

研修実施時期について

Q1 精度管理実施から研修までの期間	① 半年以内がよい	4
	② 半年～1年以内がよい(今回)	5
	③ 特にこだわらない*	1

*研修あれば時期はいつでも可. 研修ないときは報告書を早くみたいので研修も早くしてほしい

研修内容(第1日目)について

Q2 良かった点 複数回答可	① 前年度の結果の確認	5
	② 各所属での対応についての発表	8
	③ 問題点の抽出などのグループミーティング	10
	④ 全体討論でのトラブルシューティングの作成	7
	⑤ その他*	0
	⑥ なし	0

Q3 悪かった点 複数回答可	① 前年度の結果の確認	0
	② 各所属での対応についての発表	0
	③ 問題点の抽出などのグループミーティング	0
	④ 全体討論でのトラブルシューティングの作成	0
	⑤ その他*	0
	⑥ なし	9

グループミーティングについて (1グループに参加者5名、進行役1名)

Q4 グループミーティングの人数 (①あるいは②を選んだ場合、適切な人数を記入してください)	① 多い	0
	② 少ない	0
	③ 適切	10

Q5 グループミーティングの時間	① 十分	5
	② 少ない	5
	③ 多い	0
	④ その他*	0

Q6 グループミーティングに対する感想を記入してください	・自分と同じ問題が出され、その対処法が聞けて良かった
	・もう少し時間が欲しい
	・自分の問題と同じことについて話し合いができたのは有意義だった
	・すぐに答えてくれるので効率的であった
	・各施設の様子が聞けて参考になった
	・とても有意義だった
	・施設ごとに問題点や対応について話す時間が十分あり有意義だった
・時間が少なく十分な話ができなかった	

全体討論について

Q7 全体討論でのトラブルシューティングについて	① 十分であり納得している	3
	② それなりに納得している	7
	③ どちらでもない	0
	④ やや不満があり不十分と感じる	0
	⑤ 不十分である	0

Q8 今回のトラブルシューティングは役に立つと思いますか	① 思う	7
	② やや思う	3
	③ どちらでもない	0
	④ あまり思わない	0
	⑤ 役に立たない	0
	⑥ その他*	0

Q9 Q8での理由を記入してください	・評価されるだけでなく、改善すべき点が明確になる
	・ほかの機関の対応を聞いて参考になった
	・どのトラブルも心当たりがあり、今後も起こるかもしれないので吸収できた
	・同じ検査を行っている他の施設の話が聞けてよかった
	・トラブル時のチェックポイントが参考になり職場に持ち帰りたい
	・今回は役立つが完璧には解決できていないと思う
	・機器の管理、試薬、ピペットのことまで議論できてよかった
	・もっとじっくり話してもよかった
・基本的なことを再確認でき、新たに得られた知見もあった	

Q10 全体討論のメンバー	① 今回のままで良い	5
	② 感染研の専門家を加えた方が良い	0
	③ 試薬会社など民間の担当を加えた方がよい	4
	④ その他*	1
	*毎回違う衛研の参加がいい	
	リアルタイムの会社によるメンテなどの詳細説明	

今後の検討課題について

Q11 もう少し詳しく知りたい内容 複数回答可	① 基本的な操作技術	2
	② 試薬の維持管理	5
	③ 実験室の維持管理	3
	④ コンタミなどが起きた時の対応	2
	⑤ データ解釈で注意すべき点	7
	⑥ その他*	0

研修内容(第2日目)について

Q1 良かった点 複数回答可	① リアルタイムPCRのデモ	5
	② リアルタイムPCRの基本の講義	9
	③ リアルタイムPCRのデータの比較	5
	④ 試薬調製等の基本的手技	8
	⑤ その他*	2
	⑥ なし	0
	*トラブルシューティング デモ中などのディスカッションが良かった	
Q2 悪かった点 複数回答可	① リアルタイムPCRのデモ	0
	② リアルタイムPCRの基本の講義	0
	③ リアルタイムPCRのデータの比較	0
	④ 試薬調製等の基本的手技	0
	⑤ その他*	2
	⑥ なし	8
	*全員が手を動かし、手技の確認ができるとなおよかった。 実技がもう少しあるとよかった	
Q3 もう少し詳しく行って欲しかった内容 複数回答可	① リアルタイムPCRのデモ	2
	② リアルタイムPCRの基本の講義	0
	③ リアルタイムPCRのデータの比較	1
	④ 試薬調製等の基本的手技	1
	⑤ その他*	1
	⑥ なし	5
	*結果データ解析法。どのような場合に検査をやり直すか。	
研修全体について		
Q4 研修後の技術や理解度の向上(個人-1) 複数回答可	① リアルタイムPCRに対する理解が深まった	6
	② 試薬調製や機材の操作の技術が向上した	5
	③ 適切なトラブルシューティングが期待できる	7
	④ その他*	0
	⑤ 特に無し	0
Q5 研修後の技術や理解度の向上(個人-2) 複数回答可	① 手技などにおいて改善点がたくさん見つかった	8
	② あまり多くの改善点は見つからなかった	1
	③ 改善する点はない	0
	④ その他*	1
	*①と②の間	
Q6 職場での研修内容の伝達方法 複数回答可	① 伝達講習会	2
	② 担当者間での打ち合わせ	7
	③ 復命書	6
	④ その他*	2
	⑤ 特に無し	0
*朝のミーティング ②③実施済み、①実施予定		
Q7 職場で研修内容を伝達した結果	① 職場での技術向上につながった	7
	② 職場での導入は困難	0
	③ 技術向上につながるとは考えづらい	0
	④ その他*	3

	⑤ 特に無し	0
	*ウイルス担当内での反省、技術向上につながった結果がまだわかりません。①になるようにしたい。 ピペット操作やチューブの取り扱い等を少しずつ改善していきたい 復命書のみでうまく伝わるかどうかわからない 手袋を交換するなど向上(改善)する部分もあるが、チューブやピペットなどの操作で個人の癖は、その人が意識しないと直らないものなので一緒に見ていてその時は、直っても続くかという難しいので課題です	
今後の検討課題について		
Q8 望ましい研修時期	① 7-9月	8
	② 10-12月	1
	③ その他*	1
	*6月	
Q9 望ましい研修期間	① 1日	2
	② 2-3日	7
	③ その他*	1
	*1~2日	
Q10 研修の内容	① 講義中心が良い	1
	② 実習中心が良い	2
	③ その他*	7
	*両方 議論する場面が多いほうが良い	
Q11 行って欲しい講義内容 複数回答可	① リアルタイムPCRの基本	7
	② リアルタイムPCRのトラブルシューティング	8
	③ 白衣等の着脱	2
	④ 実験室のデザイン	3
	⑤ 試薬の保管・管理・取り扱い	6
	⑥ ピペットの操作	1
	⑦ チューブの取り扱い	0
	⑧ 使用済み器具の廃棄	2
	⑨ その他*	0
Q12 行って欲しい実習内容 複数回答可	① リアルタイムPCRの基本	0
	② リアルタイムPCRのトラブルシューティング	2
	③ 白衣等の着脱	3
	④ 実験室のデザイン	1
	③ 試薬の保管・管理・取り扱い	6
	④ ピペットの操作	5
	⑤ チューブの取り扱い	4
	⑥ 使用済み器具の廃棄	2
	⑦ その他*	1
	*リアルタイムPCRの解析の仕方	
Q13 研修対象者は誰が良いか	① 係長などのグループ長	0
	② 実際の検査を行っている中での年長者	2
	③ 最も検査を行う者	8
	④ その他*	1
	*各地研により適任者は異なると思う	

資料9(フォローアップ調査例)

H27年度外部精度管理実施後研修会 グループミーティング・ワークシート(まとめ) 機関名:

	問題点	考えられる原因	解決のための処置
1日目	・標準物質の10コピーが不検出	・温度(室温×) 濃度が薄ければ薄いほど	・標準物質の管理
	・G I、G IIともにCt値が大きい	・標準物質の劣化 ・ピペッターの操作	・氷冷
	・R ² が0.99以下	・標準物質の劣化 ・希釈	・新しい標準物質に変更＝保管(温度) ・記録をつける ・計算のダブルチェック ・凍結融解を繰り返さない 濃度が薄いと加水分解しやすい
	・標準物質(<10 ³ コピーDNA)でばらつき	・濃度の計算ミス ・標準物質の希釈 ・測定機器の測定ブロックの汚染	・チューブのスピンドアウンを2回 よく攪拌 <u>ピペッティングはしない</u> ・測定ブロックの汚染除去
	問題点	考えられる原因	解決のための処置
2日目	・標準物質の10コピーが不検出	・温度(室温×) 濃度が薄ければ薄いほど	・希釈系列での保管→低濃度DNAではチューブ内への付着等によりロスが大きい
	・G I、G IIともにCt値が大きい		・試薬の管理
	・標準物質(<10 ³ コピーDNA)でばらつき	・ピペッターの精度 ・サンプル添加時のピペッターの操作	・ピペッターの保守 ・目視でよく確認(量の違いに気づく目を持つ) ・管壁、管底を使い分けたサンプル添加 →チューブ内の高い位置で添加するとエアロゾルの原因
	研修担当者の指摘事項	コメント	
	・標準物質:希釈倍率が高いポイントではCt値にばらつき→ピペッティング操作(希釈)に問題 ・標準物質の劣化	・標準物質のCt値が高い→管理に問題あり ・標準物質の希釈では溶液をしっかりと攪拌する ・検査の確認を誰かにしてもらってもよかった。他の人がやったデータと比較したことがあるか	
	問題点	解決方法とその成果	
参加者	・標準物質の10コピーが不検出 ・標準物質がばらつく	標準物質の攪拌方法をタッピングとボルテックスにしたことにより、10コピーも検出され、R ² が0.99以上の安定した検量線を得られるようになったことから、標準物質の攪拌方法に問題があったことが、一番大きな原因であったことがわかった 毎回希釈系列の作成を実施することが望ましいことは分かっているが、実際には難しいことから、1つの希釈系列を2回から3回で使い切るような形をとるようにした 現在、担当者間では情報の共有はできており、また、リアルタイムPCRを実施している保健所に対しても伝達講習を実施し、実際のデータの確認を取ってもらっているところであるが、今までよりもいいデータを得ることができた、タッピングによる攪拌は従来より手間がかからないと言った意見をj得ている	

資料 10

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会（ウイルス検査）

日時：9月10日（木）13：30～17：00

9月11日（金）9：00～15：00

場所：国立感染症研究所村山庁舎 講義室および実習室（6号棟6階）

内容：On the job training を模したグループミーティング形式で、ノロウイルスリアルタイム PCR のトラブルシューティングを行う。さらに、実習を通して問題が解決できたかを確認する。

第1日目

13：30～13：40

講義室

- ・開会の挨拶（研究代表者、富山県衛生研究所：佐多）

13：45～15：25

講義室および講師控室

- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：グループミーティング（富山県衛生研究所：小淵、東京都健康安全研究センター：貞升）

休憩

15：40～17：00

講義室

- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：全体討論（東京都健康安全研究センター：貞升、富山県衛生研究所：小淵）
- ・総括
- ・研修後アンケート

第2日目

9：00～10：30

実習室

- ・リアルタイム PCR 実習：模範例および手技的失敗例のデモ（群馬県衛生環境研究所：塚越、栃木県保健環境センター：水越）

休憩

10：45～12：00

資料 10

講義室

- ・リアルタイム PCR 基礎講座：講義（国立感染症研究所：木村）

昼食

13:00～15:00

講義室

- ・結果の解析：解説および討論（栃木県保健環境センター：水越、群馬県衛生環境研究所：塚越）
- ・総括（富山県衛生研究所：小渕）
- ・閉会の挨拶（国立感染症研究所：木村）

研修参加者

＊本報告書では削除

研修担当者

小渕 正次（富山県衛生研究所）
貞升 健志（東京都健康安全研究センター）
塚越 博之（群馬県衛生環境研究所）
水越 文徳（栃木県保健環境センター）
木村 博一（国立感染症研究所）
長澤 耕男（国立感染症研究所）
佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）

グループミーティングシナリオ(第1日目)

A～C班を2分して、最初にグループ討論で昨年度の精度管理調査でうまくいかなかった原因や問題点を抽出する(事前に研修プレゼンファイル配布)。次に、グループ内でトラブルシューティングを作成する(ホワイトボード)。グループ内でまとめたホワイトボードを発表し、全体討論を行ってトラブルシューティングを完成させる。

項目	ポイント	進行
1. 問題点の抽出 (グループ討論 60分)	<ul style="list-style-type: none"> ・標準曲線は正しく描かれているか →定量値の取り扱い、定量値の持つ意味 ・作業手順書の流れ図→自分の原因がどのあたりだったのか明示(作業者個人の問題?) ・試薬や試料(標準物質)等の保管方法、調製方法、使用方法に問題はないか。 ・ ・機器・ピペット等の使用法、管理方法、点検方法のチェック。 ・問題点を、機材(機器・ピペット)、試薬類(陽性コントロールを含む)、手技の要因に収束できるような進行、まとめ方をする。 	<ul style="list-style-type: none"> ・研修プレゼンファイルの発表 ・ホワイトボードを用いてブレインストーミング形式で討論(小淵、貞升)
2. トラブルシューティングの作成 (グループ作業 60分)	<ul style="list-style-type: none"> ・グループ内で抽出した問題点をについて、トラブルシューティングを作成する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・A4紙に手書きでまとめる(小淵、貞升)→要点ごと(機材、試薬類、手技)
3. 各グループの発表 (全体討論 60分)	<ul style="list-style-type: none"> ・復命用に持ち帰りできるトラブルシューティングを目指す。 ・トラブルシューティングには正解はなく、バラバラか。 ・職場でのトラブルシューティングないしOJTを補完する目的もある? ・検査の質の向上への動機付けと問題解決能力を高める。 	<ul style="list-style-type: none"> ・各グループの代表者がスクリーンに映写して発表する(小淵:進行、貞升:記録)。
4. 総括		
5. 研修後アンケート(1日目)の実		<ul style="list-style-type: none"> ・当日実施し、回収する

ラボ研修シナリオ(第2日目)

A、B班を2分して、ノロウイルスリアルタイムPCRのデモを行い、ピペットの操作方法や陽性コントロールの希釈方法等を習得する(1グループは模範例、他方は失敗例)。また、模範例と失敗例の解析結果を比較し、機材や手技上の問題点が結果にどのように反映されるかを確認する。さらに、リアルタイムPCRの原理や解析法などの基本、機器のメンテナンス等の講義を通してリアルタイムPCRによる遺伝子検出について理解を深める。

項目	ポイント	進行
1. リアルタイムPCRのデモ (グループ見学)	<ul style="list-style-type: none"> ・試薬、試料(陽性コントロール)の取り扱い ・ピペットの正しい操作、段階希釈 	<ul style="list-style-type: none"> ・デモンストレーター(塚越、水越)による操作、説明 ・補足説明(同時進行、木村) ・写真撮影、メモ等による記録(小淵、貞升)
2. リアルタイムPCRについての講義 (講義、全体討論 120分)	<ul style="list-style-type: none"> ・リアルタイムPCRの原理、解析、メンテナンス、トラブルシューティングなどの基本を理解させる。 	<ul style="list-style-type: none"> ・講義(木村) ・質疑応答、討論
3. データ解析 (全体討論 60分)	<ul style="list-style-type: none"> ・希釈系列調製時の失敗が解析結果にどのように反映されるかを確認する。 	<ul style="list-style-type: none"> ・デモンストレーターによるデータの解析、説明(塚越、水越) ・質疑応答、討論
4. 総括 (全体 30分)	<ul style="list-style-type: none"> ・2日間の研修のまとめ 	<ul style="list-style-type: none"> ・口頭(小淵)

第 1 日目

13:00～

講師控室

- ・研修についての最終打合せ
- ・配布資料の確認（研修会プログラム、研修プレゼンファイル、グループミーティング・ワークシート、第 1 日目研修後アンケート）

13:30～

講義室（進行：小淵）

- ・開会の挨拶（佐多）
- ・チューターの紹介と参加者の自己紹介（所属と氏名のみ）
- ・研修会のアウトライン説明（小淵）

13:45～

講義室および講師控室（2 グループに分かれる）

- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：グループミーティング

1 問題点の抽出（約 50 分：13:45～14:35）

◆参加者の発表とトラブルの列挙（発表 5 分、自由意見 5～10 分）

- *進行役（貞升、小淵）から発表のポイントを示唆

職場環境→結果確認や OJT の有無

数値→PC の CT 値・R² 値

標準曲線→傾き、ばらつき

結果→範囲内か、3 つのうちいくつ判定基準値外か、判定基準値より高い・低い

原因→わからなければ強要しない

再配布 PC のデータ→改善の有無

- *まず、C 群から発表→発表者の自己診断、その後に参加者全員に自由意見としてその他に気づいたトラブルを出してもらう

- *各自の発表では質問のみ受付、示唆的なものは可

- *進行役がホワイトボード（ワークシートのように 3 つのカラムに区切る）に書き止め（重複は記述不要）、参加者はワークシートに自所のトラブルを記入（他所のトラブル等は配布資料にメモ書き）→他所の発表を聞いて自所に当てはまるものはワークシートに追記

2 トラブルシューティングの作成（約 50 分：14:35～15:25）

◆トラブルの原因、対処法の検討

- *列挙したトラブルについて、考えられる原因、解決のための処置の自由意見を出し合う→間違っても否定しない（後で塚越、水越がコメントして修正すればよい）

- *問題点の抽出と同様に、進行役がホワイトボード（ワークシートのように 3 つのカラムに区切る）

資料 11-c

に書き止め、参加者はワークシートに記入（自所の分）→各自のワークシートの完成を目指す

*ブレインストーミングで意見を自由に出し合い、皆で結論を出していく（トラブルを一つずつ解決していく必要はなく、気づいた点はなんでも OK→ホワイトボードをフル活用して自由意見を集める）

*塚越、水越両氏は示唆的な質問も含めて議論をリードするが、全ての解答が両氏によることのないように注意する

*全体討論（ホワイトボードの発表）に向けて、参考となる図表等を研修プレゼンスライドから選び、コピー&ペーストでスライドを作成する（凝る必要なし）

休憩 15:25～15:40

*ホワイトボードの写真撮影による記録（小淵、貞升）

15:40～

講義室

・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：全体討論

1 各グループの発表（約50分：15:40～16:30、各発表20分・討論5分）

*グループミーティングで作成したトラブルシューティング（ホワイトボード）をグループの代表者（A、B群の中から参加者自身で選ぶ）が発表→パワポ（上述のスライド）を併用する

*参加者から質問・意見が出なければ、塚越、水越、貞升、小淵が補足

2 トラブルシューティングのまとめ（16:30～16:40、貞升）

*2つのホワイトボードをならべ、1つにまとめる→どちらか1つのボードを中心にして他方の重複箇所は見え消し線で消すなど）

*色分け（下線や囲み等）で対処法を分類する（トラブルの原因が機材、試薬類、手技の3つに集約されることを示す）

*チューターへの意見照会

3 総括（16:40～16:50、小淵）

*トラブルシューティング完成版の送付（1か月後）、研究報告書でのデータ使用の承諾をアナウンス

*情報交換会のお知らせ

4 研修後アンケート（第1日目）の実施（16:50～17:00）

*当日、アンケートを回収する

*ホワイトボードの写真撮影による記録（小淵、貞升）

●参加者には訊いておりませんが、研修終了後に立川駅周辺で情報交換会を行いたいと思います（18:30～20:30）

資料 11-c

第 2 日目

9 : 0 0 ~

実習室

・リアルタイム PCR のデモ

◆模範例および手技的失敗例のデモ (GI と GII それぞれの標準曲線のみ、模範例：塚越、失敗例：水越)

* 2 グループに分かれ (できるだけ前日とは異なる組合せが望ましいが、希望があれば優先)、塚越、水越両氏が説明しながら実演する→手技的なトラブルの確認

* デモ中に補足説明 (木村)

* メモや写真撮影による記録 (小淵、貞升)

* 時間に余裕があれば、個々に質疑応答や実際に微量ピペッターの扱いや希釈法を体験する

1 0 : 3 0 ~

講義室

・リアルタイム PCR 基礎講座 (木村)

* リアルタイム PCR の原理や解析方法の基本、機器のメンテナンス、試薬等の保存方法に関する講義を通して参加者の理解を深める

* 質疑応答、補足等

昼食 1 2 : 0 0 ~ 1 3 : 0 0

* 実習プレゼン用のスライドに結果を貼付ける (塚越、水越)

* スライドを配布資料用にプリントアウト

1 3 : 0 0 ~

講義室

1 結果の解説および討論 (1 3 : 0 0 ~ 1 4 : 0 0、水越)

* 合わせて、事前検討のデータも紹介する

* 質疑応答、木村、塚越、貞升、小淵の追加コメント

2 総括 (1 4 : 0 0 ~ 1 4 : 3 0、小淵)

* 研修全体を通しての参加者の感想およびチューターの寸評

* 事務連絡等

3 閉会の挨拶 (木村)

研修プレゼンファイルに対する研修担当者のコメント

分類	機関	当事者のコメント	研修担当者のコメント
A群	a	・測定機器の不具合、PCの劣化	<ul style="list-style-type: none"> ・PC希釈系列の調製においてはピペティングによる混和は避けること ・陽性コントロールの攪拌はしっかり行うこと、場合によっては複数回実施 ・Ct値の間隔、波形、サンプルの場所などはよく見ておく必要がある ・「-20℃冷凍庫から新しいPCを…」とあるが、PCの保存温度は-80℃が望ましい
	b	<ul style="list-style-type: none"> ・標準物質の希釈→チップ、チューブを低吸着製品へ変更 ・解析→値の外れたものは標準曲線から外す 	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い(GII)→管理に問題あり ・再配布のPCにおいても同一希釈間でCt値に多少のばらつきがみられる→測定チューブ(プレート)への添加に問題あり? ・PCでばらつきがあるということは攪拌に問題がある可能性がある ・新しいPCで判定基準に近づいたが、全体的に低い値になっている。再度、原液から調整すべきと思う
	c	・試料全ての測定値が高い→チューブ、チップが低吸着製品でなかったため(低吸着製品へ変更)。	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い→管理に問題あり ・EQA標準曲線の同一希釈(高い濃度でも)でややばらつき→測定チューブ(プレート)への添加に問題あり? ・再配布のPCにおいて、GI、GIIいずれもCt値が3.32以上離れている希釈ポイントがある→希釈に問題 ・PCのCt値をいくつかの濃度で覚えておくと変化に気がつきやすい ・PCでCt値が高くなってしまうのは、管理、使用方法に問題
	d	・EQAでは小分け分注したPC濃度が2.5倍高かったため、全て低めの測定値となった。	<ul style="list-style-type: none"> ・再配布のPCにおいても同一希釈間でCt値にばらつきがみられる→測定チューブ(プレート)への添加に問題あり? ・リアルタイムPCRではチューブをオートクレーブする必要は無い ・NCの増幅を原因不明としてはいけない ・陽性コントロールを作成する量が多く、作成後の攪拌に注意が必要 ・H11-12だけでなく、H23もNCが陽性になるのなら、コンタミネーションの可能性が高い ・PCを扱う器具や場所を別にする、などの対策を早急にすべきである
B群	e	・EQA実施時に分与されたPCに問題があった	<ul style="list-style-type: none"> ・EQA標準曲線(GII)の10²でCt値にややばらつきあり→希釈あるいは添加に問題 ・陽性コントロールの保存では保存法・使用方法を注意するべきである ・コンタミネーションによる偽陽性を避けるために、PCR反応液の調整をした後に、PCを調整する
	f	<ul style="list-style-type: none"> ・PC: 希釈倍率が高いポイントではCt値にばらつき→ピペティング操作(希釈)に問題 ・PCの劣化 	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い→管理に問題あり ・PCの希釈では陽性コントロールをしっかり攪拌する ・検査の確認を誰かにしてもらっても良かった。他の人がやったデータと比較したことがあるか
	g	・EQAではPC(GII)のCt値が非常に高かった→プライマーの劣化によることが判明(再配布後PCで確認?)→保存方法を変更した	<ul style="list-style-type: none"> ・低い濃度が検出できていないので、試薬、プローブ、プライマーについて確認の必要がある ・作業時の温度が室温であるがどの程度の時間室温になっているのか ・コンタミネーションによる偽陽性を避けるために、陽性コントロールは極力最後に添加すべき
	h	・EQAではGII試料の測定値がいずれも低かった→PCの希釈が不正確	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い(GII)→管理に問題あり ・EQAのPC(GII): 10⁷ではCt=18にもかかわらず10³では検出限界→希釈の問題 ・検出限界が低いのは問題があるプローブやプライマーについても見直しが必要 ・10⁶のCt値が十分であるにも関わらず、10²~10³が検出されない。希釈の際に、問題があるのではと思う

