20140503 2A

厚生労働科学研究費補助金

厚生労働科学特別研究事業

科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究

平成 26 年度　総括・分担研究報告書

研究代表者　調　恒 明

山口県環境保健センター

平成 27(2015)年 3 月

目　次

Ⅰ　平成26年度総括研究報告

科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究

研究代表者　　調　恒明　　山口県環境保健センター 1

添付資料：　病原体検査の信頼性確保に関わる検討について 12

Ⅱ　研究班提言

感染症発生動向調査事業における病原体検査に関する提言

研究代表者　　調　恒明　　山口県環境保健センター 115

Ⅲ　分担研究報告

1　インフルエンザ病原体サーベイランスの意義に関する研究

研究分担者　皆川洋子　愛知県衛生研究所 129

2　国内外におけるインフルエンザ株サーベイランスおよびWHOネットワークの活用に関する研究

研究協力者　小田切孝人、渡邉真治　国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター 137

3　病原体（インフルエンザ以外のウイルス感染症）サーベイランスの意義

研究分担者　髙橋和郎　大阪府立公衆衛生研究所 147

4　病原体サーベイランスの意義（細菌・真菌・寄生虫）

研究分担者　四宮博人　愛媛県立衛生環境研究所 179

5　インフルエンザ病原体定点と検体の選定方法

研究分担者　橋本修二　藤田保健衛生大学医学部衛生学講座 216

6　インフルエンザ病原体サーベイランス検査数に関する研究

研究分担者　皆川洋子　愛知県衛生研究所 222

7　インフルエンザウイルスサーベイランス検査の標準化に関する研究

研究分担者　皆川洋子　愛知県衛生研究所 228

８　ウイルス病原体サーベイランスの現状に関する研究

研究分担者　皆川洋子　愛知県衛生研究所 266

９　病原体発生動向調査に関する疫学的検討

研究分担者　三﨑貴子　川崎市健康安全衛生研究所 273

１０　感染症発生動向調査システム（NESID）運用の改善ポイントに関する研究

研究分担者　大石和徳　国立感染症研究所 279

Ⅳ　研究成果の刊行に関する一覧表 287

Ⅰ　総括研究報告書

平成２６年度厚生労働科学研究費補助金（厚生労働科学特別研究事業）
「科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」班

研究総括報告書

研究代表者

調　恒明	山口県環境保健センター	所長

研究分担者

大石和徳	国立感染症研究所	感染症疫学センター長
宮﨑義継	国立感染症研究所	真菌部長
小澤邦壽	群馬県衛生環境研究所	所長
佐多徹太郎	富山県衛生研究所	所長
橋本修二	藤田保健衛生大学医学部	衛生学
皆川洋子	愛知県衛生研究所	所長
髙橋和郎	大阪府立公衆衛生研究所	副所長
四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所	所長
岸本剛	埼玉県衛生研究所	副所長
神谷信行	東京都健康安全研究センター	主任
三﨑貴子	川崎市健康安全研究所	企画・調整担当課長

研究協力者

小田切孝人	国立感染症研究所	インフルエンザ研究センター
渡邊真治	国立感染症研究所	インフルエンザ研究センター
松井珠乃	国立感染症研究所	感染症疫学センター
砂川富正	国立感染症研究所	感染症疫学センター
有馬雄三	国立感染症研究所	感染症疫学センター
木下一美	国立感染症研究所	感染症疫学センター
大西真	国立感染症研究所	細菌第一部
柴山恵吾	国立感染症研究所	細菌第二部
竹田誠	国立感染症研究所	ウイルス第三部
吉田　弘	国立感染症研究所	ウイルス第二部
田辺公一	国立感染症研究所	真菌部
梅山隆	国立感染症研究所	真菌部
永井正規	埼玉医科大学医学部	公衆衛生学
甲斐明美	東京都健康安全研究センター	微生物部
関なおみ	東京都健康安全研究センター	疫学情報
秋場哲哉	東京都健康安全研究センター	副参事研究員
貞升健志	東京都健康安全研究センター	食品微生物研究科
林志直	東京都健康安全研究センター	ウイルス研究科
平井昭彦	東京都健康安全研究センター	病原細菌研究科
中野道晴	北海道立衛生研究所	研究員
筒井理華	青森県環境保健センター	微生物部
髙橋雅輝	岩手県環境保健研究センター	保健科学部
勝見正道	仙台市衛生研究所	微生物課
塩野雅孝	群馬県衛生環境研究所	感染制御係
山田文也	埼玉県衛生研究所	感染症疫学情報担当
青木敦子	埼玉県衛生研究所	臨床微生物担当
篠原美千代	埼玉県衛生研究所	ウイルス担当
内田和江	埼玉県衛生研究所	ウイルス担当
江原勇登	埼玉県衛生研究所	精度管理担当
舩渡川圭次	栃木県保健環境センター	微生物部
黒木俊郎	神奈川県衛生研究所	微生物部
丸山絢	川崎市健康安全研究所	感染症情報センター
山下照夫	愛知県衛生研究所	生物学部
鈴木匡弘	愛知県衛生研究所	生物学部細菌研究室
安井善宏	愛知県衛生研究所	生物学部ウイルス研究室
鈴木智之	滋賀県衛生科学センター	健康科学情報担当
仙波敬子	愛媛県立衛生環境研究所	細菌科
山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所	ウイルス科
末吉利幸	山口県環境保健センター	企画情報室
濱﨑光宏	福岡県保健環境研究所	ウイルス課

研究要旨　平成26年11月14日に成立した「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（いわゆる感染症法）の一部を改正する法律」により、「検体検査の質の向上を図るため、知事が入手した検体について、知事による検査の実施、検査基準の策定」を規定することとなった。この法律が平成28年4月より施行されるのに伴い、自治体における感染症の検査について、その目的、検査の対象、検査数、検査の精度を確保するための方法、結果の利用のあり方等について明確にしておく必要がある。そのため、本研究班では、今後の感染症発生動向調査事業のあり方に関して6つの項目、1. 自治体における感染症検査の精度管理のあり方、2. 感染症発生動向調査事業で実施される個々の感染症の検査の目的、3. インフルエンザ及びその他の五類感染症の適切な検査数、4. 結果の利用、5. 全国で感染症検査を実施するための有効なレファレンスセンター事業、6. 今後の検討課題、について検討を行い、研究班提言としてとりまとめたのでここに報告する。また、地方衛生研究所の感染症検査の現状についても調査結果等をもとに報告する。

A．研究目的

感染症の発生や流行を制御するためには、患者から採取した検体から病原体を分離・同定し、その病原性や抗原性、薬剤耐性等の性状の変化に関する情報を収集し、さらに収集した情報の解析を行う、という三段階からなる「病原体サーベイランス」を継続的に実施することが必須である。我が国においては感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）に基づき、国と全国の自治体が、病原体サーベイランスを実施しているが、これまで詳細な実施要綱が示されたことはなく、ターゲットとする病原体の種類や採取する検体数等については、各自治体の裁量によって決定されているのが実情である。このことから、各自治体から提供された病原体に関するデータが、真に全国の状況を反映しているとは言いがたく、感染症対策の検討に効果的に活かされていないという問題がある。科学的根拠に基づいた地域に偏りのない均一な病原体サーベイランスを全国的に展開し、より信頼性の高いデータを収集することによって、感染症対策を強化することは喫緊の課題である。

本研究では、対象とする病原体ごとにサーベイランスの目的およびその効果を明らかにし、自治体あたりの必要病原体検査数について検討し、また、自治体における検査の質を確保するための方法を検討し、感染症発生動向調査に基づく病原体サーベイランスの向上に資する提言を行うことを目的とする。

B．研究方法

1．感染症検査に関する提言（調総括班）

研究組織は、統括班（調、大石、宮﨑、佐多、小澤）、疫学班（調、佐多、宮﨑）、細菌班（四宮）、ウイルス班（皆川、髙橋）とした。疫学班では自治体における感染症

の検査の質を確保するための方法について、精度管理のあり方を地方衛生研究所の検査担当者の協力を得て検討した。細菌班、ウイルス班では感染症の検査の意義についてとりまとめた。また、疫学班との連携により、インフルエンザ及びその他の五類感染症定点把握疾患の適切な検査検体数について検討した。研究班による調査、議論を踏まえて、1）自治体における感染症検査の精度管理のあり方、2）感染症発生動向調査事業で実施される個々の感染症の検査の目的、3）インフルエンザ及びその他の五類感染症の適切な検査数、4）結果の利用、5）全国で感染症検査を実施するための有効なレファレンスセンター事業、6）今後の検討課題、の6つの項目ついてとりまとめた。

2. 地方衛生研究所における病原体サーベイランスの現状（調、小澤、皆川、四宮、岸本）

地域保健推進事業の一環として、5年に一度全国79か所の地方衛生研究所を対象として地方衛生研究所全国協議会が行う地方衛生研究所業務実態調査（79か所から回答：回答率100%）をもとに、地方衛生研究所の現状について考察を行った。また、地方衛生研究所が行っている感染症の病原体検査の検体数について研究班による全国79か所（77か所から回答：回答率97.5%）のアンケート調査を行いその結果について考察した。また、愛知県衛生研究所の病原体サーベイランスの現状についてまとめた。

3. 感染症の病原体検査の意義（四宮、皆川、髙橋）

感染症発生動向調査事業における感染症検査の意義について地方衛生研究所もしくは国立感染症研究所の専門家に執筆を依頼しとりまとめた。

4. インフルエンザ病原体定点数及び五類感染症の検体数に関する検討（橋本、皆川、四宮、岸本）

各2回の全体会議ならびにウイルス小班会議に加え、橋本研究分担者との会議を開催して議論を重ねた。また、5回にわたり研究班のメンバーによる少人数の会議における議論の結果を報告書に反映させた。

5. 都道府県等（地方衛生研究所）における感染症検査の質の確保に関する検討（佐多、調、皆川、四宮、岸本、神谷）

研究班で「検査指針たたき台」を作成し、地方衛生研究所全国協議会精度管理部会の佐多部会長が精度管理部会員を対象に意見出しを依頼し、様々な意見を得た。また、宮崎小班では、検査室の構造に関する検討を行った。これらを参考としながら、本研究班では、地方衛生研究所の10人の検査担当者の参加を得て、2日間のグループワーキングにより検査指針案を作成した（研究総括報告書付属資料1）。

6. 研究班会議、検討会の開催

以上の項目について研究としての考え方をまとめるため、以下の班会議等を開催した。

平成26年10月27日　研究班全体会議
平成26年11月6日　疫学小班会議
平成26年11月13日　ウイルス小班会議
平成26年12月1日　橋本、皆川、調、他による打合せ会議
平成26年12月5日　細菌小班会議
平成26年12月17日　ウイルス小班会議
平成27年1月19日　研究班全体会議

平成27年2月5、18、20日少人数打ち合わせ会議
平成27年2月25，26日　精度管理に関する検討のためのグループワーキング
平成27年3月5、20日 少人数打ち合わせ会議

（倫理面への配慮）
本研究では、個人情報を扱わないため、個人情報保護に関係する問題は生じない。

C．研究結果

1．感染症検査に関する提言（調総括班）

上記の会議及び打ち合わせにより行われた議論を踏まえて提言案を作成し、さらに検討を加え研究班提言としてまとめた。

2．地方衛生研究所における病原体サーベイランスの現状（調、小澤、皆川、四宮、岸本）

2-1．地方衛生研究所の現状（調、小澤）

地方衛生研究所全国協議会が全国の地方衛生研究所を対象として5年ごとに1回行う「地方衛生研究所業務実態調査」によると、平成15年から20年の5年間の間に全国の地方衛生研究所の職員数が13%、予算が30%、研究費は47%減少した。自治体の公務員数の削減率はこの5年間で7%となっていることから、地方衛生研究所の人員削減は公務員の平均削減率よりも遥かに速く進行していると思われる。また、都道府県が設置する地方衛生研究所の人口10万人あたりの職員数は、0.4人から3.0人と大きな格差が生じており、数カ所の自治体においては許容できないレベルの機能低下が生じている可能性が指摘された。地方衛生研究所の主要な業務の一つである感染症の検査に自治体間の格差が生じていると考えられ、本来全国民がおしなべて平等に享受すべき感染症対策に不均一性が生じている可能性が指摘された。地方衛生研究所の地盤沈下の原因の一つは、保健所とは異なり、法律による規定がないことと考えられている。以上については、平成26年3月19日に開催された厚生科学審議会感染症部会において、地方衛生研究所全国協議会の小澤邦寿会長から報告された。1）これに基づき、本部会では自治体の感染症検査を法律で義務づける必要性が確認された。

2-2．地方衛生研究所における病原体検査の現状（調、皆川、四宮、岸本）

1）地方衛生研究所における病原体検査数に関するアンケート調査結果

研究班では、地方衛生研究所における検査の現状を把握するために、2012年、13年の検査数についての全国調査を行った。その結果、79か所の地方衛生研究所のうち、78か所から回答があった（回答率97.5%）。ウイルスについては、検査検体数、検査数（一つの検体について複数の検査項目がある事を考慮）、ウイルス遺伝子検査陽性数、ウイルス分離数について質問した。また、細菌等については、地方衛生研究所では、保健所で分離された菌株について詳細な解析を行う場合が多いことを想定して、分離数、検査数について質問した。各地方衛生研究所において、検査数の数え方の解釈が異なる場合も考えられるが、おおまかな数を把握することは可能であると考えた。また、回答方法に関する質問には、その都度回答し、且つ回答方法に関するQ＆Aを作成するなどして対応した。

2）アンケート調査による感染症検査の現状

集計結果を表1に示す。ウイルスの検体

数は、約 75,000 – 7,7000 検体であり、検査項目数は 20 万件、ウイルス検出数は 26,000、分離数は約 7,000 から 8,000 であった。分離されたウイルス株のうち、約 5,000 がインフルエンザウイルス株であった。ウイルス分離は、インフルエンザウイルスについて主に行われていることがわかる。インフルエンザウイルスの分離は、ワクチン株の選定のための抗原性の変化、抗ウイルス薬体耐性に関する生物学的確認に必要である。次に、各ウイルス感染症の検体数をグラフに示した。ここでは HIV の検査は含めていない。この結果、感染性胃腸炎、インフルエンザ、麻しん、風しんの順に検体数が多いことがわかった。インフルエンザのウイルスの検査及び分離は感染症対策上重要である。そこで、各都道府県の人口 10 万人あたりのインフルエンザ検査検体数（2012 年実施数）をグラフに示した。政令市、特別区等の地方衛生研究所を持つ自治体については、都道府県単位の合計数としている。その結果、都道府県別の人口 10 万人あたりのインフルエンザ検査検体数には、2.1 から 28.0 まで 10 倍以上の格差があることがわかった（図 1）。また、データは示さないがインフルエンザウイルスの分離が全く行われていない都道府県があることも明らかとなった。2013/14 年シーズンに、札幌市で検出されたインフルエンザウイルス A/H1N1 pdm09 の多くがタミフル耐性ウイルスであることが確認された 2）ことを考えると、世界の抗インフルエンザ薬の 7 割を消費する我が国において耐性サーベイランスが実質上行われていない自治体（地域）が存在する事は憂慮すべき事態である。したがって、自治体における検査数の基準を設定し、その検査数を確保する必要があると考えられた。そこで橋本小班、皆川小班では、インフルエンザ病原体定点数、定点あたりの検体数について検討した（後述）。

3）法律に規定されていない、臨床診断が明確でない感染症の検査について

地方衛生研究所は、感染症法に定められた疾患だけでなく、地域の医療機関等の要請に応えるため、感染症法に規定されていない、感染症が疑われる発熱疾患の検体についても病原体の検索を行っている。その実態を把握するため、今回のアンケート調査では類型外の感染症の検体数についても調査を行った。その結果、多くの検査が行われていることが明らかとなった。これらの検査は積極的疫学調査もしくは自治体独自の調査研究として行われていると思われる。地方衛生研究所における調査研究は、我が国の公衆衛生の最前線における感染症対策に対して重要な貢献を行ってきた。さらに、感染症法で規定されていない原因不明の感染症について病原体の検索を行う事も地方衛生研究所の重要な役割の一つであり、今後この重要性は増していくと考えられる。今回の法律改正により、結果的に感染症危機管理に必要な地方衛生研究所の柔軟な検査対応能力が後退することは避けなければならない。

3. 感染症検査の意義

（ウイルス：皆川分担報告書１、小田切研究協力報告書２、髙橋分担報告書３、細菌等：四宮分担報告書４）

患者情報の収集等については、感染症法に規定されているものの、病原体検査に必要な検体等の提供あるいは自治体の検査の実施等については、長らく明文化されておらず、各自治体/地方衛生研究所による不断の努力により実施されてきた。

今回の法律改正にあたり感染症法に基づく病原体検査の目的を明確にしておく必要

がある。そこで、感染症法に定められた疾患のうち、国または自治体で検査が行われている感染症について、地方衛生研究所もしくは国立感染症研究所の検査担当者、研究者に感染症検査の目的、公衆衛生学的意義について執筆を依頼しとりまとめた。

4. インフルエンザ病原体定点数及び五類感染症の検体数に関する検討

4-1. インフルエンザ病原体定点と検体の選定方法

（橋本小班　分担報告書５）

各都道府県の人口及び医療機関の分布等を勘案して、できるだけ当該都道府県全体の感染症の発生状況を把握できるように選定するとした。定点の基準数としては、インフルエンザ患者定点の小児科定点から10%以上および内科定点から 10%以上とし、かつ、それぞれ 3 定点と 2 定点を下回らないことと定めた。その結果、全国のインフルエンザ病原体定点の基準数は都道府県で 5～47 定点、全国で 529 定点と試算された。また、検体数は、インフルエンザウイルスの亜型割合を週ごとに一定の精度で推定することを目的として試算された。亜型割合が 10%以上で、その標準誤差率を10%以下と定めた場合、各定点からの検体の基準数としては、流行期の週ごとに 2 検体と試算された。

