

レジオネラ属菌検査法の
安定化に向けた取り組み

北海道立衛生研究所
感染症部 細菌G
森本 洋 H26.7.14

1

厚生労働科学研究

【 H22～24 】

公衆浴場におけるレジオネラ属菌対策を含めた
総合的衛生管理手法に関する研究

【 H25～27 】

レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る
公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究

2

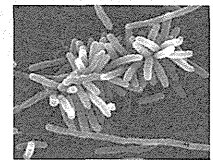
精度管理の対象となる病原菌は？

- レジオネラ属菌の場合は、大きく二つの側面から対象とする必要がある。
- ①感染症法からの必要性
- ②検査対応の困難さからの必要性

3

①感染症法からの必要性
— 法的対象 —

- レジオネラ症は、平成11年4月、「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)」が施行され、全臨床医に届け出義務のある全数把握対象の四類感染症となった。



①感染症法からの必要性
— 四類感染症の届け出数 —

'09	'10	'11	'12	'13
レジオネラ症	レジオネラ症	レジオネラ症	レジオネラ症	レジオネラ症
689	689	804	892	1111
つつがむし病	つつがむし病	つつがむし病	つつがむし病	つつがむし病
458	396	438	428	339
日本紅斑熱	A型肝炎	日本紅斑熱	デング熱	デング熱
129	342	178	220	249
A型肝炎	デング熱	A型肝炎	日本紅斑熱	日本紅斑熱
135	114	176	170	175
デング熱	日本紅斑熱	デング熱	A型肝炎	A型肝炎
92	133	104	158	127

5

①感染症(法)からの必要性
— 致命率が高い —

- 2～3%(届出時点)
- 2006年のイギリスでは、患者数551人に対し死者52人と10%近くにおよぶ。

6

②検査対応の困難さからの必要性

— 要望1 —

- * 平成21年度生活衛生関係
技術担当者研修会(H22.3.9厚生労働省)
- 施設の自主検査で「不検出」、保健所の行政検査で「検出」となり、検査結果が不一致となることがある。また、レジオネラ属菌の「ろ過濃縮法」の検査法で、フィルターの孔径により検出菌数に差が出るとの話も聞く。「検査法の確立」と「行政・民間の精度管理のあり方」について御教示願いたい。

7

厚労省回答

- レジ検査に関して、選択培地、濃縮法によって検査結果に違いが出る事が明らかとなりました(厚生科研 迅速・簡便な検査によるレジオネラ対策に係る公衆浴場等の衛生管理手法に関する研究)。検査法を統一することの是非も含め、研究結果を待って、衛生管理要領等通知の改正が必要か否か判断したい。
- 民間機関も含め、レジ検査の精度管理のあり方については、今後の厚生科研において、研究していきたいと考えている。

8

国立保健医療科学院 研究事業 推進官からのコメント

- 測定結果のばらつきの原因の解明を進めてほしい。特に測定法に関しては、全ての地方衛生研究所で実施可能であること、衛生管理指導において利害が生じる営業者にとって受容可能であること、を満たすような、信頼性、妥当性の高い測定法を確立する必要がある。

9

なぜ検査結果に
大きな差が生じているのか！

現状の確認
— 検査方法(培養法)について —

10

②検査対応の困難さからの必要性

— 防止指針 —

レジオネラ属菌培養方法の基本は、JIS K 0250-59-10:2006に準拠するが、種々の種別・状況、検査施設の規模・設備・人員その他の要因により実施方法の細部が異なる可能性がある。レジオネラ属菌検査は熟練した専門家が行為しなければならない。検査実施に際し、操作によってエラーが生じ得る可能性があるときは、ローカル2の安全キャビネット内で作業する必要がある。省のレジオネラ属菌検査に従事しようとする者は、レジオネラ研究施設において受検者として1ヶ月(研修・技術・知識・観察力・判定能力、バイオハザードの概念等を身に付けなければならない)。

検査方法の改善は、細菌学実験法の原則に基づいた省のレジオネラ属菌検査の基本に則して行うべきである。細菌学実験法の基礎知識のない者が勝手に行うてはならない。レジオネラ属菌検査を外部施設に委託しようとする場合は、委託者は細菌学の知識と技能のある人材を雇用すること、委託先での受注施設での検査・判定・菌数算定方法を熟知した上で契約することが望ましい。(付録2参照)

5.1 培養法

5.1.1 レジオネラ用培地

省の衛生部として述べられるように、レジオネラ属菌は通常の細菌培地に使用される成分を含有しない。本指針の採菌検査を行うのに、L-J培养基(L-J Broth)を用いる。

北海道衛研のこれまで

- 1976年米国フィラデルフィア市で開催された在郷軍人の会合と関連し、多数の死亡者を伴う呼吸器疾患が集団発生
- 北海道衛研では1982年から冷却塔水など、環境水のレジオネラ属菌検査を試験的に開始。
- 1987年、CDCでレジオネラの研修。
- ~現在に至る。
- * 検査導入から32年、CDCでの研修から27年ほどが経過。

12

②検査対応の困難さからの必要性
— 公定法・標準的検査法 —
公衆浴場における水質基準等に関する指針

<ul style="list-style-type: none"> • 大腸菌群 • 原水、原湯、上り用湯及び上り用水の検査方法 「水質基準に関する省令」(H.4厚生省令第69号)で定める検査方法によること • 浴槽水の検査方法 「下水の水質の検定方法等に関する省令」(S.37厚生省令・建設省令第1号)別表第1(第6条)の大腸菌群数検定方法によること 	<ul style="list-style-type: none"> • レジオネラ属菌 • 原水～ • 浴槽水～ <p style="text-align: center;">冷却遠心濃縮法又はろ過濃縮法のいずれかによること</p> <p style="text-align: center;">↓</p> <p>具体的方法(公定法)が示されていない</p>
--	---

13

②検査対応の困難さからの必要性
— SOPの基となっている検査マニュアル —

- 改訂・レジオネラ属菌防除指針
 - 温泉利用入浴施設用 — (1999.3)
 (財)全国環境衛生営業指導センター
全国旅館環境衛生同業組合連合会
- レジオネラ症防止指針(1994.3, 1999.11, 2009.3)
財団法人ビル管理教育センター
- 上水試験方法, 上水試験方法 解説編(2001, 2011)
日本水道協会
- 衛生試験法・注解(2005, 2010)
日本薬学会
- 病原体検出マニュアル(2003.12, 2011.10)
国立感染症研究所

14

疑問点？問題点？妥協点？

- これらに示されている検査法には随所に違いがある
- それぞれにおいて項目ごとに複数の選択肢が認められる場合がある
- 改訂・レジオネラ属菌防除指針
 - 温泉利用入浴施設用 — (1999年3月)
 検査方法, 検出限界, 検査範囲, 検査価格は実施機関によって異なる
 ⇒ 依頼時には、価格だけでなく、検査内容の説明をよく聞き判断する必要がある

15

②検査対応の困難さからの必要性
— 公衆浴場法の基準 —
10CFU/100mL未満

→ 100倍濃縮した検体を培養した時に生菌が検出されないことを意味する。

→ 具体的には、どの方法から導かれた基準？

16

②検査対応の困難さからの必要性
— 要望2 —
地方衛生研究所に対する検査法の実態調査から

- レファレンス担当地研を通じ、全国77地研への実態調査(アンケート形式・設問88)を実施。
- 74か所+密に連携している保健所1か所から回収。
⇒ 74自治体の計75か所から回答。
- 貴自治体ではレジ検査に対応しているか？
⇒ 74自治体すべてが検査対応可能。

17

レジ検査に不安を感じたことはありますか？

	回答数
ある	47(約63%)
特にない	28(約37%)

18

不安ありとしたコメント

レジが強く疑われるが、確定させるのが困難な場合

- 検査結果が陰性の場合
- 前処理してもレジ以外の菌が多数のときの判断
- 遺伝子検査では陽性だが、培養では陰性
- 定量検査の信頼性
- 濃縮、非濃縮の集落数に乖離がみられた場合の定量結果
- 昨年度までの精度管理の試行で、各施設間の菌数のばらつきが大きいことがわかったので
⇒方法(全体的、前処理、回収率等)