「外部精度管理」調査研究班参加者へのアンケート調査 2015.12.2-14

はじめて感染症検査の部署に配属された新人(新規配属職員)のOJTないし教育研修について調査研究班に参加いただいている方の個人的なご意見としてご回答ください

1 最近3年で新人が配属されましたか	1. はい	21
	2. いいえ	4
最近3年間に新人配属が80%にあった		
2 教育研修の担当者(指導者)は何名いますか	0名	1
	1名	4
	2名	12
	3名	2
	4名	3
	5名	1
	11名	1
	6-8名	1
教育研修指導者は2名程度が約半数 2名以上が30%程度		
3 同じ部署にいますか	1. いる	24
	2. 所内の他の部署	0
	空白	1
同じ部署の方が指導者となる		
4 教育研修担当者の検査経験年数を教えてください	5年	1
	6年	1
	10年	1
	20年	5
	22年	1
	24年	1
	25年	2
	30年	1
	32年	1
	2-5年	1
	2-15年	1
	3-10年	1
	3-25年	1
	4-15	1
	8-20年	1
	10-25年	1
	10-30年	2
	15-20年	1
	空白	1
10年以上の経験者が50% 5年以下の方もおられる		
5 教育研修の方法は		
1. 1対1		13
2. 1対複数の指導者		7
3. その他		6
<ul style="list-style-type: none"> ・2種類あります。1つは企画調整課が実施する所内全体の教育研修(2週間程度)。 もうひとつは配属された課の専門業務の研修(1年間)。 ・業務ごとに、業務担当者が指導する。 ・3年以内の職員が4名もおり、教育研修するには無理がある。 ・個別に検査をしながら教えていく。 ・主に1対1でOJTを実施するが、例えば流行予測の手技やバイオセキュリティの講義は別の職員が教える体制。 ・時と場合により1.or2. ・後ろで見学 ・細菌は前任者からの引継ぎは2~3日で、その後は業務を実践しながら技術を習得する。 必要に応じて、各種の研修会に参加する。 ウイルスは試験法、対象病原体によってそれぞれ異なりますが、すでに技術を習得している者が 		

説明しながら検査方法を一通り見せた後に、新人本人に行かせます。その後、1人で練習をしてもらい、データに問題がない場合、検査を任せます。

半数は1対1で指導、1/4は1対複数で指導
全体に関する研修は皆さんで、専門検査の
研修は1対1が多い。ただし若手職員が多
いと実施は困難

6 新人の教育研修期間はどれくらいですか

- | | |
|----------|----|
| 1. 1週間 | 0 |
| 2. 1ヶ月程度 | 1 |
| 3. 3ヶ月程度 | 0 |
| 4. 6ヶ月程度 | 7 |
| 5. 1年程度 | 10 |
| 6. それ以上 | 0 |

空白 3
5

7. その他

- ・各測定法ごとに適宜行う。
- ・検査頻度により異なるが、1～3か月程度。
- ・業務により異なるため、特に設定していない。
- ・期間は定めていない、各検査の実施に伴い研修している。
- ・概ね1年を目途としている。後はOJTにより指導。
- ・事務処理から調査研究まで全ての項目をこなせるようになるまでには2～3年程度は必要。
- ・適宜
- ・細菌は1週間、ウイルスはその他

6ヶ月から1年がほとんど、
ただし3ヶ月以下もある。

7 検査を1で行うのは何時からですか

- | | |
|----------|---|
| 1. 1週間 | 0 |
| 2. 1ヶ月程度 | 2 |
| 3. 3ヶ月程度 | 3 |
| 4. 6ヶ月程度 | 8 |
| 5. 1年程度 | 6 |
| 6. それ以上 | 0 |

空白 1
9

7. その他

- ・概ね1年と考えているが、細かい項目では3か月程度で任せている。
- ・習得の状況により判断する。
- ・検査によって異なる。
- ・実施する検査、新人の理解度によって変わる。
- ・実施する検査技術を取得してすぐ1人で検査を行う。
- ・検査項目によって必要な期間は異なるが、検査頻度の多い項目で、少なくとも6ヶ月程度。
- ・期間は定めていない、同じ検査を1ヶ月間程度を実施してから。
- ・細菌は1週間、ウイルスは試験法、対象病原体によってそれぞれ異なりますが、
すでに技術を習得している者が説明しながら検査方法を一通り見せた後に、新人本人に行かせます。
その後、1人で練習をもらい、データに問題がない場合、検査を任せます。

6ヶ月から1年が半数を占める
検査によって異なる、1ヶ月程度のこともある

8 検査担当者となるいわゆる独り立ちは何によって決めますか

- | | |
|-----------|---|
| 1. 期間 | 8 |
| 2. 検査結果 | 8 |
| 3. 何らかの試験 | 1 |

4. その他 9
- ・期間と検査結果
 - ・被研修者の習熟度や理解度
 - ・総合的に判断する。
 - ・検査手技の確認、結果の安定性・再現性。
 - ・常時、副担当者を付けている。
 - ・検査を共同して行い、ある程度単独で実施可能と判断された段階で独り立ちしてもらう。
 - ・検査を実施してもらい、その様子を観察し、大丈夫かを判断する。
 - ・現状では一定期間を経過した後、本人の学位や職位等も勘案して複数の上司が相談の上何となく決めている、試験例があれば参考にしたい。
 - ・検査が正確に実施できればその検査については独り立ちとします。
 - ・細菌は1週間、ウイルスは検査結果

期間や検査結果が良ければいい
両者ないし総合的に判断する

- 9 配属された新人を教育研修する取り決め(教育研修計画など) 1. ある 7
がありますか 2. ない 19

70%で取り決めがない

- 10 教育研修にはどんな項目がありますか 23
番号を記入してください(複数回答可)
- | | |
|-------------|----|
| 1. バイオセーフティ | 23 |
| 2. 消毒・滅菌法 | 22 |
| 3. 試薬調製 | 23 |
| 4. 器具機器の取扱い | 23 |
| 5. 検査作業 | 23 |
| 6. その他 | 8 |
- ・課内の一連の検査業務と必要な知識を1年間かけて学ぶ。
 - ・行政検査の意義、GLP検査の意味づけ、結果の取り扱い、成績書の書き方など。
 - ・細菌係では、1年目は食品GLP検査関係中心の研修を行い、2年目以降、感染症関係の研修に移行する。
 - ・OJTで行う。
 - ・検査結果文書(行政文書)の出し方等、業務全般に関すること。
 - ・事務手続き(検査成績書作成、機器・設備の修繕、備品購入、感染性廃棄物処理の業者委託、保守管理等委託の公告・入札等)、調査研究のための技術継承。
 - ・検査結果通知書作成等の文書事務、電話対応。
 - ・データの処理・解析

業務全般で、ほか例示したものが含まれる

- 11 使用する検査機器の操作のほかに、原理等も説明しますか 1. する 14
2. しない 1
3. 場合による 11

半数は検査原理なども説明する

- 12 ピペットの使い方の説明は行いますか 1. する 15
2. しない 2

半数はピペットの使い方を説明する

3. 場合による 9

- 13 使用する機器や器具の取扱説明書を読むように指導しますか 1. する 14
2. しない 2

半数は取説を読むように指導する

3. 場合による 10

14 ほか、具体的にどのように教育研修を行っていますか。概要を記載してください

- ・ 例えば、細菌の釣菌の仕方や無菌操作から教える。実技をしながら教える。
- ・ 英語のマニュアルなどに関する語学研修。
- ・ 細菌検査でもっとも基本となる生菌数測定という作業を担当してもらい、その業務の中で、培地の作製法・ピペットの使い方、オートクレーブの操作手順、滅菌の方法、希釈の方法、培養の手順等を教える。その先は、検査毎に担当者が個別にそれぞれの菌の特性とあわせて、次のステップの教育をする。
- ・ 1回みてもらい、次は自分でやってもらう。
- ・ 紙・電子媒体を利用した卓上研修、短期間の実技(基礎的、専門的)研修及び実際の試験検査業務を利用した実技研修。
- ・ 精度管理用菌株を使用した、菌株の同定操作等。
- ・ 日常検査でのOJTを基本としているが、経験する機会が少ない検査材料は特別に研修を設定している。
- ・ 一緒に作業をしながら、都度、教えていくようにしている。また、検査はある程度の慣れが必要なため、同じような検査を何度も繰り返し、覚えてもらっている。検査の意義への理解を深め、モチベーションを高めるようにしている。
- ・ 抄読会(週一回)、研究発表会(月一回)。
- ・ 自施設でできないことに関しては、近隣衛研、感染研等に研修をお願いしている。また保健医療科学院が実施する「ウイルス研修」「細菌研修」に職員を派遣する。
- ・ 論文検索と英文翻訳。
- ・ 書面資料を試用した研修、1週間程度の実技(基礎的、専門的)研修及び実際の試験検査業務を利用した実技研修。
- ・ 検査を行いながら保健所の考え方や対応の仕方などについても知っている範囲で教えている。
- ・ 日常業務を一緒に行い仕事に慣れてもらうことを第一に研修を行います。
- ・ ①トラブル発生時にトラブルシューティングを行ってもらう、②検査依頼に対する電話対応により、概要の伝達を行ってもらう。
- ・ 1回みてもらい、次は自分でやってもらう。
- ・ 論文抄読会を開催し、若手にJournal Clubの当番を割り当てて紹介させている。
- ・ 作業手順書、判定基準、非定型例の説明等。抄読会。

15 いわゆるOn the Job Trainingはできていると思いますか

- | | |
|-----------|----|
| 1. できている | 21 |
| 2. できていない | 2 |
| 3. わからない | 3 |

大半はOJTができている

16 国立保健医療科学院・感染研で行われている現在の研修のほかに、新人を対象とした研修は必要と感じたことがありますか

- | | |
|----------|----|
| 1. 必要 | 20 |
| 2. 不要 | 4 |
| 3. わからない | 2 |

3/4は新人研修が必要と感じている

17 その教育研修に指導者の1人(講師)として参加できますか

- | | |
|----------|----|
| 1. できる | 13 |
| 2. できない | 3 |
| 3. わからない | 10 |

半数は講師として参加できる

18 新人の教育研修に必要なものや足りないものはありますか
番号を記入してください(複数回答可)

- | | |
|--------------|----|
| 1. 指導者 | 13 |
| 2. 新人研修マニュアル | 16 |
| 3. 新人研修会 | 13 |
| 4. 参考書リスト | 4 |
| 5. その他 | 7 |

- ・ 最終的な目標や動機づけをもてるような機会。
- ・ 検査だけでなく研究にも目を向けることができるような研修がしていただけるとよいと思います。
- ・ 配属される新人の経歴がそれぞれ異なるため何が必要かをその都度検討している。
- ・ 当所で実施している保健所検査課職員の研修用マニュアルは当所で作成しているのが、当所職員用のマニュアルは無い。
- ・ 新人研修の場合は、業務の習得が第一のため特に足りないものは無いと思います。
- ・ 最終的な目標や動機づけをもてるような機会。

- ・ 新人を長期にわたり一から指導する職員の負担が大きいので、見返り(人事考課上プラス評価される体制)が必要。
- ・ 予算
- ・ 時間と費用

マニュアルや研修会があるといい
研究も指導できるように。

19 新人の教育研修についてご意見を記載してください

- ・ 基本的なことであっても指導する人によって微妙に異なり新人が戸惑う場合があるので、マニュアルがあれば便利だと思う。
- ・ 原理の異なる測定法ごとの技術指導、解析データの判断能力を高める指導が必要であると思う。
- ・ 基本、新人教育は、機関の責任においてすべきことだと思います。使用培地や検査機器を含め、各機関において使用されている機材は異なります。受講しても、自施設で実施できる保証はありません。新人研修の目的が明確でないと、単なる親睦の会の役割しか果たせないのではないのでしょうか。
- ・ 管理職員が新人教育研修の必要性を認識しているか大いに疑問である。
- ・ 衛生・化学、獣医師、薬剤師、臨床検査技師が新人として配属されるが、感染症法および本法に基づく検査についての知識、経験がほとんどない。また、指導する人も教育を受けたわけではなく、座学と経験に基づく研修となっている。
- ・ 所内での研修においては業務を抱えながらであるため、系統的に実施することが難しい。人材育成の観点からは国立機関での研修受講が望ましいが、旅費確保が難しい。
- ・ 衛生研究所等の公的試験検査研究機関では、マンパワーの問題で、研修専門のスタッフを抱えることや研修時間を十分に割くことは不可能です。自ずから、OJTによる研修が必須となります。しかし、人事異動の関係で、指導に当たるべき立場の職員の経験年数が短く、指導能力が十分担保されない可能性が今後高くなるのが危惧されます。
- ・ 直属の上司のスキル、人間性によって、仕事に対する意識・成長度が異なることが懸念材料である。
- ・ 新人の研修期間や教育訓練の必要性は感じているが、指導者の人材確保などの課題がある。
- ・ ①機器の原理・使用法、マイクロピペット等一般検査機器の基本的な取扱いに関する研修 ②検査に関する(精度管理含む)研修を分けて行う必要を感じた。懇切丁寧な研修を実施する必要性を感じる。
- ・ 当所に採用され配属される職員については、経験や経歴によりさまざまな技能、知識を持っており、それぞれの職員に対し、適切な研修計画を個別に組んで実施する必要があると思う。
- ・ 検査についての研修はもちろんであるが、研究者としてモチベーションを上げる研修を新人にも必要と考える。
- ・ 関東から遠隔地での地方自治体の中には研修参加旅費の確保が難しい場合がある。ブロック単位での短期間研修等が開催されると参加が容易になる。地衛研全体として最低限確保されるべきレベルの研修マニュアルが整備されると助かる。
- ・ 書面だけでは伝えられないことが多く、時間や事例数などが必要なことが多いのが現状です。何かマニュアルのようなもので解決するとも思えないので職場で研修をする人向けの研修があっても良いかと思います。
- ・ 現在は、複数のベテランによる研修が可能だが、将来的には3年位の経験者のみが新人に教える事態も予測され、技術の伝承が困難になる可能性がある。このような場合、検査技術は継承できたとしても、高度な技術を要するような調査研究を実施することは困難になっていくと思われる。
- ・ 属人的にならないようにすると良いです。
- ・ 当所では検査のOJTはあと数年は可能と考えるが、独立して調査研究を立案実行できる職員を自前で育成するだけの余裕は既になく、県内の大学院進学する意欲のある者以外は研究者として必要な見識を身につけないままになってしまうおそれが大きい。早急に学位取得者の採用や社会人大学院進学者を増やす必要性を感じている。
- ・ 研究者として独り立ちできるまでには長時間を要するため、指導者の負担は大きい。新規採用者が長期間衛研に留まることを望む。
- ・ 現場の状況を把握しないと、一方的な研修となります。検査の流れの中の、ミスの原因、改善のポイントなど、ディスカッション/事例紹介を通じ、参加者が考える機会を持ち、講師と参加者が互いに研修内容を評価し、次に立ち上がることを期待しています。
- ・ 細菌は人数が少ない細菌検査部門では研修を行う人の余裕がなく、内部のみで十分な研修をすることが難しい。特に、VNTR、PFGEなどは新人向けに研修を実施してほしい。ウイルス部門は「新人の教育研修」と言うよりも、人事異動に伴う「手技等の引き継ぎ」になります。配属された職員は、引き継ぎを受けた後、自己で研鑽を積み、グループで情報共有し、習熟していくこととなります。国立保健医療科学院感染研で行われる各種研修については、ある程度の手技を習得した者を対象としている。地方衛生研究所のレベルが実施しているウイルス研修や向上のために、経験がなく、知識が浅い新人を育成するような研修を国を挙げて計画して頂きたいと切望いたします。また、ウイルス研修は二年に一回である。しかしながら、人事異動は年に一回あり、ウイルス研修もそれに併せて、毎年開催して頂ければ幸いです。

外部精度管理調査研究班参加者へのアンケート 2015.12.2-14
～新規配属職員のOJTないし教育研修について～まとめ

1. 最近3年間に新人配属が80%あり
2. 指導者は2名程度が半数、3名以上が30%程度おられる
3. 同じ部署の方が指導者となる
4. 指導者は10年以上の経験者が50%、5年以下の方もおられる
5. 半数は1対1で、1/4は1対複数で指導、専門検査は1対1、若手が多いと実施困難
6. 新人教育研修期間は、6ヶ月から1年がほとんど、3ヶ月以下もある
7. 検査を1人で行うのは、6ヶ月から1年が半数、1ヶ月程度もある
8. その判断は、研修期間および検査結果が適切であれば可
9. 教育研修に関する取り決めは70%で存在しない
10. 検査の原理等も説明するのは半数
11. ピペットの使い方の説明は半数
12. 取扱説明書を読ませるのは半数
13. 大半ではOJTができていると回答
14. ただし3/4は新人研修の機会が必要と感じている
15. 講師として参加できると回答したのは半数
16. 新人研修に関するマニュアルや研修会があるといい、研究もできるように指導。

職場の同じ部署に経験者がおられるときは1対1でOJTで検査指導、職場での教育研修に関する取り決めはない。新人研修の機会が必要と感じていて、指導者で決まるのは良くないので、マニュアル等があるといい。

(アンケートの内容と回答数、コメントは別紙、報告書に掲載します)

3. 手足口病ウイルスに関する外部「精度管理」調査（案）に関する研究

研究協力者 山下 照夫、安達 啓一、伊藤 雅、小林 慎一、皆川 洋子 愛知県衛生研究所

研究要旨 手足口病病原体の外部精度管理案として CODEHOP PCR による遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。分離株から抽出した RNA を送付して行うことを目的として輸送方法の違いによる温度の影響を調べ、問題なく実施されることを確認した。BLAST 検索以外の解析法として NJ 法による系統樹作成のためのデータベースを作成した。

A. 研究目的

5 類定点把握対象疾患である手足口病は、毎年流行するウイルスの血清型が異なり、それらを把握することは重要である。流行の規模は年ごとに異なるが、時として大規模な流行が認められる。特に、2011 年と 2013 年のコクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6) による流行は、患者定点当たりの報告数が 10 を超え、例年の 3~5 倍の規模であった。水疱の状態や回復期に爪が剥がれるなど、従来と異なった症状が認められ、過去に分離された株との比較が進められているところである。また、まれに無菌性髄膜炎の合併症を伴うことがある。さらに、エンテロウイルス 71 型 (EV-A71) による手足口病の流行時には、中枢神経合併症の発生頻度が高いとされており、重篤化するおそれのあるウイルスである。このウイルスは 3~5 年ごとに地域流行するので、病原体検索により流行の可能性を事前に予測することは有意義である。

5 類定点把握対象疾患である手足口病病原体の対象ウイルスはエンテロウイルス (A、B、C 及び D) で、検査方法は RD、Vero、HeLa 細胞等を用いて分離培養し、中和法で同定するが、必要により遺伝子検出し PCR 産物の塩基配列により型別する場合がある。同定に関する外部精度管理が速やかに実施できるよう作業手順書を作成することを目的とした。また、2 類感染症

の急性灰白髄炎はエンテロウイルス C に属するポリオウイルスによるもので、その外部精度管理にも関連するものである。

B. 研究方法

エンテロウイルスの検査の基本は細胞培養による分離と中和反応による血清型別である。しかしながら、手足口病の原因となるエンテロウイルスはしばしば中和困難な株が分離される。また、抗血清による型別可能なウイルスは、EV-A71 までで EV-B73 以降の抗血清は入手困難である。そこで、RT-PCR 法による分離株からの遺伝子増幅と塩基配列決定による遺伝子型別を精度管理に用いることとした。手足口病病原体の種類と検出方法の検討のため、EV-A71 と CV-A6 の臨床分離株各 1 株を RD 細胞で培養し、遠心上清からウイルス RNA を抽出した。RNA 抽出には High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いた。抽出 RNA を TE 液で 101~107 倍階段希釈し、4℃、-80℃、ドライアイス容器に各々保存し、3 日後に CODEHOP PCR 法にてウイルス遺伝子を検出した。EV-A71 分離株については塩基配列を決定し系統樹解析による型別を実施した。

倫理面への配慮として、個人情報には取り扱わない。

C. 研究結果

検出方法として全てのエンテロウイルス検出

が可能であり、型別可能な VP1 領域を標的とする CODEHOP PCR 法の作業手順書概要案（別紙 1）を作成した。配布検体としてエンテロウイルス分離株の核酸 RNA を用いることとした場合を想定した保存実験では 4℃でも安定した保存状態を維持できることを確認した（図 1）。PCR 産物を遺伝子解析し BLAST 検索により遺伝子型別を行う場合、公的データベースを用いた検索は型によっては同定困難な場合も想定されるため、系統樹解析と相同性にて型別を実施する案を加えた。遺伝子型別のための標準株の塩基配列データベースを作成した（表 1 DB ファイル）。種別用ファイルには CV-A2(EV-A)、CV-B1(EV-B)、PV-1(EV-C) 及び EV-D68(EV-D)の KODEHOP PCR 増幅部位の配列を FASTA 形式で保存した。型別用ファイルには EV-A、EV-B、EV-C、EV-D 用の 4 ファイルを作成した。各ファイルに FASTA 形式で保存したウイルス標準株リストを表に示した。EV-A71 分離株について塩基配列を決定し、系統樹解析による型別と標準株との相同性を調べ報告書結果記入例として別紙 2 のとおり作成した。

D. 考察

遺伝子型別のための標準株の塩基配列データベースを配布することにより BLAST 検索による型別不能の危険性が回避できると考える。CODEHOP PCR 法及びその領域を用いた遺伝子型別の技術伝承につながることを期待される。今後の課題としてアンケートを実施した結果を別紙 3 にまとめた。分離培養と中和反応、VP4 領域を標的とした RT-PCR 法による増幅と解析方法等が課題としてあげられた。エンテロウイルスの同定はウイルス分離と中和反応によることが基本となる。生きたウイルスの輸送方法の問題を解消する必要があるが、中和反応による血清型別は精度管理が必要な項目と考える。また、分離ウイルスを用いた各施設の細胞感受性評価も可能となる。

VP4 領域を標的とした RT-PCR 法はウイルス検出方法としては優れているが、VP1 領域と比較して異なる血清型間の相同性が高く、BLAST 検索により遺伝子型を決定することは危険である。今回

標準株の VP1 領域についてデータベースを作成したが、VP4 領域で型別する場合同じ各血清型に分離株の遺伝子情報も加える必要があると考える。

E. 結論

手足口病病原体の外部精度管理案として CODEHOP PCR による遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。BLAST 検索以外の解析法として NJ 法による系統樹作成のためのデータベースを作成した。将来的にはウイルス分離と中和法による血清型別の精度管理も望まれる。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
関連論文はなし
- 2) 学会発表
関連発表はなし

H. 知的所有権の出願・登録状況

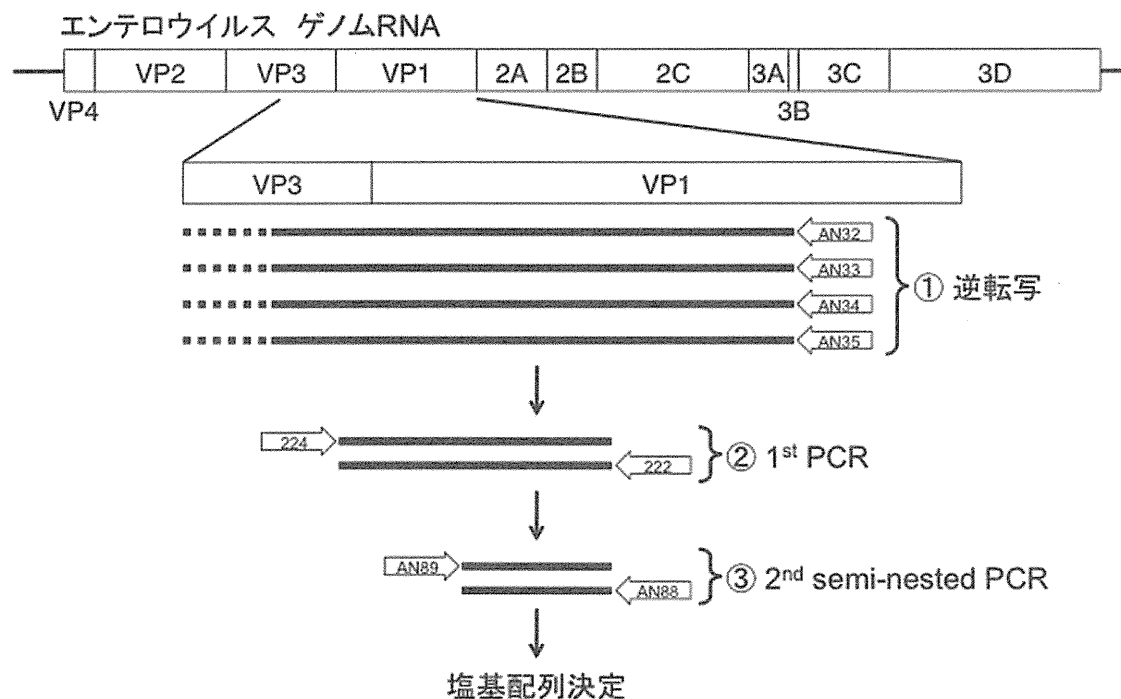
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