4-2. インフルエンザ病原体サーベイランス検査数

（皆川小班　分担報告書６、７）

亜型割合を週ごとに一定の精度で推定することを目的とした橋本小班の検討結果では、定点あたり週 1 検体と 2 検体では、標準誤差率がそれぞれ 15%、10%である。インフルエンザ検体を定点あたり患者数が 1 を超える流行期（概ね 16 週）を通して週 1 検体採取すると、日本全体で約 8,000 検体を超える数となりこれまでの検体数と同程度となる事が考えられる。従って、流行期に週 1 検体、非流行期に毎月 1 検体程度を採取し、インフルエンザの遺伝子検査、ウイルス分離を行う事が適切であると考えられた。この数を確保する事により、これまで行ってきた来期のワクチン株の検討、薬剤耐性サーベイランス等が維持できるものと思われる。これまでも病原体定点が指定されており検体の提出がなされてきたが、定点からの検体提出数にはかなりのばらつきがある事がわかっている。このため、今回の義務化により検体提出が定期的に行われるようになると検体搬送の負荷が増大することが懸念され、予算、システムの再検討が必要となる。

4-3. インフルエンザ以外の五類感染症の検査

（調、皆川、四宮、岸本小班）

研究班において、インフルエンザ以外の咽頭結膜熱、手足口病、ヘルパンギーナ、流行性耳下腺炎、無菌性髄膜炎、A 群溶血性レンサ球菌咽頭炎の検査数について検討した。本研究班のウイルス小班でまとめた報告書の感染症検査の意義に記載したとおり各感染症の検体を収集し病原体の把握を行う必要がある。これまでのサーベイランスにより流行、病原性の変化を把握することができており、今後も最低限これまでの検体数を確保する必要がある。これらの感染症については、毎年流行規模が異なることから、疾患を限定せず、あらかじめプライオリティを付し、1 小児科定点（患者定点の約 10%）から、毎月 4 検体（症例）を目途に、少なくとも年間 40 検体を採取し検

査を行う事を基本とする。感染性胃腸炎については、食中毒、施設等における集団発生に関する検体が収集されており、十分な検体数が確保されてきたため、これを継続して行う。眼科定点の対象疾患は、急性出血性結膜炎及び流行性角結膜炎であり、流行に応じて検体を採取する（検体数を定めない）。性感染症定点については検査数を指定せず、必要に応じて検体を採取する。基幹定点からの検体は、細菌性髄膜炎、無菌性髄膜炎、感染性胃腸炎（ロタウイルス）であるが、必要に応じて検体を採取する。

また、本報告書の「2-2. 地方衛生研究所における病原体検査の現状」でまとめたとおり、感染症法の類型外である原因不明であり臨床診断がつかない検体についても検査の意義は高く、これまで通り一定数の検体を検査する必要がある。

4-4. ウイルス病原体サーベイランスの現状に関する研究

（皆川　分担報告書８）

全国の地方衛生研究所で実施されている病原体検索のうち季節性インフルエンザ以外のウイルス病原体サーベイランス検査体制の参考とするため、新型インフルエンザが発生した 2009 年以降の愛知県衛生研究所における年別調査実績を解析した。その結果、インフルエンザ以外の病原体検査数の年別変動幅は小さく、毎年一定の病原体情報確保が期待できるものであった。検査の結果、陽性率（ウイルスが検出された割合）は、インフルエンザ、咽頭結膜熱、手足口病、ヘルパンギーナでは６５−８７％と高く、急性脳炎・脳症、流行性角結膜炎、下気道炎では２０％台と低い傾向であった。病原体サーベイランスと派生する調査研究は、感染症の発生動向把握に重要な病原体情報を得る手段であるとともに予防接種モニタリング及び一部のウイルス侵淫状況に関する貴重な情報源となっている。また、多様な病原体を日常的に検査、研究することで、健康危機対応時における病原体検査並びに分子疫学解析体制の速やかな立上げを可能とすると考えられた。

5. 都道府県等（地方衛生研究所）における感染症検査の質の確保に関する検討

（総括班　総括報告書付属資料及び提言）

5-1.厚生労働科学研究「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施のための事業体制の構築に関する研究　（H26-健危-一般-001）」班）（研究代表者：佐多徹太郎）との連携による精度管理に関する検討

佐多研究班では、地方衛生研究所における感染症検査の外部精度管理の導入について検討が進められている。また、研究班のアンケート調査では標準作業書、検査マニュアル、機器整備、保守管理状況等について調査を行っている。

5-2. 本研究班における検査の質の確保に関する検討（佐多、宮﨑、四宮、皆川、神谷、岸本、調）

研究班で「検査指針たたき台」を作成し、地方衛生研究所全国協議会精度管理部会の佐多部会長が精度管理部会員を対象に意見出しを依頼し、様々な意見を得た。また、宮﨑小班では、検査室の構造に関する検討を行った。これらを参考としながら、本研究班では、地方衛生研究所の 10 人の検査担当者の参加を得て、2 日間のグループワーキングにより検査指針案を作成した（研究総括報告書付属資料 1）。新たに作成すべき標準作業書については、全国の地方衛生研

究所で作成する標準作業書のひな形となることを考慮して機器の保守管理、試薬の管理、細胞の継代方法等に関する標準作業書を作成した（別添１　DNA シーケンサー保守管理標準作業書、別添２機器リアルタイム PCR 保守管理標準作業書、別添３冷凍庫保守管理標準作業書、別添４試薬リスト、別添５試薬等管理標準作業書、別添６細胞の継代管理、別添７細胞の保存融解、別添８細胞感受性試験標準作業書（ポリオ）、別添９マイコプラズマ試験標準作業書（ポリオ）、別添10検体(病原体)取扱標準作業書)。今後は、地方衛生研究所全国協議会が、国立感染症研究所の協力を得て、それぞれの感染症について検査の標準作業書のひな形を作成し、それを元にして各地方衛生研究所がそれぞれの標準作業書を作成することが想定される。検査の質を確保するために必要な要素については提言にまとめた。特に、標準作業書の整備に加えて、人材の確保と育成、検査機器の保守管理、検査室の構造、検査の質確保のための組織等が重要である。

6. 感染症発生動向調査に関する疫学的検討

（三﨑小班　分担報告書９）

感染症法の改正により、感染症発生動向調査事業実施要綱の記載について検討を行った結果、感染症発生動向調査事業実施要項に関して改訂が必要な事項として、以下の５項目が挙げられた。1. 趣旨及び目的の明確化、2. 現状に合わせた具体的な実施方法の見直し、3. 感染症情報センターの位置づけ、4. 感染症発生動向調査企画委員会の目的の明確化と現状に合わせた名称の変更、5. 精度管理を担うレファレンスセンター（もしくは精度管理センター）の新規設置、が挙げられた。

7. 感染症発生動向調査システム（NESID）運用の改善ポイントに関する研究

（大石小班　分担報告書１０）

平成29（2017）年秋頃を区切りとして計画されているNESID更改は、平成28(2016)年４月施行となる改正感染症法の内容を十分に反映させた上で、運用面については、自治体及び国のユーザーからの改善要望に関する情報収集を反映させた仕様が提案され、実装面が改善されていくことが重要である。平成26（2014）年度、全国の地方衛生研究所を対象とした NESID の主に病原体サーベイランスに関する現状把握及び要改善事項調査に関するアンケートを行い、また、国レベルのユーザーからの情報として、国立感染症研究所感染症疫学センター（2室）における NESID 運用全体に関する意見収集を行った。今回の法改正により、病原体検査結果の報告が義務づけとなるため、入力の効率化が必要であり、自治体、国の意見を取り入れた上でのシステムの改修が望まれる。

また、患者の臨床症状等疫学的情報と病原体の性質を総合的に解析しその情報を医療従事者、国民に速やかに還元する必要がある。

D．考察

行政による感染症対策は、健康危機管理、恒常的な感染症低減の両者に貢献するものであり、全ての自治体で同レベルの対策が行われるべきである。しかし、近年の地方

分権により、自治体によっては感染症対策の重要性が充分に理解されず、地方衛生研究所が弱体化し感染症危機管理対応レベルが予期せぬほどに落ち込んでいる可能性がある。今回の法律改正は、自治体に対して感染症の検査を法律で義務づけることにより一定のレベルの検査精度を保障する事が期待される。と同時に、地方衛生研究所の業務に大きな変化をもたらすと考えられる。法律で規定されることにより、検査の質は向上すると思われるが、これに対応するための事務的作業が過剰になり、これまで営々と培われてきた感染症危機管理に必要な柔軟な検査対応能力、調査研究能力は最も重要な機能でありこれを後退させることがあってはならない。

E．結論

感染症発生動向調査のうち、病原体サーベイランスは自治体間で大きな取り組みの格差が生じている。この格差をなくすために、病原体定点あたりの検体採取検体数を規定する必要があると思われた。インフルエンザについては、流行期に定点あたり毎週１検体、非流行期には月１検体程度を採取し遺伝子検査、ウイルス分離を行うことが適切と考えられた。また、その他の五類定点把握感染症についても１ヶ月あたり４検体以上の検体を確保し検査を行う必要がある。これまでは病原体定点が必ずしも均一に稼働していたと思われないことから、今後の定期的搬送により検体搬送の負荷が増大することが懸念されるため、搬送システムについて十分な検討が必要である。

検査の質を確保するためには、標準作業書、人材育成、機器の保守管理、検査室の構造等が重要である。標準作業書については、地方衛生研究所全国協議会が主体となり、国立感染症研究所の協力を得てひな形を作成する必要がある。この際、病原体検出マニュアルが参考となることから、本マニュアルは適宜最新の技術を盛り込んだものに改訂していく必要がある。人材育成は、国立保健医療科学院等が行う、技術研修を含んだ研修に計画的に派遣する必要がある。機器の保守管理についても計画性を持って実施する必要があり、予算の確保が必須である。

感染症危機管理のためには、決められた検査だけではなく常に最新の技術を取り入れ、専門的知識による柔軟な検査対応が必要となる。地方衛生研究所においては、原因不明の発熱疾患、急性呼吸器感染症などの類型にとらわれない検査対応能力を培い、健康危機に備えることが重要である。

F．健康危険情報

特記事項なし。

G．研究発表

論文発表　なし

学会発表　なし

H．知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）なし

【参考文献、web URL等】

1）第3回　厚生科学審議会感染症部会
http://www.mhlw.go.jp/stf/shingi/0000040512.html

2）IASR 2013/14シーズンに札幌市で検出された抗インフルエンザ薬耐性A(H1N1)pdm09ウイルス http://www.nih.go.jp/niid/ja/flu-m/flu-iasrs/4232-pr4081.

表1　地方衛生研究所における病原体検査数

	ウイルス				細菌、リケッチア、真菌など	
	検体数	検査件数	検出数	分離数	分離数	検査数
2012年	75,735	206,731	26,256	6,908	5,339	143,902
2013年	77,430	204,387	26,845	8,262	5,480	120,152

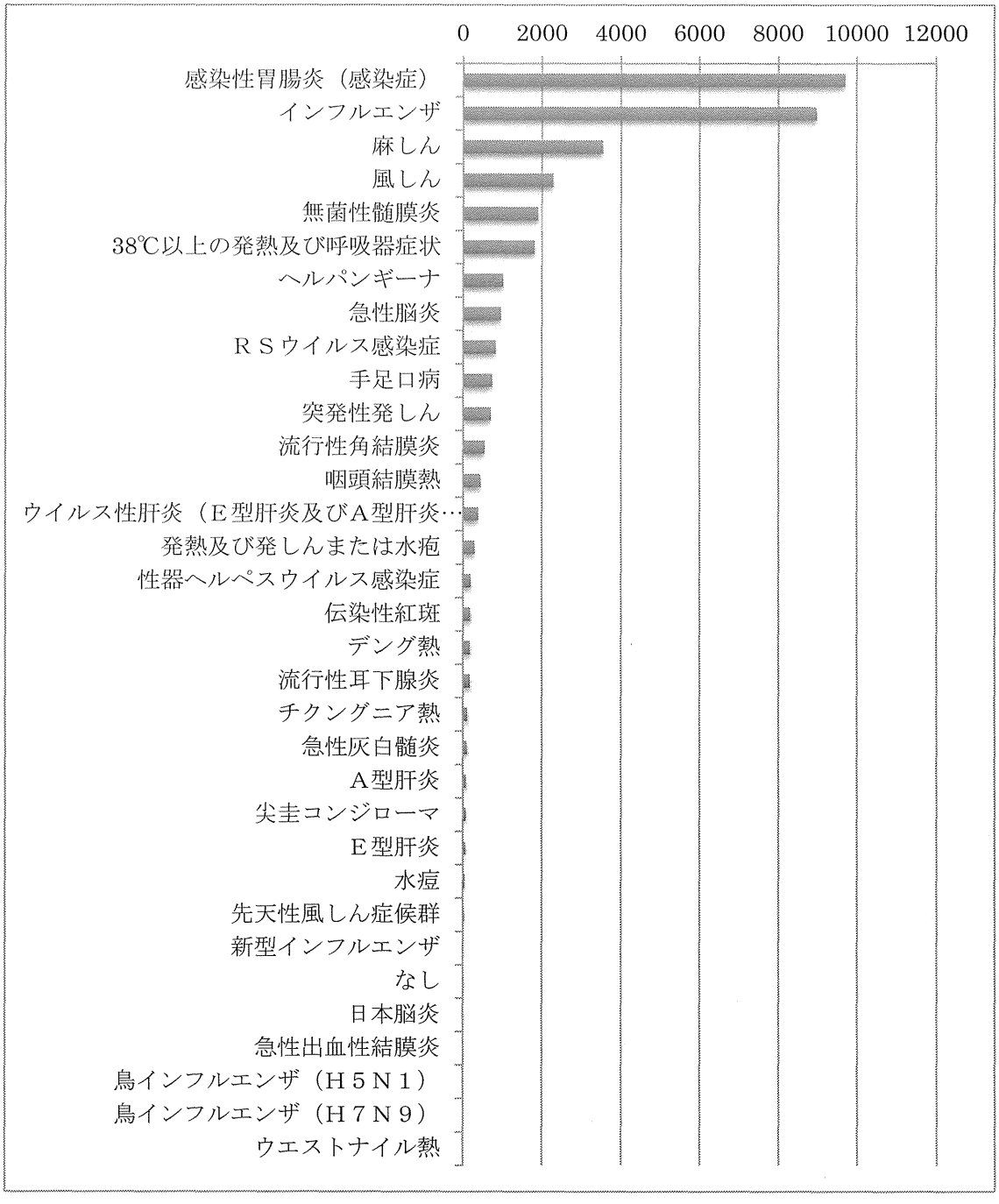


図1. 地方衛生研究所において2012年に検査されたウイルス性感染症検体数

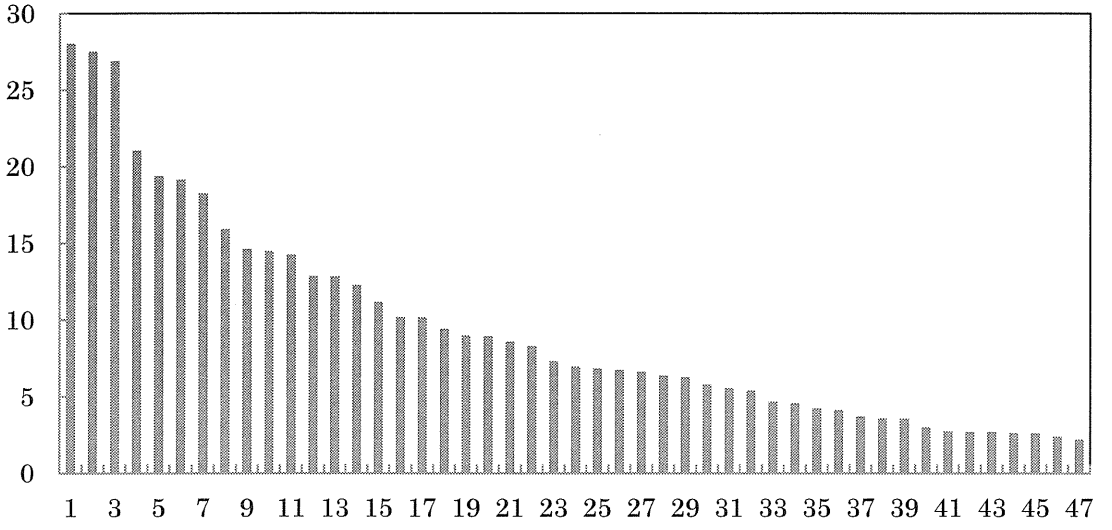


図２．インフルエンザの人口 10 万人あたり検査検体数（都道府県別）

表 2　感染症法に規定されていない疾患の検体数（2013年）

不明熱（パレコウイルスなど）	1094
急性呼吸器感染症	8924
発疹症	1391
その他の原因不明感染症	3255
合計	14664

付属資料 病原体検査の信頼性確保に関わる検討について

本資料は厚生労働科学研究費による調班、佐多班、宮崎班の研究活動の中で、病原体検査に関わる検体採取の基準、病原体検査の基準の検討をおこない、病原体検査の信頼性確保のための諸課題について整理した結果を集約したものである。

1.「病原体検査の基準」作業部会

- 2015年2月25日から2月26日（2日間）開催（東京都東京都健康安全研究センター）
- 病原体検査の基準について項目と内容を検討

参加者

青木敦子	埼玉県衛生研究所
秋場哲哉	東京都健康安全研究センター
内田和江	埼玉県衛生研究所
江原勇登	埼玉県衛生研究所
勝見正道	仙台市衛生研究所
黒木俊郎	神奈川県衛生研究所
篠原美千代	埼玉県衛生研究所
調恒明	山口県環境保健センター
末吉利幸	山口県環境保健センター
高橋雅輝	岩手県環境保健研究センター
筒井理華	青森県環境保健センター
濱﨑光宏	福岡県保健環境研究所
山下育孝	愛媛県立衛生環境研究所
吉田弘	国立感染症研究所

2. エンテロウイルス検査に関する内部精度管理研究打ち合わせ（宮崎班で実施）

- 2014年12月3日から12月5日（2泊3日）開催（国立感染症研究所村山庁舎）
- エンテロウイルス分離同定技術の研修コースの試行（ワークショップ）

内部精度管理のための①マイコプラズマ否定試験、②細胞感受性試験、の実習。
必要となる標準作業手順書の同定とひな形作成

参加者

荒畑沙織	静岡県環境衛生科学研究所
杉本大地	奈良県保健研究センター
清水耕平	横浜市衛生研究所
髙橋剣一	名古屋市衛生研究所
辰己智香	島根県保健環境科学研究所

濱崎光宏　　福岡県保健環境研究所
古舘大樹　　札幌市衛生研究所
水村綾乃　　千葉市環境保健研究所
村田達海　　北九州市環境科学研究所
山下育孝　　愛媛県立衛生環境研究所
吉田弘　　国立感染症研究所