19

さらに

- 異動等に伴い検査担当が交代する時
- 経験者が少なく、手順全般に不安
- 検査経験が全くなく、新しく担当になり、初めて検査したとき。
- 実際にレジオネラ検査を行ったことがない。
- 検査する機会があまりないため

20

レジオネラ属菌と確定
(成績書へ反映)させる根拠

- 75施設で53通りの確定方法があった。
- 大別すると4パターンに分類された。
 - ①レジオネラ属菌に対して広く対応
 - ②レジオネラ属菌に対して対応
 - ③レジオネラニューモフィラを中心に特定の種類だけに対応
 - ④線引きが読み取れなかった

21

このような状況下、検査結果は

- 行政面では
指導や行政処分等を行う根拠として
訴訟等を伴う事例への対応 など
- 公衆浴場では
⇒ * 施設の衛生管理に大きく影響
* レジオネラ症予防効果へつながる

非常に重要な役割を担っている
このためにも

自施設で行っている検査法の根拠・妥当性も重要

研修システムは
必要だと思いますか？

	回答数
必要	71(約94.7%)
不必要	0(0%)
その他	4(約5.3%)

23

検査法の統一は必要だと思いますか？

	回答数
必要	68(約91%)
不必要	3(4%)
その他	4(約5%)

24

精度管理は必要だと思いますか？

	回答数
必要	71 (約96%)
不必要	2 (約3%)
その他	1 (約1%)
記載無し	1

25

今回の実態調査結果から

標準的な検査法(⇒ある精度以上を確保した基準となる方法。基本となる部分を統一した方法。)の整理と提示

- 研修システムの構築
- 精度管理(培養法)

官・民間問わず検査精度の安定に向けた取り組みを進めることが必要

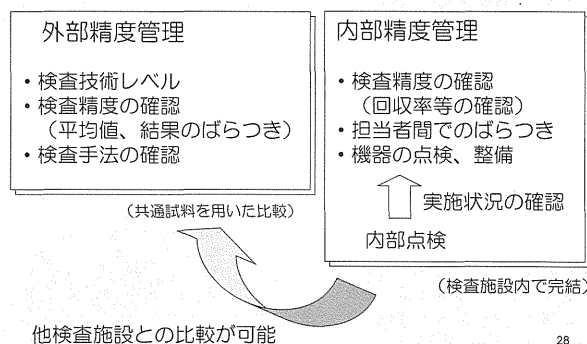
26

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(配送機関(法)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公益法人との協力(将来的な外部精度管理委託機関)
- ⑨内部精度管理の必要性
- ⑩その他(検査法の標準化、研修会等)

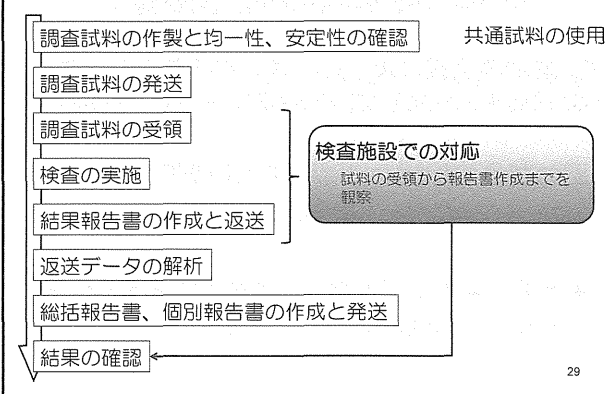
27

信頼性確保のための精度管理の位置づけ



28

外部精度管理の実施の方法



29

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

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

30

特注品BioBallの使用により

- ①外部精度管理用菌株の検討
- ②配付試料の安定化に向けた検討 **解決!**
- ③外部精度管理参加条件の設定
- ④配付方法の検討
- 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公益法人との協力(将来的な外部精度管理委託機関)
- ⑨内部精度管理の必要性
- ⑩その他(検査法の標準化、研修会等)

31

⑤検査方法の検討 どの部分に重点を置くか?

- ・現状では、検査工程や選択分離培地の幅が大きいほど、検査結果への幅も大きくなる可能性がある。
- ・手技に重点を置いた外部精度管理の場合、手技が適切でも施設間での前処理や分離培地の違いが結果に大きな影響を与える可能性がある。

32

⑤&⑥&⑦

【H25プレ外部精度管理で確認した検査法、結果、解析】
* 本来の外部精度管理は、各検査機関のSOPが適切であるかを確認するもの。

* 検査方法を指定せず、各地研のSOPに従って実施。

* WGにおいては、WG推奨法による検査も実施。

* 目標値: BioBall メーカー保証範囲の30 ~ 300%と定義し、300~15000 cfu/100mlと設定。メーカー中央値: 3383.2 cfu/100ml

参加機関	SOP	参加機関	SOP
1	2000	24	20
	5000	25	920
2	3000	26	530
3	110	27	120
4	2000		190
5	60		30
6	20	28	40
7	20	29	25
8	56	30	30
9	160	31	10
10	220	32	20
11	400	33	70
12	10	34	850
13	30	35	110
14	40	36	3000
15	350	37	810
16	310	38	370
17	300	39	560
18	80	機関数別	14/39(36%)
19	80	のべ試料数別	15/42(36%)
20	50	平均値	532.761905
21	15	最大値	5000
22	200	最小値	30
23	160	中央値	115

⑨&⑩

標準的検査法の提示とその研修会 及び 内部精度管理の必要性

外部精度管理で問題があった場合、それを各施設内で解決できる技術、知識、確認能力が必要

34

⑧将来的な外部精度管理の対応 (公益法人との協力?)

- ・ 試料作製から解析まで
 - ・ P2実験室を有していること。
 - ・ 安全キャビネットを設置していること。
 - ・ 試料作製から解析までの研修が必要。
- ・ 解析のみ
 - ・ 解析の研修が必要。
- ・ 試料作製研修: 北海道衛研で研修?
- ・ 解析研修: WGでの定義確定後、秦野研(食品中の細菌検査精度管理: GLP対応)などへ協力依頼?

外部精度管理受託機関選定

- ・ BioBallの利用により、レジオネラ属菌及び検査法の知識を十分有している必要はあるが、検体調製ノウハウを有する必要はない。
- ・ 配付製品の確認 → レジオネラ検査研修受け入れ機関と提携するなど
- * 上記により、レジオネラ属菌を直接扱える機関ではなくても受託機関として選定可能。

36

3) 検査研修会(WG意見)

- ・ 標準的な検査法の提示後、それに基づいた研修会を開催する。
- ・ 主催者、場所、条件、予算等の基本設定を明確にする。
- ・ 最終的には行政・民間検査機関すべてに対する実技を伴った研修システムを構築することが望ましい。

37

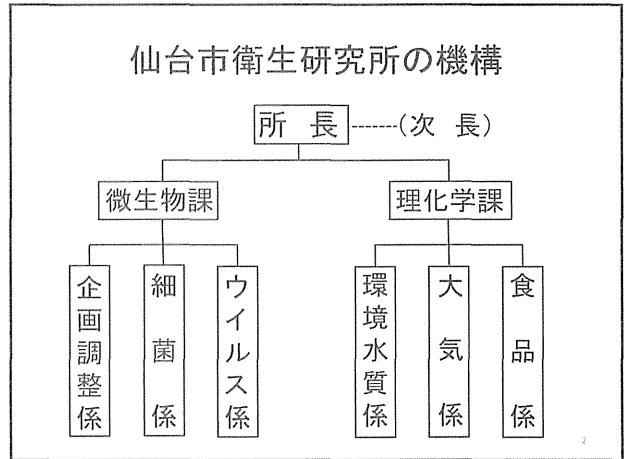
どのような研修システムでも

- ・ 研修受け入れ機関の設置 と 講師の養成 が 必要
 - ・ 地方衛生研究所を研修対応機関として機能させる場合
 - ・ 業務としての位置付け
 - ・ 予算化
- ⇒ 厚労省、各自治体、全国地方衛生研究所協議会との連携が必要
- ・ 民間研修事業の活用も検討

38

仙台市衛生研究所における感染症 検査に係る精度管理について

仙台市衛生研究所 勝見正道



業務概要(平成24年度)