(別紙1)

手足口病ウイルスの同定作業手順書概要案

【精度管理内容】検体として、手足口病患者より分離したウイルス株由来RNAを送付。各機関において遺伝子を増幅し、塩基配列を決定し、遺伝子型別（及び分子系統樹解析）を実施する。

【概要】CODEHOP PCR 法によりエンテロウイルス VP1 領域の遺伝子を増幅（下図）、ダイレクトシーケンシング法および近隣結合法（NJ 法）により配布RNAの型別を実施する。



CODEHOP VP1 RT-snPCR は、①多様性が高く血清型との関連性の高いVP1領域を増幅するため、塩基配列からの遺伝子型同定が容易である、②semi-nested RT-PCR であるため検出感度が高い、といった長所を兼ね備えている。留意すべき点として、①高感度であるがゆえコンタミネーションによる疑陽性の恐れが高くなる、②二種類以上のエンテロウイルスが混在するサンプルからは、遺伝子型同定不能である、③逆転写に加えPCRを2回行うので高価である、等が挙げられるが、高感度かつ高速な遺伝子検出法として利用価値の高い方法である。

本法ではまず、バッファー（逆転写酵素、PCR 酵素にそれぞれ付属）・プライマー・dNTP・DW を混合し、“KIT”とよぶ混合液を3種類作製する（一度に10 ml 程度作り、適宜分注して-30℃に長期保存可能）。検体解析時は、KIT とウイルス RNA、酵素等を混合し、反応を開始する。なお、下記文中のカタログナンバー等は2010年前後のカタログに基づいており、以降の変更もありうる。また、フォントの文字化け等による誤解を避けるため、マイクロμをuで表現してある（例：1マイクロリットル→1 ul）。

1. 試薬と実験器具

共通の実験器具・機器

0.2 ml PCR 用チューブ
1.5 ml チューブ
フィルター付きピペットチップ (20, 200, 1000 ul)
マイクロピペット
精製水(distilled water; DW, Milli-Q 水など)
微量高速遠心機
サーマルサイクラー
シークエンサー

RNA 抽出用試薬

市販のキット各種を利用可能である。代表的なものを列挙する。

High Pure Viral RNA Kit (Roche, 1 858 882, 100 回精製)

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904, 50 回精製, 他のサイズもあり)

電気泳動用試薬・機器

アガロース
TBE あるいは TAE バッファー
エチジウムブロマイド溶液
DNA サイズマーカー
Loading バッファー
アガロースゲル作製器
アガロースゲル電気泳動装置

塩基配列解析用試薬

市販のキット各種を利用可能である。代表的なものを列挙する。

① PCR 産物精製

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9281, 50 回分, 他のサイズもあり)

② シークエンス反応

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems, 4337455, 100 反応, 他のサイズもあり)

BigDye Terminator v1.1/v3.1 5X Sequencing Buffer (Applied biosystems, 4336697, 1 ml, 他のサイズもあり)

③ シークエンス反応産物精製

Centri-Sep スピンカラム (Applied biosystems, 401762, 100 カラム, 他のサイズもあり)

逆転写プライマー

AN32 GTYTGCCA

AN33 GAYTGCCA

AN34 CCRTCRTA

AN35 RCTYTGCCA

それぞれ 100 uM に希釈し、AN32, 33, 34, 35 cocktail (10 uM each) を作製する。

100 uM AN32	10 ul
100 uM AN33	10 ul
100 uM AN34	10 ul
100 uM AN35	10 ul
DW	60 ul
Total	100 ul

PCR/シーケンスプライマー

224	GCIATGYTIGGIACICAYRT
222	CICCIIGGIGGIAYRWACAT
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT

KIT 作製時は 10 uM、シーケンス反応時は 3.2 uM に希釈して使用する。

逆転写・PCR 試薬 (KIT の準備)

① dNTP Set, 100 mM Solutions (GE ヘルスケア, 28-4065-51, 4 x 25 umol, 他のサイズもあり)
20 mM dNTP (5 mM each) 溶液を作製する(各 KIT に混合する)。

100 mM dGTP	5 ul
100 mM dATP	5 ul
100 mM dTTP	5 ul
100 mM dCTP	5 ul
DW	80 ul
Total	100 ul

② SuperScript II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18064-014, 10000 U (50 ul), 他
のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 cDNA (RT) KIT を作製する。

5X RT Buffer	110.0 ul
20 mM dNTP (5 mM each)	27.5 ul
AN32, 33, 34, 35 cocktail (10 uM each)	27.5 ul

③ Taq DNA Polymerase (Roche, 1 146 165, 100 U, 他のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 PCR 1 KIT を作製する。

10x PCR +Mg buffer (11 271 318 001)	137.5 ul
10 uM Primer S0224	137.5 ul
10 uM Primer S0222	137.5 ul
20 mM dNTP (5 mM each)	13.75 ul
DW	646.25 ul

④ FastStart Taq Polymerase (Roche, 2 158 264, 50 U, 他のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 snPCR 2 KIT を作製する。

PCR buf. 10x +MgCl ₂ (12 161 567 001)	137.5 ul
10 uM Primer AN89	110.0 ul
10 uM Primer AN88	110.0 ul
20 mM dNTP (5 mM each)	13.75 ul
DW	701.25ul

⑤ RNasin RNase Inhibitor (Promega, N2111, 2500 U, 他のサイズもあり)

2. 操作

1) cDNA 合成

陰性対照として DW、陽性対照として必ず増幅される RNA (ポリオウイルス RNA 等) を用い、配布 RNA と並行して反応を行う。

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 cDNA (RT) kit	3 ul
0.1 M DTT	1 ul
RNasin RNase Inhibitor	0.5 ul
SuperScript II	0.5 ul

② 配布 RNA 5 ul とマスタープール 5 ul を、0.2 ml PCR 用チューブに加え混合。

③ 下記の条件にて反応 (約 1.5 時間)。

22°C 10 min

42°C 60 min

95°C 5 min

2) 1st PCR

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 PCR 1 KIT	30 ul
DW	9.5 ul
Taq	0.5 ul

② cDNA 合成反応を終了したチューブに、上記マスタープールを 40 ul 加え混合。

以下の温度で、40 サイクル反応 (約 2 時間)。

95°C 30 sec

42°C 30 sec

Ramp 0.4°C/sec (42°C から 60°C への温度変更を、0.4°C/sec で行う。Ramp を行った方が、検出感度が向上する。)

60°C 45 sec

3) 2nd PCR

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 snPCR 2 KIT	39 ul
DW	9.5 ul
FastStart Taq	0.5 ul

② 1st PCR の反応物 1 ul と上記マスタープール 49 ul を、新しい 0.2 ml PCR 用チューブに加え混合。

③ 下記の条件で反応(約 1.5 時間)。

95°C 6 min

以下のサイクルを 40 回

95°C 30 sec

60°C 20 sec

72°C 15 sec

4) 電気泳動

反応終了後、1st および 2nd PCR 反応物を、3 ul/lane でアガロースゲル電気泳動し、増幅を確認する。

5) PCR 産物の精製

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて目的とするサイズの単一のバンド (1st PCR; 約 760 bp、2nd PCR; 約 370 bp (Poliovirus Sabin 1 VP1 (Accession No. AY082688) の場合、124~498 の 375 bp に相当) が認められた場合、PCR 反応液から PCR 産物の精製を行う。市販の PCR 産物精製キットを用いると簡便である。手技については各種キット付属のマニュアルを参照のこと。精製した DNA 濃度を分光高度計により測定し、シーケンス反応に用いる。特に 2nd PCR 産物を AN88, AN89 プライマーにてシーケンスする場合、DNA 濃度が高すぎると反応を阻害する場合がある。経験的には、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製・50 ul DW で溶出した DNA 溶液を 10~20 倍に希釈し、4 ul をシーケンス反応に用いるとよいようである。

6) シーケンス反応

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

BigDye Terminator	2 ul
5X Sequencing Buffer	1 ul
Primer	1 ul
DW	7 ul
溶出 DNA (3~10 ng)	4 ul

② 下記の条件で反応(約 2.5 時間)。

96 °C 1 min

以下のサイクルを 25 回

96 °C 10 sec

50 °C 5 sec

60 °C 4 min

7) シークエンス反応物の精製およびシークエンサーによる塩基配列解析

Centri-Sep スピニングカラムなど市販の精製キットや、エタノール沈殿法を用いて精製する。シークエンサーによる解析は、機器マニュアル等参照のこと。

8) 塩基配列の相同性検索

得た塩基配列を用い遺伝子型を同定する。公共データベースにおいてブラスト検索する場合、間違っただけの情報もあるので注意が必要である。エンテロウイルス標準株のデータベースを添付したので、実施可能な機関は以下の方法により系統樹解析（NJ 法）による検索を実施する。

1. 種別用ファイルとの系統樹解析により種別（A～D）を行う。
2. 種が決まったら各種の型別用ファイルにて系統樹解析を行う。
3. 最も近縁の型が決まったら相同性が 75%以上であることを確認する。
4. 次に近縁の型との相同性が 70%以下であることを確認する。

参考文献

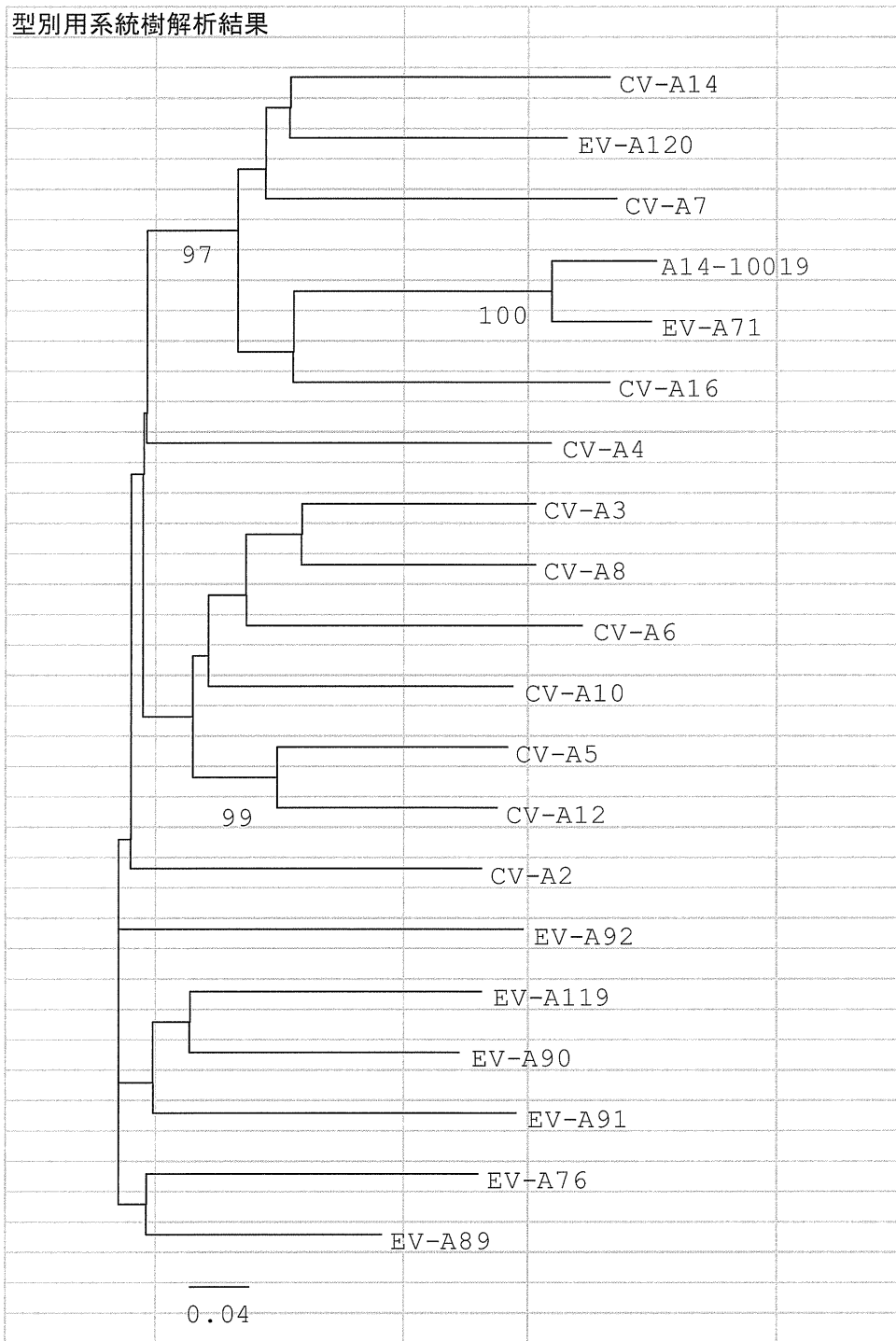
- (1) 手足口病病原体検査マニュアル（国立感染症研究所）
- (2) Nix W.A. et al. J. Clin. Microbiol. 2006, 44(8) 2698-704.
- (3) Rose T.M. et al. Nucleic Acids Res. 1998, 26(7) 1628-35.

(別紙2)

結果				
施設名:				
判定結果:				
塩基配列:				
使用機種:	PCR			
	シーケンス			
	(オプション)			
解析ソフト:	系統樹			
	相同性			
相同性:	最も高い標準株	%	2番目に高い標準株	%
種別用系統樹解析結果				
型別用系統樹解析結果				

結果(例)					
施設名:	愛知県衛生研究所				
判定結果:	エンテロウイルス71型				
塩基配列:	ATCATCGAATACTAGTGATGAGAGTATGATTGAGACACGGTGCGTTCTTAACTCACACAG CACAGCAGAGACCACCCTGGACAGTTTCTTCAGCAGAGCAGGTTTGGTGGGAGAGATAG ATCTTCCTCTAGAGGGTACCACCAACCCAAATGGTTATGCCAACTGGGATATAGACATAA CTGGTTATGCGCAAATGCGCAGGAAAGTGGAGCTGTTACCTATATGCGCTTTGATGCAG AGTTCACCTTTCGTTGCGTGCACTCCTACTGGTGAGGTTGTTCCGCAACTACTCCAGTAT				
使用機種:	PCR	ABI Veriti			
	シーケンス	ABI 3130 Genetic Analyzer			
(オプション)					
解析ソフト:	系統樹	Genetyx (ver.10.1)			
	相同性	Genetyx (ver.10.1)			
相同性:	最も高い標準株	%	2番目に高い標準株	%	
	EV-71	86.8	CV-A16	65.9	
種別用系統樹解析結果					
<p>Phylogenetic tree showing relationships between EV-71 and other EV strains. The tree has a scale bar of 0.02. EV-71 is the most similar to CV-A16 (86.8%). Other strains include A14-10019, EV-A (CV-A2), EV-C (CV-A1), EV-B (CV-B1), and EV-D (EV-D70).</p>					

型別用系統樹解析結果



(別紙 3)

手足口病、「外部精度管理調査」の「検討項目（外部精度管理として検討したい、すべき調査内容、ポイント等）」について

1. 1 細胞培養法による分離・同定

- (1) 培養細胞の準備（細胞の種類・略歴、継代法や検体接種用プレートの調製）
- (2) 使用する培地（増殖用培地、維持培地の調整）
- (3) ウイルス分離方法（検体接種法、接種後の観察法、ウイルス回収法）
- (4) ウイルスの同定（ウイルス力価の測定法・中和試験法、または解析した遺伝子部位と相同性検査法）

2 RT-PCR・ダイレクトシーケンス法によるウイルス遺伝子検出

- (1) 検体からの遺伝子抽出法
- (2) RT-PCR 法（増幅部位、増幅方法）
- (3) 遺伝子解析法

2. 1) 配布する検体及び陽性対照の形態（例：感染性ウイルス・精製 RNA・左記の中間となるウイルス液を不活化したもの等）

2) 常温・非感染性物質の配布によりウイルス検査の外部精度管理検体を実施可能か（手間と費用を節約するため）

3) 精度管理を行う項目・範囲（陽性・陰性に限定？ 型別まで？ さらに分子系統樹解析まで？）

3. 1) VP1 領域の RT-PCR シークエンスによる型別（CODEHOP 法）

2) RD 細胞による病原体分離

4. 手足口病の検体は咽頭ぬぐいが多く、発症からの日数で検体中のウイルス量は異なる変化をする。一般的には量が少ない。つまり検査陰性は、①手技、②ウイルス量、③プライマー等の試薬、④PCR 装置の不具合、⑤RNA 抽出キット、⑥輸送法（特に輸送培地と温度）等様々な要因がある。

したがって病原体個票の情報（採取日、検体の種類）なども大切であり、総合して判定しているかどうかポイントとなる。

以上の流れに基づき、EQAS は個別技術を評価することとなる。例として

1. 核酸抽出：検体からの RNA 回収（内部コントロール RNA 添加物との比較試験）及び RT-PCR によるバンド確認（合成 RNA の代わりに標的部位を挿入したプラスミドで代用）
2. DNA シークエンス：ブラインドで単独のもの、混ざったものなど用意しシーケンス解析の結果の評価

5. 1) ウイルス分離と中和反応による同定、2) PCR 遺伝子検出と Blast サーチによる同定

6. 1) VP4 を標的とするプライマーを用いたウイルスの同定。2) 中和反応による血清型の判定。

7. ウイルス分離のポイントは用いる細胞の良し悪しと思われるが、適切な評価方法は？

8. 遺伝子検査における適切なプライマーの選択、塩基配列の解析

9. 現在、感染症発生動向調査における手足口病の原因ウイルスの同定は、咽頭ぬぐい液から直接 RNA 抽出を行い、塩基配列を決定し、その塩基配列に基づいて行っている地研が多いと考えられます。外部精度管理では、以下の2点が確認できる試験が望ましいと思います。

- ① それぞれの手技が問題なく実施されていること。
- ② 結果判定の考え方。

具体的な方法

① FTA カードにコピー数が既知の低濃度から高濃度の RNA をしみこませ検体として配布。また数種類のウイルス RNA が混ざった検体も1検体入れる。

- ② 各地研の SOP に従って検査を実施。

確認できること

- ① 各地研が行っている検査方法の検出限界
- ② 複数のウイルスが混ざった検体では、シーケンス波形が乱れると予想されますので、その時の

対処方法

- ② 陰性、陽性判定の考え方

10. 大腸菌、*Morganella morganii* との鑑別を行うため、性状試験、病原遺伝子の検出の実施状況について調査する。

11. * 遺伝子検出、塩基配列の決定によって診断する事、* どの領域 (VP1?) の遺伝子検査法 (PCR 法) を標準とするのか、* 検査材料が、咽頭拭い液、糞便等、多岐にわたる事

12. ・ VP4 領域の PCR、・ VP1 領域の PCR+シーケンス、・ BLAST 検索

13. ・ 年間に実施される外部精度管理が多い。(本年度は、コレラ、結核、ノロウイルス、インフルエンザ、麻疹ウイルス)

・ 外部精度管理の年間で細菌、ウイルスでそれぞれ1つの病原体として回数を減らし、その後のフォローアップ (事後研修) などの充実を希望いたします。

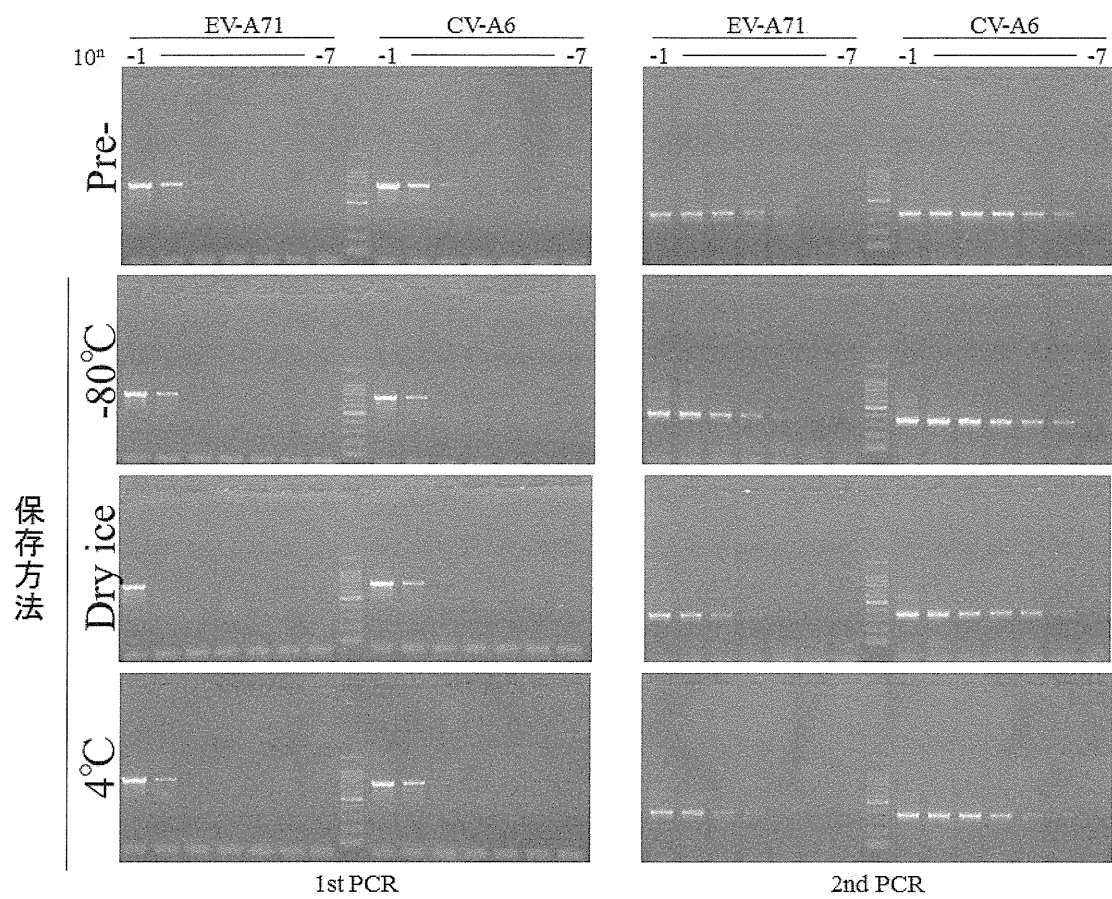


図1 RNAの保存方法の違いによるRT-PCR検査結果の比較

表1 CHODEHOP PCR領域のヒト由来エンテロウイルス標準株の種別リスト

EV-A (19型)	EV-B (59型)	EV-C (23型)	EV-D (4型)
CV-A2	CV-B1 E-29	PV-1	EV-D68
CV-A3	CV-B2 E-30	PV-2	EV-D70
CV-A4	CV-B3 E-31	PV-3	EV-D94
CV-A5	CV-B4 E-32	CV-A1	EV-D111
CV-A6	CV-B5 E-33	CV-A11	
CV-A7	CV-B6 EV-B69	CV-A13	
CV-A8	CV-A9 EV-B73	CV-A17	
CV-A10	E-1 EV-B74	CV-A19	
CV-A12	E-2 EV-B75	CV-A20	
CV-A14	E-3 EV-B77	CV-A21	
CV-A16	E-4 EV-B78	CV-A22	
EV-A71	E-5 EV-B79	CV-A24	
EV-A76	E-6 EV-B80	EV-C95	
EV-A89	E-7 EV-B81	EV-C96	
EV-A90	E-9 EV-B82	EV-C99	
EV-A91	E-11 EV-B83	EV-C102	
EV-A92	E-12 EV-B84	EV-C104	
EV-A119	E-13 EV-B85	EV-C105	
EV-A120	E-14 EV-B86	EC-C109	
	E-15 EV-B87	EV-C113	
	E-16 EV-B88	EV-C116	
	E-17 EV-B93	EV-C117	
	E-18 EV-B97	EV-C118	
	E-19 EV-B98		
	E-20 EV-B100		
	E-21 EV-B101		
	E-24 EV-B106		
	E-25 EV-B107		
	E-26 EV-B111		
	E-27		