3. 地全協精度管理部会による病原体検査指針（案）に関する意見出し（2014 年 11 月-12 月）

4. 病原体検査指針における病原体検査の基準（案）の構成
1. 病原体検査の実施体制
2. 職員の教育・研修
3. 検査室等の管理
4. 機械器具保守管理
5. 試薬等の管理
5-1 試薬等の管理について-培養細胞
6. 有毒な又は有害な物質及び危険物の管理
7. 検体（含む病原体）取扱いについて
8. 病原体検査の管理
9. 病原体検査の質管理（質保証）の実施
10. 第三者機関による病原体検査の質評価について
11. データ等の作成・保存要領
12. 国からの検体提出要請
13. 国への検体検査依頼
14. 地方衛生研究所等の検査機関から国立感染症研究所への検体送付要領
15. 病原体情報の収集と発信
別添 1. DNA シーケンサー（機械器具保守管理 SOP の例）
別添 2. リアルタイム PCR 装置（機械器具保守管理 SOP の例）
別添 3. 冷凍庫（機械器具保守管理 SOP の例）
別添 4. 試薬類管理標準作業手順書の例
別添 5. 培地の調製標準手順作業書の例
別添 6. 細胞の継代管理標準手順作業書の例
別添 7. 細胞の保存融解標準手順作業書の例
別添 8. 細胞感受性試験標準作業書（ポリオウイルス分離細胞用）
別添 9. マイコプラズマ試験標準作業書（ポリオウイルス分離細胞用）
別添 10 検体（含む病原体）取扱標準作業手順書の例

病原体検査の基準（案）

1. 検査の実施体制について

感染症発生動向調査における病原体検査の義務付けに伴い、検査結果は担当者とは、別の第 3 者が結果を保証し、管理者が承認する実施体制を構築することが必要となる。このため最小限の機能として、管理者、検査部門責任者、検査の質管理（保証）担当者を置く。

食品 GLP では検査区分責任者は検査業務を実施できないとされている。「臨床検査技師等に関する法律」の「衛生検査所」の「精度管理責任者」は「精度管理の業務に支障がない場合に限り、検査業務に従事することができる。」と規定。

病原体検査指針（案）では、検査業務への人員配置の現状を鑑み、検査部門責任者は区分責任者と兼任可能とし、かつ業務に支障がない限り、検査業務に従事可能とすることを提言する。

１）実施体制

- 管理者は地方衛生研究所長を想定

- 検査部門責任者は病原体検査部門の管理職を想定、ウイルス、細菌などの検査区分を統括する。組織上、検査部門責任者と検査区分責任者を統合する考え方もある。
  例　「検査責任者」等

- 検査区分責任者はウイルス、細菌などの検査区分における責任者を想定。検査部門責任者と兼任可能。検査に必要な各種 SOP の作成、検査結果の保管確認などの管理業務を行い、業務に支障がない限り、検査業務に従事することができることを規定。

- 検査の質管理（保証）担当者は当該検査とは独立した存在であること。病原体検査のレベルを一定に保つための定期的な技能点検、外部による技術評価、に関する事務を行う。

（病原体検査指針への書きぶり案）

病原体検査の実施体制

ア. 病原体検査を行う施設には管理者、検査部門責任者、検査区分責任者、検査の質管理部門責任者を置かなければならない。なお検査区分責任者は、当該病原体等の取扱いの知識経験を有する者でなければならない。また管理者は病原体検査の質を確保するために十分な資質を有する職員を確保するよう努めなければならない。

イ. 管理者は検査部門及び検査の質管理部門の業務の統括を行い、検査部門責任者、検査区

分責任者、検査の質管理部門責任者を指名する。なお、これらの者が不在の場合にあっては、あらかじめ当該業務を代理する者を指名し、業務を行わせることができる。検査区分責任者と検査部門責任者は兼任できるが、検査の質管理部門責任者は当該検査区分責任者若しくは当該検査部門責任者を兼任してはならない。

ウ. 検査部門責任者は検査部門の業務の統括を行い次の業務を行う。

なお、検査部門責任者又は検査区分責任者は、業務に支障がない限り、検査業務に従事することができる。

① 検査区分責任者及び検査を行う職員（以下「検査職員」 という。）の職務分掌を明らかにする文書の作成及び保存に関すること。
② 各種標準作業書の作成及び改定の承認に関すること。
③ 検査結果通知書の確認と発行の承認に関すること。
④ 検査区分責任者及び検査職員の研修計画の策定並びに研修に関する記録の保存に関すること。
⑤ 検査の質管理部門責任者から検査の信頼性に影響を及ぼすおそれのある問題について改善の指摘があった場合は，必要な改善措置を講ずること。
⑥ その他検査部門を統括するために必要な業務。

エ. 検査区分責任者は検査職員の指揮監督を行い、次の業務を行う。

① 標準作業書の作成及び改定並びにその保存に関すること。
② 標準作業書に基づき、検査が適切に実施されていることの確認に関すること。
③ 検査に係る施設設備及び機械器具の管理に関すること。
④ 検体の受領等取扱の状況の確認に関すること。
⑤ 病原体の検出、分離、同定等の結果が確認できる資料(以下「データ」という。)及び検査結果の確認
⑥ 標本、データ及び検査結果通知書の控えの保存
⑦ その他当該検査区分において検査の業務を管理するために必要な業務

オ. 検査の質管理部門責任者は、標準作業書の写しの保存その他以下に示す検査の信頼性の確保に係る必要な業務を行い、業務の内容に応じてあらかじめ指定した者(以下「あらかじめ指定した者」という。）に行わせることができる。

① 施設で行う検査の質管理の方法に関すること
② 外部による検査の質管理調査（仮の名称)に関すること
③ 検査の質管理結果の記録

2. 職員の教育・研修について

施設内で病原体検査の質を担保するための計画的な技術研修、バイオセーフティ研修を通じた人材開発を行う必要がある。技術研修には施設内の研修、on the job 研修を企画実施、国立保健医療科学院（科学院）など国などが実施する外部研修に参加させることを管理者、自治体の義務とする。また地方衛生研究所は輸送、検体採取等従事者の研修主体になることが期待される。

現行は数週間単位の検査技術研修（科学院）等、地方自治体職員を対象とした研修が開催されている。しかしながら週単位の出張は困難な現状を鑑み、以下の点を検討課題として提言する。

● 短期技術研修（1-2 日程度）の計画的開催

新たな病原体検査（SFTS, 新型インフルなど）、基本技術習得の需要に対応すべく、短期間のスポット的な各種技術研修（1-2 日）の計画的な開催を検討する。

● 検査の質管理のための教育訓練法の開発と実施

病原体検査の質を確保するための教育訓練のツールを開発し、計画的な実施導入を図る。

（病原体指針への書きぶり案）

職員の教育・研修

ア　管理者は、検体の受領、搬送等に従事する者を含む検査関係職員を対象とした研修計画を策定し、新たな技術の習得、従来の手技を維持するため、計画的かつ継続的な国の機関等が行う研修を受ける機会を与えること。当該施設職員以外で検体の搬送等に従事する者への研修は、本庁及び関係機関と連携協力のうえ実施に努めること。

イ　病原体検査の信頼性を担保するため、新規採用職員をはじめ病原体検査経験の浅い職員については、十分な研修を行うこと。

ウ　学会・外部の研修の機会も活用するよう努めること。また、学会・外部の研修に参加した場合、報告会などの方法により、組織内にその教育研修内容の共有化を図ること。

エ　管理者は職員の学会・研修への参加状況が把握できる記録を作成し、保管すること。

3. 検査室等の管理について

1）微生物学的検査室

検査室等とは、病原体を扱う検査室のほか、検査に関連するすべての室をいう。バイオセーフティの順守のため、基本的なコンセプトを規定する。詳細な作業環境、動線、備品、等は各病原体検査 SOP で規定する。廃棄物等の設備もここに含める。

（指針への書きぶり案）
検査室等の管理
微生物学的検査室
病原体検査を行う検査室等は、取り扱う病原体のバイオセーフティーレベルに応じた構造と設備を備えていること。

2）遺伝子検査室
部屋の区分などコンタミ防止策の物理的な指針。操作技術上の防止策は検査 SOP の中で作業環境の注意点として、動線、備品、消耗品の扱いで規定する。
室とは独立した部屋のほか、区画（隔壁（パーテ可）で物理的に仕切られた空間）をいう。ただし、動線に考慮すること。
場所とは、部屋、区画、クリーンベンチ・安全キャビネットをさす。

（指針への書きぶり案）
検査室等の管理
遺伝子検査室
遺伝子検査を行う検査室は、核酸抽出作業を行う室と遺伝子増幅産物の検出作業を行う室が明確に区分されていなければならない。さらに、試薬の調整を行う場所は他と区分されていなければならない。なお、空調設備は前記の室ごとに独立していることが望ましい。

3）遺伝子検査のための汚染防止要領作成
検査指針では遺伝子検査における交差汚染防止について施設構造と検査 SOP で規定しているため、包括的な要領をここで定める。
具体的にはコンタミ防止策として①部屋の区分などの物理的な環境を規定し、②操作上の防止策として、作業環境、動線の考え方、機器の取り扱い注意点、試薬、消耗品の使用法、保管法、研修を含む要領を作成する。

（指針への書きぶり案）
検査室等の管理
遺伝子検査のための汚染防止要領作成
遺伝子検査については、交差汚染防止のため、次の項目を参考にし「遺伝子検査のための汚染防止要領」を各検査機関が定め、これに従うこと。

遺伝子検査のための汚染防止要領に含まれる項目（案）

1. 遺伝子検査室の構造
2. 作業動線の注意点、
3. 機器の扱い
   ア. 安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内における試薬調製、汚染防止のための定期点検、
   イ. 遠心分離器
   ウ. 専用の微量分注器
4. 試薬消耗品の管理
   ア. 試薬の調整時の分注（プライマー、コントロールなど使い切り等）
   イ. 使い捨て消耗品の事項（フィルター付きチップ、０．２ml チューブの種類など）
   ウ. 使い捨て手袋の使用
5. 陰性コントロール、陽性コントロールの事項
6. 非特異反応への対処法（解釈）
7. 検体の取り違え防止
8. 研修
9. その他注意事項

4. 機械器具保守管理について

遺伝子検査手法などの導入で病原体検査の技術が進歩するに伴い、各種機器はハード面、ソフト面で複雑、精密化してゆく傾向である。同時に価格も上昇している。また病原体検査というバイオセーフティー上の要求事項も考慮しつつ、機器維持管理を適切に実施し、機械器具が仕様通りに作動する環境を整備しなければならない（バイオセーフティ基準、空調など設置作業環境の整備、SOP の作成)。そして仕様通り、作動するかどうかを検証する手順をあらかじめ定める必要がある（日常点検、定期点検の方法）

1）機械器具保守管理準作業手順書に含まれる項目は以下の項目を提言する

- 日常点検の方法
  常時行うべき保守点検の方法（使用前、使用後など）
- 定期点検の方法
  定期的な保守点検に関する計画
- 事故対応の方法
  使用中に故障が起こった場合の対応 （検体の取扱いを含む。）に関する事項
- 保守記録台帳（フォーマット）
  検査機器保守管理台帳と、その記入要領。事故対応の記録はここに含まれる。
- 使用記録台帳（フォーマット）
  使用記録日誌とその記入要領。
  必要に応じて日常点検の項目はここに含める。
  使用記録日誌は機器ごとに作成し、担当者が記入を行う。

（SOP 作成時の考慮点参照：微量分注器、ミキサー等は、頻繁に使用するため、使用ごとの記録は行う必要はなく、保守管理の目的に応じ、作成必要不必要を判断する。）

2）病原体検査室に備える機器例

検査区分により異なるが、感染症発生動向調査で用いられる主なものを示す。

安全キャビネット（クリーンベンチを含む）
遠心分離機
高圧蒸気滅菌器
乾熱滅菌器
ふ卵器（CO2 インキュベーターを含む）
核酸増幅装置
リアルタイム PCR 装置
自動核酸分析装置（DNA シーケンサー）

純水製造装置
微量分注器（ギルソン、エッペンドルフなどのピペッター）
電子天秤
電気泳動装置及びゲル撮影装置
生物顕微鏡（正立、倒立顕微鏡を含む）
その他顕微鏡（蛍光顕微鏡、微分干渉顕微鏡等）
冷蔵庫、冷凍庫、超低温槽（試薬保管及び検査前検体の一時保管に供する機器に限定）
pH メーター
ミキサー
LAMP 装置

3）SOP 作成時の考慮点

病原体検査は機器を用いた測定より、定性検査が多い。このため機器保守計画は用いる機器の特性に合わせて、日常点検、定期点検、保守記録、使用記録について実施する検査内容にあわせ施設ごとに、手順と記録様式を定めることとなる。頻繁に使用する微量分注器、ミキサーなど使用記録は不要と考えられるため事前に SOP の中で規定しておく。
以下、手順書作成の際の考慮点を示す。

ア. 定性検査を目的とする機器
例）DNA シーケンサー
なぜ必要か：耐性株スクリーニング検査の読み取りエラー（点変異）を防止。
具体的な方法：定期保守契約、定期的な試薬・消耗品交換と結果解釈のための研修（含むソフトウエア）が必要

イ. 温度管理が必要
例）ふ卵器（含む CO2 インキュベーター）
なぜ必要か→適切な培養条件を保証し、病原体分離、培養を担保するため。
具体的な方法：データロガーを用いた温度モニター、定期点検
例）冷蔵庫
なぜ必要か→試薬の管理、検体、標準品の管理（試薬の劣化、標準品の劣化を防ぐ）
具体的な方法：データロガーを用いた温度モニター

ウ. 定量検査
例）リアルタイム PCR 装置
なぜ必要か→検量線を用いる定量試験のため。機器メンテと結果解釈のための研修（含

むソフトウエア）が必要
具体的な方法：定期保守契約、定期的な試薬・消耗品交換と結果解釈のための研修（含むソフトウエア）が必要
例）pHメーター、電子天秤
　なぜ必要か→いずれも測定機器。必要な精度に応じて保守管理計画を策定
具体的な方法：定期点検。

エ.安全管理上
例）安全キャビネット、オートクレーブ、遠心分離機
　なぜ必要か→労働安全、バイオセーフティ上、そして交差汚染防止
具体的な方法：定期保守契約
（精度管理より、検査の質の保証の意味合いが大きい）

オ.日常のもの
例）ピペットマン
　なぜ必要か→交差汚染防止、と精度維持のため
具体的な方法：重量法による定期点検。

4）維持コストについて
　精度保証、安全性担保など必要とされる目的に基づき保守管理計画を立てる。参考までに病原体検査に用いられる機器のリストと保守コストについて表１に示す。

5）ひな形
別添1.　DNAシーケンサー（機械器具保守管理SOPの例）
別添2.　リアルタイムPCR装置（機械器具保守管理SOPの例）
別添3.　冷凍庫（機械器具保守管理SOPの例）

表１　主な検査機器と保守管理コスト

主な機器名（保有していない施設もあることに留意）	保守管理の目的	保守頻度	およその年間保守費（千円）	備考
安全キャビネット	病原体検査に用いる。定期保守はバイオセーフティーを担保する以外に、検体のクロスコンタミネーションリスクを減少させるもの。	定期	160	4 種病原体は定期的な保守点検を 56 条 24 にて規定。
クリーンベンチ	細胞調整、試薬調整に用いる。定期保守は細胞--細胞汚染、試薬汚染リスクを減少させる	定期	未調査	安全キャビネットで代用している施設もある
オートクレーブ	汚染エリア（検体滅菌）、清浄エリア（試薬調整）で用いる。点検+パッキン交換が必要	定期	120	4 種病原体は定期的な保守点検を 56 条 24 にて規定. 他の関連法：安衛法第四十五条（定期自主点検）、ボイラー及び圧力容器安全規則第九十四条
遠心機(中・小型冷却遠心機)	汚染エリア（検体処理）、清浄エリア（検査）で用いる。	定期	40	労働安全衛生規則第百四十一条　（定期自主点検）
リアルタイムＰＣＲ装置	各種病原体に関わる迅速遺伝子診断用。定量性の確認のため標準試薬を用いた保守。	定期（年 1 回）	300-500	—
PCR 装置	各種病原体に関わる迅速遺伝子診断用。	定期	150	—
ＤＮＡシーケンサー	各種病原体に関わる遺伝子診断用。レーザー、機械部分の定期保守。日常的な消耗品交換が必要	定期（年 1 回）	1300-1500	—

ふ卵器（CO2 インキュベーター含む）	検体分離培養、細胞培養などに用いる。温度センサー等の仕様確認	定期	50	
ピペット	各種検査における試薬分注操作に用いる。	定期	15	
電子天秤	各種試薬の怦量に用いる	定期	20	
ＥＬＩＳＡリーダー	抗体測定試験。光学部など清浄	定期		
純水製造装置	各種試薬調整に用いる。各種フィルター、カートリッジの交換が必要	定期	400	—
自動核酸抽出装置	集団発生時、遺伝子検査のため大量の検体処理に用いる	定期	150	
パルスフィールドゲル電気泳動装置	洗浄エリアで用いる。細菌感染症の集団発生時の遺伝子型別に用いる。	定期	380	
超低温槽		定期	130	
冷蔵庫、冷凍庫	試薬、試液、病原体管理のためには、温度管理が望まれる			
ミキサー				
LAMP 装置	遺伝子検査	定期		
pH メーター		定期		
生物顕微鏡(正立、倒立顕微鏡)			未調査	
その他顕微鏡（蛍光顕微鏡、微分干渉顕微鏡等）		定期	未調査	

（検査指針への書きぶり案）

機械器具保守管理

ア　検査区分責任者は検査機器及び情報処理装置を適正に使用するため、検査結果への影響が起きないよう、機械器具保守管理標準作業書の作成及び改定を行い、個別の機械器具について管理を担当する職員を定め、保守管理維持に努めなければならない。

イ．機械器具保守管理標準作業書（SOP）に記載すべき事項

①　常時行うべき保守点検の方法

②　定期的な保守点検に関する計画

③　使用中に故障が起こった場合の対応　（検体の取扱いを含む。）に関する事項

④　検査機器保守管理記録、作業日誌の記入要領

⑤　作成及び改定年月日

ウ.使用記録を残す機器については作業日誌を機器ごとに作成し、担当者が確認を行うこと

5.試薬等の管理について

病原体検査は定量を目的とする規格試験と異なり、病原体の検出、遺伝子型の判定など定性的な検査項目が多いのが特徴である。これに伴い、試薬、試液の調製・管理には、検査判定の基準となる病原体、細胞、遺伝子検査用陽性コントロールの管理という項目が含まれる。