・微生物課	食品検査	1603件
	苦情・食中毒検査	586件
	病原微生物検査	503件
	環境細菌検査	20件
・理化学課	食品検査	869件
	水質検査	251件
	大気汚染物質検査	635件
	その他の検査	135件

食品GLP対象検査

- ### 検査の流れ
- ・ 依頼主(保健所、環境局、健康福祉局等)
 検体採取—検体搬入—検査項目を指定して検査依頼
 - ・ 衛生研究所 検体の確認—検査—成績書発行
 —成績書送付、手数料請求
 - ・ 依頼主 成績書受取—手数料支払

- ### GLP導入の経緯
- ・ 平成 8年 5月 食品衛生法施行令改正
 - ・ 平成 9年 4月 食品GLP開始
 - ・ 平成12年 化学物質の審査及び製造等の規制
 に関する法律改正
 (化学物質GLPの導入)
 - ・ 平成15年 水道法改正(水道GLPの導入)
 - ・ 平成18年 7月 環境検査に係るGLP導入検討開始
 - ・ 平成19年 3月 感染症検査に係るGLP導入検討開始
 - ・ 平成19年 4月 「仙台市衛生研究所における検査業務
 管理における基本要綱」制定

- ### 仙台市衛生研究所における 検査業務管理に関する基本要綱
- | | |
|-------------|-------------|
| ・ 目的 | ・ 検査業務管理委員会 |
| ・ 適用 | ・ 内部点検 |
| ・ 組織 | ・ 内部精度管理 |
| ・ 検査部門責任者 | ・ 外部精度管理 |
| ・ 検査区分責任者 | ・ 研修 |
| ・ 品質管理部門責任者 | ・ 文書等の保存期間 |
- 平成19年4月1日 実施

仙台市衛生研究所における 検査業務管理に関する基本要綱

- 目的
食品衛生法に基づく検査又は試験以外の
試験又は検査の業務管理
- 適用
試験品の受領から検査結果通知書の発行
まで

7

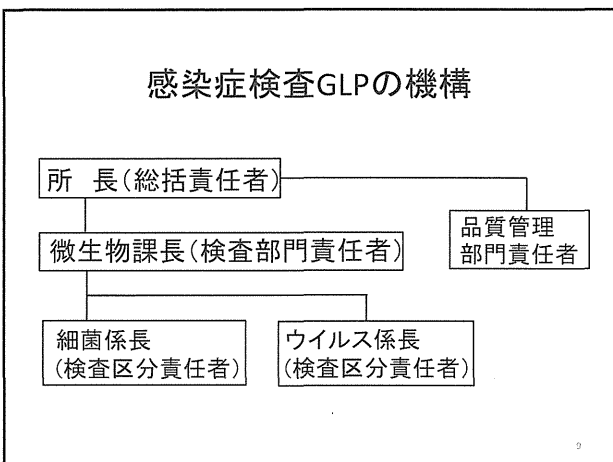
衛生研究所微生物検査業務実施要領

平成19年6月 制定

微生物検査部門における検査の業務管理の実施

標準作業書、機械器具の管理、試薬等の管理、有毒
な又は有害な物質及び危険物の管理、試験品の取扱
いの管理、検査の操作等の管理、検査の結果の処理、
検査結果通知書、試験品の保存、内部精度管理、外
部精度管理、データの作成、データ等の保存、その他

8



内部点検

検査部門責任者による点検(年4回)
品質管理部門責任者による点検(年2回)

点検項目
職務分掌、研修計画、研修・職務経験記録、
検査室の管理、機械器具の管理、試薬等の管理、
劇毒物、危険物の管理、試験品の取扱管理、検
査に関わる事項の管理(標準作業書、検査に関
する記録、検査成績書等)、精度管理記録

10

精度管理の導入 1

- 臨床検査技師等に関する法律
第二十条の三 衛生検査所
(1)臨床検査技師等に関する法律施行規則
第十二条の一 衛生検査所の登録基準
第十二条の二 衛生検査所の開設者の義務
(精度管理・研修)
第十二条の三 書類の保存
(2)衛生検査所立入検査実施要綱(厚生労働省医政局)
仙台市衛生検査所精度管理専門委員設置要綱
(細菌係長 ウイルス係長が専門委員)

11

精度管理の導入 2

- 宮城県臨床検査技師会 精度管理調査
微生物1:感染症原因菌の同定、感受性検査、
画像サーベイ
(対象病原体が異なるので断念)

参考(平成25年度)
微生物1:血流感染の原因菌の同定検査
Klebsiella pneumoniae
微生物2:髄膜炎の原因菌の同定検査および薬剤感受性検査
Streptococcus pneumoniae
フォトサーベイ: *Neisseria meningitidis*, *Granulicatella adiacens*

12

精度管理の導入 3

- 通常の検査業務に支障をきたさない。
- 精度管理用の試薬・器材等は購入しない。
- 外部検査機関での結果と比較できる。
- 厚生労働省からの通知等で精度管理方法が明示されている。

13

細菌の精度管理 1

- 腸管出血性大腸菌 血清型別
 検査担当者 仙台市内で発生したEHEC分離菌株を
 同定、O型別、H型別実施、感染研に菌株送付
 ↓
 国立感染症研究所が実施したO型別、H型
 別結果と比較、区分責任者に報告
 ↓
 区分責任者 結果を比較し評価、内部点検時に
 信頼性確保部門責任者に報告

14

EHEC精度管理結果

平成25年度結果 平成24年度との比較

	一致	不一致	一致率
O型別	69	1	99%
H型別	40	30	57%

	H24	H25
O型別	95%	99%
H型別	77%	57%

15

細菌の精度管理 2

- レジオネラ属菌(定量)
 「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆
 浴場等における衛生管理手法に関する研究」の
 外部精度管理事業に参加
 ↓
 検査担当者は結果を区分責任者に報告
 ↓
 区分責任者 結果を比較し評価、内部点検時に
 信頼性確保部門責任者に報告

16

レジオネラ属菌(定量)精度管理結果

実施日	H25.10.25
実施者	〇〇 〇〇
検査結果	2,000
良好範囲目標値	300~15,000
判定	良好

17

細菌の精度管理 3

- 溶血性レンサ球菌(血清群及びT型別)
 区分責任者 既存の分離保存株を検査担当者
 (3名)に配布
 ↓
 検査担当者 血清群別及びT型別実施
 区分責任者に報告
 ↓
 区分責任者 結果を比較し、評価
 内部点検時に信頼性確保部門責任者
 に報告

18

ウイルスの精度管理 1

• インフルエンザウイルス核酸検出検査
(リアルタイムRT-PCR法)

国立感染症研究所インフルエンザ研究センターが実施した第1回地方衛生研究所外部精度管理事業に参加

検査結果 問題なし

19

ウイルスの精度管理 2

- 1 ノロウイルス(リアルタイムPCR法)
(当該検査を実施する際、毎回精度確認検査実施)
 - Echoウイルス Hill株の増幅確認
 - ノロウイルス遺伝子陽性コントロールを用いた検量線の作成
- 2 ノロウイルス(RT-PCR法)
(当該検査を実施する際、毎回精度確認検査実施)
 - Echoウイルス Hill株の増幅確認

20

ウイルスの精度管理 3

• インフルエンザウイルス
(当該検査を実施する際、毎回精度確認検査実施)

オフシーズンに練習時に精度管理も実施
インフルエンザウイルス遺伝子陽性コントロール
による検査感度チェック

21

感染症GLPの課題

- 1 検査実施標準作業書の整備
- 2 検査機器の点検時間及び費用の増加
- 3 品質管理部門の人員確保
- 4 精度管理
 - (1)Hill 株利用の限界
エンテロウイルス関与を疑う検体
糞便以外の検体
 - (2)細胞培養法

22

国内外の検査室における質の管理について
～ポリオウイルスを中心に～

国立感染症研究所ウイルス第二部
吉田 弘

世界のラボの現状について

感染症対策における検査機能強化の流れ

世界ワクチン接種行動計画
(The Global Vaccine Action Plan; GVAP, 2012年WHO総会で採択)

2020年までに、全国で90%以上、すべての地区で80%以上の接種率を達成。
ワクチンで防ぐことができる病気をすべての制御を進める一方、ポリオの根絶が最初の目標。
次世代ワクチンの研究・開発の推進。