EV-A: エンテロウイルスA、CV: コクサッキーウイルス、E: エコーウイルス、PV: ポリオウイルス

EV-B 型別用 DB

>CV-A9
gcacacctcgcgaagtactccaagtgcacctatgcagacaagacatgtgaaaaactatcattcgcgctctgagtcgactgtggagaatttctcgggtcgg
tcggcatgctgtacatggaagagtacaagaccactgataagcatgttaacaagaattcgtcgcctggccaatcaacacaaaaacaaatgggtcagatgc
ggaggaagctggaaatgttcaacttatcttaggtttgatatggaggtaacttttggatcacaagtcgacaagaccgggaacaacctagctcaggacat
gccggtgtgacgcgccaatc
>CV-B1
tcatactctcaagtcgtaaccagtgacaccatgcaaacctagacacgtgagaattaccactcaaggtcggatcttccattgaaaatttcttctggtcga
tctgcttgtgtgtattacgccaactacaataaataattctgagaagggctacgcagagtggttatcaacaccaggcaggttgcgcagttgctgaggagga
aactagagttcacttacttaaggttcgatctggaattgacattttgtgataacaagtgcccaggagcccagttaccgtaccagtgtagacgcacctgtaca
aacccaacagata
>CV-B2
acacacatcacaggttacacctagtgacacgatgcaacaagacatgtgcacaactaccattcaaggtcogaatccagcgttagagaacttctcggcagc
tcggcttgtgtgtttatatacaacatcaccaacagtaaaaaatgcccgaagagagaagaatttgcacagtggaaggtgagtttagacaagccgccaac
taagaagaagctagagttattcacatactacgctgtgacatogaactaacatctgcatcaccagtgcaacaagatccatcgaocgctaccaacttga
tgtgccagttgtgacccatcaata
>CV-B3
acatacttcccaggtggatccaagtgacacgatgcaacaagacatgtgcataactaccactccagatcagaatcatctatagaaaacttctgtgcaga
tctgcttgcgtaatttatataaaaactcactcagtgctgaatcaacaacactgaagcggatgcccaggtgggttatcaacacaaggcaggtggctcaactaa
ggcgaagatggaaatgttcaacttatattcgggtgcgacatggagcttacctttgtgattaccagccatcaggagatgtccaccgccactaactcagatgt
tccagtcgacacaccaata
>CV-B4
acatacttcccaggtggatccaagtgacacgatgcaacaagacatgtgcataactaccactccagatcagaatcatctatagaaaacttctgtgcaga
tctgcttgcgtaatttatataaaaactcactcagtgctgaatcaacaacactgaagcggatgcccaggtgggttatcaacacaaggcaggtggctcaactaa
ggcgaagatggaaatgttcaacttatattcgggtgcgacatggagcttacctttgtgattaccagccatcaggagatgtccaccgccactaactcagatgt
tccagtcgacacaccaata
>CV-B5
gcacacgtctcaggtgtgacggcagacactatgcagaccagacatgtgagaattatcactcgcgttctgagtcaccggttagagaatttctcgtgtaga
tctgcttgtgtatattactacttacaagaacctggcaccgatggcgaacaatttgcctattgggtgattaatacaagacaggttgcgcagctacgcc
gcaatttgaaatgttcacatagccagatgttagagctcactttgtgataacaagcacacaagagcaatctaccattcaaggccaagactcggc
tgtgttaactcatcaata
>CV-B6
gcacacctccaagtcgctcccagtgataacatgcaaacaggcagctgagaactaccattcagctccgaaaccagcgtcgagaacttctgtgtag
gtctgcatgtgtatatttaccacataaagaaccagacagggcgaaaaatagatttgccttctgggtaatcaccacaagacaagtgcccgctcagg
agaaaactagaaatgtttacgtacttgcgtttcgcacattgaactcacctttgtcattacaagtcgcaagaccaatccactatttcccaagacgcccctg
tcgacacatcagata
>E-1
tcacactcgcagggcagctactggtgataaccatgcagactagacatgtgatcaacaatcagtgaggtcagaatctacaattgagaacttcttgcaga
tcagcgtgtgttttctactagagtacaagacagggccaagagattccaatagcttcaacaattgggtgattacaaccagcaggtggctcaactac
gtagaaaaactggaaatgtttacttactcaggtttgacatggaaatcacctggctcattacaagctcgaagatcagttcacaacaaaccagaatgc
accagtgctaacacaccagata
>E-2
gcacacctcacaggtgttccaagcgataccatatacaaacaccagacatgttcacaattaccatagtagaactgaatccacctggagaacttctcgggaaga
tcagcatgctgtgcatactactcgtataagaccaaagggagtgaccggcagagacccggtagcatcattgggagatcaccactcgcgagatggtgcagc
tcgggaggaagtgtaacttccactacatgcgatatgatctagaaatcacgctttgtgattacaagtcgcccaggagcaaggggccaactgtcgcagaa
catgccagatatacaacatcagatc
>E-3
ccacacctcacaggtcgttctcgtgtgacacaatgcagacagggcatgttaagaactatcactccaggacagatcatcaattgaaaacttctgtgcagg
gtcgtgctgtgtatatacaacatacaaaatcagctgggtggaacccccacagagcgatagcaagttggaggataaacaccaggaacaaatgggtcagctca
ggaggaaatgtgagctcttccatacttgcgtttgacatggaaatcacatattgtgatcacaagcacacaagatcctgggacacaattggcacaagat
gctgtactaactcatcagctc
>E-4
ccatactcgcaggtgacaccaggcagacaatgcaaacacggcctgtgtgaaatgcaacaccgctctgagtcgctcagatcagagaatttctcggcagct
tcagcatgctgtgatactacttgcattaccaaacgggagagggcccggcagatcagatatttggccagtgaccattaccagagaggggttgcgaattgc
gtcgaaggtggagatgttcaacttataagatttgacatggaaatcacaaatcgtgtattactagttcacaggatcaactcaccatctcgaaccagatc
accagtttgcagcaccacaat
>E-5
acacacatcgcgaagtgttccaagtgataccatccaaaccagacatgtgcagaatttccactctaggtcogagtcgaccattgaaaatttctcagtagg
tcagcatgtgtgcatactcgaatatacaacgcgaagggcgataagacggatgtgaaacaggtttgacaggtgggagatcaacattcgtgaaatggtgcac
tacgtagaaggtgagatgttcaactatctacgctttgatattgaaatcattttgtatataaccagcaaacagatcagggcccaactaaaccagga
tatgctgttcttaccaccaaat
>E-6
acatactcgcaggtcgtcccagcgcacacatccagacgcgacatgtgaggaaatttccagctcggctcagtcagtagagaatttcttagcagg
tcagcttgcgtgtacatcgtggagtacaaaaccaggacacgactcccgaacaagatgtatgatagctgggttatcaataccagacaagtgccgagttga
gaaggaagctggagttcttaccatgtcagattcgcagctggaagttacctttgtcataaccagcgtgcaagatgactccacaagacagaacaccgacac
cccagtgtaactcatcaaat
>E-7
tcacacgtcacaagtcgagcccagcgatacagtgcaaacctagacatgtcaaaaactaccactcgcgcttctgagtcacaccgtggaaaacttcttaagtcgc
tcgcttgtgtgtacatcgaagactacaccaaggaacaaatgttaaataggtacatgctcgtggacaataaatgccagaagaatggtgcaattga
ggagaagtttgagctgttaccatatacagatgttgataaggaaatcacgctttgttaatcacaagtagacaactaccctgggactagcatagcacaagat
gccgccaactcaccaccagatc
>E-9
acacacctcacaggtgttccctagcagacactatgcaaacagggcagctgagaattaccattcagcctctgaatccaccattgaaaactttttatgtaga
tcagcctcgtgtcgaatggcaaaatgtagggcaaggggcaacctgaaagcactgacgcttgacgatgggagataaagcgtgcccagacatggtacaactgc
gacgcaagtcgagatgttcaactcagatgtgacgctggaagtcacatttgcctcactagctatcagcggcaagcacttctcaatccagatag
cccctatgacgcccagatc
>E-9 (Bat)
acacacctcaagtggtgcccagtgacactatgcaaacctaggcagctgaaaaataccactctcagatccaggtccactatagagaacttttctgtgtaga
tcggcttgtgtgctgagatggccaagttatgaagcaaggggtgacctgagagcacagatcgtcttgatgcatgggagataaagcgtgctgacatggttcaaa
tgccgccaagtggtgaaatgttcaactacctacgctttcgcagctagaggtcacgcttctgtaattactagttaccagcatcaaggtccattaatcaagacat
gccccgatgactcatcaata
>E-11
gcacacatctcaggtgacaccagtgataccatgcaaacaggcagatgtcaagaactaccattccagatctgagtcacagcattgaaaacttctcagcaga
tctgcttgcgtttatatagggaggaataccacacaaccaacactgaccagacaaaatatttgcctcagtgactattagtgacagcagcaggttcaaatga
gacgcaagctagagatcttcaactagctcgttttggatgtggaggtgacttttggattaccagcaagcaggaccagggctcccagttggggcaagacat
gccacccctgactcaccagatc
>E-12

catgcctgttctcacaccaagtt
>EV-B97
acacacttcacaagtcgaaccagtgacactgtccaaccagacatggttaagaacacacactccagaactgagtcacaatagaaaatttcttcagtcgt
gccgcgtgtgtaaaggatcatggagatatacccttgacaaaatgtcgaggacatgacacgtacgcagctgggatctcagtgagagatattggtacagc
tgcgacggaagtgtgagatgttccctatctccgctttgacttgaagtcacctgcgtgataactagctatcaggtgccgggcacactgcaaacacaaga
catgccggtgttaacacatcaagtt
>EV-B98
acacacgtcgaagtggaaacctagtgatacgggtgcaaacacgtcacggttgttaactatcacactagatcggagtcctagcgtggagaacttcttgggcga
gcagcctgtgtcaaagtgagaacatacaacattggacccaacattaaagaagaagatcgatacagcgttggacactgtcggctcgtgacatggtgcaaa
tacgacgcaaatgtgagatgtttacttacatgagatttgacattgaaataacctatgtggtcactagctaccaacaaccaggaaccataacaacacaaga
catgccggtgttaacacatcaagtt
>EV-B100
gcacacatcgcgatgttgtgctggcgatactattcagaccagacacggttgaacttccactcagatcggagtcacgatagagaatttcatgggcagg
tcagcttgcgatattcatgaagacatacaaagctatgggggaagatactgataccagtaggttctgctgcatgggacatcaacataagggagatggtgcagt
tgagaagaaagtgtgagatgttccctatctcagatttgacatagaggttaacatttgtgatcacaagttgccaggaccctagtcacaactggaccaaga
catgccagtgctgacgcaccagatt
>EV-B101
ccacacctcacaagtggtaccgggtgacacatgcagaccagacatgtaaagaatttccacaccggttcggaatctagtgtcgaataatttcttgagccga
tcagcctgtgtatacatcggtaattacagtagaaaacacgaaaagcctgaggataagtaacatgagttgggtgatcaacacgcccagatggtgcagctac
gacgtaagtttgaaatgttccctacatgagatttgataggagatcacagtggttaataacgtcccacaaaggcacggccaccaactattcacaagatgc
tccagtgtttactcaccagatc
>EV-B106
tcacacctcacaagtggaaccaagcgcacaccatacaaaacagggcatgttgtgaactaccactcgagatctgagtcacacatagagaatttcttggtaga
tcagcttgtgtttacctcgggggaataccggggccacaggggtggaagaaggggacacggagcagtttgagtggtggaacataagcgtgaaagacatggttc
aaatgcgtagaaagtgtgagctcttcaacttacctcaggttcgacatggaggtcactttcgtcatcactagcaagctgtctaccgccaccggctcaacaag
tgacacccccatcaccatcaagta
>EV-B107
acacacctcgcaggtgactcctagtgacaacatacaaaactaggcatgttaagaactaccactccagatcagaatcatccatagaaaatttctggggaga
tcggcatgtgtgatacgaaggactataagaacaagataatgacatgacaaaacaaatcgtcgcacatggacaatcaacacaagacagatggtacaaatga
ggcgtaaagttggagatgttccagatgtgcgcttcgacatggaagtgacttttgttataactagcagacaagacccccaccgacacttggacaggacat
gccagtgctgacacatcaata
>EV-B111
acacacatcacaggttacgccgggtgacacaaatgcagacacgacacgtaaaaaactaccacactcggtcggaatcgagtattgagaacttctcagcaga
tcagcgtgcgtgtatattgataattataccagcaatgatgtaaccaaagtgatgaaatttctgacatggacaataaacacaagcaaatggtacaactac
gcgaaagtttgaaatgttccagtcacatgaggtttgataggaggttacatttgttataacatcatatcagggccaaggaaccgaccacagccaggtgc
ccctgtgttcacgcaccaagtg

EV-C 型別用 DB

>PV-1
ggccacaaatccactagtcctcttgatacagtgcaaacagacatggtgtacaacatagggtcaagggtcagagtcagatagatagagtcttctcggcgcg
ggtgcattgctggcattataacggtggataaactcagctccaccaagaataaggataagctatttacagtggtggaagatcacttataagatactgtcc
agttacggaggaaatgaggatttccacctaatttagattgatagattgacatttacctttgttggtactgcaaatttactgagactaacatggcagtc
cttaaatcaagtgtaccacaaat
>PV-2
ggctaccaatccggttggtgcttccgacacggtgcaaacgagcagtcacccagagacgaacgcgagcagagtcacaggttgagtcattctttgcaaga
ggggtctgctggtgctatcattgaggtggacaatgatgacccgacaagcgcgccagcagattgcttccggtttggaaaataacttacaagatactgttc
aactgagacgcaaacctggaattttcacataattcgagatttgacattggagttcacctttgtggtcacctcaaacatacttgatgcaaaataacggacatgc
attgaaccaagtttcatagata
>PV-3
agccacaaatccctctggcacatccgacacagttcaaacgagccagtcacacgagcagaggtcagagtcocacaatagaatcattcttccgcagc
ggggtctgctgctgctatattgaggtggacaatgacaaccaaccacccggggcagaaactatttgccatgtggcgtattacatacaagatacagtg
agttgctgctgtaagttggagttttcacatactctcgttttgacatggaaattcaccttctggttaaccgcaacttcccaacgctaataatgggcatgc
actcaaccaggtgtaccagata
>CV-A1
tgctactagtcagagtagaacagggtgacttgattgaaaccagacatggtataaaacatgagacaagatctgaagcatctatgaaatcttcttggcga
tccgcagttggtgcatacttggtttgtcaaacgcaaacctgaacacaaacacaaactttggtcaaaacatggagaataatcatttagaaaactc
accaactcagagaanaacttgagttccttcacatactctcgttttgacatggaaattcaccttctggttaaccgcaacttcccaacgctaataatgggcatgc
attgctgcaattatgtgtaccacaaat
>CV-A11
ggcgaacagtgtggttccatctgacctaattcagactagacagctattgaaatggttaaaccaggtcgaatccacatcagagtcatttttgcaaga
gctgcatggtgaaccattatgaggtggacaatttcaacgcaacctctgtggagacaanaagaaagttggttgcataagggcaatcactacactgata
ccgctccagctgagacggaaatttagagttttcactattcttagatttgacttagagatgacttttgtgtcaactgagagataactactccaaaagctcagg
gcatgctagatctcaggtgtaccacaaat
>CV-A13
cgccacgaatccctctagagcctggcgacacagttcagactagacatggtatacaaacatagaagtgaagtgaagtacagtggagtccttcttggcga
ggtgcagttgtaaccattatgggagtggaacaactaataatgagacattgaaaggagaccagaagtcctcatttacaacctggaacatcacctacactg
acacagctcagctcaggagaaaactggaaaatggtcacttactccaggtttgacatcaggtttacttttgggtgactgaacgctactactcatcaaacag
tggcgatgctcgaaccaaggtgtaccacaaat
>CV-A17
cgcgcaaaatccattggagcctctgacacggtgacaaacaggtattatccagactagatccaggtcagagtcocacaatagagtccttctcggcgt
ggtgcagttgtgacaactcattgacagttgaaaattttcaacgcaactcctgagcggcgagacaanaagttgttgcacattggaatattcacatcacagaca
cagtgacgtcagaaggaagttggagatgctcacttactctcatttgcatttgaatttaccttctgaccacagaaggtactacggcagtaactcagg
ccatgctcgtaactcaggtttaccaact
>CV-A19
ggctactagtcaagtgaccatcagacctaataagaaactagacatggtattaataacggcctcagatctgagtcgacaatagaatcattcttgggagg
tcagatgctggccataatggggttatcaacaaaaaccacagtgacaatgacagcaagctcttggctacatggaagattagttatcttgatgattg
atcaattgagaagaaaattggaattcctccatatactcagatatttagactttagatttaacctttgtaatttcagaagatcttccactcaacttcagctgc
tgcaagagattatgtataccagatc
>CV-A20
agcaactagtagcgtagtagcagctgatctggtccagagcggcagctggtatatacaaacactgagcagaagtcactacagttgagtcattcttggctcgg
ggggtgctggtgaacaatcattgctcagtggaacttacaatgaaacgcctacgcagagtcacaaatatttaccagttggaacattcacatcacagacacag
tccagttgagaagaaaactagagatttccatatactccagattttagatttgcacattgtgttgggtgactgagcgttaccactccgcaaacctcaggtca
tgcactaaatcaagtttaccagatc
>CV-A21
agcatctggtcaagcagatcccagctgatctggtggaaacttagacacgtgataaaatcaaaaaccaggtcgaatcgtgctttagctgactcttcttgggaga
gctgctggtgacaaatccttctgaccaactcttcaacgagcggggagggagaagaagcatttcaacataggaaacattcacatcacagcactgctt
agttacgcagaaaattgaggtttttccagctatccaggtttgaccttgaatgacttttgggtccacagagaattaccctagtacagccagttgggaggt
gcgtaaccaatgtgaccagatc
>CV-A22
tgcaaccagtcagtcaccctgaagattttagtcgaaaccaggtcagttattaacaatagactaagatctgagtcgactgtggagggccttcttggaaagg
tctgcatggttgccatccttggtggtgtaaacaaaaagccagacaccacaatggcaagacctcttacaacatggaggttacccttaccctgcaaacct
atcaactgagggaggaaaactggaacttccactcgtattttagatttggaaattaaacgtttgtcattacagaagatacttttccaggcagagcagccac
aacagagattatgtttaccaata
>CV-A24
tgccctcgggacaagcagtcgccagtgatggtggaacttagacacgtggttaattataagaccggatctgaaatcactctttagcttcttcttggaaagg
tcagcttggtgaccataattgaggtcgagaacttcaatgccacttagtgaaagcagacaagaggaaacagtttaccacttggccattcacatcacacaaata
ccgtgcaatttgcaggaaaaactagaattccttccacttactccaggtttgacctagagatgacctttgtagtgacagaaaagataattatggcagcaaacacagg
tcacgccagaaaccaagtgatcaaaata
>EH24
tgatccggccaggcaatccccagtgatgaaattgagactagacatggtgtaactacaagaccagatctgaaatcaacgctttagcttcttcttggaaagg
tctgctggttaccatcttggaggtggaataatttcaacgccacggcaatgtcagacaagaagaatggttcagttggtggagatcaattacactgata
cagtcagctcaaggagaaaactagaatttcttaccactcttagattttagatttagagatgacttttgcataacagaaaaggtattacaccagcaaacacag
gtagtccaggaaccaagttaccacact
>EV-C95
ggcttccggccaagcaattccagcgagctagtggaacttagacatgtcataaattataaaactogacagaatcgtgcttggagtccttctcggggcga
gcagcatgtgtgcatccttagaggttaactaattcagcacaacaaactgagaatttcaaacatcagacaatattgggaaatcaactacaccgacaccgtgc
agttgagggcaaacctggagttcttcacataattccggtttgacctagaaatgacattctgcttcaactgaaaattaccggagcactagtagtggtaggt
tagaaatcaggtttaccaaat
>EV-C96
agccagcggacagcggctccctgagatgtcatagaaacaggaagtcataaattacaaaactcggagtgaatcaaccattgagagctttttcgggaga
tcagctgcatatacatgctcagtgagaaacttcaacgccaagcgaatgtcagacaagaagaatgttcagttggtggagatcaattacactgata
ccgtgcaacttccaggaagttgagatttcacatactcagcgtttgacacccaggttcaactttgtgttaactgagagatattacacccaaaattccgg
tcatgcagtaatacaagtttaccagatc
>EV-C99
agcctcgggacagcagtcagtcaggtgcatgaaacttagacatggtggttaattacaaaacaggtcgaagcaccctggagtcgttcttgggtagg
tcagcttggttaccatctggaagttggagaactttatgctcacagaacacagcagataagaaaagcatttactgtgtggcctattacatacaccaaca
ctgtccagctcaggagaaaagttggagttcttcacataatttaggtttgatttggagatgacttttgggtgactgaaaggtattacactagcaattcagg
acatgcaaaaattcagtgatcagatc
>EV-C102
tgcacccaaccagcagtcctcagacttagtacaacaaggcagctgttgccagacacgcagcaggtgaaatctacggtggagtccttcttgcgaaga
ggagatgctgaccatcattgtctggtgaaaattttatgagtcagcaaggtgcttcaactcaaaattatttgccaaatggaacattacatacacccgata
cgtgcaactaaggagaataattggaaatgtttacgtaactcttagatttgacatggaggttcaatttgaatgacagagaggtactttaatgctggttaattg
cttgaatcaggtgtaccacaaat
>EV-C104

tgccaccagccagggtcgagccgtcgatcctaagagaccggtcaggtcaagaactcccgcttaggtcagagtgatccatagaatcatttcttggtaga
gcagcatgtgtgagtcataagacttagcaacaaagaaccaaccgatggcaatgcaaaggacttggttccaagtggaagattaactacctagacggt
accaactgcccgcgcaagctagaatgttcacctactcagatgttgatgtggagctcaccttgtgataaccgagcggttgcaccggggggagcgtgc
ggcagccattacgtgtaccaaat
>EV-C105
tgcgacaagcaaagtcacccatccgacgtcatagagaccgcatgtgataaaacaaaagacaaagatcagagtgactgtggagtccttcttgggaga
gctgctgtgtgacaattatgagtttgcacaatgcccgtccactgaacaaaacgctgatgaccttttgcacgtggaagattagttatctactacgcat
accaattgcccaggaacttgaaatgttcacctactccagatgtgacatcgagctcacttttgcattaccgagcgatttgcggccagcggagctccag
tagacattatgtataccaaatt
>EV-C109
agcaactagtaaagtggtcccatccgacctcattgagaccggcagcttataaataagagacaaagggtcagagtgacggtagagtccttcttgggtaga
gcccattggtgaccatacttaaaactgcaaaatgcccgtcccaccagcgacaacgccaaggatctcttccacatggaaaatacttaccactacgcat
atcagttgctgtagaaattgaaatgttcacctatcttagatgtgacattgaactcacttttgcattactgagcgcttgcagctagtgccgatggtc
cagcaggcactatgtgtaccagatt
>EV-C113
agcaactagccaagtgactccagaagatttaattgagacaaggcatgtaatcaataataggttgaggtcggaaatgcacaattgagtccttcttggtaga
tcagcctgtgtggcaatcttctccgtcactaacaacaaccacagcaactaatggtaatgaattatccaccacttggaagattacatacacacagacat
accaacttagaaggaaattagagttatttacttactcaagatgttgaattggaactcacttttgaatcactgaaagggttactccagcaattcggctgc
tgcccggaactatataccaatc
>EV-C116
tgcactagccaagtgacccagaagatgtcattgaaacacgacatgtgataaataacagactcagatcagagagtacaattgaaatccttcttggtagg
gctgctgtgtgctatactaggagatcaaaacaaggcccagccgmgaggaatgagaaggagctgttaccacctggagaataagttatcttcaaacat
atcagctcaggcgaagcttgaattctttacctactctagatgttgatgtgagttaaccttgaattaccgagaggtactactctggaattcagcaac
caccgcaactacgtttaccaatc
>EV-C117
ggccacaagtcaggctgacctgctgatctcattgagacaagacacgtggtcaataggcgtcagcgaacggaatgcactgttgaatcatttctgggcagg
gcccgtgtgtcgccattattagcttataaaatgatgaaccaccgctagcaatgctaaggacctgttggccacctggaagatcagctacttgaatgcat
accagctgcccgtgaaacttgagatgttcacctactcgagatgttgatgtggaactgaccttgcattacagaaagggttgcacaagtggggattgttc
tggtagacactacgtgtatcagata
>EV-C118
cactaccaaccctggtgacgtctgatgtgatagagaccagacacgtaattaacaacgccaagggtcagagtgacagttgaaatccttcttagggaga
tctgctgtgtagctataattggactcaaaaatgacaaccagataccgctgctgcaaacgaaatgttccacgtggaacattgggtaccattacgctt
accagttgcccagaaaagcttgaaatgttcacctactctagatgtgacagagctcacatttgtgatcactgagcgattcgtcgaagcggggactgttc
tgggcgacactatgtgtatcagata

EV-D 型別用 DB

>EV-D68

tgcaacttccaacactgaaccagaagaagccatacaaaactcgcacagtaataaatcagcatgggtgtcggagacgtagtgagagaatcttctggtagg
gcagccctagtgtcaaagaaaagttttgaatacaagaatcatgcctcatccagcgcagggacacacaaaaacttttttaaatggacaattaataactaagt
cttttgtccagttaagaagaaagctggaattattcacataccttaggtttgatgctgaaatcaccatactcacaactgtggcagtaaatggtaataatga
cagcacatacatgggtctccctgacttgacactccaagca