1）試薬等の定義は次の通りとする。

試薬等とは、試薬、試液、細胞、参照株（ウイルス標準株、細菌標準株など）、陽性コントロール（病原体遺伝子）をいう。

ア.試薬

検査等に使用する化学物質及び生物学的製剤をいう。

（基礎培地、培地添加物質、細胞、免疫血清、抗原、赤血球等）購入した液体培地

イ.試液

試薬を調製して得られた溶液等をいう。（調製した培地、抗血清、抗原等を含む）

ウ.細胞

ウイルス分離に使用する株化細胞等をいう。由来及び継代歴が明確なものを使用する。

エ.参照株（ウイルス参照株、細菌参照株など）

ATCC 等の生物資源バンクに登録されているウイルス、細菌株で、文献等で公に基準株として使われているものをいう。

オ.陽性コントロール（病原体遺伝子）

病原体遺伝子（抽出 RNA 液、抽出 DNA 液、cDNA 液、PCR 増幅産物等）で、遺伝子検査時に陽性コントロールとして使われているものをいう。

2）試薬等の管理標準作業手順書に含まれる項目は以下の通り

ア. 調製方法

① 試液の場合:検査 SOP に含まれる

② 培地：寒天培地、培養細胞などの培地類の調製法は、検査の SOP に含まれる

③ 陽性コントロール（病原体遺伝子）：検査の SOP に含まれる

④ 参照株：検査に用いる参照株の保存法は SOP に含まれる（別に定めてもよい）

⑤ 細胞：維持管理方法（凍結保存、継代法、質管理法）について別に定める

イ. 表示法と管理台帳への記載項目

① 試薬

試薬の容器には、次の事項を表示する（購入時のラベル、あるいは添付文書に表示されている場合は不要）とともに、試薬管理台帳にも事項を記載する。

・名称
・濃度
・ロットナンバー（ロットを構成しない試薬については製造番号）
・製造年月日
・有効期限
・保存方法（常温、冷蔵、冷凍等）
・受領年月日
・開封年月日（必須）

② 試液

試液の調製は、それぞれの検査実施標準作業書に定める試液調製方法に従って行い、少なくとも次の事項を試液管理簿に記録する。(使用時に外観等に異常がないことを確認する。)

・調製年月日
・調製者氏名
・識別名称（濃度が含まれる）
・調製に使用した試薬の識別名称および量
・調製量
・保存方法
・保管場所
・使用期限
・使用開始年月日

試液の容器には、少なくとも次の事項を表示する。

・調製年月日
・試液名称（濃度が含まれる）

・保存方法
・使用期限

③ 陽性コントロール

遺伝子診断用陽性コントロールは専用の容器に保管し、容器には次の事項を表示する。陽性コントロールは、遺伝子診断用試薬類と交差汚染が起こらないよう、注意深く保管せねばならない。

・陽性コントロール名
・病原体株名（ウイルス遺伝子保存場合はRNA、DNA、cDNA、PCR増幅産物等の別）
・保存年月日

④ 参照株

遺伝子検査実施時など、核酸抽出法の質の管理のため、参照株を添加し検査を行う場合等、次の事項を参照株管理簿に記録する。

・入手年月日
・入手先名称
・ウイルス名
・保存年月日／保存者名
・保存方法／保管場所／保存量
・廃棄年月日／廃棄者名
・備考（血清型・遺伝子型等）

ウ. 試薬等管理の注意事項

① 試薬等は必要量以上に購入しないこと。また、必要量以上に調製しないこと。
② 試薬等の使用期限は使用目的に応じて設定すること。
③ 試薬等は適切な条件で保存し、純度の低下したもの、変質したもの、使用期限を過ぎたものは使用してはならない。ただし、十分に使用に耐えることが証明された場合には期限を延長することができる。
④ 試液は検査実施標準作業書に従って調製すること。
⑤ 使用時ごとに調製する必要のある試液は、当該検査終了時に廃棄すること。
⑥ 冷蔵、冷凍で保存している試薬等を、使用時に室温まで戻すときは吸湿あるいは体積の変化等に注意すること。通常、室温まで戻して使用すること。
⑦ 毒物、劇物、危険物の取扱いは、関係法令に従うこと。
⑧ 病原体及び有害物質の取扱いは、作業従事者が危害を被ることのないよう、また環境汚染がないよう十分配慮すること。
⑨ 試薬等の廃棄に当たっては、各種法令に違反することなく、環境汚染のないように十

分配慮すること。

⑩ 標準ウイルス株・ウイルス遺伝子（陽性コントロール）は必要量以上に保存しないこと。

⑪ 標準ウイルス株等感染性を有する可能性があるものの廃棄に当たっては、各種法令に違反することなく、環境汚染のないように十分配慮し、必ず滅菌処理を施した上で廃棄すること。

3）細菌検査用培地の管理

感染症の原因となる細菌の検査には、分離用、増菌用あるいは性状試験用等の培地が使用される。培地の性能や質は検査結果に大きく影響するため、適切に管理し、必要に応じて質を確認することが重要である。

ア　細菌検査用培地の管理

細菌検査用培地の管理は、試薬管理の方法に準じて行う。培地の作製法および保存法等は標準作業書に記載し、記載された方法で作製・保存する。

イ　細菌検査用培地の質の管理

細菌検査用培地の質は、自家調製であれば作製ごとに、市販培地であればロットごとに異なる場合がある。培地の質の管理に関する標準作業書を作成し、それに従って適切に質の管理を行う必要がある。

（検査指針への書きぶり案）

試薬等の管理

ア　検査区分責任者は試薬等管理標準作業書（SOP）の作成及び改定をおこなうこと。検査区分責任者は、試薬等管理標準作業書に従い、以下の項目について試薬、試液、細胞、参照株、陽性コントロール（病原体遺伝子）等について管理を担当する検査職員を定め、次の事項の確認を行うこと。

① 試薬等

試薬等の容器には、少なくとも次の事項を表示する（購入時のラベル、あるいは添付文書に表示されている場合は不要）とともに、試薬管理台帳にも事項を記載する。

・名称
・濃度
・ロットナンバー（ロットを構成しない試薬については製造番号）
・製造年月日
・有効期限
・保存方法（常温、冷蔵、冷凍等）

・受領年月日
・開封年月日（必須）
② 試薬等を調製した場合は、その記録を作成し保存すること。
③ 変質したもの、又は使用期限が経過したものを使用しないこと。
④ 参照株については、名称及び保存方法を表示した専用の容器に保存すること。
イ 試薬等は 管理台帳を作成し適切に管理すること。

4）ひな形
別添 4 試薬類管理標準作業手順書の例

5-1 試薬等の管理について-培養細胞

ワクチン候補株の選定、耐性株の解析を目的としたウイルス分離株を得るために培養細胞の維持管理は基本である。顕微鏡下の観察では、目的とするウイルスへの感受性はわからないが、適切に保存された参照株を用いた感受性試験（ウイルス力価）を定期的に行うことで客観的に細胞の状態を評価できる。

ウイルス検査室では各種細胞を維持しており細胞同士の汚染を防ぐために、継代時間をずらす、培地を独立させるなど様々な注意が必要。
マイコプラズマ汚染も目視では判定できず、遺伝子診断など別の手法を用いて汚染を確認し、細胞維持管理を行う。

培養細胞の維持管理には、適切な細胞の入手、cell bank の確立、継代法、といった手技的なものから、冷凍庫、ふ卵器等の温度管理等多岐にわたる。

2 類感染症のポリオの場合、検査はウイルス分離を基本としている。このため分離に用いる RD-A と L20B 細胞（ポリオウイルスレセプター発現 L 細胞）の質の管理法は、すでに WHO によりウイルス感受性試験等、定められている。

1）細胞
ウイルス分離に使用する株化細胞等をいう。由来及び継代歴が明確なものを使用する。
入手は ATCC、民間等を通じ、MTA 条項といったコンプライアンスを順守の上、施設に保存する。

2）培養細胞の管理
（1）細胞は、細胞毎に次の事項を細胞管理簿に作成し記録する。
・入手年月日
・入手先
・細胞名

・入手時継代数
・保存年月日／保存者名／保存時の継代数
・保存方法／保管場所／保存量
・廃棄年月日／廃棄者名
（２）細胞は保存チューブに入れ、次の事項を表示する。
・細胞名
・継代数
・作成年月日
（３）培地類の作成
以下の項目を含む培地作成作業書に基づき、調製した培地に必要項目を容器に表示させ、定められた温度条件で保存する。

ア. 培地の種類
　イーグル MEM 培地を用いた増殖培地、維持培地など
イ. 用いる細胞
　RD-A、L20B 細胞など
ウ. 出典
エ. 試薬
　用いる試薬類を列挙
オ. 機械器具
　使用する機会・器具、消耗品を列挙
カ. 培地の調整法
キ. 作業環境、操作上の注意点
　清浄区域の安全キャビネット内の操作等、無菌操作について記載
ク. 作成記録及び容器への表示法
　①培地調製の記録（作成日、名称、使用期限、作成量、作成者等、試薬等 SOP に準じて記録）
　②培地保存容器への表示（名称、保存法、作成日、使用期限など試薬等 SOP に準じて記録）

3) 培養細胞の継代法
細胞ごとに継代法の手順書を定め、継代歴を記録する。SOP に含む項目は次の通り。
ア. 細胞の種類
イ. 用いる培地、試薬
ウ. 継代の手順
エ. 細胞カウント法

オ. 作業環境と注意点
無菌操作上の注意点
異なる細胞の継代を同時に行わないこと（細胞同士のコンタミ防止）
細胞のカウントを行うこと（ポリオの RD-A, L20B 細胞は定められている）
継代数の上限を定める（ポリオ用の細胞は 15 代まで）
ふ卵器の温度モニター（データロガーを用いた記録）→温度記録はふ卵器の保守 SOP で規定

カ. 継代の記録と培養ボトルへの表記

4）凍結保存と再起培養法
細胞ごとに凍結保存と再起培養法継代法の手順書を定め、保存履歴（数量等）を記録する。SOP に含む項目は次の通り。
ア. 細胞の種類
イ. 用いる培地、試薬
ウ. 手順
エ. 細胞カウント法
オ作業環境と注意点
無菌操作上の注意点。
異なる細胞の継代を同時に行わないこと（細胞同士のコンタミ防止）
細胞のカウントを行うこと（ポリオの RD-A, L20B 細胞は定められている）
カ. 凍結保存と再起培養の記録、細胞保存容器への表記項目

5）培養細胞の質の管理法
ポリオウイルス分離時に用いる RD-A, L20B 細胞の質の管理を目的として WHO は①ポリオウイルスに対する定期的な感受性試験（ワクチン株を用いた力価試験）、とマイコプラズマ汚染の否定試験を推奨している。①②ともひな形を示す。
（1） ウイルス感受性試験
適切に保存されたポリオウイルスワクチン株を用いて、定期的に細胞への感受性を調べる。ポリオウイルスは-20-30 度で数年にわたり安定。-80 度ならば半永久的に安定である。このことを利用し、いったん調製したウイルスストックを用いて、定期的に細胞への感受性を確認する。温度管理が適切に行われていれば、ウイルス力価は安定である。WHO のマニュアルは in house 用の参照ウイルス株が対数値+/-0.5 の範囲ならば許容できるとし、細胞は 15 代で入れ替えることを推奨している。
（2） マイコプラズマ否定試験
培養細胞は、継代の過程でマイコプラズマ汚染のリスクがあり、感受性など影響が存在す

る。このため、施設で管理する培養細胞は定期的にマイコプラズマ汚染を確認することが望まれる。マイコプラズマ検出法は各種商用キットが利用でき、メーカーマニュアルに基づきSOPの作成を行う。

別添５　培地の調製標準手順作業書の例
別添６　細胞の継代管理標準手順作業書の例
別添７　細胞の保存融解標準手順作業書の例
別添８　細胞感受性試験標準作業書（ポリオウイルス分離細胞用）
別添９　マイコプラズマ試験標準作業書（ポリオウイルス分離細胞用）

（病原体指針への書きぶり案）
試薬等の管理
　培養細胞等の管理
ア　検査区分責任者は培養細胞管理標準作業書（SOP）の作成及び改定をおこなうこと。検査区分責任者は、細胞維持管理標準作業書に従い、細胞同士の交差汚染、ウイルス分離偽陰性を防ぐため培養細胞の維持管理に努めなければならない。
イ.細胞維持管理標準作業手順書に記載すべき事項
①　細胞の入手先等を含む管理簿の作成
②　継代法
③　結保存法、再起培養法
④　細胞の継代記録

6. 有毒な又は有害な物質及び危険物の管理
　病原体以外の危険物の安全管理について規定する項目

（指針の書きぶり案）
有毒な又は有害な物質及び危険物の管理
　検査区分責任者は、毒物、劇物、高圧ガスその他の有毒、有害物質及び危険物の保管、設置等について関係法令を遵守して適切に管理すること。また検体検査に用いられる全てのものに係る廃棄物について安全かつ衛生的に管理すること。

7. 検体（含む病原体）取扱いについて
１）定義
“検体（含む病原体）取扱”は検体の受付時から検査終了後の検体、病原体の保管、保存と定義する。ここでは発生動向調査により実施される検査を指す。

２）検体（含む病原体）の取扱作業手順書に含まれる項目について

ア. 検体（病原体）受付時の確認事項

受付時の確認事項。検体と検査依頼書（検査票）が一致すること、検査依頼書（検査票）の内容、検体の状態、輸送方法の妥当性を確認し、検体受付簿に記入する。記入内容は第３者による再確認を行う（職員が少ない場合は、搬入者に依頼するなど）。

（検査指針書きぶり案）

検体（含む病原体）取扱いについて

ア　検査区分責任者は、検体（病原体）の受領・保管等について、検体取扱標準作業書を作成し、必要に応じて改定すること。

イ　検体（病原体）を受領する職員は、次の事項を確認し受領すること。

①検査依頼書（検査票）の記載事項と検体（病原体）に同一性があること。

② 検体（病原体）は検査の目的に合っていること。

③ 検体（病原体）の状態（外観、量）が適切であること。

④ 受付番号を検査依頼書（検査票）及び検体（病原体）受付管理簿へ記入する。

⑤ 検体の取り違えや紛失等を防ぐため、複数の担当者が記載事項について誤りがないか確認すること（搬入者とのダブルチェック等、ダブルチェックの方法を工夫する）。

イ. 検体（病原体）の分割に関する事項

検体を分割し細菌とウイルス検査を実施するときなどを想定。検査目的に応じて検体（病原体）を適切に分割し取り違えなど防止する。

（検査指針書きぶり案）

複数検査を行う場合は、検査目的に応じて検体（病原体）を適切に分割すること。

① 検体（病原体）受付管理簿に保管場所等を記載し、検体の取り違え、紛失等を防ぐこと。

ウ. 検体（病原体）受領後の保管に関する事項

検査前の一時保管の方法、温度など保管条件を定める。

（検査指針書きぶり案）

検体（病原体）を受領した職員は、必要に応じて次により適切に保管すること。

① 検体（病原体）の保管にあたっては、検体（病原体）を保管する容器ごとに番号等を表示すること。

② 検査の目的に応じた適切な条件で検体（病原体）を保管すること。

③ 検体（病原体）受付管理簿に保管場所等を記載し、検体の取り違え、紛失等を防ぐこと

エ. 検査終了後の検体（病原体）保存に関する事項

検査が終了し、結果通知書の発行後、保存期間は各病原体ごとに異なることが想定されるため、終了後の保存期間、保存条件は病原体検査 SOP に示す。また廃棄時にはバイオセーフティーを順守し廃棄するとともに廃棄記録を残すことを定める。

（検査指針書きぶり案）

検査に用いた検体（病原体）については検査結果通知書の発行後一定期間、適切な条件の下に保存すること。

① 保存期間及び保存条件（保存方法）は、病原体検査 SOP で定めること。
② 検体（病原体）の廃棄については適切に行うこと。
③ 検体（病原体）を廃棄した時は、関係帳簿（書類）に記録し検査区分責任者の確認を受けること。
④ 廃棄物処理法を遵守すること。なお、滅菌の要否、感染性廃棄物容器への収納方法については病原体検査 SOP で定めること。

3）ひな形

別添 10　検体（含む病原体）の取扱作業手順書の例

8. 病原体検査の管理について

病原体検査に関する標準作業手順書作成の目的は、①感染症発生動向調査事業において病原体定点から収集した検体の検査を行い、一定水準の検査結果を得、国内の病原体の流行状況を調べること、②都道府県知事が検体提出を要請した病原体検査の信頼性を保証することを目的としている。

他方、病原体検査は薬品、食品のように国際的に統一された規格試験のようなものは、ほとんどないのが現状である。このため検査結果は、技術的な評価及び臨床症状を含め総合的に解釈を行う必要がある。

標準作業手順書は、通知で定められた方法は、これに基づき作成し、通知などによらない場合は、成書、病原体検査マニュアルなどを参考にして作成する。

1）記載項目

病原体検査標準作業手順書には以下の項目を含め作成する

- 検査項目：インフルエンザウイルス遺伝子検査など
- 検体の種類：血液、尿、咽頭ぬぐい液など記載
- 検査方法：

原理：PCR 法, 分離・同定法等検査法を記載

出典：SOP 見直しの際に必要。

- 試薬類：

調製法・保管法：の一覧（名前、メーカー）

標準品・株：陽性コントローロールについて（試薬 No）

- 機械器具

必要な機器リスト（機器 SOP. No.、設置場所）

器材:消耗品のリスト

機器点検・消耗品管理：必要に応じて注意事項を記載

- 検体等の取り扱い：

前処理方法

保管方法、検査開始までの保管方法（検査開始までの時間など）

- 作業環境、検査操作上の注意点：

実施場所（部屋番号等）：作業動線等の注意点

検体処理、核酸抽出、カクテル作成、核酸添加、増幅、増幅産物の取り扱い、陽性コントロールの取り扱い

- 検査の手順：

検査の手順、必要機器の操作方法、作業者の記載、機器の故障、事故、操作ミス、

- 結果の判定：

判定基準、検査の有効性の判定方法、結果の判定、判定の留意事項、陽性の場合の対処方法、判定保留場合の処理方法

- 記録の保管管理
- その他:

検査を実施する資格：(例) 検査責任者が認めたもの。

2）検査の記録台帳

検査の記録：様式を規定する。保存するデータを規定(シーケンス波形データ) 保管場所、ファイル名、検査開始日、検査終了日、検査実施者 (工程ごと)、責任者確認欄、特記事項

3）検査結果通知書

・検査依頼又は検体採取年月日
・検体の種類
・検査項目
・検査の方法
・検査の結果
・検査結果通知書の発行年月日並びに番号

(検査指針への書きぶり案)

病原体検査の管理

ア．病原体検査標準作業手順書には以下の項目が含まれていること

・検査項目：
・検体の種類
・検査方法：
・作業環境：
・用いる試薬等
・検体等の取り扱い：
・用いる機械器具：
・検査操作上の注意点：
・検査の手順：
・結果の判定：
・記録の保存・保管
・検査を実施する資格：

イ．検査記録台帳には次の事項を記載すること。

・検体受付番号 ID など
・検体保管場所
・検査開始日、検査終了日
・検査結果

・検査実施者
・責任者確認欄
・特記事項

ウ．検査結果通知書には、次の事項を記載すること。
・検査依頼又は検体採取年月日
・検体の種類
・検査項目
・検査の方法
・検査の結果
・検査結果通知書の発行年月日並びに番号

9. 病原体検査の質管理（質保証）の実施

１）検査の質管理（質保証）実施要領の作成
検査の質保証責任者が作成。検査結果の信頼性を確保するための施設が定めたポリシーを記載。病原体検査に関しては標準的な内部精度管理基準のようなものがないため、検査の質を保証するための点検方法を各施設独自に検討し作成、必要に応じて実施が必要な項目は検査の質管理（質保証）試験標準作業手順書として作成することを想定している。
地方衛生研究所で実施する病原体検査体制は一律ではないため、指針案では質管理の方法について、想定する内容と実施要領のひな形を示すのみとする。

２）検査の質管理（質保証）試験標準作業手順書
技術点検のイメージ。例）リアルタイム定量装置の定期点検、細胞のウイルス感受性試験、DNA シーケンサーの陽性コントロールを用いた波形確認、冷蔵庫、冷凍庫のデータロガーを用いた温度モニターなど。

○○県衛生研究所検査の質管理（保証）実施要領

１．目 的
この要領は，○○県衛生研究所が行う感染症発生動向調査病原体検査における、感染症法施行規則に基づく検査の質保証の方法を示し，信頼性を確保することを目的とする。

２．用語の定義
この要領において用いる用語の定義は、「病原体検査指針（案）」に準じる。（指針あるいはここで定義）

3. 検査の質管理（保証）部門責任者の役割

検査の質管理（保証）部門責任者は、検査部門責任者と協議し、検査の信頼性が適正に評価できるよう、次の項目を含む検査の質管理（保証）実施計画を作成する。

①実施頻度と実施時期

②対象検査項目

③実施方法

4. 検査の質管理（保証）の実施

（１）検査の質管理（保証）部門責任者は、各部門の検査部門責任者に対し、作成した実施計画に従い、質管理（保証）の実施を指示する。

（２）検査部門責任者は、検査の質管理（保証）に用いる試料や添加方法等を検討し、試験品を調製する。

（３）各検査担当者は、対象項目について検査実施標準作業書に基づき検査を行い、結果を検査部門責任者に提出する。

（４）検査部門責任者は、検査担当者の検査の質管理（保証）を評価する。改善措置が必要な場合は、検査担当者に指示し、質管理（保証）結果表に措置内容も併せて記録し、検査の質管理（保証）部門責任者に提出する。

（５）検査の質管理（保証）部門責任者は、各部門の検査部門責任者から提出された質管理（保証）結果表の内容を確認し、保存する。

＊様式について

検査担当者が記入するのは、通常の検査の実施記録

部門責任者→質保証は、評価及び改善事項まで記入できるものが望ましい

10. 第三者機関による病原体検査の質評価について

地方衛生研究所等による病原体検査結果を第三者による評価し、結果をフィードバックすることで検査体制の改善につなげるメカニズム、いわゆる EQA（外部による質保証：external quality assurance）は、国際的には広く普及されている。しかし感染症発生動向調査における病原体検査の現状では研究費の活用による試験的調査のみである。

今般の法改正に伴う検査の義務付けで、知事（地方衛生研究所等）が実施する感染症検査の質を、第三者機関によって、評価するメカニズムについて、十分に検討する必要がある。

ここでは技術的な第三者評価を想定する考え方のみ、下記に示す。

表１　特化した試験

第三者機関が作成した試験品を用いて、検査のプロセスごと（核酸抽出技術他）を評価する方法、或は特定の病原体の検査技術を評価することを想定

		例	想定されるもの	アウトカム
特化した試験	技術	核酸検出系の精度管理	H5,H7	機器、手技、試薬の状況
		培養細胞の精度管理	インフル	細胞の維持管理(MDCK他)
	病原体	分離が困難なもの	レジオネラ	技術一般の評価

表２　ブラインドテスト

第三者機関が作成した試験品を用いて、病原体検査の正確性を評価することを想定

		例	想定されるもの	アウトカム
ブラインドテスト(Proficiency test)	病原体別	エンテロ 呼吸器	分離とPCR	機器、手技、試薬の状況
(陰性+陽性数種)		腸内細菌	分離、血清型	
	症候群別	下痢症 発疹など		

表３　検体提出による方法

株収集の目的などで地方衛生研究所等から感染研へ検体提出時に、ダブルチェックし確認する方法。

		例	想定されるもの	アウトカム
検体提出による方法	感染研での収集目的	各種病原体	季節性インフル(耐性、株選定など)	感染研で再確認安価な精度管理

11. データ等の作成・保存要領について

病原体検査の義務化に伴う、検査結果の信頼性保証のため、追跡可能な方法で検査データの作成、並びに保存のルールを策定しておく必要がある。

文書管理の基本ポリシーは要領で規定するが、検査データは機器の操作より作成される電磁的データも多いことから（シーケンスファイル等）、必要に応じて各検査 SOP の中にデータ作成・保管法を記載する。

検討事項

・検査指針で具体的に保存期間を決めるかは要検討
・他の帳票類（検査結果通知書等）の保存期間も決定も要検討
・食品衛生法関連通知の通り 3 年間であると管理しやすい。
・あえて保存期間を定めない方がいいという意見もあり

検査施設が作成するデータ等作成保存要領には、以下の項目を入れることを想定

（検査指針書きぶり案）

データ等の作成・保存要領

検査部門責任者は、データの作成方法、保存方法、保存期間等を定めた要領を作成し、これを保管しなければならない。

ア. データの作成・保存方法

検査中に得られるデータの作成は、次により行うこと。

① 読み易く、かつ、容易に消すことのできない方法で作成すること。

② 作成の年月日を記載し、検査職員等の署名又は捺印を行うこと。

③ データの内容を変更する場合にあっては、変更前の内容を不明瞭にしない方法で行うとともに、変更の理由及び年月日を記入し、変更者の署名又は捺印を行うこと。

イ. 保存対象

データ、他の帳票類（検査結果通知書等）、電磁データなど対象を定める。

ウ. 保存期間

（自治体に定める行政文書規則を参考にする→要検討）

エ. データ、報告書等の保存

① データ、報告書等の保存に際し担当者を定め、データ、記録、報告書、検査依頼書、結果表、結果通知書等の控え等は、適切に保存すること。

② 電磁的記録については、バックアップを取り、セキュリティ対策を講じること。

12.　国からの検体提出要請

1類、2類、指定感染症他、必要な病原体検査について、国（国立感染症研究所）が地方衛生研究所等に対し検体提出要請をする際、要領を準備し地方衛生研究所に周知しておくことが望まれる。要領には、提出要請の範囲（株収集の目的等）、提出された分離株を用いた解析結果の公表時の分離施設の貢献を含める、等を定めておくことが必要と考えられる。

（検査指針への書きぶり案）

国が、迅速な危機管理体制の構築のため、必要な病原体検査について国（国立感染症研究所）に検体の一部及び分離株の提出を求めたときは、都道府県知事等はこれに応じなければならない。

13.　国への検体検査依頼

都道府県等に検査体制がない場合（検査できない、広域発生の場合）、国（国立感染症研究所）に検体検査依頼を行うことができる。この場合、病原体等の輸送に係る規定等を遵守し、国立感染症研究所へ検体を送付する。

輸送に係る規定等とは以下の通知等である。

・特定病原体等の運搬について

・感染症発生動向調査事業等においてゆうパックにより検体を送付する際の留意事項について。

（検討事項）

検査結果の還元を速やかに行う(国の役目)。

輸送に関わる費用負担を検討すること

輸送時における検体の温度管理を含む検体及び病原体等輸送要領をつくること

（検査指針への書きぶり案）

広域患者発生を疑われる場合等において、都道府県等は必要に応じて、国立感染症研究所へ検体を送付し検査を依頼することができる。検体を送付する際は、輸送に係る遵守事項（検体及び病原体等輸送要領）に従わなければならない。

14. 地方衛生研究所等の検査機関から国立感染症研究所への検体送付

地衛研から感染研へ検体輸送を行う場合は、分離株（特定病原体を含む）なども対象となるため、病原体を安全、かつ失活を防ぎ安定な方法で送付する必要があることから、検体輸送要領を定め送付する。

（検査指針への書きぶり案）

検査機関の管理者は、次の項目を含む検体送付に係る実施要領（標準作業書でなく）を作成し、必要に応じ所定の研修を受講した包装責任者を指定する。

①搬送容器

②包装方法・包装責任者・包装確認表（チェックリスト）

③温度管理

④検査依頼書

⑤搬送（受領）確認

⑥研修

⑦遵守すべき規定等

・特定病原体等の運搬について

・感染症発生動向調査事業等においてゆうパックにより検体を送付する際の留意事項について

15. 病原体情報の収集と発信

感染症情報についてのインターネットなどを通じて地方感染症情報センターを通じて発信は行われているが、病原体検出情報は十分ではない。検査の義務化に伴い、病原体検出情報を地方感染症情報センターが発信する週報、月報等に掲載することを検討する。また発生動向調査事業実施要領改定時に位置づけを行う。

（検査指針への書きぶり案）

都道府県知事等は、「検体等の採取の基準」及び「病原体検査の基準」により得られた検査結果を、病原体検出情報として、疫学情報と総合的に解析し、広く地域に還元するよう努めなければならない。

機械器具保守管理標準作業書

管理番号　　○-△

対象機器　　DNA シーケンサー　○○

施行年月日　　平成 27 年○月○日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作成者　　○○部○○課○○○○

承　認　者　　○○

（部門責任者）

廃止日　　平成　　年　　月　　日

○○県保健環境研究所○○課

DNA シーケンサー

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	廃止年月日
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

DNA シーケンサー保守管理標準作業書

1．適用範囲

この標準作業書は、○○県保健環境研究所○○課の DNA シーケンサー○○に適用する。

2．保守点検計画

1）使用時点検

使用者は機器の使用を開始する前に使用時開始時点検を行う。

2）定期点検

メーカーによる定期点検を年に 1 回実施する。

3．保守点検の手順

（1） 使用時点検

① 点検基準

点検者は使用時点検基準（表１）に従って点検し、使用時点検簿（様式１）に記入する。

② 点検簿記入要領

a）点検年月日を記入し、点検項目ごとに正常を○、異常を×と記入する。
また、表示値を記入するものにはその数値を記入する。

b）試薬等を交換した場合は有に○、交換なしの場合は無に○を記入する。

c）異常の場合は異常時点検・修理簿（様式３）に記入し必要な処置を行い、復旧時は×→○と記入する。

表１：使用時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処　置
緩衝液	機器のモニターより確認	使用期限内	新しい緩衝液に交換する
ポリマー	機器のモニターより確認	使用期限内	新しいポリマーに交換する
キャピラリー	機器のモニターより確認	使用期限内	新しいキャピラリーに交換する
外観	扉の開閉、汚れ等目視で点検	完全に開閉ができる	調整、機器の修理行う

（2） 定期点検

①点検基準

メーカーによる定期点検を実施しその記録を保管する。

③ 点検簿記入要領

異常がある場合は異常時点検・修理簿（様式２）に記入し必要な処置を行う。

（3） 異常時点検

機器が異常な場合、定期点検基準による処置または標準作業書あるいは取扱説明書による処置で異

常の原因を確認し、修理を行う。また、回復不能の場合は納入業者又はメーカーに修理を依頼する。
記録は異常時点検・修理簿（様式２）に記入する。

４．異常時の連絡または問い合わせ先

購入先名　　電話：○○○－○○○○（担当）
機器メーカー名　電話：○○○－○○○○

様式１

DNA シーケンサー使用時点検簿

使用日	緩衝液交換	ポリマー交換	キャピラリー交換	外観	備考
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		
	有 ・ 無	有 ・ 無	有 ・ 無		

様式２

異常時点検・修理簿

点検日：　年　　月　　日

管理番号：　　管理担当者：

機種名：　　検査区分責任者：

１　異常の状況（異常発生日、状況 etc）

２　原因と処置内容及び結果

３　修理の依頼年月日、依頼先、依頼内容

４　修理等の概要

（作業報告書を添付すること。ただし、メーカー等に依頼しないで修理した場合、その内容を記入すること）

機械器具保守管理標準作業書

管理番号　　○-△

対象機器　　遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）

施行年月日　　平成 27 年○月○日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作成者　　○○部○○課

承　認　者　　○○

（部門責任者）

廃止日　　平成　　年　　月　　日

○○県保健環境研究所○○課

遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	廃止年月日
平成 27 年〇月〇日	新規作成		

1　適用範囲

この標準作業書は、○○県保健環境研究所○○課の遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）に適用する。

2．保守点検計画

1）使用開始時点検

使用者は，機器の使用を開始する前に使用時開始時点検を行う。

2）使用時点検

使用時開始時点検をした機器を使用する場合は，使用時点検を行う。

3）使用終了時点検

使用を終了する場合は，使用終了時点検を行う。

4）定期点検

メーカーによる点検を年１回実施する。

3．保守点検の手順

1）使用開始時点検

使用者は使用開始時点検基準（表－１）に従って点検し，点検時刻および点検結果を遺伝子増幅装置使用記録表（様式１）に記入する。異常が認められた場合は、使用開始時点検基準（表－１）の「処置」に従う。

2）使用時点検

使用開始時点検が終了した機器を使用する場合は、使用時点検基準（表－２）に従って点検し、遺伝子増幅装置使用記録表（様式１）に記入する。異常が認められた場合は、使用時点検基準（表－２）の処置に従う。

3）使用終了時点検

メインスイッチを切る時に使用終了時点検を行う。使用終了時点検基準（表－３）に従って点検し、点検時刻および点検結果を遺伝子増幅装置使用記録表（様式１）に記録する。異常が認められた場合は、使用終了時点検基準（表－３）の処置に従う。

4）**定期点検**

年１回のメーカーによる点検を実施しその記録を保管する。

4．遺伝子増幅装置使用記録表（様式１）記入方法

a. 正常を○、異常を×と記入する。

b. 全ての点検項目が良好であった場合は、判定欄に○を記入する。

c. 異常の箇所があった場合は正常な状態に復旧するよう処置し、復旧時は×→○を記入する。また、備考欄または欄外に処置内容を記入する。

5．異常時の処置

1）機器の取扱い

保守点検時又は使用中に機器の異常が認められた場合、使用者は直ちに管理担当者又は検査区分責任者に報告する。管理担当者はメンテナンスガイドに従って点検し、点検結果から修理が必要と判断された場合は、使用を中止し、修理又は修理を外部委託するなどの処置を行う。その経過を異常時記録及び修理記録表（様式２）に記録する。

２）試験品の取扱い

検査中に機器の異常が認められた場合は、検査担当者は直ちに検査を中止し、試験品及びその検査の取り扱いについて検査区分責任者と協議の上適切に処置する。検査担当者は経過を検査等に関する記録に記録する。

６．異常時の連絡または問い合わせ先

購入先名　　電話：○○○－○○○○（担当）

機器メーカー名　　電話：○○○－○○○○

表－１　使用開始時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
設置状態	目視による。	高温多湿を避け温度・湿度等の安定した場所に設置及び収納する事。機器ならびに使用器材が清潔に保持されており、外見上変形・傷・腐食などがないこと。	環境条件の安定した場所に設置する。汚れは清拭及び洗浄などメンテナンスガイドに従い除去し、汚染器材は使用しないこと。器具に傷みがあり機器の性能に影響を与えるものは修理を行う。
性能	電源を入れる．機器を試験的に作動させ、性能を確認する．	電源が入り作動すること．本機のセルフテスト機能でエラーが出ないこと．	異常の原因を確認し修理を行う、またはメーカーに修理を依頼する。エラーの発生時、メンテナンスガイドに記載されている内容にそって、メーカーへの修理の依頼等対処する。

表－２　使用時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑの運転状況	操作パネルによる目視による.	ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑが正常に稼働していること。	異常発生時、メンテナンスガイドに従い対処し、改善されない場合メーカーに連絡の上修理を依頼する。
音 （冷却ﾌｧﾝ）	冷却ﾌｧﾝが異常音を発していない事を確認する。	ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ上冷却のｽﾃｰｼﾞにある時に正常に稼働していること。	異常発生時、メンテナンスガイドに従い対処し、改善されない場合メーカーに連絡の上修理を依頼する。
（シャッター）	シャッターの音正常音を発している事を確認する。	ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ上、サイクルが進む毎に正常音を発している事を確認する。	

表－３　使用終了時点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処置
設置状態	目視による.	機器ならびに使用器材が清潔に保持されており、外見上変形・傷・腐食などがないこと.	汚れは清拭及び洗浄などメンテナンスガイドに従い除去し、汚染器材は使用しないこと.
延べ点灯時間	ソフトウェア【Instrument】メニューから延べ点灯時間を確認し、記載する	交換したハロゲンランプの延べ点灯時間が2000時間を超えないこと.	延べ点灯時間が 2000時間を超えた場合は、メンテナンスガイドに従い、ハロゲンランプを交換し、ROI キャリブレーションを実施後、使用する.