↓

根絶、排除確認のための病原体サーベイランスの強化(ポリオ、麻疹)
ワクチンで予防可能な疾患

国際保健規則(2005)
(International Health Regulation: IHR, 2007年発効)

国際的に脅威となる(感染症に限らない)公衆衛生緊急事態(public health emergencies of international concern: PHEIC)全てをWHOに通知するシステム
PHEICを検知してから24時間以内の通告を義務化
感染症は天然痘、新型インフル、ポリオ、SARS

↓

公衆衛生ラボの機能強化 あらゆる検査

ラボネットワークの例

Global WHO Vaccine Preventable Disease Laboratory Network

ラボネットに属する機関は定期的な認定を受ける

WHO Labs/institutes testing for:

- ★ Polio (22)
- Measles/rubella (543)
- Polio and measles/rubella (109)
- ◇ Measles/rubella and yellow fever (14)
- ◇ Polio, Measles/rubella and yellow fever (13)
- Polio and/or Measles/rubella and/or JE

Data as of Aug 2007

WHO Vaccine Preventable Disease Lab Network

ラボネットワークの構成とその役割(ポリオ)

Structure of the network

Every country need not have the same capacity
"networking" provides access to services

ポリオラボのレファレンス

Global Specialized Labs
N = 7
Isolates & types viruses
Performs ITD & sequencing
Prepares & distributes reagents
Prepares & distributes PT test
Research

Regional Reference Labs
N = 16
Serves > 1 country
Isolates & serotypes viruses
Differentiates (ITD) wild & Sabin-like polio viruses
Distributes supplies as needed. Performs sequencing or
Refers wild & ITD discordant isolates for sequencing

National / Subnational Labs
N = 123
Serves host country and others
Isolates viruses in cell cultures & refers untyped or serotyped virus for ITD
Since 2009 several labs have ITD capacity

Global Polio Laboratory Network

(例)WHOポリオウイルスラボの認定条件と査察項目

認定条件	1. Results are reported on at least 80% of all AFP specimens within 14 days:	%
	1. Tests are performed on at least 150 stool specimens annually:	%
	1. At least 80% of suspected poliovirus isolates from AFP cases and contacts are forwarded for ITD within 7 days:	%
	1. Accuracy of identification of polioviruses among all isolates obtained in L20B cells is at least 90%:	%
	1. Result on most recent virus isolation PT is at least 90%:	%
	1. Score on annual on-site review is at least 80%:	%

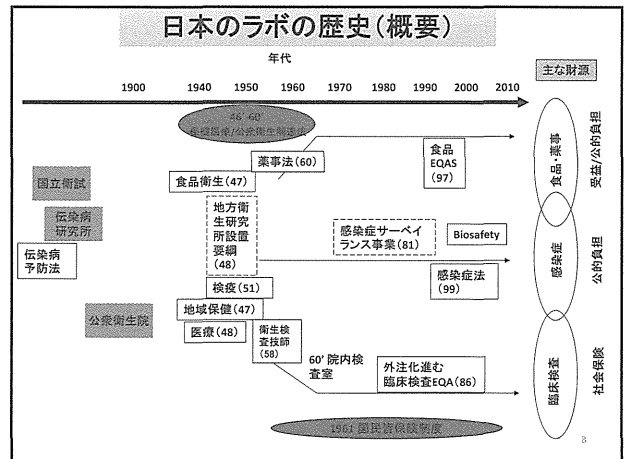
査察項目

PT(proficiency test)=EQASに該当

1.スタッフ(人数、経験、研修歴、等)	6.便検体処理
2.検査室(広さ、動線、清浄区と汚染区との区別等)	処理法SOP、作業記録
3.細胞継代、ウイルス分離のマネジメント	保管記録
4.細胞	バイオハザード対応状況
SOP(継代法など)、記録	7.ウイルス分離
使用細胞(RDとL20B)	分離のSOP、観察記録
継代時の細胞数のカウント	株保管記録、状況
培地調整、保管(温度、使用期限の記載等)	8.ポリオの場合の保管状況
5.細胞の感受性試験(内部精度管理)	9.バイオセーフティ
標準品による感受性試験(SOP、記録)	10.試薬と消耗品の保管、調整記録など
マイコテスト、等	11.機器保守管理状況
	12.疫学部門との連携
	13.データマネジメント

各種SOPと記録は査察時に必要不可欠

日本のラボについて



エンテロウイルス検査における質の管理状況について

H25年度厚生労働科学研究費「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」にて、エンテロウイルス検査における質の管理状況について、地方衛生研究所を対象にアンケート調査を行った(2013年12月)

エンテロウイルス検査とは
主に2類感染症(ポリオ)、5類感染症(手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等)を対象

①ウイルス分離・同定検査の品質管理の状況
ウイルス分離は培養細胞を用いて行うもの。得られたウイルスは型別同定検査、抗原解析、抗体保有状況調査等に用いる。

②PCR検査、遺伝子配列解析に関する品質管理の状況
PCR検査、遺伝子配列解析は①で得られたウイルス、或いは直接臨床材料を用い、各種機器により検査を実施するもの

③検査に関わるSOP(標準手順書)整備状況
①②の検査手順を示した標準マニュアル。

エンテロウイルス検査における質の管理状況について(結果)

エンテロウイルス検査を実施している67地方衛生研究所からの回答のまとめ

①ウイルス分離・同定検査に関する品質管理

計	特に実施していない 57(85%)	実施している* 10(15%)
---	----------------------	--------------------

*実施項目は様々な状況

②PCR検査、遺伝子配列解析に関する品質管理

計	特に実施していない 42(63%)	実施している* 25(37%)
---	----------------------	--------------------

*実施項目は様々な状況

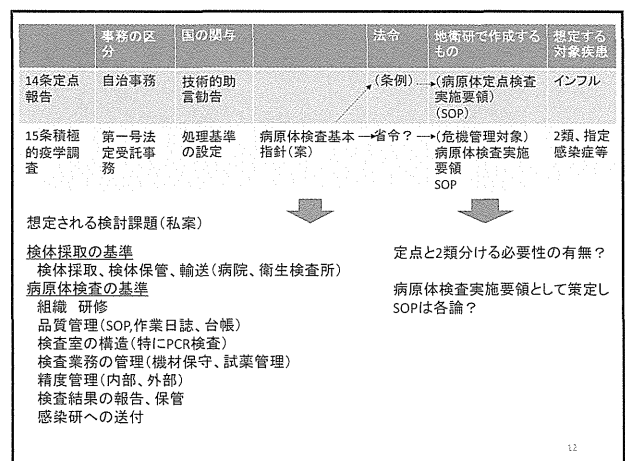
③検査に関わるSOP(標準手順書)の有無

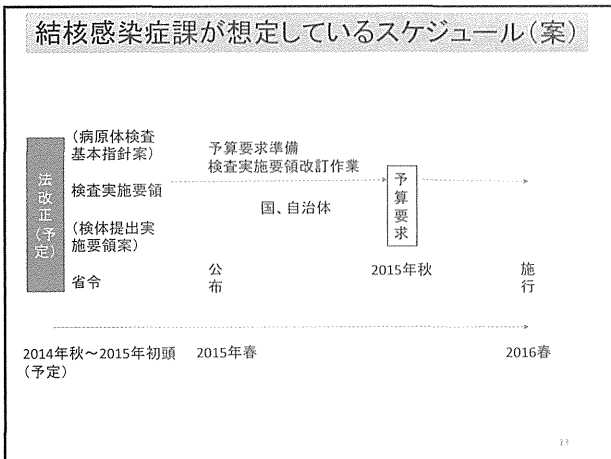
計	独自に作成している 16(24%)	特に作成していない 51(76%)
---	----------------------	----------------------

H25年度厚生労働科学研究費「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」による。

各種検査の関連法

区分	検査	法的根拠
水質	河川などの水質検査	水質汚濁防止法15条(法定受託)
	水道の水質検査(地衛研は事業者に対する外部精度管理を担当)	水道法20条(自治事務)
	温泉の水質検査	温泉法(自治事務)
大気/環境	大気汚染の検査	大気汚染防止法22条(法定受託) 悪臭防止法11条12条(自治)
	土壌汚染検査	農用地の土壌の汚染防止等に関する法律11条(法定受託)
	ダイオキシン検査	ダイオキシン類対策特別措置法27条(法定受託)
食品	食品収去検査	食品衛生法(法定受託)
	食中毒検査	食品衛生法(法定受託)
感染症	定点サーベイランス	地域保健法
	積極的疫学調査(病原体管理)	感染症法14条(届け出)(自治) 感染症法15条(調査、届け出)(法定受託)
	感染症法	感染症法
薬事	医薬品分析	薬事法
	栄養調査	健康増進法





