根拠についての概略を記入するものとする。

7. 地方衛生研究所精度管理研究班による平成 26 年度外部精度管理細菌検査結果報告書の提出

平成 26 年 12 月 27 日 (金) まで電子メールで送付

8. 問い合わせおよび送付先

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所村山感染症疫学センター第 5 室 石岡 大成 宛

E-mail: ishioka@nih.go.jp

TEL: 042-561-0771 (内 3702)、042-848-7132 (直通)

別添 2

地衛研精度管理研究班による平成 26 年度外部精度管理細菌検査手順書 ー臨床検体からのサルモネラ属菌定性検査の精度管理手順書ー

・精度管理内容

地衛研精度管理研究班による平成 26 年度地方衛生研究所外部精度管理細菌検査実施要領に基づき、模擬臨床検体（糞便）からサルモネラ属菌の分離検出、同定を実施する。

・操作法

1. 試験の概要

送付試料を均一にし、寒天平板に直接塗抹、または必要に応じて選択増菌培地での培養を経てから寒天平板に画線塗抹する。寒天平板は、硫化水素産生株を検出する培地と硫化水素産生株または非産生株であっても検出できる培地を併用して培養する。サルモネラが疑われる集落を純培養し、生化学性状培地等を用いて生化学性状の確認を行い、その後 O 多価または O1 多価血清での凝集反応によりサルモネラ属菌と推定する。引き続き H 血清を用いて H 抗原（1 相および 2 相）を確認する。必要に応じて、検査キット、遺伝子検査法を組み合わせる。同定する。

2. 使用器具、装置など

三角フラスコ、滅菌ピンセット、滅菌薬さじ、天びん、pH メーター、滅菌メスピペットまたはマイクロピペットおよび滅菌マイクロチップ、メスシリンダー、小試験管、中試験管、試験管ラック、エーゼ、高圧蒸気滅菌器、乾熱滅菌器、恒温槽または恒温水層、滅菌シャーレ、スライドグラス、シャーカステンなど

3. 培地、試薬および抗血清

① 選択増菌用培地

- ・ Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地、Tetrathionate (TT) 培地、セレナイト-シスチン培地、セレナイト-ブリリアントグリーン培地、セレナイト-ブリリアントグリーン-サルファ培地などを使用する。各使用説明書に従って作製する。

② 分離寒天平板培地

- ・ 硫化水素の産生性を確認できる培地：MLCB、DHL、SS、XLD などを、使用説明書に従って作製する。
- ・ 硫化水素非産生性サルモネラであっても判定可能な培地：ES II サルモネラ寒天培地、ブリリアントグリーンサルファピリジン寒天培地、クロモアガーサルモネラ、SMID II などを、使用説明書に従って作製する。

③ 生化学性状確認用培地および試薬類

必要に応じて、以下の培地を、試薬を用意する。

- ・ TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地：使用説明書に従って作製する。
- ・ LIM (Lysine Indole Motility) 培地：使用説明書に従って作製する。

- ・シモンズクエン酸ナトリウム培地：使用説明書に従って作製する。
 - ・VP 半流動培地：使用説明書に従って作製する。
 - ・インドール試薬
 - ・VP 用試薬 A：6%アルファナフトール+エタノール溶液
 - ・VP 用試薬 B：0.3%クレアチン加 40%水酸化カリウム水溶液
 - ・チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙
- ④ 血清型確認用血清
- ・サルモネラ免疫血清セット（デンカ生研）など

4. 検査手順

1) 選択増菌培養（実施する場合）

- ① 送付試料をそれぞれの選択増菌培地に接種する。
- ② それぞれの選択増菌培地を $42 \pm 0.5^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。

2) 分離用寒天培地培養

- ① 培養後の選択増菌培地をよく攪拌する（実施した場合）。
- ② 1 エーズ量を、上記 3-②で示した分離用寒天培地に画線塗抹する。
- ③ 接種した寒天培地を $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。

3) 確認培養

- ① 各分離平板に形成された定型的集落を 3 個以上釣菌し、TSI 培地、LIM 培地等に接種する。
- ② それぞれの培地を $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。
- ③ 培養後、以下の結果が得られた場合サルモネラと推定する。

TSI 培地：高層部黄変（硫化水素産生の場合は黒変）、斜面部赤変、
ガス産生（高層部における気泡または亀裂の発生）

LIM 培地：培地全体が紫変（リシン陽性）、インドール反応陰性、運動性陽性

- ④ TSI 培地、LIM 培地において、上記のような定型的な性状とは一部異なる性状を示す非定型的サルモネラ属菌が疑われる場合は、以下の 4) に示す生化学性状試験を実施する。

4) 生化学的性状試験

- ① 上記の非定型的サルモネラが疑われる場合は、以下の（ア）～（ウ）に示した生化学的性状検査を実施する。

（ア）オキシダーゼ試験：チトクロームオキシダーゼ試験用ろ紙に菌を塗布し、1 分以内に深青色になれば陽性とする。

（イ）クエン酸：シモンズクエン酸ナトリウム培地に菌を塗抹後、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養する。培地が深青色になれば陽性とする。

（ウ）VP：VP 半流動培地に菌を穿刺し、 $35 \pm 1^\circ\text{C}$ 、 22 ± 2 時間培養後、VP 用試薬 A および B を滴下する。陽性の場合には数分後に試薬付近が赤色となる。1 時間経過後も赤色のままであることを確認する。