（様式１）

遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）使用記録表

メーカー名：○○○○　　形式：○○○○　　管理番号：

備品番号：ID　　設置場所：○○○○室　　管理担当者名：

異常発生時連絡先：　　TEL　○○○－○○○○

点検年月日	点検区分	点検時刻	設置状態	性能	ﾌﾟﾛｸﾞﾗﾑ	音	延べ点灯時間	判定	点検者	備考
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									
年	開始時									
月	使用時									
日	終了時									

＊使用開始時：作動状態以外の全項目を点検する。

＊使　用　時：作動状態の項目を点検する。

＊使用終了時：設置状態の項目を点検する。

（様式 2）

遺伝子増幅装置（定量 PCR 装置）異常時記録および修理記録表

メーカー名：○○○○　　形式：　○○○○　　器番：○○○○

管理番号：　　管理担当者：

設置場所：○○○　　室　　設置年月日：　　年　　月

異常発生時連絡先：　　TEL　○○○－○○○○

年月日	使用者	点検者	異常事項	処置	修理等

機械器具保守管理標準作業書

管理番号　　○-△

対象機器　　冷凍庫

施行年月日　　平成 27 年○月○日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作成者　　○○部○○課

承　認　者　　○○

（部門責任者）

廃止日　　平成　　年　　月　　日

○○県保健環境研究所○○課

冷凍庫

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	廃止年月日
平成27年○月○日	新規作成		

冷凍庫保守管理標準作業書

1．適用範囲

この標準作業書は、○○県保健環境研究所○○課の冷凍庫に適用する。

2．保守点検計画

1）日常点検

担当者又は代行者は、1日1回日常点検を行う。

2）定期点検

担当者又は代行者は、年に1回定期点検を実施する。

3．保守点検の手順

（1） 使用時点検

① 点検基準

点検者は日常点検基準（表1）に従って点検し、日常点検簿（様式1）に記入する。

② 点検簿記入要領

a）点検年月日を記入し、点検項目ごとに正常を○、異常を×と記入する。
また、表示値を記入するものにはその数値を記入する。

b）判定欄は点検項目毎に定めた許容範囲内にあるか否かを判定し、正常は○、異常は×と記入する。

c）異常の場合は異常時点検・修理簿（様式3）に記入し必要な処置を行い、復旧時は×→○と記入する。

表1：日常点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処　置
温度表示	機器のモニターより確認	設定温度±3℃	調整、機器の修理等依頼する
扉の開閉、汚れ等の異常箇所	扉の開閉、汚れ等目視で点検	完全に開閉ができる	調整、機器の修理行う

（2） 定期点検

①点検基準

管理担当者は定期点検基準（表2）に従って点検し、定期点検簿（様式2）に記入する。

②点検簿記入要領

a) 点検年月日を記入し、点検項目ごとに正常を○、異常を×と記入する。また、表示値を記入するものにはその数値を記入する。

b) 総合判定は点検項目毎に定めた許容範囲内にあるか否かを判定し、合格又は不合格を記入する。

c) 不合格の場合は異常時点検・修理簿（様式3）に記入し必要な処置を行い、復旧時は×→○と記入する。

表２：定期点検基準

点検項目	点検方法	管理基準	処　置
温度表示	温度計にて指示温度を確認する	機器毎に定められた管理基準内であること	修理依頼
汚れ	汚れていないか	汚れがないこと	必要に応じ清掃する
異常音	外から庫内の音を聞く	モーター音など異常音を確認	修理依頼
霜	霜の状態観察	吹き出し口がふさがれていないか	霜取りを設定 霜を取り除く
フィルラー 廃水	汚れの有無を確認 廃水だめを確認	ほこり、ゴミ等によりフィルターがふさがっていないか たまっていないか	清掃する 排水する

（３）　異常時点検

機器が異常な場合、定期点検基準による処置または標準作業書あるいは取扱説明書による処置で異常の原因を確認し、修理を行う。また、回復不能の場合は納入業者又はメーカーに修理を依頼する。記録は異常時点検・修理簿（様式３）に記入する。

４．異常時の連絡または問い合わせ先

購入先名　　電話：○○○－○○○○（担当）

機器メーカー名　　電話：○○○－○○○○

様式１

冷凍庫日常点検簿

備品・器具の設置場所 / 種類等	管理番号	○○検査室　フリーザー　マイナス20℃

記入例		設定温度	実測温度	異常箇所	その他	判定	点検者
2015/2/2	月	−20℃	*-20℃*	*なし*	*なし*	*○*	*○○*

		設定温度	実測温度	異常箇所	その他	判定	点検者
	日	−20℃					
	月	−20℃					
	火	−20℃					
	水	−20℃					
	木	−20℃					
	金	−20℃					
	土	−20℃					
	日	−20℃					
	月	−20℃					
	火	−20℃					
	水	−20℃					
	木	−20℃					
	金	−20℃					
	土	−20℃					
	日	−20℃					
	月	−20℃					
	火	−20℃					
	水	−20℃					
	木	−20℃					
	金	−20℃					
	土	−20℃					
	日	−20℃					
	月	−20℃					
	火	−20℃					
	水	−20℃					
	木	−20℃					
	金	−20℃					
	土	−20℃					
	日	−20℃					
	月	−20℃					
	火	−20℃					

異常箇所の所見：
振動　騒音　蓋の開閉　エラーランプの点滅　外観　その他感知できる異常

様式２

冷凍庫定期点検簿

点検年月日：　　年　　月　　日　　点検者：

管理番号：　　機種：

（1）温度表示

設定温度	温度計の示す温度
判定	

（2）汚れ

汚れていないか	
判定	

（3）異常音

異常音の有無	
判定	

（4）霜

霜の状態確認	
判定	

（5）フィルター

汚れの確認	
判定	

（6）廃水

廃水だめの確認	
判定	

様式３

異常時点検・修理簿

点検日：　年　　月　　日

管理番号：　　管理担当者：

機種名：　　検査区分責任者：

１　異常の状況（異常発生日、状況 etc）

２　原因と処置内容及び結果

３　修理の依頼年月日、依頼先、依頼内容

４　修理等の概要

（作業報告書を添付すること。ただし、メーカー等に依頼しないで修理した場合、その内容を記入すること）

試薬等管理標準作業書

SOP No.　　△-1

施行年月日　　平成　　年　　月　　日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作　成　者　　○○課　○○××

承　認　者　　△△□□
（検査部門責任者）

失効日　　平成　　年　　月　　日

○県保健環境研究所
○○部　○○課

試薬等管理標準作業書

	年　月　日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作　　成	平成27年　月　日	○○××	△△□□	
第　1回改訂				
第　2回改訂				
第　3回改訂				
第　4回改訂				
第　5回改訂				
第　6回改訂				
第　7回改訂				
第　8回改訂				
第　9回改訂				
第１０回改訂				

○県保健環境研究所

○○部　○○課

1．適用範囲

感染症法第14条及び第15条に基づくウイルス学的な検査又は試験（以下「検査等」という）を行う際に使用する試薬等全般に適用する。

2．定義

試薬等の定義は次の通りとする。

試薬等とは、試薬、試液、細胞、参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）、陽性コントロール（病原体遺伝子）をいう。

1）試薬

検査等に使用する化学物質及び生物学的製剤をいう。（基礎培地、液体培地、培地添加物質、細胞、免疫血清、抗原、赤血球等を含む）

2）試液

試薬を調製して得られた溶液等をいう。（調整した培地、抗血清、抗原等を含む）

3）細胞

ウイルス分離に使用する株化細胞等をいう。由来及び継代歴が明確なものを使用する。

4）参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）

ATCC 等の生物資源データバンクに登録されているウイルス、細菌株で文献等で公に基準株として使われているものをいう。

5）陽性コントロール（病原体遺伝子）

病原体遺伝子（抽出 RNA 液、抽出 DNA 液、cDNA 液、PCR 増幅産物等）で、遺伝子検査時に陽性コントロールとして使われるものをいう。

3 調整方法

1）試液

検査実施標準作業書に記載された方法で調整する。

2）細胞

維持管理方法（凍結保存、継代方法、品質管理方法）について別に定める。

3）参照株

参照株を再度保存する場合は、元の特性が引き継れていることを遺伝子増幅法等により確認すること。

4）陽性コントロール（病原体遺伝子）

検査実施標準作業書に記載された方法で調整する。

4 表示方法と管理台帳への記載項目

1）試薬

（1）試薬の容器には、次の事項のうち①～⑧を表示するとともに、試薬管理台帳（様

式１）に①～⑪の事項を記載する。購入時に留意すべき事項

① 入手年月日
② 入手源（製造者又は販売者等）
③ 識別名称
④ ロット番号（又は製造番号）
⑤ 純度（グレード）又は濃度
⑥ 保存方法
⑦ 保存場所
⑧ 使用期限
⑨ 開封年月日
⑩ 開封確認者氏名
⑪ 使用終了年月日
⑫ 使用終了確認者氏名

２）試液

（１）試液の調製は、それぞれの検査実施標準作業書に定める試液調製方法に従って行い、次の事項を試液管理簿（様式２）に記録する。また、別の標準作業書で調整記録があるものについては試液管理簿への記載は不要。

① 調製年月日
② 調製者氏名
③ 名称（濃度が含まれる）
④ 調製に使用した試薬の名称および量
⑤ 調製量
⑥ 保存方法
⑦ 保管場所
⑧ 使用期限
⑨ 使用開始年月日
⑩ 使用開始確認者氏名
⑪ 使用終了年月日
⑫ 使用終了確認者氏名

（２）試液の容器には、次の事項を表示する。

① 調製年月日
② 試液名称（濃度が含まれる）
③ 調製者氏名

３）参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）

（1）遺伝子検査実施時など、核酸抽出法の質の管理のため、参照株を添加し検査を行う場合等、次の事項を参照株管理簿（様式3）に記録する。

① 入手年月日
② 入手先名称
③ 病原体名
④ 保存年月日／保存者名
⑤ 保存方法／保管場所／保存量
⑥ 廃棄年月日／廃棄者名
⑦ 備考（血清型・遺伝子型等）

4）陽性コントロール（病原体遺伝子）

（1）遺伝子診断用陽性コントロールは専用の容器に保管し、容器には次の事項を表示する。陽性コントロールは、遺伝子診断用試薬類と交差汚染が起こらないよう、注意深く保管せねばならない。

① 陽性コントロール名
② 病原体株名（ウイルス遺伝子保存場合は RNA、DNA、cDNA、PCR 増幅産物等の別）
③ 保存年月日

5 試薬等の管理に関する注意事項

1）試薬等は必要量以上に購入しないこと。また、必要量以上に調製しないこと。
2）試薬等の使用期限は使用目的に応じて設定すること。
3）試薬等は適切な条件で保存し、純度の低下したもの、変質したもの、使用期限を過ぎたものは使用してはならない。ただし、十分に使用に耐えることが証明された場合には期限を延長することができる。
4）試液は試液調整実施標準作業書に従って調製すること。
5）使用時ごとに調製する必要のある試液は、当該検査終了時に廃棄すること。
6）冷蔵、冷凍で保存している試薬等を、使用時に室温まで戻すときは吸湿あるいは体積の変化等に注意すること。通常、室温まで戻して使用すること。
7）毒物、劇物、危険物の取扱いは、関係法令に従うこと。
8）病原体及び有害物質の取扱いは、作業従事者が危害を被ることのないよう、また環境汚染がないよう十分配慮すること。
9）試薬等の廃棄に当たっては、各種法令に違反することなく、環境汚染のないように十分配慮すること。
10）標準ウイルス株・ウイルス遺伝子（陽性コントロール）は必要量以上に保存しないこと。

11) 標準ウイルス株等感染性を有する可能性があるものの廃棄に当たっては、各種法令に違反することなく、環境汚染のないように十分配慮し、必ず滅菌処理を施した上で廃棄すること。

様式１

試薬管理台帳

試薬名（純度又は濃度）	保存方法及び保存場所	製造者又は販売業者

管理番号	入手年月日/確認者氏名	使用期限/ロット番号	開封年月日/確認者氏名	使用終了年月日/確認者氏名	備考

様式2

試薬名：＿＿＿＿＿＿＿＿

調製年月日	調整者	調整量	試薬名称／量	試薬名称／量	試薬名称／量	保存方法／保存場所	使用開始／確認者	使用終了日／確認者	備考

様式３

参照株管理簿

病原体名	入手年月日／入手先	保存年月日／保存者名	保存方法／保存場所／保存者名	保存量	廃棄年月日／廃棄者名	備考

試薬管理標準作業書

SOP No.　　XXXX

項目　　試薬の調整

適用　　ウイルス検査に使用する培地

施行年月日　　平成　　年　　月　　日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作　成　者　　○○課　氏名

承　認　者　　氏名
（検査部門責任者）

失効日　　平成　　年　　月　　日

○○○研究所
○○課
検査実施標準作業書

［細胞培養用培地作成］

	年　月　日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作　　成	平成　　年　月　日			
第　１回改訂				
第　２回改訂				
第　３回改訂				
第　４回改訂				
第　５回改訂				
第　６回改訂				
第　７回改訂				
第　８回改訂				
第　９回改訂				
第１０回改訂				

○○○研究所
○○課

試薬調整標準作業書

1. 適用範囲

ウイルス分離培養で使用する培地と試薬の調整方法

2. 種類

細胞の維持管理に使用する培地

3. 出典

1) イーグルMEM培地「ニッスイ」① 製品説明書
2) 井出利憲「細胞培養入門ノート」1999 羊土社

4. 調整に使用する機器・器具及び器材

1) 機器・器具

ガラスビン
電子天秤（SOPNo. ）
冷蔵庫（SOPNo. ）
ピペッター
メスシリンダー
オートクレーブ（SOPNo. ）

2) 器材

10ml ピペット（滅菌済み）
アルミ箔
オートクレーブテープ

3) 捜査上の注意

① 安全キャビネットでの作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
② オートクレーブする際、ビンは密栓しない。
③ オートクレーブ後の操作は、安全キャビネット内で行うこと。

5. 試液の調整

MEM培地

1) 試薬

イーグルMEM培地「ニッスイ」①（粉末）
牛胎児血清：メーカー名
7.5%炭酸水素ナトリウム：
グルタミン（200mmol/L）：

2)　調整法

① イーグルMEM9.4gを電子天秤で量りとりビンに入れる。

② 蒸留水1000mlをメスシリンダーで量りとり、イーグルMEMを完全に溶解する。

③ ビンの蓋を軽く閉め、アルミ箔で覆う。

④ オートクレーブシールを貼る。

⑤ 121℃で15分間オートクレーブする。

⑥ 室温まで冷やす。(翌日まで置く。)

⑦ 安全キャビネット内で7.5%炭酸水素ナトリウム 20ml、牛胎児血清100ml、グルタミン溶液10mlを加える。

⑧ 密栓して、冷蔵庫（2～10℃）に保存する。

MEM 作成記録用紙

作成日：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　　作成者：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

作成量：　　L

作成
イーグル MEM 培地「ニッスイ」①粉末（以下イーグル MEM 培地）

Lot No. ：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

□以下の表に従って必要量を測り取り混合する。

作成する量に○	作成する MEM 培地の量（蒸留水の量）	イーグル MEM 培地の必要量	実際の量
	1L	9.4g	
	2L	18.8g	
	3L	28.2g	
	5L	47	

□オートクレーブ滅菌する（121℃　15 分）。（時間：　　～　　）

□安全キャビネット内で以下の試薬を加える

作成する量に○	作成する MEM 培地の量	7.5%炭酸水素ナトリウム溶液	200mmol/L グルタミン溶液	牛胎児血清
	1L	20ml	10ml	100ml
	2L	40ml	20ml	200ml

	3L	60ml	30ml	300ml
	5L	100ml	50ml	500ml

添加日時：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　添加実施者：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

□試薬添加後は直ちに冷蔵庫で保存する。

試薬管理標準作業書

SOP No.　　XXXX

項目　　試薬の調整

適用　　ウイルス検査に使用する細胞の継代

施行年月日　　平成　　年　　月　　日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作　成　者　　○○課　氏名

承　認　者　　氏名
（検査部門責任者）

失効日　　平成　　年　　月　　日

○○○研究所
○○課

試薬管理標準作業書
［細胞の継代］

	年　月　日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作　　成	平成　　年　月　日			
第　１回改訂				
第　２回改訂				
第　３回改訂				
第　４回改訂				
第　５回改訂				
第　６回改訂				
第　７回改訂				
第　８回改訂				
第　９回改訂				
第１０回改訂				

○○○研究所
○○課

細胞の継代標準作業書

1　検査の項目

培養細胞の継代（接着細胞）。

2　試験品の種類

実験室内において使用している細胞。

5　検査等に用いる試薬

① PBS(-)
② Trypsin-EDTA(0.05%)
③ イーグル MEM 培地(10%FBS)
④ トリパンブルー染色液

7　検査等に用いる機器・器具及び器材

1) 機器・器具
① 炭酸ガス培養装置（SOP No.　　）
② メスピペット
③ オートピペッター
④ マイクロピペット

2) 器材
① 細胞培養フラスコ(75cm^2)
② 顕微鏡（SOP No.　　）
③ チップ(p-100 用)
④ 1.5ml エッペンチューブ
⑤ ビルケルチュルク血球計算盤
⑥ カウンター

8　操作上の注意

1) 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
2) 細胞の計数以外の作業はすべて安全キャビネット内で行うこと
3) 細胞のクロスコンタミネーションを避けるため、細胞ごとに培地は用意し、作業は同時に行わないこと。

9　細胞継代

1. 細胞の状態を観察する。90%程度コンフルエントのものを用いる。細菌や真菌のコ

ンタミネーションが認められるものは使用せず廃棄する。

2. PBS(-)で細胞を3回洗浄する。
3. Trypsin/EDTAを3ml加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTAを取り除く。
4. Trypsin/EDTAを1ml加え、細胞全体にいきわたらせる。トリプシン溶液は細胞に直接かからないよう、壁をはわすように静かに加える。
5. 37℃のインキュベーターに5分程度静置。
6. 細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。
7. イーグルMEM培地(10%FBS)を10ml加え、泡立たないよう優しくピペッティングし、single cellにする。
8. 7.の増殖培地細胞数をエッペンチューブに100μlとり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。
9. 新しいフラスコに移す。(目安量1~2×10^5個/ml、25ml、75cm^2フラスコ)
   (1) 目的量の培地を新しいフラスコに入れる。
   (2) 目安量となるように細胞浮遊液を新しいフラスコに加える。
   (3) 以下を明記する。
      i 自分の名前
      ii 細胞の名前
      iii 日付
      iv 継代数(継代毎に1代ずつ数を増やす)
10. 蓋をしっかりと閉め、37℃のインキュベーターに静置。

培養細胞の継代記録用紙

実施日：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　　実施者：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