まとめ

- ・GVAP: ワクチンで予防可能な疾患(ポリオ、麻疹、風疹など)の病原体サーベイランスの信頼性確保(標準化、認定制度あり)
IHR(2005): 危機管理対応のための検査体制強化→信頼性確保
- ・感染症分野を除き精度管理に関する国内法令は整備
- ・信頼性確保のための項目は何か。そして限られたリソースで何が、どこまでできるか?
- ・外部精度管理の仕組み(民間機関、公的機関、財源)
- ・検査の基準(定点検査、精度管理)を維持のためには?
産業界(KAIZEN→コスト削減)、医療界(事故防止)、食品(輸出)、環境(公害)

感染症: 国内法令、IHR、ポリオ根絶、麻疹排除→危機管理/公衆衛生

H26年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的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)

研究代表者 佐多徹太郎

研究分担テーマ:精度管理に関する技術的支援

国立感染症研究所
感染症疫学センター第6室
木村 博一

研究班分担表

体制小班 精度管理実施要領(綱)案作成	佐多(富山)	平田宏(名古屋) 平田輝(福岡) 山本(大阪) 岡野(北海道) 水野(横浜) 末吉(山口) 岸本(岡山) 田原(東京) 倉根・宮崎・大石(感染症)
ウイルス小班 精度管理法(精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成)	小澤(群馬)	木村(感染症) 柴田(名古屋) 貞升(東京) 藤井・岸本(岡山) 岡野(北海道) 佐多(富山) 塚越・小林(群馬) 宮崎・駒瀬(感染症)
細菌小班 精度管理法(精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成)	調(山口)	石岡(感染症) 世良(福岡) 勢戸(大阪) 清水(北海道) 太田(横浜) 佐多・磯部(富山) 大石・清池(感染症)
突態調査(アンケート調査)	佐多(富山)	各小班担当者全員

H26年度 ウイルス検査外部精度管理(案)について

- 衛生研究所におけるウイルス検査の主な対象疾患
1. インフルエンザ
 2. ノロウイルス感染症(感染性胃腸炎・食中毒)
 3. 麻疹・風疹
 4. その他の呼吸器感染症(RSVなど)
 5. AIDS
 6. 急性脳炎(脳症)
 7. ウイルス性肝炎
 8. 手足口病・ヘルパンギーナ
 9. 無菌性髄膜炎
 10. その他原因不明疾患(ウイルス感染症疑い)

H26年度ウイルス検査診断精度管理体制の構築

・精度管理対象ウイルス:NoV

- 1) 精度管理実施要領(案)
- 2) 精度管理実施手順(案)
- 3) 標準検査法(案)
- 4) 精度管理データ記入ファイル(案)

・各地研におけるウイルス検査の精度管理の実態把握

- 1) 精度管理アンケート(案)

精度管理対象機関・実施時期

- ・対象:地方衛生研究所協議会加盟機関
- ・参加形態:任意とする
- ・測定法:プレート法のみ?
- ・実施時期:H26年度後半(10月以降?)
- ・実施方法:精度管理実施要領・精度管理実施手順に従う

ウイルス検査精度管理実施方法

- ・模擬検体: ノロウイルス(NoV)
- ・材料: NoV cDNAあるいはNoV組み換えプラスミドDNA
- ・方法: 精度管理実施要領・精度管理実施手順に従い、NoV遺伝子定量標準曲線作成と模擬検体測定

- ・日常業務に数検体程度の追加試験で済む
- ・精度管理解析のための必要なデータが得られる
- ・一定の内部精度管理体制が確立されていると思われる

ウイルス検査法の種類

- ・細胞培養法
- ・遺伝子検査法
- ・抗原検査法
- ・抗体検査法
- ・電子顕微鏡法

➔

遺伝子検査の汎用化
(迅速・高感度・特異的)

↕

- ・RT-PCR法
- ・リアルタイムPCR法
- ・シーケンス/系統解析法
- ・NGS解析

データ解析および送付について

1. 曲線の関数式および相関係数(R value)
2. 各標準物質濃度別Ct値(NoV組み換えプラスミドDNA)
3. 使用試薬名と反応系
4. 測定装置(機種名や購入年など)
5. 標準曲線図(平均値プロット図)

・模擬検体に関するデータ

1. 測定生データ(3重測定の各々のデータ)

↓

1-4をデータファイルに入力
5をPDFファイル化

↓

電子メールにて送付

データ解析・還元について

- ・ウイルス小班によるデータ収集解析
- ・解析データと報告書については研究代表者に一括還元

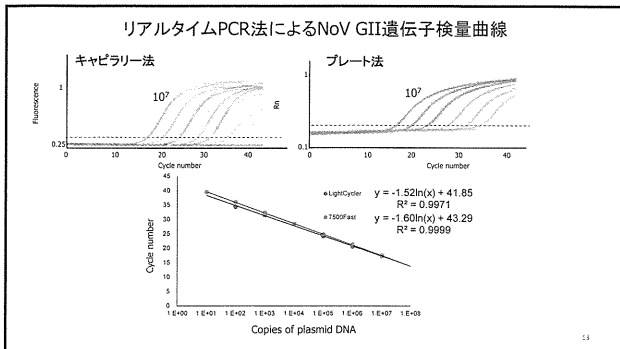
その他

詳細について、当班会議後、各小班のメンバーで検討し、とりまとめを行う。

リアルタイムPCR法の特徴

- ・長 所
 1. 迅速・高感度・特異的
 2. ウイルス遺伝子の定量が可能
 3. 実験室内コンタミネーションが起こりにくい
- ・短 所
 1. ある程度の熟練が必要
 2. 高コスト(試薬・機器)

地研のウイルス検査に汎用されている(特にNoVとインフルエンザ)



H26年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と
継続的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)
研究代表者 佐多徹太郎

研究分担テーマ:精度管理に関する技術的支援
(細菌検査部門について)

国立感染症研究所
感染症疫学センター第五室
石岡 大成

2014.07.14

分 担 表

担当小班	とりまとめ	担 当
体制小班 精度管理実施要領(綱)案 作成	佐多 (富山)	平田宏(名古屋) 平田輝(福岡) 山本(大阪) 岡野(北海道) 水野(横浜) 末吉(山口) 岸本(岡山) 田原(東京) 意根、宮崎、大石(感染症研)
ウイルス小班 精度管理法: 精度管理実施手順(案) 標準検査法(案) 作成	小澤 (群馬)	木村(感染症研) 柴田(名古屋) 貞升(東京) 藤井、岸本(岡山) 岡野(北海道) 佐多(富山) 塚越、小林(群馬) 宮崎、駒瀬(感染症研)
細菌小班 精度管理法: 精度管理実施手順(案) 標準検査法(案) 作成	調 (山口)	石岡(感染症研) 世良(福岡) 勢戸(大阪) 清水(北海道) 太田(横浜) 佐多、磯部(富山) 大石、蒲池(感染症研)
実態調査 アンケート調査	佐多 (富山)	各小班担当者全員

平成26年度
地衛研外部精度管理(案)

地衛研で実施される細菌検査の主な病原体

1. 病原大腸菌(腸管出血性大腸菌)
2. 赤痢菌属
3. コレラ菌(ビブリオ属菌含む)
4. 結核菌
5. カンピロバクター属菌
6. サルモネラ属菌(腸チフス・パラチフスA菌含む)
7. 黄色ブドウ球菌
8. セレウス菌
9. ウェルシュ菌
10. エルシニア属菌
11. レジオネラ菌
12. A群溶血性レンサ球菌
13. 細菌性髄膜炎起因菌
14. 百日咳起因菌
15. その他原因不明疾患

感染症法における精度管理としての候補は

平成26年度
地衛研精度管理体制(細菌検査診断)の構築
(案)