>EV-D70

agctacatccaacacagaaccagaggaagctattcaaaactcgtactgtgatcaatatgcatggtactgcagagtgctgggtggaaaatctttaggcaga
tctgcacttgggtgatgcatcatttgagtacaagaatcactcaacaagtagctcatccattcaaaagaatttcttcatctggactttgaacaccagag
aacttgtccaaaattaggaggaagatggaattgtttacttacctaaggtttgacactgaaataactattgtaccacaccttagactattctcaagcagcaa
tgtctccttttctggattgcccaatctaactctacaagcg

>EV-D94

agcgaccttaacaccacccagaggaggcaattcagactaggcgggtgatcaaccaacacggcaccagtgaaccttagtgagagaacttcttagggagg
gcagcactagtaatgatgaaagattttgaatacaagaacctgtgactggcacacaaaagtacaacagaactttttcaagtggaccattaacaccggtt
cctatgtgcaactcagaagaaagtttgacttttacttatataaggtttgatagtgaaataacaatagtcacctacaattaggctatacacgtctactgg
tgcatacattcgggtcttcccaatttgacggttgcaagct

>EV-D11

agcaacatctaatactagtagcagaggaggtatacaaaaccagaactgtcattaatttacatggtacctcagagactttggctgagagaatctttagggagg
gcagcactgggtttgatgcaaagcattgaatacaaaaaaccagctaccggcacttccaccacacaaaagaacttcttcaattggacactaaatactagag
aatttgttcaattaagacggaaaatggagttgttcacatactgaggtttgacactgaagttacaatagtgcccacacttcgactgtttagctcatctgg
ttctagctacacaggggttgccaaatctaactttacaggca

EV-種別用 DB

>EV-A (CV-A2)

tgcaacgtccaacgcatccgatgaaaatctaattgaaactaggtgtgtagtcaataagaacagtggtggaggaagctagcttaaacacttcttctcccg
gctgcatagttggcaaagtggagctaaatgacacagggacggctgtacaggggtcaccaattggaatattgacataatggggtatgcgagttgcgga
gaaactagagatgttcacatacatgaggttcaatgctgaattcacttttgggccaccactagggctgggcggtgccgtctaggggtctcagtac

>EV-B (CV-B1)

tcatacctctcaagtcgtaccagtgacacatgcaaactagacacagtgagaattaccactcaaggtcggaatcttccattgaaaatttcttgccga
tctgcttgtgtattacgccacctacaataataattctgagaaggctacgcagagtggttatcaacaccaggcaggttgccagttgctgaggagga
aactagagttcacttacttaaggttcgatctggaattgacatttgtgatacaaatgcccaggagcccagctaccagtgtagacgcacctgtaca
aaccacagata

>EV-C (PV-1)

ggccacaaatccactagtcccttctgatacagtgcaaaccagacatggtgtacaacataggtcaaggtcagagcttagcatagagttcttcttcgcgcg
ggtgcatgctggccattataaccgtggataactcagcttccaccaagaataaggataagctatttacagtggtggaagatcactataaagatactgtcc
agttacggaggaaattggagttcttcacctattctagatttggatggaatttaccttctgtggtactgcaaatttctcagactaacaatgggcatgc
cttaaatcaagtgtaacaaatt

>EV-D (EV-D68)

tgcaacttccaacactgaaccagaagaagccatacaaaactcgcacagtaataaatcagcatgggtgtgtcggagacggttagtgagaaatcttcttggtagg
gcagccctagtgcaaaagaaagtttgaatacaagaatcatgcctcatccagcgcaggacacacaaaaactttttaaaggacaattaataactaagt
cttttgcagtttaagaagaaagctggaattattcacataccttaggttggatgctgaaatcaccatactcacaactgtggcagtaaatggaataatga
cagcacatacatgggtctccctgacttgacactccaagca

4. 平成 26 年度に実施したサルモネラ外部精度管理調査について —トラブルシューティングを中心に—

研究協力者	森本 洋、清水 俊一	北海道立衛生研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	磯部 順子、佐多徹太郎	富山県衛生研究所
	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	荒川 英二、緒方喜久代、大西 真	国立感染症研究所
研究分担者	岡野 素彦	北海道立衛生研究所
	大石 和徳	国立感染症研究所

研究要旨 平成 26 年度の外部精度管理調査(試料:2 種類のサルモネラ属菌を添加した模擬便)結果について、総括・分担研究報告書(平成 26 年度)及び北海道立衛生研究所における結果より推察された事象を基に問題点等を検証した。外部精度管理実施機関側の検証を行った結果では、配付試料の妥当性評価が困難だった。また、参加機関側の検証では、試料の妥当性評価ができなかったため、最終的に問題点の絞り込みができなかった。このことから、今回の調査に関しては、事後研修などを実施せず、国立保健医療科学院などの座学と研修を伴った通常行われる研修会において、検査意識とともに精度管理の向上につながるような、機会を持つことが望ましいと思われた。外部精度管理調査実施機関側は、参加機関に求める結果を想定し、そのことを達成するための安定した配付試料を作製することが不可欠である。また、参加機関側は自ら、内部精度管理ができるシステムを導入し、日常検査における精度の担保や外部精度管理の結果が思わしくなかった場合に迅速かつ適切な検証ができるよう体制を整える必要がある。全国的な公的外部精度管理調査を継続的に行うためには、施設、人員、予算などを確保し、安定した実施母体を構築する必要性があると思われた。

A. 研究目的

平成 26 年度に実施した地方衛生研究所を対象とした細菌検査に関する外部精度管理調査における事後評価を行い、問題点等を検証し、適切な実施に向けた検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

平成 26 年度に実施した地方衛生研究所を対象とした細菌検査に関する外部精度管理結果について、総括・分担研究報告書(平成 26 年度)及

び北海道立衛生研究所における結果より推察された事象を基に問題点等を検証した。

C. 研究結果及び考察

本研究概要として、第二回研究班会議(平成 28 年 1 月 8 日)の発表資料を添付した。特に発表資料 9 枚目の具体的なトラブルシューティング全体像については、別に添付にした。

外部精度管理実施機関側の検証を行った結果では、配付試料の妥当性評価が困難だった。実施

機関側は、必須事項として参加機関に求める結果を想定し、そのことを達成するための外部精度管理用の菌株の選定、配付試料の安定化に向けた検討（作製法、輸送法など）を事前に十分に確認する必要があると思われた。また、実際の調査時においても、実施機関側は地衛研と同様の検査を同時に実施し、配付試料の確認等を行う必要があると思われた。参加機関側の検証では、配付試料の妥当性評価が困難であったことから、問題点の絞り込みができなかった。

以上、今回の調査に関しては、事後研修を実施せず、国立保健医療科学院などの座学と研修を伴った研修会において、検査意識とともに精度管理の向上につながるような機会を積極的に持つことが望ましいと思われた。

D. 結論

全国的に質の高い外部精度管理調査を継続的に行うためには、施設、人員、予算などを確保し、事前に十分な協議・検討が必要である。そのためには安定した実施母体を構築する必要があると思われた。

E. 参考文献

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

昨年度のサルモネラ 「外部精度管理」調査について (トラブルシューティングを中心に)

【方法】総括・分担研究報告書(平成26年度)及び北海道立衛生研究所の結果より推察された事象を基に問題点等を検証した。

北海道立衛生研究所 森本 洋
H28.1.8 第二回研究会議

1

昨年度供試試料

- 材料:ヒト由来糞便(胃腸炎患者を想定)
- 対象病原体
添加血清型:
Salmonella Infantis(鶏肉由来)
→ 硫化水素非産生性の非典型株
Salmonella Cerro(鶏盲腸便由来)
* 両血清型とも食肉衛生検査所から分与
* それぞれ100000CFU/g添加し、シードスワブで対応



感染研保有の菌株から供試するのは
困難だった、とコメントされていた。

(ヒト由来株では、倫理審査の問題が発生する可能性?)

H26年度トラブルシューティング(TS)ポイント

- 外部精度管理調査全体のTSを考えた場合
1)実施側(システム、菌株選定、予備調査、送付方法等)のTS
* 試行段階だったこともあり、いくつかの検討課題が認められた。
2)検査結果のTS
- 1) → 実施側の課題解消
2) → 参加側の課題解消 → 研修

3

昨年度の外部精度管理調査について —検討課題—

(石岡先生H26年度第二回研究会議スライドより)

- 細菌検査精度管理実施要領の改訂
- 他の添加菌種の検討および菌株の入手方法
- 試料の作製について(臨床検体、菌株)
- 試料送付方法
- 試料送付に関わる送料
- 対象参加機関および実施時期

4

報告書には(1)

- 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。
(石岡先生報告書結論)
- 感染研での実施においては、
* BS室への届け出、審査、当日のチェック、梱包
* 対象11機関→7機関、4機関の2回に分け発送
* 79地衛研へ対応する場合、安定した大量の試料を作製し、同一期日に到着するよう発送するのはかなり困難。

5

報告書には(2)

- まずは、精度のしっかりした試料を作製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。
(石岡先生報告書結論)

6

微生物学調査試料の作製

- ▶ 微生物学検査用調査試料の最大の問題点は、添加菌の増殖、死滅、変異をいかに抑えるのか
- ▶ 定性検査で結果に影響を及ぼさないことを前提とした場合には、いかに死滅させないか
⇒調査試料中の添加菌の均一性、安定性の担保

→ 妥当性評価

これらは定量検査では結果のばらつき、定性検査では誤判定につながる可能性がある

外部精度管理調査期間中にどの容器を用いても、いつ検査を実施しても一定の結果が得られることが調査試料に求められる前提条件

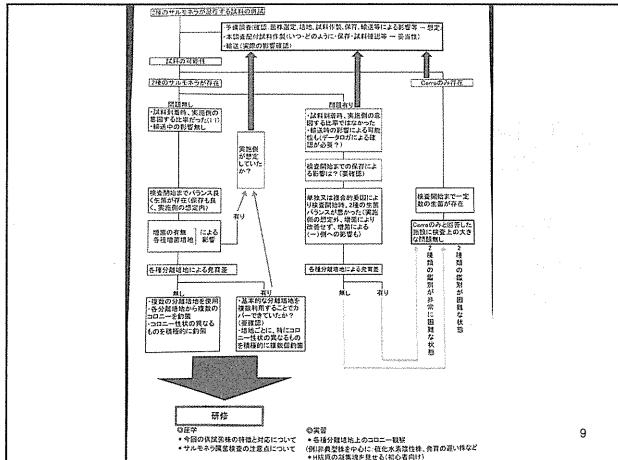
→ 実施側の想定

7

全国規模の精度管理を行うためには

- ①外部精度管理用菌株の検討(安定性と管理)
- ②配付試料の安定化に向けた検討(作製・輸送法・温度管理)
- ③外部精度管理参加条件の設定(設備が対象菌に「適」?)
- ④配付方法の検討(梱包は?、配送機関は?)
- ⑤検査方法の検討(定義:どの部分に重きを置くのか)
- ⑥プレ外部精度管理実施
- ⑦評価と解析方法の検討
- ⑧内部精度管理の必要性
- ⑨外部機関との協力(将来的な外部精度管理委託機関)
- ⑩その他(検査法の標準化、研修会等)

8



9

実施側のTS①

- 予備調査は行ったか。
* 行っていた場合、①菌株選定、②選定菌株と各種培地との相性、③実際の実施をどこまで想定し確認したか(試料作製直後、試料到着時及びそれ以降、輸送による影響:分割・温度・時間、適切な保存法等)。→ 確認後の想定
- 本調査配付試料作製
→ ③と同等の確認による妥当性評価
特に接種ミスが無いかわり2人以上での確認
- 輸送:実際にどのような影響があるか確認が必要か?

10

検査結果のTS&研修①

- 配付試料から実施側が想定していたこと(推定)
 - ①急性期のサルモネラ症
 - ②血清型の異なる2種類のサルモネラがほぼ同程度混在しているサルモネラ症
 - ③硫化水素(-)で選択分離平板によっては、発育が遅い非典型的なタイプと抗原構造が変異する可能性のあるタイプによるサルモネラ症
 - ④増菌や選択分離平板によって、発育が異なるタイプが混在するサルモネラ症
- 参加機関側は、実施側が想定するようなサルモネラ症に対応するための検査意識向上が必要

実施側のTS②

- 今回は、実施側が想定していたこと(推定)が複雑だったこと、それに基づく配付試料の妥当性評価が困難だったことから、
* 実施側は、
 - ①外部精度管理調査として参加機関に求める結果の適切な想定。
 - ②適切な妥当性評価が可能な配付試料の作製。
- 以上のことを踏まえて調査を実施することが必要。

12

検査結果のTS&研修②

- 配付試料の妥当性評価が困難だったことが否めないため、TSポイントの絞り込みが難しい状況。
- そのため、
 - ①事後研修の実施を見送ることに。
 - ②一般的な対処確認(培養温度、試薬期限、使用培地、経験値等)について別で細菌研修が必要か。
 - * 経験が浅い → ミスを誘発する可能性がある？
大きく見て相関関係はあるかもしれないが、因果関係があると断定できない。機関内担当者全員が同様の認識で検査している可能性も。。。 ¹³

検査結果のTS&研修③

- 検査意識向上と内部精度管理につながるような、サルモネラ属菌検査研修会の実施。
- ◎座学(案):サルモネラ属菌検査の注意点
 - * 供試菌株の特徴と対応について(推定)
 - * 培地:各特徴を理解、複数使用の推奨
 - * 非典型的なタイプの可能性を視野に入れた検査
 - * チフス菌、パラチフスA菌の検査について
 - * 亜種ごとの性状について
 - * Kauffmann-Whiteの抗原構造表について
- ◎実習(案)
 - * 各種分離培地上のコロニー観察(非典型的株中心に)
 - * H抗原の凝集塊を見せる(初心者向け) ¹⁴

まとめ1

- 本課題は、総括・分担研究報告書(平成26年度)及び北海道立衛生研究所の結果より推察された事象を基に問題点等を検証した。
- 結果、配付試料の妥当性評価が困難であり、問題点の絞り込みが難しい場合があった。

15

まとめ2

- 外部精度管理調査実施機関側は、参加機関に求める結果を想定し、そのことを達成するための安定した配付試料を作製することが不可欠である。
- また、参加機関側は、内部精度管理ができるシステムを導入し、日常検査の精度担保や外部精度管理の結果が思わしくなかった場合の適切な検証ができるよう、体制を整える必要があると思われた。

16

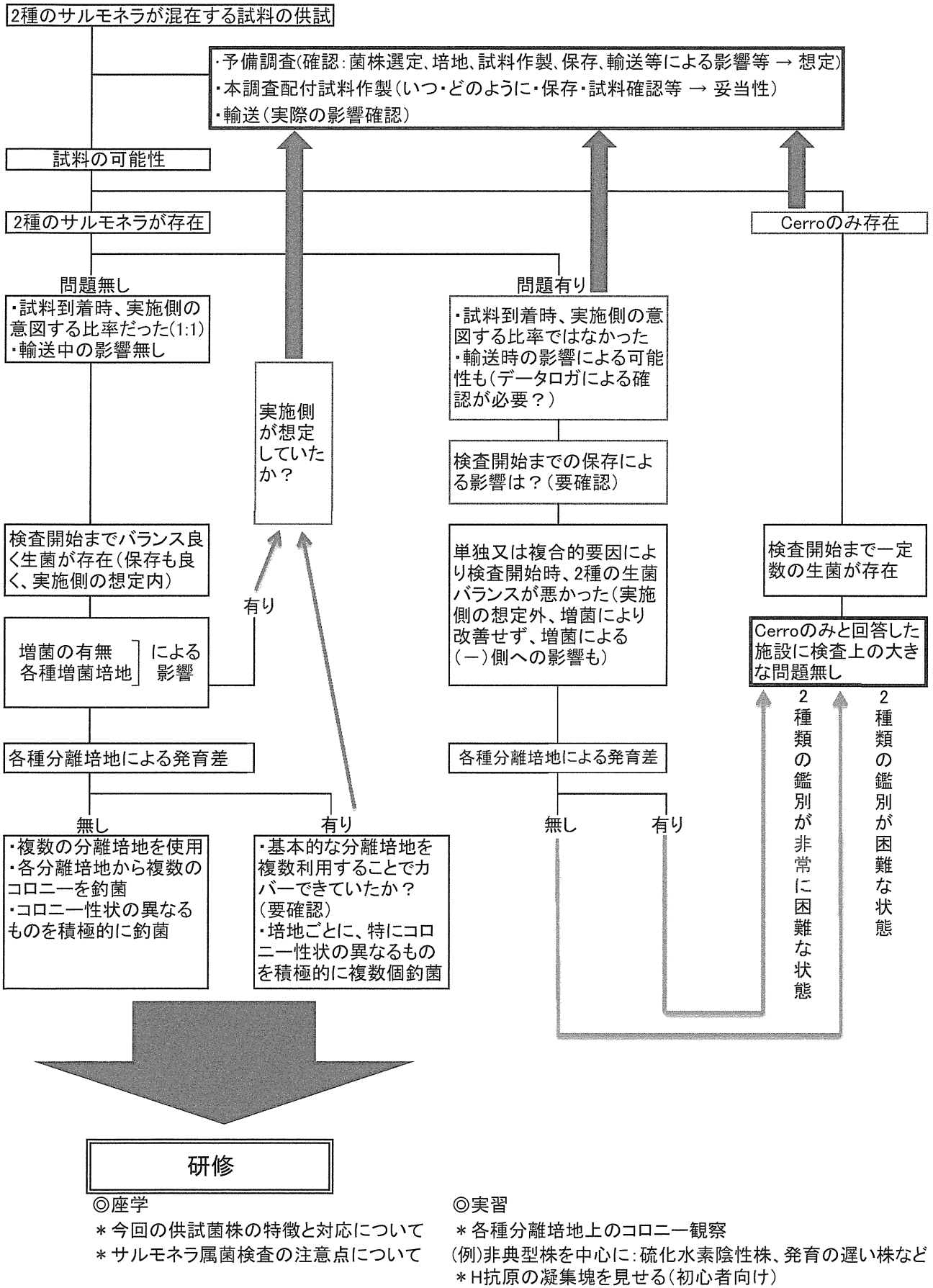


図 平成26年度地方衛生研究所外部精度管理調査トラブルシューティング

5. 試料発送から検査実施までの温度変化における検査結果への影響について

研究協力者	森本 洋、清水 俊一	北海道立衛生研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	磯部 順子、佐多徹太郎	富山県衛生研究所
	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	荒川 英二、緒方喜久代、大西 真	国立感染症研究所
研究分担者	岡野 素彦	北海道立衛生研究所
	山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所

研究要旨 平成 27 年度の外部精度管理調査(試料:コレラ菌)に当たり、ゆうパックによる試料発送から検査実施までの温度変化を把握し、過度な変化があった場合の供試試料に与える影響を、検討した。7 月 24 日(金)発送、27 日(月)着で 4 カ所の地衛研(北海道、埼玉県、富山県、大阪府)で行った事前調査では、いずれにおいても試料引受郵便局到着時での温度を基準に $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 以内の温度幅で輸送されていた。また、この時の試料では血清学的検査及び毒素検査について適切な結果が得られていた。10 月 1 日(木)、2 日(金)発送、5 日(月)着(1 地衛研のみ 1 日発送、2 日着)で行った本調査(全国 74 地衛研)では、輸送中、試料引受郵便局での温度と比較し、大きな温度変化が認められた試料が複数あった。また、輸送中及び試料到着後の一時保存温度を含め、 20°C 以上の高低差のある環境下に置かれた試料が 5 試料あり、本来 O1 抗原(+)となる菌株 1 で 2 機関、菌株 2 で 1 機関、計 3 機関が O1 抗原(-)と報告した。このうち 1 機関の試料は、最も高低差のある温度環境下(高低差 26.8°C)にあった。なお、このことが菌株に影響していたかについては、判断することができなかった。外部精度管理調査においては、配付試料の安定性を担保することが不可欠である。従って、シミュレーションを入念に行うのはもちろんのこと、実施時期にかかわらず、外気温の影響を受けにくく、試料到着後輸送中の温度と変わらない温度帯で一時保存しやすい、冷蔵輸送での対応が適当と思われた。加えて、配付試料においては、輸送中の温度、一時保存温度を念頭に置いた菌株選定が必要と思われた。

A. 研究目的

ゆうパックによる試料発送から検査実施までの温度変化を確認し、過度な変化があった場合、そのことが行政対応として必須の確認項目である血清学的検査及び毒素検査結果に対し、影響を与えるかについて検討する。

B. 研究方法

1) 事前調査

<実施日時>

試料発送:平成 27 年 7 月 24 日(金曜日)

試料到着:平成 27 年 7 月 27 日(月曜日)

<方法>

外部精度管理本調査前のシミュレーションとして実施した事前調査において、北海道立衛生研究所で保有する自記温度記録計を供試試料へ同梱(3次容器と4次容器の間)し、試料到着後、各地衛研から自記温度記録計を回収し、北海道、埼玉県、富山県、大阪府の地衛研への輸送中の温度変化を確認し、血清学的検査や毒素検査結果に対して影響を与えるかについて検討した。なお自記温度記録計は、10分毎に記録するように設定した。

2)本調査

<実施日時>

試料発送:平成27年10月1日(木曜日)

岐阜県より東を中心とした38地衛研

:平成27年10月2日(金曜日)

西日本を中心とした36地衛研

試料到着:平成27年10月5日(月曜日)

一地衛研のみ1日発送、2日着

<方法>

参加地衛研で使用している自記温度記録計を、試料輸送容器とともに事前に集め、発送試料中に同梱(3次容器と4次容器の間)し、輸送中の温度記録の回答を求めた。また、後日追加データとして、輸送中の最高、最低、平均温度及び試料到着後すぐに検査しなかった場合の検査開始までの試料保管温度についても回答を求めた(別添)。これらのデータをもとに、過度な温度変化があった場合、そのことが行政対応として必須の確認項目である血清学的検査や毒素検査結果に対して影響を与えるかについて検討した。なお自記温度記録計は、10分毎に記録するように依頼した。

C. 研究結果及び考察

1)事前調査

試料輸送中の温度変化として、表1に基準温度(引受郵便局到着時:牛込局)とそれぞれの最高、最低、平均温度を、表2に基準温度と比較した振れ幅の温度を、表3に最大温度差を示した。なお表2は、引受郵便局到着時の各自記記録計温度を基準温度とし、輸送中に、基準温度からどれだけ「振れ幅」が

あったか(上方:最高、下方:最低)を確認し、加えてその最大値(小数点以下切り上げ)を記載したものである。

輸送中最も温度が上がったのは大阪府の30.3℃、最も下がったのは北海道の22.1℃であった。輸送中の平均温度が最も高かったのは埼玉県の27.0℃、最も低かったのは北海道の24.5℃であった。また、北海道では、輸送中、基準温度±5℃以内、富山県、大阪府では±4℃以内、埼玉県では±2℃以内で推移していた。輸送中の最大温度差が最も大きかったのは、北海道の6.4℃、最も小さかったのは、埼玉県の2.3℃であった。埼玉県での温度変化は、常温輸送としては、非常に安定していたと思われた。夏季に実施したため、特に高温側に大きく温度が振れる可能性を予想していたが、比較的安定した結果であった。これは、輸送車及び配送中継所内が、冷房等により安定した環境になっていたためと思われる。

この時の試料においては、4機関すべてから、行政対応として必須の確認項目である血清学的検査及び毒素検査について適切な結果が得られていた。

2)本調査

参加全74機関中、自記温度記録計の設定不備(5機関)、電源の入れ忘れ(2機関)、輸送中の故障(2機関)、作動せず・不具合(2機関)、電池切れ(1機関)、記録計入れ忘れ(1機関)のため、これら13機関からのデータは、ほとんど得ることができなかった。加えて、追加データについては、送り状の「お問い合わせ番号」を記録していなかった機関、送り状を廃棄していた(依頼時期が遅れたことも影響)機関等が8機関あった。これらのことから、計21機関から詳細なデータが得られない場合があった。また、必要期間を含む1か月前後の折れ線グラフデータを提出する機関も散見され、詳細データの読み取りが困難な場合もあった。引き受け日時を最寄りの集配所からと考え、感染研から各自治体までの輸送中の温度記録が提出されていなかった機関もあった。なお、当初から提出を求めていた温度記録等から推測できるものについては、可能な限り表に記載した。