5) 血清型別

- ① サルモネラ属菌の性状を示した菌株については、サルモネラ免疫血清（デンカ生研）を用いたスライド凝集法による O 血清型別試験を行う。この際、菌塊については TSI 斜面上から採

取して実施する。

(ア) O 多価血清および O1 多価血清を用いて凝集試験を行い、凝集が確認されたら O 群単身血清を用いて当該菌の O 群を決定する。

(イ) サルモネラ属菌としての定型的な生化学性状を示したにかかわらず、いずれの血清にも凝集が見られないときは O 群型別不能とする。

6) 記載内容

① サルモネラ陽性が推定された場合は、O 群または O 群型別不能について記載する。その後 H 血清型別 (1 相→相誘導→2 相) を実施する。相誘導は、クレーギー管法や濾紙法などで実施する。

② H 血清型別により 1 相および 2 相が決定したら、*Salmonella* 抗原構造表 (Kauffmann-White Schema) に基づいて血清型を決定する。

③ 非定型的サルモネラが認められた時も同様に O 群型別までは実施するとともに、どの生化学的性状が異なっていたかも注意する。

「地衛研精度管理研究班」による平成 26 年度外部精度管理細菌検査結果報告書

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 26 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。

検査実施日	該当する結果を○で囲んでください			
	サルモネラ属 菌の判定結果	試料 1	陽性	・ 陰性
		試料 2	陽性	・ 陰性

サルモネラ属菌陽性の場合の血清型：

試料 No. _____ 血清型 _____

サルモネラ検査

検体No.:

実施年月日	検査担当者	確認欄		
_____	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	送付容器および試料に異常が無いか確認	時間:
			↓	
_____	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	寒天培地()に画線塗抹	時間:
			寒天培地()に画線塗抹	時間:
			↓	
_____	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	典型的もしくは疑わしい集落を地	hrs培養 孵卵器:
			()に移植	温度:
				培養開始時刻:
				温度:
				培養終了時刻:
				温度:
			↓	
_____	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	培地、 培地の生化学性状判定	時間:
			↓	
_____	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	(同定キット等の実施)	hrs培養 孵卵器:
				温度:
				培養開始時刻:
				温度:
				培養終了時刻:
				温度:
			↓	
_____	<input type="text"/>	<input type="checkbox"/>	判定	時間:

区分責任者		確認年月日	
-------	--	-------	--

血清型別(O抗原)

時間:



血清型別(H抗原:1相)

時間:



H相誘導



培養開始時刻:

温度:

培養終了時刻:

温度:

hrs培養 孵卵器:

血清型別(H抗原:2相)

時間:

その他の検査

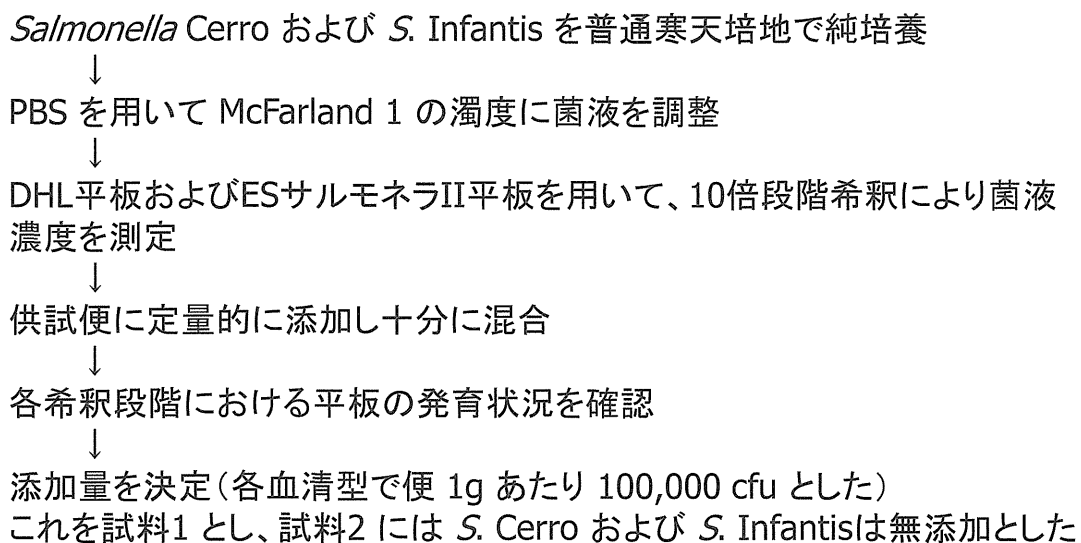
区分責任者		確認年月日	
-------	--	-------	--

検体管理記録簿

検体番号						
受付年月日						
検査項目						
受領時の記録	検体受領年月日					
	検体の状態と検査目的の整合性	適／不適	適／不適	適／不適	適／不適	適／不適
	検体の状態	冷蔵・冷凍・常温	冷蔵・冷凍・常温	冷蔵・冷凍・常温	冷蔵・冷凍・常温	冷蔵・冷凍・常温
	検体の外観	適／不適	適／不適	適／不適	適／不適	適／不適
	受領者署名					
検体管理の記録	検査終了日					
	検査結果発行日					
	検体廃棄年月日					
	廃棄担当者署名					
	検査区分責任者 確認年月日署名					

別添3

送付試料(サルモネラ属菌)の調整方法



別添7

試料からのサルモネラ属菌分離培養検査フロー