外部精度管理対象病原体: サルモネラ属菌(案)

- ・精度管理実施要領(案)
- ・精度管理実施手順(案)
- ・検査結果報告書(案)
- ・検査経過記録書(案)
- ・検体管理記録簿(案)
- ・生化学性状試験記録表(案)

→ 検討事項のまとめ

各地衛研における細菌検査精度管理に関する状況

- ・精度管理アンケート(案)

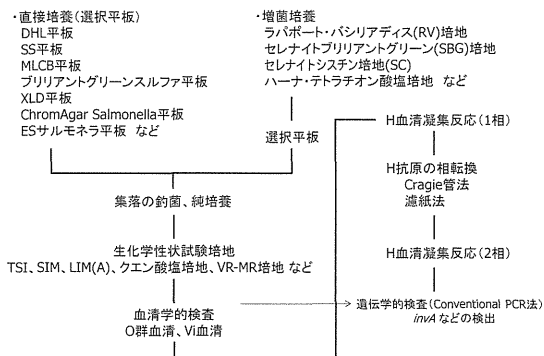
外部精度管理実施方法

- ・対象: 地方衛生研究所全国協議会加盟機関
- ・実施形態: 希望調査の上検討
- ・実施時期: 平成26年度後半(年明け)
- ・実施方法: 精度管理実施要領、精度管理実施手順に準じて行う

細菌検査精度管理（案）

- ・材料：病原体添加臨床検体
- ・対象病原体：サルモネラ属菌
候補血清型：*Salmonella* Infantis
他に*S. Cerro* など
- ・方法：培養法によるサルモネラの同定および血清型別を精度管理実施要領、精度管理実施手順（地衛研におけるSOP）に従って実施

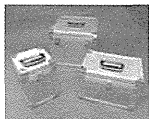
臨床検体からのサルモネラ属菌分離培養検査フロー



精度管理検体の送付方法

第一選択候補：ゆうパック

1. 一次容器
スクリュウキャップチューブを使用(パラフィルムでシール)
2. 二次容器、三次容器、四次容器
国連容器を用いて吸収剤を入れ、緩衝材で固定
各地衛研から発送場所に事前に送付
3. 発送場所および送料
国立感染症研究所 村山庁舎



(参考)
ゆうパック送料 80サイズ(片道)
東京 → 北海道 (1230円)
東京 → 新潟 (930円)
東京 → 大阪 (1030円)
東京 → 鹿児島 (1340円)
東京 → 沖縄 (1440円)

結果の報告方法およびデータ解析について

- ・ 検査結果報告書(様式1)、検査経過報告書(様式2)を使用して郵送またはE-mailで報告
- ・ 各増菌培地、選択平板の使用状況および組み合わせ
- ・ 使用試薬名およびメーカー
- ・ 培地による検出感度
- ・ 機器使用の場合は当該機種、メーカー
- ・ SOPの比較(独自の場合)
- ・ その他(輸送方法)

データとりまとめおよび還元

- ・ 細菌小班にてデータ収集および解析を行う
- ・ 解析データと報告書については研究代表者に一括還元

厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業

「地方衛生研究所における病原微生物検査の精度管理の導入と継続的实施のための全国的制度の構築に関する研究（H26-健危-一般-001）」班

研究代表者：佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

第二回研究班会議

日時：平成27年1月9日（金）13時30分から16時30分

場所：国立感染症研究所共用第二会議室

議題等（案）

- 1) 挨拶等 原田志織（厚生労働省健康局がん対策・健康増進課地域保健室）
- 2) 研究班の進捗状況説明 佐多徹太郎（研究代表者）
- 3) 感染症検査の精度管理に関する実態調査 佐多徹太郎
- 4) 外部精度管理のしくみ構築のためのウイルス検査 木村博一（研究分担者）
- 5) 外部精度管理のしくみ構築のための細菌検査 石岡大成（研究分担者）
- 6) 地方衛生研究所における感染症検査に係わる精度管理実施要綱(案) 佐多徹太郎
- 7) 討論および今後の予定等

「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」 第2回研究会議 概要

平成27年1月9日 感染研 共用第三会議室 13時～17時00分

1. 佐多研究代表者より挨拶

2. 原田地域保健専門官（厚労省）

感染症法の改正について、地研の強化と精度管理についての記載があることから、本研究の成果について期待している。

3. 佐多（研究班の進捗状況の説明）（配布資料1）

次年度の継続申請書についてはこれまでのスキームを来年度も使用したい。感染研の宮崎班との連携も視野に入れる。必要に応じて、都道府県の感染症担当部局への研究の結果を情報として提供し、予算獲得の根拠に使ってもらうことを想定している。

今年度を実施したことは、①アンケート調査を行い、結果を解析した。②精度管理実施要領素案を作成した。③ウイルス・細菌小班別に外部精度管理調査を実施した。

4. 佐多（精度管理に関する実態調査アンケート報告）

感染症検査における「標準検査法」「標準作業書」「プロトコール」など、言葉のもつ意味が混同されている状況となっている。感染症検査においては、食品検査と同じような「SOP」な導入は、検査に制約が生まれるという意見があった。20年ほど前にもこの研究班と同じようなテーマで実施し報告書がまとめられていることが判明した。その報告書についてCD化しているので後日皆さんに配布したい。総括に述べられていることは、外部精度管理の意義はあるが、実施母体、予算、人的な問題があるということであった。すなわち、今回の研究班とよく類似している。ただし、今回は時代背景が異なるとともに、感染症法に盛り込まれる可能性があるという点が異なる。また、20年間ほとんどできなかつたとならないように考えていきたい。

5. 木村（ノロウイルスの精度管理要綱等の説明）（配布資料2）

今回の外部精度管理調査は、標準検査法としては食中毒検査の公定法とし、ウイルス研修のコースでも実際に使用した方法である。検査は各機関が日頃実施している方法で実施することとした。59機関が参加した。試料Bでは、結果は95%信頼区間外であった機関が36～40機関と半数以上であった。原因としては、試料の混和が十分でなかった可能性、配布試料の劣化、器具や機器の問題などが考えられたが、明らかではなかった。40サイクル以上でCt値が上がったものを陽性とした機関も見られた。

→ノロウイルスの検査に半定量値が必要かどうか、調査項目として適当か？

→実際の検査では、検体からの遺伝子の抽出に精度の問題があると思われる。

→定量値で2桁の違いが認められたら、陽性検体を陰性と判断する可能性があるということなので、定量値による調査も意味がある。

→食中毒検査の場合、実際のプロトコールで実施すると、試薬代が高い。

→キャリアオーバー、クロスコンタミ、フォールスネガ、フォールスポジティブのような検体も調査項目の中に入れるべきである。

→40サイクルでCtが立ち上がる例は食品業務従事者やふき取り検体である。これを単純に「陰性」として処理できず、意味のある40サイクルといえるので、判断は難しい。

→はずれ値の原因について、プライマーの凍結融解による劣化が問題であったと自施設で考察している
→結果が思わしくなかった機関については、その原因について考察してもらい、その情報はみんなで共有すべきである。

5. 石岡（細菌小班の精度管理結果）（配布資料3）

サルモネラを対象として、2検体で調査した。検体の送付時に大きな問題が浮上し、調査開始が遅れた。原因のひとつは、菌株の入った検体の発送時に大きな制約（病原体輸送の規定）があったことである。感染研との協議が必要である。10機関への調査で、1検体はサルモネラ陰性、1検体には *S. Infantis* と *S. Cerro* を接種し、送付した。3機関では *S. cerro* のみ検出したと回答。7機関では2血清型を検出していた。

→予備実験で48時間培養から検出されていたが、そのような培養は基本的な方法ではないので、菌株の選定に問題がないか？

→地衛研に対する調査であることを考慮すべき（今回の項目は医療機関向けであった）
施設基準の申請もわずらわしかった

→調査項目に対し選定された菌の特性により、結果としてクイズみたいになった？

→食中毒菌ではなく、感染症法にある菌で実施してほしい

佐多の（アンケート部分は報告書に改訂した最終版を提示した）

6. 佐多（結果報告の最終版はアンケート調査結果の報告書に添付）（配布資料4）

地方衛生研究所における感染症検査に係わる精度管理実施要綱（案）の作成について（体制小班）として、これまでの地衛研研究活動の調査結果について、体制小班の担当として代表者から紹介された。アンケートの自由記載意見にあった「おなじような精度管理事業を行った記憶」との指摘から、平成9年度の「行政検査における精度管理システム構築に関する研究」班の報告書を入手した。その概要について紹介があり、今後役に立てることになった。報告書はpdfファイル化して班員に配布する予定とのことであった。そして今回、精度管理実施要綱（案）が提示された。こういった点を踏まえて今後さらに検討すること、そしてその計画等について提示された。

厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業
「地方衛生研究所における病原微生物検査の精度管理の導入と継続的実施のための全国的制度の構築に関する研究 (H26-健危-一般-001)」班
研究代表者: 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)

第二回研究班会議
日時: 平成27年1月9日(金)13時30分から16時30分
場所: 国立感染症研究所共用第二会議室

議題等(案)

- 1) 挨拶等 厚生労働省健康局がん対策・健康増進課地域保健室 原田志織
- 2) 研究班の進捗状況説明 佐多徹太郎(研究代表者)
- 3) 感染症検査の精度管理に関する実態調査 佐多徹太郎
- 4) 外部精度管理のしくみ構築のためのウイルス検査 木村博一(研究分担者)
- 5) 外部精度管理のしくみ構築のための細菌検査 石岡大成(研究分担者)
- 6) 地方衛生研究所における感染症検査に係わる精度管理実施要綱(案) 佐多徹太郎
- 7) 討論および今後の予定等

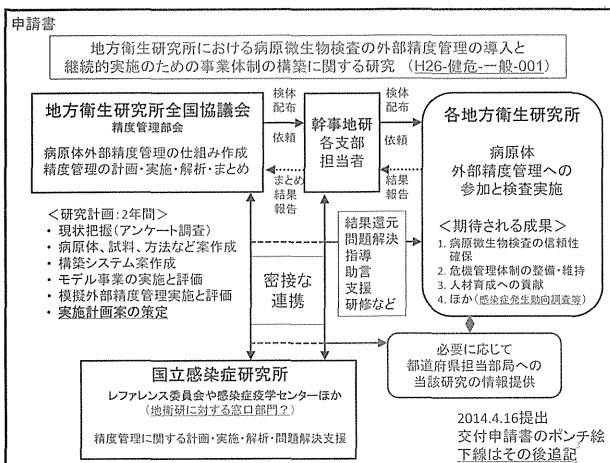
申請書
平成26年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的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)

研究代表者: 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)

研究分担者:
(地衛研全国協議会精度管理部会) (感染研・レファレンスセンター)
調 恒明(山口県環境保健センター) 倉根一郎(国立感染症研究所)
平田宏之(名古屋市衛生研究所) 宮崎義継(国立感染症研究所)
平田輝明(福岡県保健環境研究所) 大石和徳(国立感染症研究所)
岸本壽男(岡山県環境保健センター) 木村博一(国立感染症研究所)
山本容正(大阪府公衆衛生研究所) 石岡大成(国立感染症研究所)
岡野素彦(北海道立衛生研究所) (敬称略)
協) 小澤邦寿(群馬県衛生環境研究所)
協) 水野哲宏(横浜市衛生研究所)
協) 田原なるみ(東京都健康安全研究センター)

研究協力者: ほかに地衛研および感染研の関係者



分担表(案) 2014.7.14-23

担当グループ	とりまとめ	担当
体制小班 精度管理実施要綱(案)作成	佐多(富山) 12名	平田宏(名古屋) 平田輝明(福岡) 山本(大阪) 岡野(北海道) 水野(横浜) 末吉(山口) 岸本(岡山) 田原(東京) 倉根・宮崎・大石(感染研)
ウイルス小班 精度管理法・精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成	小澤(群馬) 12名	木村・野田(感染研) 柴田(名古屋) 貞升(東京) 藤井・岸本(岡山) 塚越・小林(群馬) 佐多(富山) 勝見(仙台市) 宮崎・駒瀬・影山・吉田(感染研)
細菌小班 精度管理法・精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成	調(山口) 11名	石岡(感染研) 世良(福岡) 勢戸(大阪) 清水・森本(北海道) 太田(横浜) 四宮(愛媛) 佐多・磯部(富山) 大石・蒲地(感染研)
実態調査(アンケート調査)	佐多(富山)	各小班担当(分担、協力)全員

厚生省: 原田、林、中嶋、福島、梅木

計画実施中 本研究班の成果物として期待 (せねばならぬ) 20150109 update

1. 地衛研の精度管理の実態(アンケート調査の解析)
(地衛研は感染症法に関連する精度管理が必要)
→ 6月20日までアンケート項目の提出依頼(班員等全員へ)
→ 案2回、回答付き案2回の意見聴取し、10月8日調査開始、10月21日締切64件。
→ 76地衛研から回答あり(10/31まで)集計作業開始 精度管理部会(11/4)調班(11/6)
→ 全79地衛研から回答(11月中旬)再集計 班員配布(12/5)調班(12/16)
2. 外部精度管理実施要綱(案)ないし精度管理実施要綱(案)(体制小班)
→ 要綱案の案の項目の提出依頼: 6月27日まで
→ 11月4日の精度管理部会で項目議論→その後了承 その後立案予定(メール等)
→ これまで地衛研で行ってきた精度管理に関する研究報告の収集・まとめ
→ 平成9年の報告書を手直し、本日供覧、ここまでのまとめを行う
3. 外部精度管理の適切な方法(実験結果も含む)ないし精度管理実施手順(案)
→ ウイルス・細菌小班的キックオフ班会議を7月14日に開催
ウイルス小班(59地衛研参加)、細菌小班(11地衛研参加)→本日報告。
4. (病原体検査マニュアルの改訂)→ 宮崎班へ依頼

○本外部精度管理事業は、地衛研における微生物検査の技術的水準の維持・向上のために、外部精度管理の手法による全国的な仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築し、その妥当性を評価する
○外部精度管理の導入に向けて種々の課題の抽出と整理を行うことを今回の研究目的とする 5

H26年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と
継続的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)

研究代表者 佐多徹太郎

研究分担テーマ:精度管理に関する技術的支援

研究分担者
国立感染症研究所
感染症疫学センター第6室
木村 博一

ウイルス検査精度管理小班構成メンバー

研究代表者:佐多徹太郎

小班長:小澤邦壽(群馬県)

班員(研究協力者)

塚越博之 小林美保(群馬県)

貞升健志(東京都)

柴田伸一郎(名古屋市)

藤井理津志 岸本寿男(岡山県)

宮崎義継 駒瀬勝啓 野田雅博 木村博一(感染研)

H26年度ウイルス検査診断精度管理体制の構築・実施

- ・検査精度管理対象ウイルス:NoV
- ・リアルタイムPCR法によるNoV遺伝子定量

- 1) 精度管理実施要領
- 2) 精度管理実施手順
- 3) 標準検査法
- 4) 精度管理データ記入ファイル

- ・各地研におけるウイルス検査の精度管理の実態把握

- 1) 精度管理アンケート

ウイルス検査診断精度管理実施経過

- ・対象:地方衛生研究所協議会加盟機関
- ・参加形態:任意

7~10月

- 1) 精度管理実施要領
- 2) 精度管理実施手順(プレート法)
- 3) 標準検査法
- 4) 精度管理データ記入ファイル

10月下旬:配布資料作成

11月上旬:試料配布

11~12月上旬:試料測定・データ還元

12月中旬からデータ解析開始

標準曲線作成試料および配布試料の配列

挿入配列

NoVG1

CGTTTGATCGGGTTCCATGATCTGAGCATGTGGACAGGGGATCGCGATCTCTGCCCCATTATG
TAAATGATGATGGGCTTAAGGACCCGCCCAACAGATGATGGACACAGTGGTCCGCGCCGCGC
TGGTACAGAGGCAACACACAGCTGACCTATTGCTATGGATCCAGTATGGTGTCTCAACGGC
AGTTGCCACTGCTGGTCAAGTAAATGATGATGACCCCTGGATTATGAGTAATTTTGTTCAAGCAC
CCAGAGGAGTTTTACATTCACCCATACACACCCCTGGTATTTGTTTGGATTCAATTA
GGACCTCAATTAACCCCTTTTGTCTCATTTAGACAAATGACAATGGCTGGGTTGG