表 4 に表 5～7 の各ブロックの地衛研を表記した。表 5 に 10 月 1 日 発送分 38 機関、表 6 に 10 月 2 日 発送分 36 機関の基準温度(引受郵便局到着時)と最高、最低、平均と機関到着時、開封時温度を(脚注には試料一時保存中の温度も示した)、表 7 に基準温度と比較した振れ幅の温度(脚注には試料一時保存中の振れ幅も示した)を、また表 8 に輸送中の最大温度差を示した。表 7 は、事前調査と同じく、引受郵便局到着時の各自記録計温度を基準温度とし、輸送中に、基準温度からどれだけ「振れ幅」があったか(上方:最高、下方:最低)を確認し、加えてその最大値(小数点以下切り上げ)を記載したものである。測定結果が報告された 61 機関のうち、輸送中最も温度が上がったのは E-1 の 30.8℃、最も下がったのは F-11 の 5.5℃であった。輸送中の平均温度が最も高かったのは D-8 の 26.1℃、最も低かったのは A-6 の 19.4℃であった。また、輸送中の基準温度と比較した振れ幅が最も大きかった F-11 では、輸送中、基準温度 $\pm 19^{\circ}\text{C}$ 以内、最も小さかった B-1、B-15 では基準温度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ 以内で推移していた。また、B-5 を除く 60 機関では、基準温度と比較し下方側への振れ幅が大きかった。最も振れ幅が大きかった F-11 ($\pm 19^{\circ}\text{C}$ 以内)では、地理的要因から航空輸送を利用しており、貨物室内で 5.5℃まで下がっていたことが原因と思われる。

輸送中の温度差が最も大きかったのは、F-11 の 23.5℃、最も小さかったのは、B-15 の 2.8℃であった。7 月に実施した事前調査においては、輸送中冷房等により安定した環境が作られていたと思われるが、10 月に実施した本調査では、輸送地域ごとに差があり、全国的に外気温の影響を受けやすい状況下にあったと思われる。そのため、輸送中の振れ幅、最大温度差が大きかった地域が多数存在していた。常温輸送で外部精度管理を実施する場合には、このような状況を想定し、輸送中の温度変化が配付試料へ影響しないように十分事前チェックをする必要があると思われる。

輸送中及び試料到着後の一時保存温度を含め、20℃以上の高低差のある環境下に置かれた試料が 5 試料あった。本調査において、本来 O1 抗原(+)と

なる菌株 1 で 2 機関、菌株 2 で 1 機関、計 3 機関が O1 抗原(-)と報告していたが、このうち 1 カ所の試料(E-1)においては、最も高低差のある温度環境下(高低差 26.8℃)にあったことが分かった。しかしながら、他の試料では、長時間 4℃保存環境下に置かれた場合や輸送中の温度差が最も大きかった機関でも、O 抗原型及び毒素検査について適切な結果が得られていた。

D. 結論

今回、試料発送から検査機関到着後開封、検査開始までの温度記録を確認したが、今後このような温度記録を求める場合は、必要とするデータが確実に得られるようシミュレーションを入念に行い、実施要領への分かりやすい記載が必要と思われた。

全国的に見て、試料引受郵便局での温度を基準に大きな温度幅が認められた試料が、複数あった。特に、前述したように、基準となる温度より輸送中または試料到着後の一時保存中に 20℃以上低い環境下に置かれた試料も複数あった。しかしながら、最も高低差のある温度環境下(高低差 26.8℃)にあった試料(E-1)をのぞき、長時間 4℃保存環境下に置かれた場合や輸送中の温度差が最も大きかった機関でも、O 抗原型及び毒素検査について適切な結果が得られていた。このことから、今回の温度変化が、試料菌株に対し影響を与えていたかについては、最終的な判断をすることができなかった。

今回の外部精度管理調査は常温輸送で実施したが、温度記録解析の結果、輸送中外気温の影響を強く受けていたことが示唆された。外部精度管理調査においては、配付試料の安定性を担保することが不可欠であることから、基本的には、実施時期にかかわらず外気温の影響を受けにくく、また、試料到着後輸送中の温度と変わらない温度帯で一時保存しやすい、冷蔵輸送での対応が適切と思われた。なお、配付試料においては、輸送中の温度、一時保存温度を念頭に置いた菌株選定が必要と思われた。

E. 参考文献

なし

F. 研究発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

(別添)

細菌の外部精度管理調査（コレラ菌）における輸送中の温度管理記録データについて2

細菌感染症外部精度管理調査・参加担当者 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会および研究班の活動にご協力いただきありがとうございます。

先日10月7日に、試料の輸送中の温度変化を把握するため、温度記録器の同封とデータの回収についてお願いし、データファイルの提出を、10月26日までに、お願いしておりました。ご多忙中申し訳ありませんが、追加で下記のデータを10月30日までにお知らせいただきたく、ご連絡申し上げます。

感染研からの試料発送時から、貴地衛研到着までの日時と温度について、下記の通り、お願いします。

(1) 郵便局のHPにある、個別番号検索 URL

<https://trackings.post.japanpost.jp/services/srv/search/input> にアクセスしていただき、保存してあるゆうパックのお問い合わせ番号を入力してください。

(2) 追跡記録のデータと温度記録のデータを添付ファイルに記入してください。

(3) 記入した回答ファイルを seidokanri2015@iph.pref.osaka.jp までお送りください。

以上です。ご協力感謝致します。

2015年10月23日

「外部精度管理」研究班
佐多徹太郎、磯部順子
富山県衛生研究所
toyamaeiken_do@vanilla.ocn.ne.jp

地衛研	基準	最高	最低	平均
北海道	26.5	28.5	22.1	24.5
埼玉県	26.4	28.2	25.9	27.0
富山県	26.3	28.3	23.0	25.3
大阪府	26.5	30.3	25.3	26.5

基準温度:引受郵便局到着時温度

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅
北海道	2	4.4	+5
富山県	2	3.3	-4または+4
大阪府	3.8	1.2	
埼玉県	1.8	0.5	+2

地衛研	最大温度差
北海道	6.4
富山県	5.3
大阪府	5
埼玉県	2.3

ブロック	記号	枝番号(ランダム)
北海道・東北・新潟	A	1～12
関東・甲・信・静	B	1～20
東海・北陸	C	1～7
近畿	D	1～13
中国・四国	E	1～11
九州	F	1～11

表5 本調査での輸送中温度変化概要(10月1日発送分)

地衛研	基準	最高	最低	平均	機関到着	開封
北海道	25.7	25.7	16.8	21.3	16.8	17.8
札幌市	25.9	25.9	16.8	ND	17.2	17.2
函館市*	25.7	26.6	16.2	24.2	18.4	18.5
青森県	25.6	25.6	17.9	22.3	22.1	約22.3
秋田県	25.6	25.6	18.4	21.6	20.1	20.1
岩手県	ND	20.2	15.9	19.4	16.05	16.0
宮城県	25.9	25.9	13.1	21.0	18.6	19.0
仙台市	約25.4	26.3	16.9	24.5	約19.4	約21.6
山形県	ND	ND	ND	ND	ND	20.1
福島県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
新潟県	25.9	26.1	21.6	24.6	25.4	25.4
新潟市**	24.93	25.11	20.34	24.05	24.8	24.8
茨城県	24.4	26.5	22.0	24.0	23.6	23.6
栃木県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
宇都宮市	25.6	25.6	20.3	23.3	21.5	22.9
埼玉県	22.4	28.5	19.4	24.2	21.8	24.7
さいたま市	25.7	25.7	14.4	20.0	23.2	23.2
千葉市	25.4	?	?	?	23.3	23.5 or 23.9
東京都	26.0	26.9	20.3	23.7	21.8	22.5
足立区	25.6	26.5	19.8	25.3	20.5	21.8
杉並区	25.5	26.5	20.0	23.284	20.0	20.0
神奈川県	23.7	25.9	20.0	24.2	22.9	23.1
横浜市	25.8	26.2	22.0	23.65	25.3	26.2
川崎市**	ND	ND	ND	ND	ND	ND
相模原市	約25.4	25.5	20.4	23.4	ND	23.3
山梨県	25.8	25.8	23.0	24.4	23.4	24.3
長野県	25.2	25.2	18.4	21.6	20.4	20.5
長野市	25.3	27.6	18.1	23.2	21.4	25.2
静岡市	26.0	28.0	22.0	25.2	23.5	26.0
浜松市	ND	ND	ND	ND	ND	24.4
富山県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
石川県	25.6	26.4	21.4	23.7	24.4	23.5
福井県	25.8	25.9	20.8	24.3	21.2	23.6
愛知県	25.0	25.5	20.5	23.9	23.5	23.5
名古屋市	ND	27.3	24.3	26.2	24.7	25.1
岐阜県	25.3	25.5	20.6	23.3	22.8	23.2
岐阜市	25.6	26.7	18.9	25.1	22.9	23.3
沖縄県***	24	29.0	5.5	24.5	29	25.0

基準温度:引受郵便局到着時温度

ND:データ無し

?:データが読み取れず

*到着後10℃以下(冷蔵庫内)で保存(検査日10/5)

**到着後4℃で保存(検査日10/5)

***日通航空利用

岩手県:到着後25℃で保存(検査日10/6)

仙台市:到着後室温で保存(検査日10/5)

山形県:到着後室温で保存(検査日10/6)

茨城県:到着後NDで保存(検査日10/5)

仙台市:到着後25℃(室温)で保存(検査日10/5)

岐阜市:到着後24℃で保存(検査日10/6)

沖縄県:到着後25℃で保存(検査日10/5)

表6 本調査での輸送中温度変化概要(10月2日発送分)

地衛研	基準	最高	最低	平均	機関到着	開封
群馬県*	26.1	26.1	17.3	22.9	17.3	19.0
静岡県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
滋賀県	25.6	27.8	18.6	22.7	23.4	24.4
京都市	25.9	27.3	20.2	24.9	24.2	24.4
大阪府	ND	25.1	22.2	23.5	ND	ND
大阪市	ND	?	?	?	21.8	21.8
堺市	ND	28.2	8.4	23.5	約23.7	21.0
東大阪市	25.9	26.8	20.5	25.3	24.8	25.4
兵庫県	25.8	29.1	18.1	25.1	21.5	21.5
神戸市**	ND	26.5	25.7	26.1	ND	26.5
姫路市	25.5	25.5	21.6	24.3	24.8	24.4
尼崎市	ND	ND	ND	ND	ND	ND
奈良県	25.8	27.4	18.1	23.5	21.2	26.1
和歌山県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
和歌山市	25.9	27.4	16.9	24.6	25.8	24.7
鳥取県***	25.9	30.8	17.0	24.3	23.8	23.8
島根県	25.9	27.9	16.5	25.0	22.7	23.3
岡山県	25.4	26.5	18.2	23.9	22.1	22.2
岡山市	25~28	28.0	17.2	23.7	約23	約23
広島県	25.4	26.9	17.3	24.3	23.1	22.3
広島市	25.7	28.7	16.1	25.0	18.6	19.1
山口県	25.3	26.3	15.0	21.3	21.1	21.1
徳島県	25.6	?	?	25.3	24.2	25.6
香川県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
愛媛県	25.7	27.2	19.5	23.3	24.2	24.3
高知県	ND	ND	ND	ND	ND	23.5
福岡県	25.5	26.6	17.9	21.1	21.5	24.9
福岡市	25.5	27.0	17.6	24.0	21.0	22.6
北九州市****	25.8	28.4	18.2	23.9	22.7	22.6
佐賀県	25.6	29.6	17.9	25.0	24.0	24.2
長崎県	ND	ND	ND	ND	ND	ND
大分県	25.6	29.5	16.4	24.8	23.1	25.5
熊本県	25.8	28.0	17.8	22.4	24.3	23.9
熊本市	25.8	27.0	18.2	24.0	24.3	25.2
宮崎県	25.6	27.1	17.7	24.0	26.0	25.3
鹿児島県****	ND	ND	ND	ND	ND	ND

基準温度:引受郵便局到着時温度

ND:データ無し

?:データが読み取れず

* 到着後4°Cで保存(検査日10/14)

** 到着後7°Cで保存(検査日10/5)

*** 到着後4°Cで保存(検査日10/7)

**** 到着後4°Cで保存(検査日10/5)

静岡県:到着後NDで保存(検査日10/21)

大阪市:到着後25.3°Cで保存(検査日10/7)

東大阪市:到着後20°Cで保存(検査日10/6)

尼崎市:到着後常温で保存(検査日10/6)

広島市:到着後25°Cで保存(検査日10/6)

山口県:到着後25°Cで保存(検査日10/6)

表7 本調査での輸送中温度変化(基準との比較)

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅	
沖縄県	5.0	18.5	-19	
宮城県	0.0	12.8	-13	
さいたま市	0.0	11.3	-12	
山口県	1.0	10.3	-11	
大分県	3.9	9.2	-10	
広島市	3.0	9.6		
島根県	2.0	9.4		
函館市*	0.9	9.5		
札幌市	0.0	9.1	-9	
和歌山市	1.5	9		
鳥取県**	4.9	8.9		
広島県	1.5	8.1		
仙台市	0.9	8.5		
北海道	0.0	8.9		
群馬県***	0.0	8.8	-8~-11	
岡山市	3~0	7.8~10.8		
佐賀県	4.0	7.7		
兵庫県	3.3	7.7		
熊本県	2.2	8.0	-8	
北九州市****	2.6	7.6		
長野市	2.3	7.2		
福岡市	1.5	7.9		
宮崎県	1.5	7.9		
奈良県	1.6	7.7		
熊本市	1.2	7.6		
福岡県	1.1	7.6		
岡山県	1.1	7.2		
青森県	0.0	7.7		
秋田県	0.0	7.2		
滋賀県	2.2	7.0		-7または+7
埼玉県	6.1	3.0		
愛媛県	2.0	6.2		
岐阜市	1.1	6.7		
長野県	0.0	6.8		

* 保存中振れ幅 -16: 検査日10/5

** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7

*** 保存中振れ幅 -23: 検査日10/14

**** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅 ±
京都市	1.4	5.6	-6
足立区	0.9	5.8	
東京都	0.9	5.7	
杉並区	1.0	5.5	
東大阪市	0.9	5.4	
宇都宮市	0.0	5.3	
相模原市	0.1	5.0	-5
福井県	0.1	5.0	
岐阜県	0.2	4.7	
愛知県	0.5	4.5	
石川県	0.8	4.2	
新潟市*****	0.18	4.59	
新潟県	0.2	4.3	-4
静岡市	2.0	4.0	
神奈川県	2.2	3.7	
横浜市	0.4	3.8	
姫路市	0.0	3.9	±3または-3
茨城県	2.1	2.4	
山梨県	0.0	2.8	ND
岩手県	ND	ND	
山形県	ND	ND	
福島県	ND	ND	
栃木県	ND	ND	
千葉市	ND	ND	
川崎市	ND	ND	
浜松市	ND	ND	
富山県	ND	ND	
名古屋市	ND	ND	
静岡県	ND	ND	
大阪府	ND	ND	
大阪市	ND	ND	
堺市	ND	ND	
神戸市	ND	ND	
尼崎市	ND	ND	
和歌山県	ND	ND	
徳島県	ND	ND	
香川県	ND	ND	
高知県	ND	ND	
長崎県	ND	ND	
鹿児島県	ND	ND	

***** 保存中振れ幅 -21: 検査日10/5

ND: データ無し

表8 本調査での輸送中温度変化(最大温度差)

地衛研	最大温度差
沖縄県	23.5
鳥取県*	13.8
大分県	13.1
宮城県	12.8
広島市	12.6
佐賀県	11.7
島根県	11.4
さいたま市	11.3
山口県	
兵庫県	11.0
岡山市	10.8~13.8
和歌山市	10.5
函館市**	10.4
熊本県	10.2
北九州市***	
広島県	9.6
長野市	9.5
仙台市	9.4
福岡市	
宮崎県	
奈良県	
滋賀県	9.3
札幌市	9.2
埼玉県	9.1
北海道	
群馬県****	8.8
熊本市	
福岡県	8.7
岡山県	8.3
愛媛県	8.2
岐阜市	7.8
青森県	7.7
秋田県	7.2
京都市	7.0
長野県	6.8
足立区	6.7

* 保存中26.8(検査日10/7)

** 保存中16.6(検査日10/5)

*** 保存中24.4(検査日10/7)

**** 保存中22.1(検査日10/14)

地衛研	最大温度差
東京都	6.6
杉並区	6.5
東大阪市	6.3
静岡市	6.0
神奈川県	5.9
宇都宮市	5.3
相模原市	5.1
福井県	
愛知県	5.0
石川県	
岐阜県	4.9
新潟市*****	4.77
新潟県	4.5
茨城県	
横浜市	4.2
姫路市	3.9
山梨県	2.8
岩手県	ND
山形県	
福島県	
栃木県	
千葉市	
川崎市	
浜松市	
富山県	
名古屋市	
静岡県	
大阪府	
大阪市	
堺市	
神戸市	
尼崎市	
和歌山県	
徳島県	
香川県	
高知県	
長崎県	
鹿児島県	

***** 保存中21.11(検査日10/5)

ND: データ無し

6. 全国の地方衛生研究所を対象にしたコレラ菌検査の外部精度管理調査

研究協力者	勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
	森本 洋、清水 俊一	北海道立衛生研究所
	倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
	黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
	太田 嘉	横浜市衛生研究所
	磯部 順子、佐多 徹太郎	富山県衛生研究所
	望月 利洋	兵庫県立健康生活科学研究所
	世良 暢之	福岡県保健環境研究所
	荒川 英二、緒方 喜久代、大西 真	国立感染症研究所
研究分担者	山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所
	岡野 素彦	北海道立衛生研究所

研究要旨 地方衛生研究所（地衛研）で実施する細菌検査の信頼性確保のため、外部精度管理調査を実施し、検査能力の実態を把握するとともに、継続的な実施に必要な手順や問題点を検証した。実施項目は「三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定」とし、74施設の参加を得た。検査試料は国立感染症研究所（感染研）の保存株から、事前に4箇所の地衛研で性状を確認した上で3株（試料1: *Vibrio cholerae* O1 稲葉型 コレラ毒素（CT）陽性、試料2: *V. cholerae* O1 小川型 CT陰性、試料3: *V. cholerae* O139 CT陽性）を選び、感染研から発送した。検査報告書の集計の結果、正答は試料1: 72施設、試料2: 66施設、試料3: 74施設で、試料2では正しい同定結果（O1抗原陽性、CTまたはCT遺伝子陰性）であったが「コレラ菌陽性」と判定した施設が7施設あった。検査経過記録書や事後アンケートから、全体として地衛研では概ね適切にコレラ菌検査が実施されていることがわかった。特に、届出基準のひとつであるCT産生あるいはCT遺伝子の確認については、74施設で一致した結果が得られていた。試料1および2ではO1抗原陰性と判定した施設が3箇所あり、原因については、使用した免疫血清やラテックスの劣化、凝集反応に供した菌株が不適切（ラフ型）等の要因が考えられた。血清凝集反応で判定不能の場合、特にCT産生あるいはCT遺伝子陽性の場合、PCR法によるO1抗原あるいはO139抗原の確認を実施すべきであると考えられた。大規模な外部精度管理調査を実施するにあたって、配付株の選定には検体の保存条件を考慮する必要がある。また、検査経過記録書やアンケート等については、多様な回答を想定し記入しやすい様式を作成することが課題である。参加施設から提出される各種文書のとりまとめには、集計に至るまでの事務作業に相当の時間が必要であり、未記入や記載ミスと考えられる回答を提出元に確認するなど、実施結果の集計や解析には専従の担当者をおくことが望ましい。

A. 研究目的

地方衛生研究所（地衛研）で実施する細菌検査の信頼性確保に向けて、外部精度管理を実施して地衛研の検査能力の実態を把握するとともに、外部精度管理を大規模に実施するにあたって必要な手順や問題点を検証した。

B. 研究方法

1. 実施項目

昨年度実施したアンケートの結果、多くの地衛研が三類感染症の検査を実施していた。防疫対象となるコレラ菌の決定は地衛研における検査によって行うと明記されていることから（昭和 63 年 9 月 28 日健医発第 1133 号）、実施項目を「三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定」とした。

2. 実施組織

4 箇所の地衛研と国立感染症研究所（感染研）の研究協力者からなるワーキンググループ（細菌 WG）を立ち上げ、配付株の選定、実施計画の立案、検査結果やアンケートの集計などの実務を担った。細菌 WG で検討した内容や文書は細菌小班に諮った上で関係者に送付した。検査試料（検体）の準備と発送は、感染研が担当した。

3. 配付株の選定と輸送

配付する試験菌株は、典型的なコレラ菌株（血清群 O1）、コレラ菌と類似しているがコレラ毒素（CT）遺伝子を保有せずコレラ菌と同定できない株、血清群 O1 以外で重要となる血清群 O139 の株で CT 産生株の各 1 株ずつとすることが細菌 WG で決定された。

菌株選定のための確認項目として、O 血清群および血清型決定性状、CT 産生性の 2 項目に加え、*Vibrio cholerae* の同定の鍵となる性状：Vibrio 選択培地での増殖、白糖の分解、リジン脱炭酸試験陽性、無塩ブイヨンでの発育の 4 項目を挙げた。これらの性状が明瞭であること、特に選択培地での発育の悪い（遅い）ものや、コロニー形態が異常なもの、VP 試験（*V. cholerae* の生物型を決める重要な性状）の性状に基づいて保存株のなかから 17 の候補株を選抜した。この中から最も典型的と考

えられた 8 株を細菌 WG メンバー（北海道衛研、埼玉県衛研、富山県衛研、大阪府公衛研）にプレチェックのために送付した。

感染研の病原体等の分与等に関する取扱い要領に則り、研究・検査依頼として取扱様式 8「特定病原体等分与（譲渡）申請書」を整えた（感染研__資料 1）。取扱様式 8 に添付する送付先リストを作成し、各参加施設からの参加申込書および誓約書（別添 1 別紙 3）を添付することとした。

病原体輸送に関する手続きを国立感染症研究所バイオセーフティ管理室と協議し、輸送容器の事前確認、「国立感染症研究所での病原体等輸送に関わるチェックシート輸送分類”カテゴリ-A”」の簡易版作成（感染研__資料 2）を行った。搬送用容器は事前に参加施設に配付した資料「菌株搬送容器の準備」（別添 1 別紙 1）および「菌株搬送容器発送チェックシート」（別添 1 別紙 2）に基づいて参加施設で用意され、地域別に指定された期日（9 月 24 日、9 月 25 日、9 月 28 日）に感染研に集められた。搬送容器は、9 月 29 日、9 月 30 日の 2 日間でバイオセーフティ管理室員立会いのもと事前確認を行い、必要な表示等を確認し、感染研の規定に沿っていない搬送容器に関しては規定に沿うように手直しをした。

3 種の試料は 9 月 30 日、10 月 1 日に輸送用培地に接種し、3 種 1 セットを 2 次容器に入れ密封したのち、培養を開始した。それぞれ 10 月 1 日、2 日に 3 次容器におさめ、バイオセーフティ管理室員とともにチェックシートをもとに確認作業を行いながら適切に搬送準備が整えられていることを確認した。

4. 実施スケジュール（表 1）

実施案内に先立ち、コレラ菌検査・診断マニュアル（マニュアル）を作成して、感染研ホームページに掲載した（7 月 1 日付け、9 月 1 日に修正版掲載）。実施時期は 10 月とし、8 月 17 日に地衛研代表メーリングリストを使って実施案内を送付した（別添 1）。参加にあたっては、規定に沿った菌株搬送容器と温度管理のためのロガーを準備して指定日に感染研へ送付することとし、四種病

原体に関する各種基準（厚生労働省令）を遵守するよう誓約を求めた。検体の発送は、1施設は航空便で10月2日に、他はゆうパックで10月5日に到着するよう指定した。検体受領後はすみやかに検査を実施し、10月26日までに検査結果報告書および検査経過記録書を提出するよう依頼した（別添2）。また、検査手順書を作成して送付したが、異なる方法を実施した場合は各施設の手順書の添付を依頼した。

5. 事後アンケート

検査結果報告書および検査経過記録書の集計結果を参考に、A. 使用した培地や試薬の準備状況、B. 詳細な検査手順や内容、C. 赤痢菌検査の実施状況について事後アンケートを作成し、参加施設へ回答を依頼した（別添4）。C. 赤痢菌検査の実施状況については、磯部らの分担報告書にまとめた。

6. 感染症検査体制アンケート

感染症法の改正に伴い、感染症検査においても業務管理体制が求められることから、内部精度管理の現状を把握するためのアンケートを実施した（別添6）

（倫理面への配慮）

本研究で使用したコレラ菌については、すでに患者情報が連結不可能匿名化されており、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針の対象とされない。

C. 研究結果

1. 配付株の選定と輸送

感染研で選択した8株について4施設の細菌WGメンバーが実施した検査の結果をもとに、3株を試験株として選択した。3株は試料1: *V. cholera* O1 稲葉型 CT 陽性株、試料2: *V. cholera* O1 小川型 CT 陰性株、試料3: *V. cholera* O139 CT 陽性株とした。

取扱様式8「特定病原体等分与（譲渡）申請書」はゆうパックを利用した73施設を1枚に集約すること、参加施設の誓約書を添付することで、通常求められる「フロア図・ラボ配置図」は添付しないこととした。航空便で送付する1施設に関す