使用細胞：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

使用培地（MEM）Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
（自家製の場合で作成記録がある場合はLot. No.記載不要、作成
日：＿＿＿＿＿＿＿＿　）

PBS(-)Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
（自家製の場合で作成記録がある場合はLot. No.記載不要、作成
日：＿＿＿＿＿＿＿＿　）

Trypsin-EDTA(0.05%) Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

トリパンブルー染色液Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

継代（開始時間：　　：　　）
□継代する細胞が90%程度のコンフルエントかどうか顕微鏡で確認する。

細胞名：＿＿＿＿＿＿　継代可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　継代可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　継代可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　継代可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　継代可能？　yes□、No□

↓

□PBS(-)で細胞を3回洗浄する。

↓

□Trypsin/EDTAを3ml加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTAを取り除く。

↓

□Trypsin/EDTAを1ml加え、細胞全体にいきわたらせる。

↓

□37℃のインキュベーターに5分程度静置する。

（時間：　　：　　～　　：　　）

↓

□細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。

↓

□イーグルMEM培地(10%FBS)を10ml加え、泡立たないよう優しくピペッティングし、single cellにする。

↓

□増殖培地細胞数をエッペンチューブに100μlとり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。

細胞名	実測数	細胞密度	希釈

↓

□目的量の培地を新しいフラスコに入れ、冷蔵庫の細胞浮遊液を加える。

フラスコには以下を明記する。

ⅰ自分の名前

ⅱ細胞の名前

ⅲ日付

ⅳ継代数(継代毎に1代ずつ数を増やす

↓

□37℃のCO_2インキュベーターで培養する。

終了時間：　　：

試薬管理標準作業書

SOP No.　　△-1

実施項目　　細胞の凍結保存

施行年月日　　平成　　年　　月　　日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作　成　者　　ウイルス課　○○××

承　認　者　　△△□□
（検査部門責任者）

失効日　　平成　　年　　月　　日

○県保健環境研究所
保健科学部　ウイルス課

試薬管理標準作業書
［細胞の凍結保存］

	年　月　日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作　　成	平成 26 年　月　日	○○××	△△□□	
第　１回改訂				
第　２回改訂				
第　３回改訂				
第　４回改訂				
第　５回改訂				
第　６回改訂				
第　７回改訂				
第　８回改訂				
第　９回改訂				
第１０回改訂				

○県保健環境研究所
保健科学部　ウイルス課

細胞の凍結保存標準作業書

1　目的および適応範囲

実験室内で使用している細胞について凍結保存方法の基準を定め、試験等の信頼性確保を図ることを目的とする。

2　必要な試薬および器具・機械

・CELLBANKER® 1plus またはCELLBANKER® 1（日本全薬工業株式会社）
・PBS(-)
・トリプシン-EDTA液
・細胞増殖培地（10%FBS加MEM）（作成については標準手順書「培地作成」を参照）
・滅菌チューブ（15ml容量）
・血球計算盤
・マイクロピペット、チップ
・クライオチューブ（1.8ml容量）
・炭酸ガス培養装置（SOP No.　　）
・倒立顕微鏡（SOP No.　　）
・遠心分離機（1,000rpm）（SOP No.　　）
・ディープフリーザー（-80℃）（SOP No.　　）

3　操作法

① 細胞汚染の有無や細胞の状態を確認する。80～90%コンフルエント状態の細胞が望ましい。
② 培養フラスコ内の培地を捨て、5mlのPBS(-)で細胞を洗浄する操作を2回行う。
③ トリプシン-EDTA液を5ml加え細胞を浸漬後トリプシン溶液は捨てる。
④ 37℃の炭酸ガス培養装置に入れ、静置する。
⑤ 細胞が円形になり剥離してきたら10mlの細胞増殖培地を加え、ピペッティングにより細胞を懸濁させる。
⑥ 細胞懸濁液の一部を取り、等量のトリパンブルー溶液と混合し血球計算盤で生細胞数を計測する。
⑦ 細胞懸濁液を1,000rpm、5分遠心し、上清を捨てる。
⑧ 5×10^5 ～ 5×10^6 個の細胞に対し1mlの割合でCELLBANKER® を加え優しくピペッティングする。
⑨ 細胞懸濁液をクライオチューブ(予め、以下の情報を記載しておく)に1mlずつ分注する。
1. 細胞名、2. 継代数、3. 凍結年月日
また、保存した細胞の情報を記録簿に記す。
⑩ クライオチューブを-80℃のディープフリーザーに入れ凍結する。
⑪ 後日、保存した細胞を用いて再起することを確認すると良い。

凍結細胞記録簿

No.	凍結年月日	細胞名	由来	実施者	保存場所	再起培養年月日	備考
1							
2							
3							
4							
5							
6							
7							
8							
9							

細胞の凍結保存記録用紙

実施日：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　　実施者：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

使用細胞：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

使用培地（MEM）Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
（自家製の場合で作成記録がある場合はLot. No.記載不要、作成日：＿＿＿＿＿＿＿＿　）

PBS(-)Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
（自家製の場合で作成記録がある場合はLot. No.記載不要、作成日：＿＿＿＿＿＿＿＿　）

Trypsin-EDTA(0.05%) Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

トリパンブルー染色液Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

保存（開始時間：　　：　　）
□保存する細胞が90%程度のコンフルエントかどうか顕微鏡で確認する。

細胞名：＿＿＿＿＿＿　保存可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　保存可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　保存可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　保存可能？　yes□、No□

細胞名：＿＿＿＿＿＿　保存可能？　yes□、No□

↓

□PBS(-)で細胞を2回洗浄する。

↓

□Trypsin/EDTAを5ml加え、細胞表面に均一に分散させる。Trypsin/EDTAを取り除く。

↓

□37℃のインキュベーターに5分程度静置する。
（時間：　　：　　～　　：　　）

↓

□細胞を顕微鏡で観察し、細胞がはがれていることを確認する。はがれていない場合にはインキュベーターでの静置時間を延長する。

↓

□イーグルMEM培地(10%FBS)を10ml加え、泡立たないよう優しくピペッティングし、single cellにする。

↓

□増殖培地細胞数をエッペンチューブに 100μl とり、等量のトリパンブルーで染色、生細胞数を計測し、細胞密度を計算する。計数中細胞は冷蔵庫に入れておく。

細胞名	実測数	トータル細胞数	CELLBANKER®添加量

□細胞懸濁液を 1,000rpm、5 分遠心し、上清を捨てる。

（時間：　　：　　～　　：　　）

□5×10^5 ～ 5×10^6 個の細胞に対し 1 ml の割合で CELLBANKER® を加え優しくピペッティングする。

□細胞懸濁液をクライオチューブ（予め、以下の情報を記載しておく）に 1ml ずつ分注する。

ⅰ 細胞名
ⅱ 継代数
ⅲ 保存年月日

□-80℃のディープフリーザーに入れ凍結する。

終了時間：　　：

試薬管理標準作業書

SOP No.　　△-1

実施項目　　細胞の再起培養

施行年月日　　平成　　年　　月　　日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作　成　者　　ウイルス課　○○××

承　認　者　　△△□□
（検査部門責任者）

失効日　　平成　　年　　月　　日

○県保健環境研究所
保健科学部　ウイルス課

試薬管理標準作業書
［細胞の再起培養］

	年　月　日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作　　成	平成 26 年　月　日	○○××	△△□□	
第　１回改訂				
第　２回改訂				
第　３回改訂				
第　４回改訂				
第　５回改訂				
第　６回改訂				
第　７回改訂				
第　８回改訂				
第　９回改訂				
第１０回改訂				

○県保健環境研究所
保健科学部　ウイルス課

細胞の再起培養標準作業書

1　目的および適応範囲

凍結保存している細胞について再起培養方法の基準を定め、試験等の信頼性確保を図ることを目的とする。

2　必要な試薬および器具・機械

・細胞増殖培地（培地作成については、標準手順書「培地作成」を参照 SOP No.　　）
・70%アルコール綿
・滅菌チューブ（15ml 容量）
・培養フラスコ（75cm^2）
・恒温水槽（37℃）
・遠心分離機（1,000rpm）（SOP No.　　）
・炭酸ガス培養装置（SOP No.　　）
・倒立顕微鏡（SOP No.　　）

3　操作法

① 保存されているクライオチューブを取り出し、直ちに 37℃の恒温水槽で振盪し素早く融解させる。
② クライオチューブの外側を 70%アルコール綿で拭く。
③ 保存していた細胞懸濁液を 10ml の細胞増殖培地が入った 15ml チューブに移し混和する。
④ 1,000rpm、5 分遠心分離し、上清を捨てる。
⑤ 5ml の細胞増殖培地を加え細胞を再懸濁する。
⑥ 培養フラスコに細胞懸濁液を全量移し、細胞増殖培地 15ml を加える。
⑦ 培養フラスコに以下の情報を記入する。
　1. 実施者　2. 細胞名　3. 実施日　4. 継代歴
⑧ 炭酸ガス培養装置に入れ 37℃、5%二酸化炭素下で 1 晩培養する。
⑨ 翌日、細胞の定着状態を確認し、培地を新しい細胞増殖培地に交換する。
　定着細胞が少ない場合は再度再起培養を行う。

細胞の再起記録用紙

実施日：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿　実施者：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

再起細胞：＿＿＿＿＿＿＿＿　保存年月日：＿＿＿＿＿＿＿＿　継代数：＿＿＿＿＿＿＿＿

再起細胞：＿＿＿＿＿＿＿＿　保存年月日：＿＿＿＿＿＿＿＿　継代数：＿＿＿＿＿＿＿＿

使用培地（MEM）Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
（自家製の場合で作成記録がある場合はLot. No.記載不要、作成日：＿＿＿＿＿＿＿＿　）

PBS(-)Lot. No.＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿
（自家製の場合で作成記録がある場合はLot. No.記載不要、作成日：＿＿＿＿＿＿＿＿　）

再起（開始時間：　　：　　）
□保存されているクライオチューブを取り出し、直ちに37℃の恒温水槽で振盪し素早く融解させる。
↓
□クライオチューブの外側を70%アルコール綿で拭く。
↓
□保存していた細胞懸濁液を10mlの細胞増殖培地が入った15mlチューブに移し混和する。
↓
□1,000rpm、5分遠心分離し、上清を捨てる
（時間：　　：　　～　　：　　）
↓
□5mlの細胞増殖培地を加え細胞を再懸濁する。
↓
□培養フラスコに細胞懸濁液を全量移し、細胞増殖培地15mlを加える。
↓
□培養フラスコに以下の情報を記入する。
ⅰ自分の名前
ⅱ細胞の名前
ⅲ日付
ⅳ継代数
↓
□炭酸ガス培養装置に入れ37℃、5%二酸化炭素下で1晩培養する。
（時間：　　：　　）
↓
□翌日、細胞の定着状態を確認し、培地を新しい細胞増殖培地に交換する。定着細胞が少ない場合は再度再起培養を行う。

終了確認日時：

検査実施標準作業書(ひな形)

SOP No.　　XXX

試験品の種類　培養細胞

検査項目　　細胞感受性試験

試験法　　参照ウイルスを用いた力価試験

施行年月日　　平成　　年　　月　　日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作　成　者　　ウイルス課　山田太郎

承　認　者
(検査部門責任者)

失効日　　平成　　年　　月　　日

○○○○研究所
○○部　○○課
検査実施標準作業書

［細胞感受性試験］

	年　月　日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作　　成	平成 26 年　月　日	○○××	△△□□	
第　１回改訂				
第　２回改訂				
第　３回改訂				
第　４回改訂				
第　５回改訂				
第　６回改訂				
第　７回改訂				
第　８回改訂				
第　９回改訂				
第１０回改訂				

細胞感受性試験標準作業書

1　検査の項目

ポリオウイルスに対する細胞感受性試験

2　試験品の種類

RD-A 細胞および L20B 細胞

3　検査法

原理：弱毒参照ポリオワクチン株（ＢＳＬ１）を用いて力価試験を行う。

出典：World Health Organization. Polio laboratory manual 4th edition, WHO/IVB/04.10, page 73-79, 2004

4　検査等に用いる試薬

試薬

① イーグル MEM 培地：和光(型番　　)

② PBS(-)：和光(型番　　)

③ FBS：シグマ

④ ＥＤＴＡ-トリプシン溶液：シグマ(型番　　)

⑤ トリパンブルー溶液：シグマ(型番　　)

※培地作製については、「培地作製標準作業書」(番号 XXX)を参照すること。

参照ウイルス

弱毒参照ポリオワクチン株 (NIBSC 株)

※参照ポリオウイルスの調整（in house 参照ウイルス)、保管条件は「培地作製標準作業書」(番号 XXX)を参照すること。

5　検査等に用いる機器・器具及び器材

1) 機器・器具

① 炭酸ガス培養装置（○○○○社　型番)

② 顕微鏡（○○社　型番)

③ ボルテックス（○○社 型番)

④ マイクロピペット

⑤ 数取器

⑥ 試験管立て

⑦ マルチチャンネルマイクロピペット
⑧ 冷凍庫
⑨ 冷蔵庫

2) 器材
① 細胞培養用 96 穴マイクロプレート
② 15ml 滅菌チューブ
③ 細胞培養フラスコ 25cm^2
④ ビルケルチュルク血球計算盤
⑤ フィルター付き滅菌チップ（p-200 用，p-1000 用）
⑥ 25ml リザーバー

6 作業環境、操作上の注意

1) 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。
2) 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心すること。
3) 検査工程により作業エリアを区分する。

作業内容	作業エリア
細胞の調整	無菌室（細胞調整室）
ウイルス接種	無菌室（病原体取扱室）
CPE の観察	無菌室（病原体取扱室）

4) 作業工程の操作は、検査工程管理チェックシートで確認する。

7 検査法

1. カルチャーボトルの培養液を捨てる。
2. PBS で細胞を 3 回洗浄する。
3. トリプシン溶液を 1ml 加える。
4. トリプシン溶液で細胞を満たしたらトリプシン溶液は捨てる。
5. 細胞がすべて壁面から剥がれたのを確認し、10%細胞増殖培地 5ml で懸濁し細胞懸濁液とする。（注：懸濁時、泡が立たないようにする。）
6. 細胞懸濁液とトリパンブルーを等量混合する。
7. ビルケルチュルク血球計算盤の片側に 6 の混合液 10μl を入れ、顕微鏡下で細胞を

計測する。

8. 1～4×10^5個/mlになるように細胞懸濁液を希釈する。
9. 10^{-1}から10^{-8}までの希釈系列用チューブを準備する。
10. それぞれのチューブに2%細胞維持培地を9ml入れる。
11. マイクロピペットを用いて10^{-1}と記載されたチューブにウイルス溶液1ml加え10回転倒混和でよく撹拌し10^{-1}希釈とする。
12. 10^{-8}希釈まで同様に調製する(図1)。
13. 10^{-5}から10^{-8}まで希釈したウイルス溶液100μlをウェル番号1から10番に2列ずつ計20穴に加える(図2)。
14. 100μlの2%細胞維持培地をウェル番号11と12番すべてに加え細胞コントロールとする。
15. すべてのウェルに1～4×10^5個/mlの細胞浮遊液を100μl加える。
16. プレートに蓋をして、36℃、5%炭酸ガス存在下で培養する。
17. 7日間観察し、毎日、CPEの出現を記録する。
18. ウイルス力価をKärberの式を用いて計算する(別紙)。
19. 求めたウイルス力価のlog値が内部基準の±0.5の範囲に入っていることを確認する。

図1

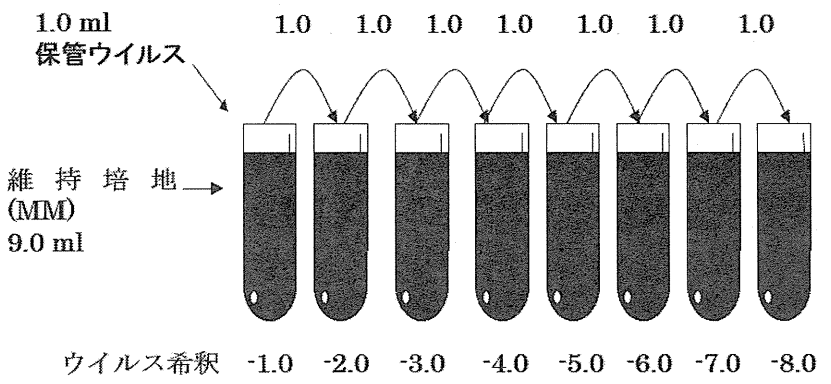
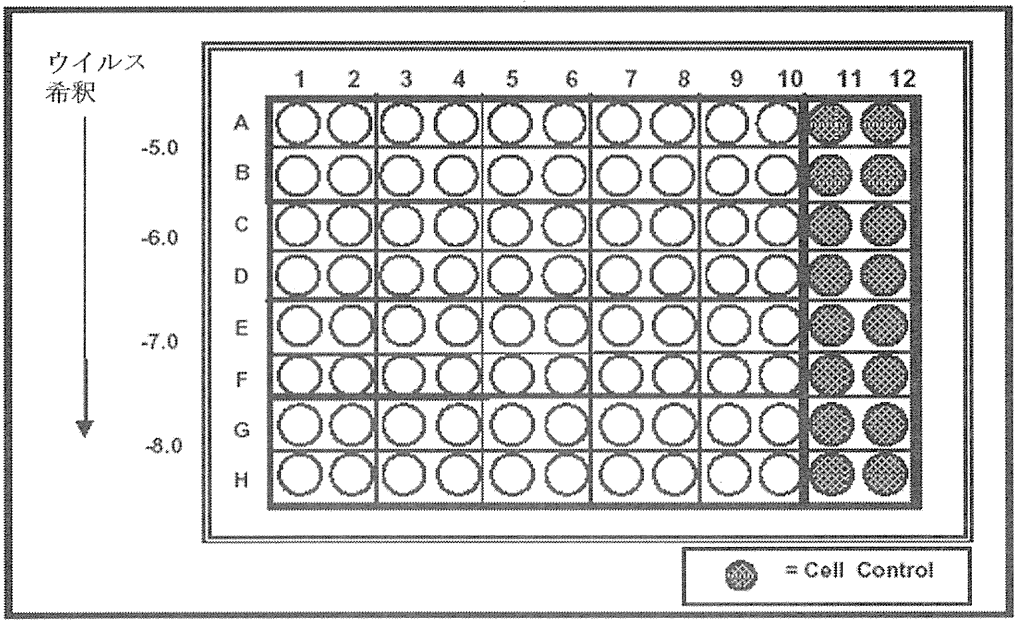