る取扱様式8と合わせて、感染研総務部調整課研究支援係に提出した。

2. 参加施設

9月4日までに74施設から「参加申込書及び誓約書」が提出された。内訳は、都道府県44施設、指定都市20施設、中核市など10施設であった。

3. 同定結果の提出

10月31日までに、全施設から依頼の様式で検査結果報告書および検査経過記録書が提出された。5施設は検査のフロー図や自施設の手順書を添付していた。

4. 検査結果報告書のまとめ

正答は試料1で72施設、試料2で66施設、試料3で74施設であった（表1）。試料1で正答でなかった2施設は、ともにCT遺伝子陽性であったが、O1抗原およびO139抗原が陰性であった。試料2では、正しい同定結果（O1抗原陽性、CTまたはCT遺伝子陰性）であったが「コレラ菌陽性」と判定した施設が7施設あった。また、1施設はO1抗原陰性であった。

5. 検査経過記録書のまとめ

検査担当者情報として、24施設は1名、23施設は2名、27施設は3名を記載しており、合計151名の担当と検査経験を表3aにまとめた。コレラ菌検査および細菌検査の経験年数については、記載欄にトレーニングも含むと注釈をつけたが、約3割がコレラ菌検査の経験なしと回答していた。

検体は、航空便で発送した1施設を含む73施設には指定日どおりに届いたが、ゆうパックで発送した1施設で指定日より早く10月2日に届いていた。検体の状況は72施設では良好であったが、2施設で一部不良とされ、「四次容器の蓋の留め金がコードバンド等で結束されていなかった」「チューブが二次容器内に横倒しの状態で入れられており、3本中2本のチューブのフタの内側に凝固水がついていた（チューブ外への漏れはなかった）」との記載があった。検体到着日に検査を開始した施設は61か所で、1週間以上保管後に開始した施設が2か所みられた（表3b）。保管期間の長短はあるが、17施設で検体を冷蔵庫に保管

していた。

送付試料が純培養であることの確認は、1～5種類の培地を使用して全施設で実施されていた。検査手順書で例示した食塩加普通寒天（NA）培地が最も多く44施設で使われていたが、22施設ではTCBSなど選択分離培地のみを記載していた（表3c）。検査に使用した選択分離培地は、全施設でTCBSが使われており、クロモアガーVibrioやビブリオ寒天などを併用した施設も43か所あった。釣菌したコロニー数の記載は1～16個であったが、記載様式の不備で平板あたりか検体あたりかの区別がつかなかった。

分離菌性状検査について、主な検査項目と使用培地を表3dにまとめた。オキシダーゼ試験は市販品（ろ紙またはディスク）を使用して全施設で実施されていた。その他に、ブドウ糖からのガス産生、マンニト、アルギニン、オルニチン、簡易同定キットを用いた性状検査のほか、O/129ディスク感受性、ポリミキシンB感受性、ヒツジ赤血球溶血性などが実施されていた。

血清凝集反応は、コレラ菌免疫血清（免疫血清、デンカ生研）とビブリオコレラ免疫血清O139“Bengal”（O139血清、デンカ生研）を使用した施設が45施設、これにコレラ菌AD（ラテックス、デンカ生研）を併用した施設が26施設、ラテックスとO139血清を使用した施設が3施設あった。

CTの検査には、71施設でPCR法によるCT遺伝子検査が、35施設でRPLA法によるCT産生性試験が行われていた。PCRプライマーは、マニュアルに記載されたプライマーが46施設、市販プライマーが23施設、小林らのプライマーが4施設、自施設のプライマーが1施設で使用されており、3施設は2種類のプライマーを併用していた。

その他の遺伝子検査として、マニュアルに記載の*V. cholerae*同定のためのPCR (housekeeping geneである*atpA*遺伝子を標的としている)を実施した施設は33施設あった。また49施設では、PCR法によるO1抗原、O139抗原の確認を実施していた。

遺伝子検査に使用した機器類の記載欄には、遺

伝子増幅装置は63施設で記入があり、Applied Biosystems (32施設)、Takara (13施設)、BIO-RAD (11施設)の製品が多く使われていた。リアルタイムPCR法は3施設で実施されていた。電気泳動装置は57施設で記入があり、さまざまなタイプのMupidが41施設で最も多く、E-gelが6施設、その他のアガロース電気泳動装置が4施設、自動解析装置が5施設で使用されていた。

6. 事後アンケートのまとめ

事後アンケートは、12月28日までに70施設の協力が得られた。

今回の精度管理調査で使用した培地や試薬について、日常からの準備状況を尋ねた（表4）。多くの地衛研で、選択分離培地ではTCBS、性状確認培地ではVP試験や耐塩性試験、オキシダーゼ試験、血清凝集反応用の免疫血清やO139血清、CT遺伝子検査用のプライマーを日常検査で使用していた。精度管理用に、マニュアルに記載された各種プライマーを準備した施設もあった。培地や試薬について、自由記載欄に12件の意見が寄せられた。

実際の検査手順や検査内容についてのアンケート結果を表5にまとめた。

安全キャビネットは、試料の開封や培地への接種、テンプレート作製に使用した施設が多かったが、30施設では使用していなかった（表5a）。

O1抗原の型別について、検査内容の詳細を集計した（表5b）。試料1は、免疫血清で稲葉型と判定した施設が64施設あり、56施設は生菌で、8施設は加熱死菌で判定していた。このうち35施設はラテックスも実施しており、28施設では稲葉型と判定されたが7施設は判定不能であった。2施設は免疫血清、ラテックスともに彦島型と判定していた。血清凝集反応でO1抗原陽性と判定できなかった施設が4施設あり、このうち2施設はPCR法でO1抗原陽性と判定したが、2施設はPCR法未実施で「O1抗原陰性」と報告していた。試料2は、免疫血清またはラテックスにより69施設で小川型と判定された。免疫血清の判定は、56施設は生菌で、12施設は加熱死菌で行われていた。

免疫血清で小川型と判定されたもののラテックスでは判定不能となった施設は 2 施設あった。1 施設は、免疫血清、ラテックスともに判定不能であった。なお、血清凝集反応で彦島型あるいは判定不能と判定した施設には試料の再送付を含めて再検査を依頼し、5 施設から生菌を用いた凝集反応で良好な結果を得たと報告された。

試料 1 および 2 について生物型別を実施した施設は 31 施設 (44.3%) で、29 施設でどちらもエルトール型と判定されていた (表 5c)。判定の根拠となった試験項目は、ヘモリシン遺伝子の鑑別が 24 施設と最も多く、ついで VP 試験が 14 施設であった。ファージ感受性試験を実施した施設はなかった。VP 試験やニワトリ赤血球凝集性を実施したが判定不能となった施設が 2 施設あった。

RPLA 法で CT 産生性試験を実施した施設に毒素産生の培地を尋ねたところ、CAYE 培地または CAYE-L 培地が最も多く 16 施設で使用されていた。寒天培地発育菌から実施した施設もみられた。

検査項目ごとに、陽性対照および陰性対照の使用状況を質問した (表 5d)。コロニー観察や生化学的性状試験、血清凝集反応で対照を使用した施設は少なかった。コレラ菌免疫血清では、10 施設が陰性対照に生理食塩水を使用したと回答していた。PCR 法では 74.3~89.4%の施設で対照を使用しており、陽性対照は *V. cholerae* O1 または O139 の CT 陽性株あるいはその DNA 抽出液が、陰性対照には滅菌水が多く使用されていた。コレラ菌 AD、市販の CT 遺伝子検出用プライマー、RPLA 法による CT 産生性試験では、試薬に添付の対照が使用されていた。

コレラ菌の判定を行政に報告する場合に必要と考えられる検査項目については、陽性判定の場合は 48 とおり、陰性判定は未記入の 1 施設を除いて 49 とおりの回答があった。陽性判定には、血清凝集反応、CT 遺伝子の確認、TCBS でのコロニー観察をあげる施設が多く、陰性判定でも同様であった (表 5f)。一方で、陽性判定に血清凝集反応または PCR による O1 抗原、O139 抗原の確認

のどちらも選択しなかった施設が 2 施設、CT 遺伝子の確認または CT 産生性の確認を選択しなかった施設が 1 施設みられた。

コレラ菌の保存培地については、67 施設から回答があり、このうち 17 施設では複数の方法で保存していた。保存培地は、スキムミルクまたはマイクロバンクで凍結保存、あるいはカジトン培地で室温保存がよく使われていた (表 5g)。

自由記載欄には、血清凝集反応や耐塩性試験などで判定に迷った点などが記載されていた。マニュアルや培地等への質問には、個別に回答した (表 5h)。特に PCR 法については、使用する Taq polymerase によって増幅条件が異なる場合があり、マニュアルの改訂を予定している。

7. 感染症検査体制アンケートの結果 (別添 6)

検査に関する部門責任者など、多くの機関で体制は整っていないかった。安全キャビネットは 1 機関を除き設置されていたが、その使用方法は菌株によると回答したところが多かった。微量分注器などの校正については、半数以上で実施されておらず、予算がないことがその理由であった。フランシスなどの機器類は、日常点検は概ね実施されていたが、その結果を記録している機関は 10~30%程度であった。培地については、使用時に記載する機関が多かった。また、陽性コントロールは遺伝子検査ではほぼ用いられていたが、培養検査では用いられていない状況であった。機器類の管理、試薬の管理等、食品 GLP と重なる部分についてはよく実施されている傾向であった。改正感染症法が施行される平成 28 年 4 月以降、これらの検査体制がどのように変化するのか調査し、その結果を共有すべきであると思われる。

D. 考察

コレラの届出には、*V. cholerae* の分離・同定に加えて、O1 または O139 抗原の検出および CT 産生または CT 遺伝子の確認が必須である。今回の外部精度管理調査により、コレラの原因となるコレラ菌の検査について、地衛研では概ね適切に実施されていることがわかった。

特に CT 産生あるいは CT 遺伝子の確認については、74 施設で一致した結果が得られていた。CT の検出に使用された VET-RPLA (デンカ生研) の添付文書には、コレラ菌毒素産生培地として Syncase 培地 (Finkelstein, 1966) が記載されているが、RPLA 法を実施した約半数の施設では CAYE 培地や CAYE-L 培地を使用しており、AKI 培地も使用されていた。これは、エルトール型のコレラ菌は Syncase 培地では毒素産生能が低いとの報告 (Iwanaga, 1985、松本, 1991) によるものと推察される。毒素産生用に工夫されていない一般的な培地を使用した施設でも CT 産生性が確認されており、今回送付した検体の判定については、培地による影響は少ないと推察された。PCR 法においても、少なくとも 4 種類の CT 遺伝子検出用プライマーが使われていたが判定は一致しており、CT の判定に関わる検査に問題はないと考えられた。

O1 抗原の検出については、一部の施設で陰性となった。コレラ菌の O1 抗原は抗原因子 (A, B, C) の有無によって小川型 (AB(C))、稲葉型 (AC)、彦島型 (ABC) に区別される。免疫血清の添付書類には、混合血清に凝集した場合、小川型、稲葉型の単味血清で型別し、単味血清に凝集しない場合は判定保留とすること、生菌で凝集陰性の場合には加熱死菌で再試験することが記載されている。また、ラテックスの添付文書によると、感作ラテックス a および b が陽性の場合を小川型、a および c が陽性の場合を稲葉型、すべて陽性の場合を彦島型と判定し、対照ラテックスに凝集した場合は非特異凝集となる。試料 1 は稲葉型、試料 2 は小川型の株を送付したが、事後アンケートの集計から血清凝集反応で 2 株とも正しく型別されたのは、70 施設中 63 施設であった。試料 2 は、1 施設で判定不能であったが、CT 遺伝子陰性であったため精査の必要がないと判断されていた。試料 1 では、2 施設で彦島型、4 施設で判定不能と判定されたが、この 6 施設は試料 2 では小川型と正しく型別できていた。免疫血清で稲葉型と判定できたがラテックスでは判定不能となった施設も 7 施

設あり、自由記載欄に感作ラテックス b に遅れて凝集したため判定に迷ったと記載した施設もみられた。「稲葉型」と判定されなかった原因については、使用した免疫血清やラテックスの劣化、凝集反応に供した菌株が不適切 (ラフ型) 等の要因が考えられたが、同じロットの免疫血清であっても、混合血清や小川型単味血清に比べ稲葉型単味血清は凝集が弱い可能性も推察された。また、1 施設は検査開始まで検体を冷蔵庫に保管していたが、検査結果への影響は判断できなかった (詳細は森本らの分担報告書)。

届出に小川型、稲葉型の型別は必要ないが、免疫血清では単味血清に凝集しない場合は判定保留となり、届出基準を満たすことができない。本調査では、49 施設が PCR 法による O1 抗原および O139 抗原の確認を実施しており、試料 1 では血清凝集反応で判定陰性の 2 施設も PCR 法により O1 抗原陽性と報告していた。免疫血清やラテックスについては使用期限内のものを常備するのは困難との意見も寄せられており、血清凝集反応で判定不能の場合、特に CT あるいは CT 遺伝子陽性の場合には、PCR 法を実施すべきであると考えられた。

本調査は、医療機関や検査機関で分離されたコレラ菌疑い株の検査を想定して実施したが、分離株として搬入された場合、純培養であるかどうかの確認は必須である。検査経過記録書によると全施設で純培養の確認が実施されていたが、選択分離培地のみを記載した施設があったが、コレラ菌の選択分離培地は、塩類の含有量が多く pH が高い (pH 8.4~9.0) ことから、*Vibrio* 属菌以外のほとんどの菌は発育が抑制される。したがって、純培養の確認には非選択培地の使用が望ましい。また、*Vibrio* 属菌の鑑別性状である耐塩性試験において、*V. cholerae* は食塩濃度 0%での発育確認が必須であり、本調査では多くの施設で 0~10%の 3~6 段階の濃度で実施していた。0%で発育陰性であった場合に接種ミスを否定するためにも、0%に加えて少なくとも 1%または 3%を実施する方が良いと考えられた。

配付株の選定にあたっては VP 試験の性状も確認項目とし、陽性株を送付したが、試料 1 および 2 について生物型別を実施した 31 施設のうち、2 施設で判定不能であった。また、エルトール型と判定できた施設でも、陽性判定まで時間がかかったと記載した施設があった。いずれの施設も、市販 VP 半流動培地が使用されていたが、培地の食塩濃度については回答を求めておらず不明である。前述のように、コレラ菌は食塩濃度 0% で発育可能であるが、生化学的性状試験では食塩濃度 1~2% が望ましい。市販生培地を使用する場合は、高濃度の滅菌食塩水を加えるとよい。

行政への報告に必要な検査項目について、わずかではあるが O1 抗原および O139 抗原の検出や CT 産生または CT 遺伝子の確認をあげない施設があった。質問の意図が正しく伝わらなかった可能性もあるが、本調査担当者の約 3 割にコレラ菌検査の経験がなかったことから、地衛研職員が参加する研修等の機会に、コレラの届出基準や「コレラ菌検査・診断マニュアル」を周知する必要がある。

対照（株）の使用状況について、PCR 法では陽性対照、陰性対照の使用率が高かったものの 100% ではなかった。血清型別においても、使用している免疫血清やラテックスの内部精度管理に对照株が必要である。陽性対照株の入手が困難との意見もあり、コレラ菌だけでなく「病原体等検査の業務管理要領」が適用される範囲については、国立保健医療科学院の細菌研修等を通して提供してもらうよう国に要望すべきである。その際、適切な菌株保存方法についても指定していただきたい。コレラ菌の保存方法についての回答から、同じ保存培地であっても保存温度や保存期間は施設によって異なっていた。保存設備の有無など施設によって事情は異なるが、できる範囲で最適な方法が望まれる。

本研究班で地衛研の 9 割以上が参加する大規模な外部精度管理調査を実施することができ、今後の参考となる反省点が明らかになった。まず、配布株の選定にあたっては、検体の保存条件を考慮

したプレチェックが必要であった。検体の発送に関しては、地衛研から表示などの体裁を整えた菌株搬送容器を送ることで発送元の負担を軽減し、少なくとも感染研細菌第一部からの発送は可能であることが検証できた。参加施設から提出された各種文書のとりまとめに関しては、送信された添付ファイル名の重複や異なるファイル形式での提出、未提出施設の確認と督促などに対応が必要であり、集計に至るまでの事務作業にある程度時間を要した。また、検査経過記録書や事後アンケートは様式を統一したが、施設によっては回答にふさわしい選択肢のない場合があり、未記入や記載ミスと考えられる回答もみられた。多様な回答を想定し、記入しやすい様式を作成することは今後の課題であるが、受領直後に内容を確認して不明な点を提出元に問い合わせるなど、集計と解析を担当する専従者の必要性を感じた。

参加施設のご協力に感謝するとともに、本調査結果が検査能力の向上につながることを期待したい。

E. 結論

三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定について外部精度管理調査を実施し、74 施設の地衛研で概ね適切に検査が行われていることがわかった。今後も、コレラの届出基準を正しく理解し、地衛研で正確に判定できるよう準備しておくことが大切である。

コレラ菌の同定に必要な O1 抗原の検出について、血清凝集反応で判定不能の場合は PCR 法を実施すべきである。

大規模な外部精度管理調査を実施するにあたって、配付株の選定には検体の保存条件を考慮する必要がある。また、実施結果の集計や解析は専従者が担当することが望ましい。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表1 コレラ菌外部精度管理調査実施スケジュール

日付	実施内容・送付文書など
7月1日	コレラ菌検査・診断マニュアルを感染研ホームページに掲載
7月14日	ワーキンググループ会議
8月17日	地衛研代表メーリングリストに実施案内等(別添1)を送付 ・実施案内 ・別紙1 菌株搬送容器の準備 ・別紙2 菌株搬送容器発送チェックシート ・別紙3 参加申込書及び誓約書
8月26日	参加申し込み締め切り
9月1日	コレラ菌検査・診断マニュアル 修正版を感染研ホームページに掲載
9月2日	参加施設へ実施案内等(別添2)を送付 ・検査手順書 ・検査結果報告書 ・検査経過記録書 ・感染症検査体制アンケート
9月9日	菌株搬送容器の感染研への送付日を連絡(別添3)
10月1, 2日	検査試料を感染研から発送
10月2, 5日	参加施設に検査試料が到着
10月23日	試料輸送中の温度管理記録データの提出を依頼
10月26日	検査結果報告書、検査経過記録書および感染症検査体制アンケート 提出締め切り
10月30日	温度管理記録データ提出締め切り
12月18日	結果報告書のまとめ(別添4)を送付 事後アンケート(別添5)を依頼
12月25日	事後アンケート提出締め切り

表 2 検査結果報告書のまとめ

	試料	判定結果	検査内容	施設数
1	V. cholerae O1 CT陽性	陽性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	72
		陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陽性	2
2	V. cholerae O1 CT陰性	陰性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陰性	66
		陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陰性	1
		陽性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陰性	7
3	V. cholerae O139 CT陽性	陽性	O139抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	74

表 3 検査経過記録書のまとめ

a. 検査担当者情報

担当	記載数	コレラ菌検査の経験			細菌検査の経験		
		なし	5年未満	6年以上	なし	5年未満	6年以上
検査担当者	133	42	54	37	1	61	71
検査区分責任者	11	1	6	4	1	1	9
検査部門責任者	5	4	0	1	3	0	2
その他	2	2	0	0	0	1	1
合計	151	49	60	42	5	63	83

b. 検査開始日と検体の保管温度

試料到着日	検査開始日	施設数	検査開始までの検体保管場所(施設数)
10月2日	10月2日	1	冷蔵庫(1)
	10月5日	1	常温(1)
10月5日	10月5日(すぐに検査開始)	44	
	10月5日(数時間保管)	16	冷蔵庫(13), 安全キャビネット(1), 検査室(1), 室温(1)
	10月6日	8	冷蔵庫(1), 検査室(4), 管理区域内(1), 鍵付き保管庫(1), 指定菌株保管場所(1)
	10月7日	2	冷蔵庫(1), 検査室(1)
	10月14日	1	冷蔵庫(1)
	10月21日	1	SOPの指定場所(1)

c. 純培養であることを確認した培地

使用培地数	培地名	施設数
1	食塩加NA	31
	食塩加TSA	4
	食塩加HI	1
	NA	1
	TSA	2
	TCBS	14
	クロモアガーVibrio	2
2	食塩加NA+血液寒天	1
	食塩加NA+TCBS	3
	食塩加TSA+TCBS	1
	食塩加HI+TCBS	1
	TCBS+クロモアガーVibrio	3
3	食塩加NA+TCBS+クロモアガーVibrio	4
	食塩加NA+TCBS+ビブリオ寒天	1
	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天	3
4	食塩加NA+TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天	1
5	食塩加NA+TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天+PMT	1

NA:普通寒天, TSA:トリプトソイ寒天, HI:ハートインフュージョン寒天

d. 検査に使用した選択分離培地

使用培地数	培地名	施設数
1	TCBS	21
2	TCBS+クロモアガーVibrio	22
	TCBS+ビブリオ寒天	8
	TCBS+X-VP	2
	TCBS+PMT	1
3	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天	17
4	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天+PMT	2
	TCBS+クロモアガーVibrio+ビブリオ寒天+X-VP	1

e. 分離菌性状検査の実施状況と使用培地

検査項目	使用培地(使用施設数)					未実施	
ブドウ糖	TSI	(72)	単糖代謝確認培地	(2)			
乳糖	TSI	(68)	単糖代謝確認培地	(5)		1	
白糖	TSI	(69)	単糖代謝確認培地	(5)			
運動性	LIM	(66)	SIM	(5)	半流動培地	(3)	
インドール	LIM	(67)	SIM	(5)	市販キット	(2)	
リジン脱炭酸	LIM	(71)	メラーのアミノ酸培地	(2)	その他	(1)	
VP試験	VP半流動培地	(64)	簡易同定キット	(1)	その他	(7)	2
耐塩性試験	食塩濃度(%)	0	(2)				
		0, 3, 8	(1)				
		0, 3, 7, 10	(2)				
		0, 3, 8, 10	(7)				
		0, 3, 6, 8, 10	(60)				
		0, 3, 7, 8, 10	(1)				
		0, 1, 3, 6, 8, 10	(1)				

表4 使用した培地・試薬などの準備状況(事後アンケートの集計)

培地・試薬	日常検査で 使用している	精度管理用に 準備した	実施(使用) していない	未記入
選択分離培地				
TCBS	69	1		
クロモアガーVibrio	34	7	28	1
ビブリオ寒天	19	7	44	
PMT	3	2	65	
X-VP	3	1	66	
性状確認培地				
VP試験	61	6	3	
耐塩性試験	61	9		
オキシダーゼ試験	69	1		
単糖代謝確認培地	41	5	24	
アミノ酸脱炭酸培地	46	5	19	
簡易同定キット	33		37	
その他の性状試験				
O/129ディスク感受性	7		63	
ニワトリ赤血球凝集性	1	2	67	
ヒツジ赤血球溶血性	2	1	67	
ポリミキシンB感受性	2	1	67	
血清凝集反应用試薬				
コレラ菌免疫血清 混合	68	2		
コレラ菌免疫血清 稲葉型	67	2	1	
コレラ菌免疫血清 小川型	67	2	1	
ビブリオコレラ免疫血清O139	65	5		
コレラ菌AD (ラテックスキット)	37	1	32	
PCR法によるCT遺伝子検査				
検出マニュアルのプライマー	33	17	20	
市販プライマーセット	28	3	38	1
その他(自家合成)	9		56	5
RPLAによるCT産生性の確認				
VET-RPLA	31	2	37	
その他の遺伝子検査				
<i>V. cholerae</i> 確認用プライマー	16	17	37	
O1抗原, O139抗原の確認用 プライマー	30	18	22	
生物型確認用プライマー	11	15	44	

表 4 使用した培地・試薬などの準備状況(事後アンケートの集計)つづき

自由記載欄の意見など

- 1 昨年度までは日常検査でコレラ菌の遺伝子検査を実施していなかったが、検出マニュアルが作成された時点で検査項目に追加し、必ず実施するようにした。
単糖代謝確認、アミノ酸脱炭酸、O/129ディスク感受性試験、ヒツジ赤血球溶血性、ポリミキシンB感受性については、コレラ菌の通常の検査では実施しておらず、今回の外部精度管理でも実施していないが、必要に応じて実施することとしている。
- 2 リジン脱炭酸試験をLIM培地で実施した。なお、今回は実施していないが、通常、単糖代謝の確認は、簡易同定キットで実施している。
- 3 PCR法によるCT遺伝子検査用プライマーは、小林ら(感染症誌, 64:1323-1329, 1990)を使用している。
- 4 その他の性状試験について、O/129ディスク感受性およびポリミキシンB感受性の試験については、必要に応じて実施することもある。
- 5 コレラ菌検査の依頼は、ほとんどありません。今回、精度管理として実際に遺伝子検査を行うことが出来たため、今後は遺伝子検査を導入していきます。
- 6 PCRの陽性コントロール(O1及びO139)については、入手が難しいと思います。研究班で手配等していただけるとありがたいです。
- 7 RPLA: キットを準備しているが実施していない。
- 8 病原体検出マニュアルの各種プライマーを、今後は日常検査で使用する予定。
- 9 今回の精度管理ではRPLAによるCT産生性の確認のための検査を実施していませんがVET-RPLAは常備しています。
- 10 クロモアガーVibrioは、期限切れのものを使用しました。また免疫血清は、日常検査で使用しているものとは別に新調しました。
当方では、コレラ菌検査は数年に1例程度しかなく、期限内の試薬類すべてを常備するための予算を獲得するのに苦慮しています。他所さんは如何でしょうか。
- 11 実施項目を『三類感染症検査に係る「コレラ菌」の同定』ではなく、『三類感染症の原因となる「コレラ菌」の同定』にしていただければNo.2の判定が判りやすかったと思います。
- 12 血清凝集反应用試薬およびRPLA試薬は常備していましたが、期限切れであったため今回新たに購入しました。

表 5 実際の検査手順および検査内容の詳細(事後アンケートの集計)

a. 安全キャビネットの使用状況

作業内容	安全キャビネット 使用施設数
試料の開封	25
培地への接種	28
培地の観察	11
血清凝集反応	19
テンプレート作製	25
PCR反応液の作製	15 (5)
使用していない	30
カッコ内アはクリーンベンチ使用施設数	

b. O1 抗原の型別実施状況

・ 試料1			・ 試料2		
免疫血清	ラテックス	施設数	免疫血清	ラテックス	施設数
生菌で稲葉型	稲葉型	24	生菌で小川型	小川型	26
生菌で稲葉型	判定不能	5	生菌で小川型	判定不能	2
生菌で稲葉型	未実施	27	生菌で小川型	未実施	28
加熱死菌で稲葉型	稲葉型	4	加熱死菌で小川型	小川型	8
加熱死菌で稲葉型	判定不能	2	加熱死菌で小川型	未実施	4
加熱死菌で稲葉型	未実施	2	混合のみ実施	小川型	1
生菌で彦島型	彦島型	1	判定不能	判定不能	1
加熱死菌で彦島型	彦島型	1			
加熱死菌で判定不能	判定不能	1			
加熱死菌で判定不能	未実施	2 ^a			
混合のみ実施	判定不能	1 ^b			

a 1施設はPCR法でO1抗原陽性と判定
b PCR法でO1抗原陽性と判定

c. 生物型別の実施状況

実施の有無(判定結果) ^a	検査項目	施設数 ^b
実施した(エルツール型)		29
	VP試験	14
	ニワトリ赤血球凝集性	2
	ヒツジ赤血球溶血性	1
	ポリミキシンB感受性	1
	ファージ感受性	0
	ヘモリシン遺伝子の鑑別 ^c	24
	rtx因子の有無	2
実施した(判定不能)		2
	VP試験	2
	ニワトリ赤血球凝集性	1
実施しなかった		39

a 試料1と試料2は同じ結果であった

b 検査項目は複数実施した施設がある

c マニュアルに記載の生物型別用PCRなど

d. 毒素産生試験に使用した培地

培地名	施設数
CAYE培地, CAYE-L培地	16
Syncase培地, コレラ菌毒素産生培地	8
食塩加普通寒天培地, 食塩加BHI寒天培地	3
酵母エキスブイヨン	2
AKI培地	1
BHIブロス	1
試薬添付文書記載培地	1
記載なし	1

BHI:ブレインハートインフュジョン

e. 対照(株)の使用状況

検査項目	回答数 ^a	陽性/ 陰性	対照使用 施設数(%) ^b	使用株など ^c									
				A	B	C	D	E	F	G	H	I	
選択分離培地でのコロニー観察	70	陽性	12 (17.1)	4	10	6	1		1	1			
	58	陰性	5 (8.6)								2	3	
生化学的性状の確認	69	陽性	10 (14.5)	3	9	5	1			1			
	57	陰性	5 (8.8)								2	2	1
血清凝集反応;コレラ菌免疫血清	70	陽性	12 (17.1)	5	11	5	1		1	1			
	58	陰性	16 (27.6)								2	4	10
血清凝集反応;コレラ菌AD	50	陽性	8 (16.0)	2	5	3		2	1	1			
	43	陰性	7 (16.3)								1	3	3
PCR法によるCT遺伝子確認	67	陽性	56 (83.6)	17	30	17	2	6	1				8
	66	陰性	59 (89.4)								2	57	
RPLA法によるCT産生確認	35	陽性	21 (60.0)		3	2		18					
	33	陰性	15 (45.5)					3		1	3	8	
PCR法による <i>V. cholerae</i> 確認	35	陽性	26 (74.3)	7	20	5	1		1	1			
	34	陰性	29 (85.3)								1	28	
PCR法によるO1, O139抗原確認	50	陽性	38 (76.0)	12	26	29	3		1				3
	47	陰性	40 (85.1)								2	39	

a 当該検査項目を実施しなかった施設、未記入を除く

b 実施施設にしめる使用施設数の割合

c A. *V. cholerae* O1 稲葉型 CT陽性

B. *V. cholerae* O1 小川型 CT陽性

C. *V. cholerae* O139 CT陽性

D. *V. cholerae* non-O1, O139 C CT陽性

E. 試薬に添付の陽性対照

F. *V. cholerae* O1 小川型 CT陰性

G. *V. cholerae* non-O1, O139 CT陰性

H. 滅菌水

I. その他

f. 行政報告に必要な検査項目

検査項目	陽性判定に必要	陰性判定に必要
TCBSでのコロニー観察	65	66
TSI寒天培地の性状	61	54
LIM培地の性状	61	54
オキシダーゼ	54	47
無塩ブロスでの発育	52	47
VP試験	46	40
その他の生化学性状	10	9
PCRによる <i>V. cholerae</i> の確認	15	19
血清凝集反応	67	51
PCRによるO1抗原, O139抗原の確認	27	27
CT遺伝子の確認	65	57
CT産生性の確認	25	16
生物型の確認	13	3
その他	4	4

g. コレラ菌の保存培地と保存条件

	スキム ミルク	マイクロ バンク	グリセリン 加培地	カジトン 培地	ドルセット 卵培地	半流動(軟 寒天)培地	その他	
保存温度	-80°C	23	20	5			4	
	-20~-70°C	1	1	1			1	
	4°C				2			
	室温 ^a				18	2	2	5
保存期間	永年, 無期限 ^b	19	9	5	11			6
	20年以上	1			1			
	10~20年	1	2		1			
	数年	1	4	1	3	1		
	1年		3		1		1	
	数ヶ月				1		1	3
	未記入	2	3		2	1		1

a 常温, 22.5°C, 25°Cを含む

b 決めていないを含む

h. 自由記載欄の意見・質問など

安全キャビネットの使用状況

- 1 血清凝集反応は、混和までは安全キャビネット内で行ったが、観察は困難であったため安全キャビネット外で実施。また、テンプレート作製も、菌液調整までは安全キャビネット内で行ったが、加熱・遠心は安全キャビネット外で実施。

血清型別

- 2 試料1のコレラ菌ラテックスキットの結果について：感作ラテックスaとcに対して明瞭な凝集が見られたが、感作ラテックスbに対しても弱い凝集が見られたため、判定不能とした。
- 3 試料2 生菌で実施したが判定不能であった。
- 4 コレラ菌免疫血清→試料1と試料2はコレラ菌免疫血清（混合）を使用しました。試料1は(+)、試料2は(2+)です。
- 5 試料1のラテックスによる凝集反応は、ラテックスa及びcに凝集後、わずかに遅れてラテックスbにも凝集し、判定に迷った。

行政への報告に必要な検査項目

- 6 血清凝集反応が不明瞭の場合、10.PCRIによるO1抗原、O139抗原の確認を実施、CTの確認については、11または12どちらかを実施するばよいと考えます。
- 7 陰性判定の根拠とする検査項目は事例により異なると考えますが、TCBS上で疑わしいコロニーが明らかに認められない場合には、その段階で陰性との判定は可能だと考えます。

菌株保存

- 8 イフキ懶製造販売の菌株保存用バイアル“マイクロバンク”を使用。
保存期間の定めは特に指定していないが、コレラ菌株保存の場合、4年間保存でも性状が失われないことを確認済み。
- 9 菌株保存については、標準作業書に期間を設定していないので、回答欄を空欄にしています。
- 10 コレラ菌株の保存において、適切な継代培養の頻度(何週間に一回等)があれば教えていただきたい。
- 11 コレラ菌株で最も古いものは平成13年に保存したものです。

その他

- 12 0%NaCl加ブロスでの発育が、試料1は(-)、試料3は極弱い発育(±)で、培地を作り直して再検査しても同様で、判定に迷いました。
- 13 実際の検査手順や内容についてという質問であるのに、通常の行政への対応や菌株保存という質問があり、紛らわしい。
- 14 報告されているPCR用プライマーは様々あるため、使用可能なものについてはマニュアル等で併記してもらいたい。特に今回の検体のように、*V. cholerae*でO1であるにもかかわらずCT遺伝子(-)のような場合は、別のプライマーで確認する等必要ではないかと感じた。
一部非典型的な性状だった場合、コレラの届け出にはならないのは防疫上問題ないのか不安である。
- 15 検査マニュアルについての質問
・Ⅲ-1-a-③耐塩性試験培地について、食塩を添加するとpHが低下するがpH調整は必要ないでしょうか。
・Ⅲ-1-c-⑥-1*V. cholerae*確認用PCRのPCRの条件について、伸長反応68°Cは正しいでしょうか。
・Ⅲ-1-c-⑥-3生物型確認用PCRのPCR反応液の組成について、dNTP混合液0.5 μL/25 μL反応系は正しいでしょうか。
- 16 市販血清の期限管理について教えていただきたい(冷凍状態での期限等)。
- 17 「*V. cholerae* non-O1, non-O139 の CT(+)」は感染症法の届出対象外になるのかと思われますが、取扱い上の注意点や感染症としての問題はないと考えていいのでしょうか。

回答

15 耐塩性試験培地のpHについて

*Vibrio*属菌の多くはpH7~8を好むとされていますが、*V. cholerae*はpH6.0~9.6で発育します(出典：食品由来感染症と食品微生物)。使用する培地に応じて、必要な場合はpHを調整してください。

*V. cholerae*確認用PCRの伸長反応の温度

PCR条件は、使用するTaqにあわせて変更してください。

マニュアルはKOD-FX-Neoを使用した場合の条件を記載しましたが、説明不足であった点をお詫びします。

生物型確認用PCRのdNTP混合液の量

原著論文(Riveraら, Appl. Environ. Microbiol. 67:2421-2429)を参考に記載しましたが、使用するTaq等にあわせて変更して下さるようお願いいたします。

16 市販血清を冷凍保存した場合の使用(有効)期限

デンカ生研の添付文書には、凍結をさけるよう記載されています。

「凍結させた場合は、品質が変化して正しい結果が得られないことがありますので使用しないでください。」と明記されていますので、ご理解ください。

17 *V. cholerae* non-O1, O139 CT陽性株の取扱い上の注意点や感染症としての問題点

特定病原体にはなりませんが、腸炎ビブリオなど同様の「病原体」としての取扱いをお願いします。

また、食中毒の場合は「ナグビブリオ」に該当します。

CT陽性のnon-O1, O139 *V. cholerae*は貴重な研究材料ですので、感染研へ血清型別等を依頼されることをお勧めします。

取扱様式 8 海外用
 WHO コラボレーションセンター
 国内用

特定病原体等分与（譲渡）申請書

国立感染症研究所長 殿

申請日 平成 27年9月10日
 申請者 細菌第一部（センター・室）長
 氏 名 大西 真 ㊞

国立感染症研究所病原体等安全管理規程第 20 条第 2 項の規定に基づき、特定病原体等の分与について申請します。

1. 分与する特定病原体等の名称(種別, BSL) (毒素にあつては種類及び数量)	Vibrio cholerae (コレラ菌) 01, 0139 (特定四種, BSL2)			
2. 家畜伝染病予防法に基づく輸入品分与許可の有無	(有 ・ <input checked="" type="checkbox"/> 無) 有の場合は、許可証明書の写しを添付すること。 無の場合は、その理由を次の中から選ぶこと。 <input checked="" type="checkbox"/> 1. 国内分離株のため 2. 監視伝染病の病原体でないため 3. その他：理由 ()			
3. 移 動 理 由	外部精度管理のため			
4.	許可または届出の有無 (二種及び三種)注②			
	分与先機関名	別添 (73箇所)		
	分与先機関の移動責任者	所 属	別添	
		氏 名	別添	
連 絡 先	住 所	別添		
	TEL:	別添	e-mail:別添	
5. 移 動 方 法 注③	<input checked="" type="checkbox"/> 1. 郵便 2. 配達業者 () 3. その他 ()			
6.	分 与 担 当 官	職 名：主任研究官 氏 名：荒川英二 ㊞		
	庁舎名・搬出実験室名	庁舎名：戸山庁舎 実験室名：02-047		
	BSL2 実験室運営責任者、又は BSL3, 4 実験室運営責任者	泉谷秀昌	㊞	
	BSL2 特定病原体等取扱責任者 又は BSL3, 4 病原体等取扱責任者	泉谷秀昌	㊞	
7. 移 動 予 定 日 注④	平成 27年 10月 1 および 2 日 公安委員会届出年月日 届出者 届出公安委員会名			
8. 備 考	承認日： 整理番号：			

注意事項

- ①この申請書は、特定病原体等を感染研以外の機関へ分与する場合に提出する。分与の承認を受けている場合は、病原体等分与承認書(写)の承認日及び整理番号を備考欄に記入すること。
- ②「4. 許可の有無」の欄は、感染症法に基づく分与先の二種病原体等許可所持者の許可の有無または三種病原体所持届出の有無を記載すること。
- ③カッコ内には具体的な名称ないし方法を記入する。
- ④二種及び三種病原体の分与の際には、移動予定日のほか公安委員会への届出にかかる事項を記載すること。

国立感染症研究所での病原体等輸送に関わるチェックシート ト輸送分類“カテゴリーA”

国立感染症研究所病原体輸送要領、および WHO 病原体等輸送ガイダンスは、バイオセーフティ管理室の HP に掲載されています。

特に、カテゴリーA 病原体の例については要参照のこと。感染症法では、一種、二種、三種病原体等は運搬について公安委員会の運搬許可証が必要となるので管理室に要相談。表やフロー図を参照し輸送分類を決めてください。

NIID-Biosafety 番号 : 20 - (バイオセーフティ管理室記入)		平成 27 年 10 月 1 日
荷送人 : 荒川英二	所属部/室/センター : 室 : 細菌第一部 第二室	戸山・村山・ハンセン内線番号 : E-mail :
受取人 : 別添	送り先住所 : 〒 別添	電話:別添 E-mail :別添
送付内容(病原体等名) : コレラ菌 非特定・ 特定 (一種・二種・三種・ 四種)	一次容器の種類と個数及び検体量 : チューブ、3、各_____	輸送分類“カテゴリーA” : レ
バイオリスク運営委員(サイン):泉谷秀昌 所属 (部/室/センター):		内線番号 : 2 2 3 0 E-mail : izumiya
バイオセーフティ管理室	(サイン) :	年月日 : 平成 年 月 日
事務担当官	(サイン) :	荷物の追跡結果 : 平成 年 月 日

基本三重梱包 (Basic triple packaging system) のチェックシート

チェック項目	Yes	No
1. 国連規格の病原体輸送容器を使用し、正しく梱包しているか		
2. 検体を入れる一次容器は防水性で密閉性(防漏性)があるか		
3. 液体検体か (Yes の場合は 3-1 へ、No の場合は 4 へ)		
3-1. 液体検体を全量吸収出来る、十分な吸収材を入れたか		
3-2. 一次容器のキャップに適切なシールを施したか		
4. 複数検体を入れたか(Yes の場合は 4-1 へ、No の場合は 5 へ)		
4-1. 検体は何種類で何本か (種類 ・ 本)		
4-2. 複数検体は個別包装し相互に接触しないか		
4-3. 三次容器の内側に無関係な物質を入れていないか		
5. 適切なクッション材を二次容器と三次容器に入れたか		
6. 送付検体一覧表を二次容器と三次容器の間に入れたか		
7. 冷却剤は使用しているか(Yes の場合は 7-1 へ、No の場合は次ページへ)		
7-1. 冷却剤の種類は [水 ・ 保冷材 ・ ドライアイス ・ その他()]		
注) 液体室素を使用する場合はバイオセーフティ管理室に要事前連絡		
7-2. 冷却材にドライアイスを使用している場合は、二次容器より外側に入れたか		非該当

送付内容の項目及び 7-1 では該当するものを○で囲んで下さい。

一次容器と二次容器はしっかりと密封し、バイオリスク管理運営委員によるチェック後、外装(三次)容器とオーバーパックを閉じずに指定の場所までお持ち下さい。

バイオセーフティ管理室のチェックを受けて下さい。

輸送分類 “カテゴリーA” の包装、ラベル、書類のチェックシート

チェック項目	Yes	No
分与等の要領の様式5（病原体等移動（分与）申請書）に対する承認書または様式8（病原体等移動（分与）届）に対する受理書、特定病原体の場合は管理規程の取扱様式8（特定病原体等分与（譲渡）申請書に対する承認書はあるか または 写しを添付したか		
病原体等は特定一種～三種病原体等であり、公安委員会への届出・証明書が揃っている		非該当
荷送人は輸送業者・荷受人と連絡がとれているか ※二種・三種の場合別途の書類		
〔梱包：国連規格の病原体輸送容器を使用〕		
1. 以下のいずれかの要件に合致しているか		
1-1. 陸上または海上輸送であり、固体検体 400Kg または液体検体 450ℓ 以内である		非該当
1-2. 航空輸送であり、カテゴリーA病原体で 50g 又は 50ml 以内である		非該当
1-3. 航空輸送であり、カテゴリーA病原体で 50g 又は 50ml を超え、4Kg 又は 4ℓ 以内である		非該当
2. 特定病原体等で液体検体の場合または非特定病原体等で 50ml 以上の液体検体の場合、一次容器の口が上を向いているか		非該当
〔三次容器への表示・標識〕		
3. 荷送人の住所・氏名・電話番号の記載はあるか		
4. 輸送荷物を熟知している責任者(通常荷送人)の氏名及び電話番号の記載はあるか		
5. 荷受人の住所・氏名・電話番号の記載はあるか		
6. ヒトに関わる病原体等の場合「区分 6.2 標識ラベル」が貼付され、「UN2814 Infectious substance affecting humans」及び正味量(Net Qty)の表示		非該当
7. 動物のみに関わる病原体等の場合「区分 6.2 標識ラベル」が貼付され、「UN2900 Infectious substance affecting animals」及び正味量(Net Qty)の表示		非該当
8. 三次容器にドライアイス梱包した場合は「第 9 分類標識ラベル」が貼付され、「DRYICE UN1845」及び正味量(Net Qty)の表示		非該当
9. 遺伝子組換え生物または微生物を梱包した場合は「UN3245 ラベル」が貼付され、「Genetically modified (micro) organisms」及び正味量(Net Qty)の表示		非該当
10. 上記 2 に該当する場合、天地無用ラベルを貼付したか		非該当
11. 貯蔵温度の要件があれば記入(オプション) ----- (室温 冷蔵 冷凍)		
〔オーバーパックへの表示〕		
12. オーバーパック（三次容器の外から保冷または複数の三次容器を一まとめ）を使用しているか (Yes の場合は 12-1 へ、No の場合は 13 へ)		非該当
12-1. 発泡スチロールを用いた場合は段ボールやプラダン等で覆われているか		非該当
12-2. オーバーパック表面に上記 3～11 と同じ表示		
12-3. オーバーパック表面に「OVERPACK」の表示		
12-4. 保冷剤にドライアイスを使用した場合は「第 9 分類標識ラベル」が貼付され、「DRYICE」、 「UN1845」、及び正味量(Net Qty)の記載		非該当
〔文書〕		
13. 航空輸送か (Yes の場合は 13-1 へ、No の場合は 14 へ)		非該当
13-1. 危険物申告書及び航空貨物運送状はあるか		
13-2. 見積送り状 (Proforma Invoice) はあるか		非該当
13-3. 輸出入許可書及び申告書等はあるか (必要な場合)		非該当
〔その他〕		
14. ゆうパックを利用するか		非該当
14-1. 送り状に品名「病原体」及び注意書き「危険物」の記載はあるか		
14-2. 金属製のオーバーパック（四次容器）を使用しているか		
14-3. ドライアスを梱包した場合は、送り状の摘要欄に「ドライアイス在中」の記載はあるか		非該当

簡易版チェックシート（数字は参加施設リストに振られた番号となる）

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
1. 関連規格の病原体輸送容器を使用し、正しく梱包しているか	Yes															
2. 検体を入れる一次容器は防水性で密閉性（防漏性）があるか	Yes															
3. 液体検体か（Yesの場合は3-1へ、Noの場合は4へ）	No															
4. 複数検体を入れたか（Yesの場合は4-1へ、Noの場合は5へ）	Yes															
4-1. 検体は何種類で何本か（ 3 種類 ・ 3本 ）	—															
4-2. 複数検体は個別包装し相互に接触しないか	Yes															
4-3. 三次容器の内側に無関係な物質を入れていないか	Yes															
5. 適切なクッション材を二次容器と三次容器に入れたか	Yes															
6. 送付検体一覧表を二次容器と三次容器の間に入れたか	Yes															
7. 冷却剤は使用しているか（Yesの場合は7-1へ、Noの場合は次ページへ）	NO															
分与等の要領の様式5（病原体等移動（分与）申請書）に対する承認書または様式8（病原体等移動（分与）届）に対する受理書、特定病原体の場合は管理規程の取扱様式8（特定病原体等分与（譲渡）申請書）に対する承認書はあるか または 写しを添付したか	Yes															
病原体等は特定一種～三種病原体等であり、公安委員会への届出・証明書が揃っている	—															
荷送人は輸送業者・荷受人と連絡がとれているか ※二種・三種の場合別途の書類	Yes															
1. 以下のいずれかの要件に合致しているか																
1-1. 陸上または海上輸送であり、固体検体400Kgまたは液体検体450L以内である	Yes															
1-2. 航空輸送であり、カテゴリーA病原体で50g又は50mL以内である	—															
1-3. 航空輸送であり、カテゴリーA病原体で50g又は50mL を超え、4Kg又は4L以内である	—															
2. 特定病原体等で液体検体の場合または非特定病原体等で50mL以上の液体検体の場合、一次容器の口が上を向いているか	—															
3. 荷送人の住所・氏名・電話番号の記載はあるか	Yes															
4. 輸送荷物を熟知している責任者（通常荷送人）の氏名及び電話番号の記載はあるか	Yes															
5. 荷受人の住所・氏名・電話番号の記載はあるか	Yes															
6. ヒトに関わる病原体等の場合「区分6.2標識ラベル」が貼付され、「UN2814 Infectious substance affecting humans」及び正味量(Net Qty)の表示	Yes															
7. 動物のみに関わる病原体等の場合「区分6.2標識ラベル」が貼付され、「UN2900 Infectious substance affecting animals」及び正味量(Net Qty)の表示	—															
8. 三次容器にドライアイスを梱包した場合は「第9分類標識ラベル」が貼付され、「DRYICE UN1845」及び正味量(Net Qty)の表示	—															
9. 遺伝子組換え生物または微生物を梱包した場合は「UN3245ラベル」が貼付され、「Genetically modified (micro) organisms」及び正味量(Net Qty)の表示	—															
10. 上記2)に該当する場合、天地無用ラベルを貼付したか	—															
11. 貯蔵温度の要件があれば記入(オプション)……………(室温 冷蔵 冷凍)	室温															
12. オーバーバック（三次容器の外から保冷または複数の三次容器を一まとめ）を使用しているか	Yes															
(Yesの場合は12-1へ、Noの場合は13へ)																
12-1. 発泡スチロールを用いた場合は段ボールやブラダン等で覆われているか	—															
12-2. オーバーバック表面に上記3～11と同じ表示	Yes															
12-3. オーバーバック表面に「OVERPACK」の表示	Yes															
12-4. 保冷剤にドライアイスを使用した場合は「第9分類標識ラベル」が貼付され、「DRYICE」、「UN1845」、及び正味量(Net Qty)の記載	—															
13. 航空輸送か（Yesの場合は13-1へ、Noの場合は14へ）	NO															
14. ゆうパックを利用するか	Yes															
14-1. 送り状に品名「病原体」及び注意書き「危険物」の記載はあるか	Yes															
14-2. 金属製のオーバーバック（四次容器）を使用しているか	Yes															
14-3. ドライアスを梱包した場合は、送り状の摘要欄に「ドライアイス在中」の記載はあるか	—															