図 2



8　結果判定

In house 参照ウイルス株のウイルス力価の log 値が内部基準の±0.5 の範囲ならば合格、再度試験を行っても範囲外ならば細胞のリカバリー、あるいは新たな細胞入手、ウイルス保管温度管理条件等を検討し適切な対応をとること。

作成上の留意点

培地作製、in house 参照株の調製方法、保管方法は「試薬などの調製」の項で別の SOP を作成する。特に in house 参照株の保管は温度管理モニター導入が望まれる。

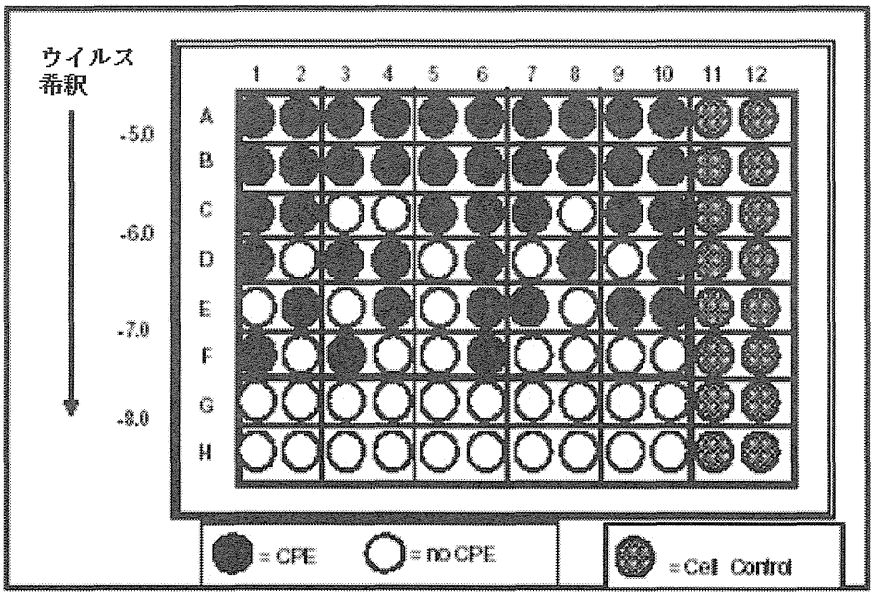
ウイルス同定時のウイルス力価測定試験の SOP は異なる。

細胞の保存、リカバリー、継代の SOP は、「試薬などの調製」の項で SOP を作成すること。

別紙

Kärber 法によるウイルス力価の計算

公式　log CCID50 = L – d (S – 0.5)
L = 試験で用いられた最も低い希釈倍率(対数)
d = 各希釈倍率間(対数)の差;
S = 各希釈倍率における、CPEが出現したウエル数の比率



-5: 20/20=1
-6: 13/20=0.65
-7: 9/20=0.45
-8　0/20=0

上記の結果を得た時の、計算例

(20ウエル中何個のウエルにCPEが現れたか数え、比率を求め、各希釈列の割合を足す)

L = -5.0; d = 1.0; S = 1 + 0.65 + 0.45 + 0 = 2.1　:
log $CCID_{50}$ = -5 – 1(2.1 – 0.5) = -6.6
ウイルス力価= $10^{6.6}$ $CCID_{50}$ / 0.1 ml

感受性試験工程管理チェックシート

No.1

細胞の調整

①使用細胞(継代数):　　継代日(実施者):

②使用細胞(継代数):　　継代日(実施者):

開始日時:　　試験実施者

1. カルチャーボトルの培養液を捨てる。
2. PBSで細胞を3回洗浄する。
3. トリプシン溶液を1ml加える。
4. トリプシン溶液で細胞を満たしたらトリプシン溶液は捨てる。
5. 全ての細胞が壁面から剥がれたのを確認し適当な量の培養液に懸濁し細胞懸濁液とする。
6. 細胞懸濁液とトリパンブルーを等量混合する。
7. ビルケルチュルク血球計算盤の片側に10μlの細胞懸濁液を入れ、顕微鏡下で細胞を計測
8. 1～4×10^5個/mlになるように細胞懸濁液を希釈する。

検体番号	計測結果		1ml当たりの細胞数	希釈	
	実測	平均		細胞懸濁液	培地

使用した試薬又はキット

イーグルMEM　Lot:　　使用期限:

トリプシン　Lot:　　使用期限:

PBS　Lot:　　使用期限:

FBS　Lot:　　使用期限:

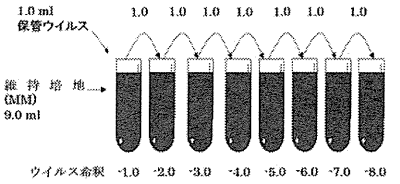
感受性試験工程管理チェックシート

No.2

本試験

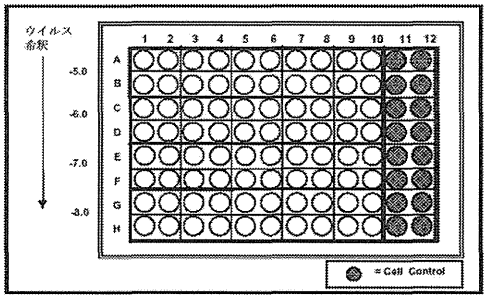
開始日時:　　試験実施者

図1



1.イーグルMEM培地を用いてウイルスを10^{-8}希釈する
2. 10^{-5}から10^{-8}希釈のウイルス溶液を100μlずつ96穴マイクロプレートに下図のように分注する。

図2



3. 全てのウェルに1～4×10^5個/mlに調整した細胞を加える

4. 36℃、5%炭酸ガス存在下で培養する

感受性試験工程管理チェックシート

No.3

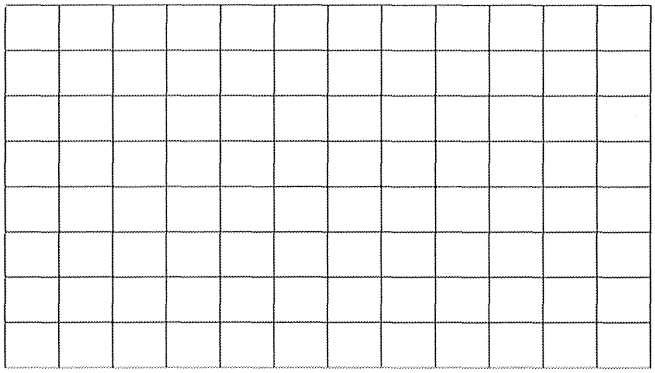
判定

観察

1. CPEの観察は同一人が行う。
2. 観察した日付、CPEが見られたものは"＋"と同一色で記載する

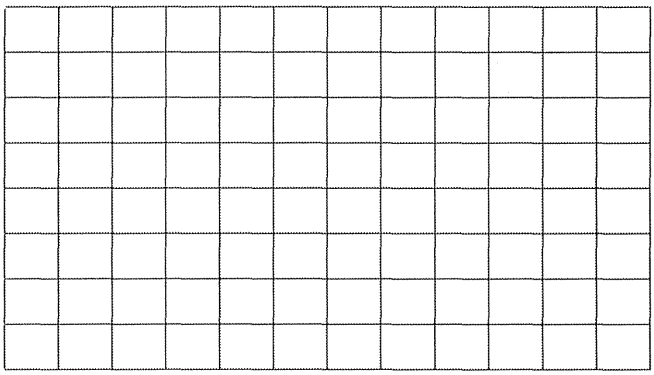
観察者

日付



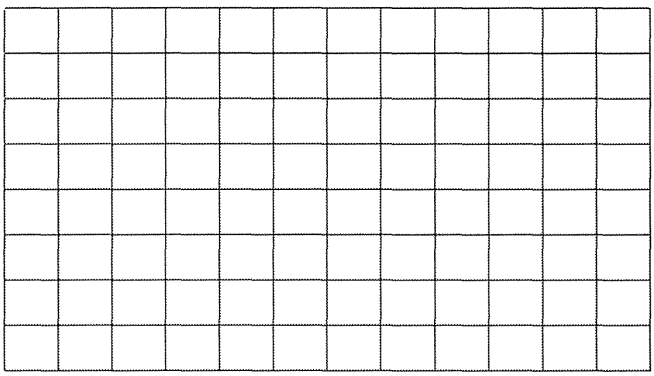
観察者

日付



観察者

日付



(観察用紙が足りないときは足す事)

感受性試験工程管理チェックシート

No.4

計算法

公式　log CCID50 = L – d (S – 0.5)
L = 試験で用いられた最も低い希釈倍率(対数)
d = 各希釈倍率間(対数)の差;
S = 各希釈倍率における、CPEが出現したウエル数の比率

最も低い希釈率(L):
それぞれの希釈率でのCPEの出現割合

10^5希釈	/20
10^6希釈	/20
10^7希釈	/20
10^8希釈	/20

計算結果:

用いたin house ウイルス
力価:
測定年年月日:
細胞の種類:

判定日時:　　判定者:

検査実施標準作業書

SOP No.　　XXXX

試験品の種類　培養細胞

検査項目　　マイコプラズマ汚染否定試験

試験法　　ＰＣＲ法によるマイコプラズマゲノムの検出

施行年月日　　平成　　年　　月　　日

改訂年月日　　平成　　年　　月　　日

作　成　者　　○○課　○○○○

承　認　者　　○○○○
（検査部門責任者）

失効日　　平成　　年　　月　　日

○○○研究所
○○課

検査実施標準作業書

［マイコプラズマ試験］

	年　月　日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作　　成	平成　年　月　日	○○○○	○○○○	
第　１回改訂	平成　年　月　日	○○○○	○○○○	検出キットの変更
第　２回改訂				
第　３回改訂				
第　４回改訂				
第　５回改訂				
第　６回改訂				
第　７回改訂				
第　８回改訂				
第　９回改訂				
第１０回改訂				

○○○研究所
○○課

細胞感受性試験標準作業書

1　検査の項目

マイコプラズマ汚染否定試験

2　試験品の種類

培養細胞

3　検査法

原理：細胞培養液の上清について、マイコプラズマ特異的なプライマーを用いた PCR でマイコプラズマ遺伝子を検出する。判定は電気泳動で PCR 産物の有無で行う。

出典：タカラバイオ社製 PCR Mycoplasma Detection Set の取扱説明書

4　検査等に用いる試薬

① PCR Mycoplasma Detection Set：TAKARA

② 蒸留水

5　検査等に用いる機器・器具及び器材

1) 機器・器具

① 炭酸ガス培養装置

② ボルテックス

③ 冷却遠心器

④ サーマルサイクラー

⑤ マイクロ冷却遠心器

⑥ マイクロピペット

⑦ チューブオープナー

2) 器材

① マイクロチューブ(1.5ml)及びマイクロチューブラック（冷蔵冷凍用）

② フィルター付き滅菌チップ（P-2, 10 用, P-20 用, p-100 用, p-200 用, p-1000 用）

③ PCR 用チューブ・蓋及びチューブラック（冷蔵冷凍用）

6　作業環境、操作上の注意

1) 作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する。

2) 作業中、マイクロピペットで吸引する時はフィルター付きチップを使用し、チューブのフタを開ける時はその前に軽く遠心し、チューブオープナーを使用すること。

3) 試薬の調整は試薬専用のクリーンベンチ内で行うこと。その際クリーンベンチのファンを止め、コンタミ防止、DNase 及び RNase の混入防止に細心の注意を払うこと。

4) 検査工程により作業エリアを区分する。

作業内容	作業エリア
試験品の前処理	無菌室（病原体取扱室）
試薬の調製	専用クリーンベンチ
PCR	血清実験室
電気泳動	化学実験室

6）作業工程の操作は、検査工程管理チェックシート（別添No1-3）で確認する。

7　検査法

PCR反応に使用する試薬は、全てキットに付属のものを用いる。

・試験品の前処理

1. 継代後、3～6日間細胞培養を行った培養上清1mlを1.5mlのマイクロチューブに移す。
2. 3000rpm×10分遠心。上清を検査に用いる。
3. 上清を94度、5分加熱後、冷却（4度）。検査を当日行わないなら―20度保管

・試薬の調製

4. 表1に従いPCRカクテルを調整する。冷却用ラックを用いる

表1　1st PCR反応液の調整

試薬	容量
10 × PCR Buffer	5μl
dNTP Mixture	4μl
MCGp F1 Primer	0.5μl
MCGp R1 Primer	0.5μl
TaKaRa Taq	0.25μl
Distilled water	34.75μl
Subtotal	45μl
細胞培養上清	5μl
Total	50μl

5. サーマルサイクラーの電源を入れる
6. PCRチューブのラベリング(サンプル番号、陽性、陰性コントロール)
7. PCR用チューブに反応液を45μlずつ分注する。
8. 細胞培養上清 5μlを加え、しっかりと蓋を閉める。
9. 別のPCRチューブに陰性対照として水5μlを加え、しっかりと蓋を閉める。
10. PCR用8連チューブを緩やかに転倒混和した後にスピンダウンする。
11. 8連チューブをサーマルサイクラーにセットする。
12. 液晶画面でマイコプラズマ検査プログラムを選択する。反応条件は、94℃で30秒後、[94℃、30秒間→55℃、2分間→72℃、1分間]を30サイクル後に4℃に保持する。
13. “RUN”を選択し反応液量を入力する。50μl
14. 反応が終了したらPCR用チューブを取り出しサーマルサイクラーを止める。

・電気泳動

15. 2%アガロースゲル電気泳動でPCR産物の確認を行う。

8　結果判定

電気泳動写真からPCR産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陽性対象で810bp付近にバンドが確認できること。370-680bp付近にバンドが確認された検体は陽性、バンドが確認できないものは陰性と記載する。

作成上の留意点

作業に用いる機器、器材、消耗品、試薬名などは各検査室の状況にあわせ、名称、操作法など変更訂正する。

マイコプラズマ検出にはPCRのほか、リアルタイムPCR、IFなど別の原理で測定できる各種キットが販売されている。キットの種類により操作法、判定法など適宜変更する。

電気泳動、細胞培養についても別途、マニュアルあるいはSOPの作成が望ましい

細胞の調整（検査に用いた種類を記載）

①使用細胞（継代数）：　　サンプリング日（実施者）：

②使用細胞（継代数）：　　サンプリング日（実施者）：

③使用細胞（継代数）：　　サンプリング日（実施者）：

④使用細胞（継代数）：　　サンプリング日（実施者）：

⑤使用細胞（継代数）：　　サンプリング日（実施者）：

PCR　開始日時：　　試験実施者

10 × PCR Buffer		5μl	×		=	μl
dNTP Mixture	4μl	×		=	μl	
MCGp F1 Primer 0.5μl	×		=	μl		
MCGp R1 Primer 0.5μl	×		=	μl		
TaKaRa Taq	0.25μl	×		=	μl	
Distilled water	34.75μl		×		=	μl
Subtotal		45μl			=	μl

45μl ずつ分注し、細胞培養上清を 5μl 加える

94℃　30 秒
↓
94℃　30 秒
55℃　2 分　30cycle
72℃　1 分
↓
4℃　∞

使用した試薬又はキット：
タカラバイオ　PCR Mycoplasma Detection Set　Lot：

電気泳動

2%アガロースゲル　調製日：

開始日時：　試験実施者

（レーンの説明）

結果の判定

電気泳動写真から PCR 産物の有無を判定する。陰性対照でバンドが確認されないこと、陽性対象で 810bp 付近にバンドが確認できること。370-680bp 付近にバンドが確認された検体は陽性、バンドが確認できないものは陰性と記載する。

結果判定表

結果判定表

検体番号	判定

判定

判定日時： 判定者：

微生物検査区分 ○○－●●－□□

検体（病原体）取扱標準作業書

作成日：年 月 日

改定日： 年 月 日

検査部門責任者

検査区分責任者

作成者

○○衛生研究所

標準作業書改定の履歴

区 分 名

記 号

微生物検査区分　No. ○○○○○

	作成日	事　由	備　考
1	年月日		新規

	改訂日	事　由	備　考
2	年月日		
3	年月日		
4	年月日		

１．目的

この作業書は、微生物検査における検体の取扱いについて管理基準を定め、検査等の信頼性確保を図ることを目的とする。

２．適用範囲

この作業書は、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律第14条に基づく検査または試験（以下「感染症発生動向調査検査」）を行う検体に適用する。

３．検体の定義

検査等に供する目的で採取された臨床検体、その他の検体及び病原体をいう。

臨床検体：糞便・嘔吐物・咽頭拭い液・鼻洗浄液・喀痰・水泡液・眼粘膜拭い液・髄液・血液・血清等をいう。

その他の検体：病原体媒介性生物等をいう。

病原体：細菌、ウイルス、原虫等をいう。

４．検体の受領

４．１　検体受領時の確認

検体を受領する職員は、次の事項について確認する。

（１）　一類感染症・二類感染症・三類感染症・四類感染症及び五類感染症検査票（病原体）、または保健所長による検査依頼書の記載事項と検体に同一性があること。

（２）　検体は検査の目的に合っていること。

（３）　検体の状態（外観、量）が適切であること。

４．２　検体受領時の記録

検体受領の確認を行った後、受付番号等の必要事項を検体受付管理簿へ記入する。

（１）　検体の取り違えや紛失等を防ぐため、検体受付管理簿の記入事項を複数確認すること。

４．３　検体の分割

複数検査を行う場合は、検査目的に応じて検体を適切に分割する。

（１）分割した場合は、必要に応じて新たな受付番号等を検体受付管理簿に記入すること。

５．検体受領後の検体の保管

検体受領後、必要に応じて、次により検体を適切に保管する。

（１）　検体の保管にあたっては、検体を保管する容器ごとに番号等を表示すること。

（２）　検査の目的に応じた適切な条件で検体を保管すること。

（３）　検体受付管理簿に保管場所等を記載し、検体の取り違え、紛失等を防ぐこと。

６．検査終了後の検体の保存

検査に用いた検体については、検査結果通知の発行後一定の期間、適切な条件の下に保存する。

（１）保存期間及び保存条件は病原体検査 SOP で定めること。

７．検体の廃棄

検体の廃棄は、次により適切に行う。

（１）　検体を廃棄した時は関係帳簿に記録し、検査区分責任者の確認を受けること。

（２）　検体の廃棄にあたっては、廃棄物の処理及び清掃に関する法律を遵守すること。

（３）　滅菌の要否及び感染性廃棄物容器への収納方法等については、病原体検査 SOP で定めること。