NoVGII

CAGGAAGCTGTTTCAGGTGATGAGGTTCTCAGATCTAAGCACATGGGAGGGCGATCGCAATC
TGGCTCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGGCTCGAATGACGCTGCTCCATCTAATGATGTCGGC
CCGGCCTCGCCAGAGATCAACAATGAGGCAATGGCCCTAGACCCAGTGGCGGGTGGAGCGAT
AGGAGACCCCTCCTGCTGGCAGAAATGATATTGATCCCTGATATGATATATTGTTGGAAAG
CACCTGGTGGATTTACAGTGTCCCTAGGAATCCCTGGTGAAGTCTCTTAATTTGGAA
TTGGCCCAAGAAATTAACCCCTATTGTCCTACTGCTAGATGATCAATGGCTGACAGGTTG



プラスミド

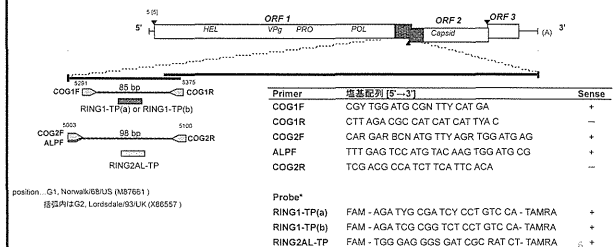
NoV検査の標準物質として全国地方衛生研究所に配布
NoV遺伝子挿入プラスミドを配布試料として使用
増幅効率:ほぼ100%

NoVリアルタイムPCR検査法

検査方法:実施要領標準検査法

配布された検体をリアルタイムPCR法により3重測定し、
定量結果(コピー数)、Ct値などを報告する。

J Clin Microbiol. 2003 Apr;41(4):1548-57.



H26年度 NoV検査 精度管理解析結果

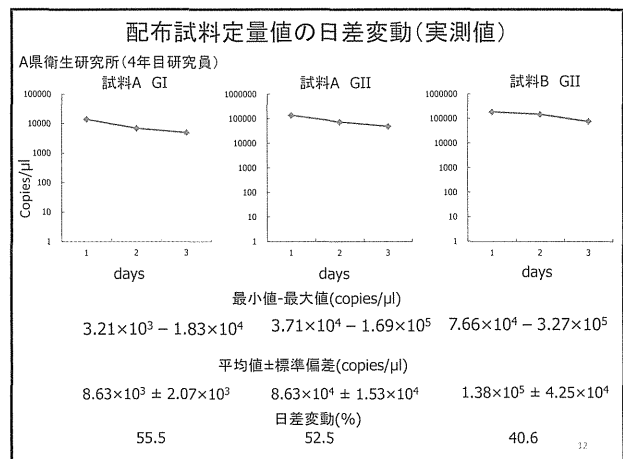
- 精度管理応募・実施機関
- 参加希望機関 66機関
 - 参加機関 60機関 (参加希望後辞退: 1機関)
 - 参加辞退機関 2機関 (A県、A市)
 - 精度管理参加およびデータ解析機関数: 59機関 (都道府県37 政令指定都市 8 中核市11 特別区3)

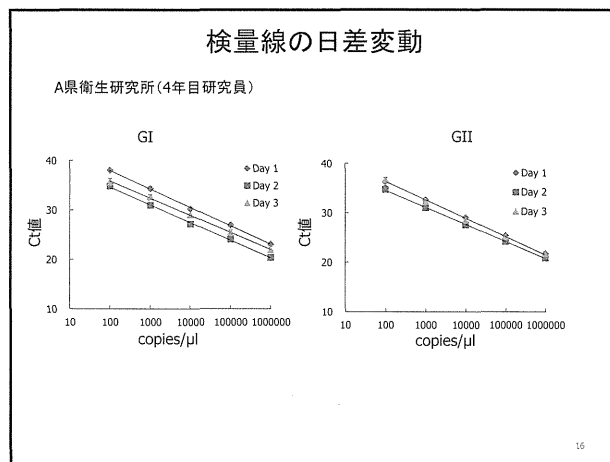
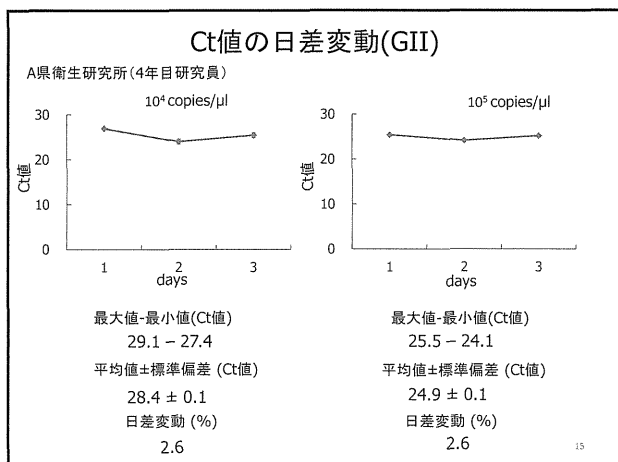
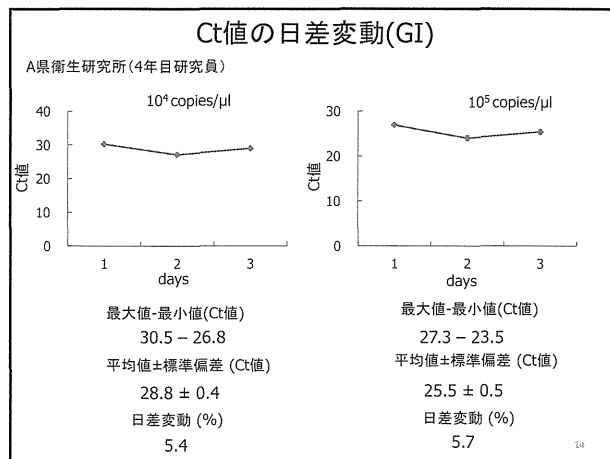
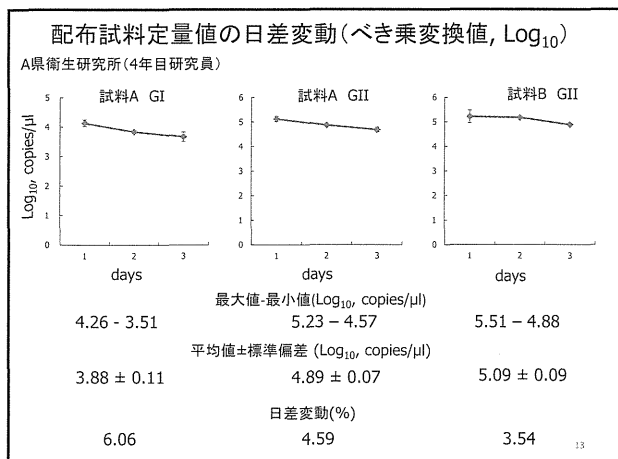
ブロック別参加機関

北海道・東北・新潟	10/12機関
関東甲信静	19/23機関
東海・北陸	7/8機関
近畿	10/14機関
中国・四国	8/10機関
九州	5/12機関

- 配布試料
- 試料A (NoV GI NoV GII混合試料)
NoV GI (理論値: 2.5×10^3 copies/ μ l)
NoV GII (理論値: 2.5×10^4 copies/ μ l)
 - 試料B (NoV GIIのみ)
NoV GII (理論値: 7.5×10^4 copies/ μ l)

- 予備試験
1. 配布試料の日差変動
 2. 検量線の日差変動





H26年度 ウイルス検査精度管理結果

- ### ウイルス検査精度管理実施方法
- ・配布試料: NoV cDNAあるいはNoV組み換えプラスミドDNA
 - ・方法: 精度管理実施要領・精度管理実施手順に準じる。
遺伝子定量標準曲線作成と配布試料測定(3重測定)
 - ・取得データ
1)配布試料定量値 2)各反応系のCt値 3)標準曲線図
4)標準曲線の相関係数 4)使用試薬 5)測定機器 6)その他

各機関の試験系のバリエーション

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

↓

各定量値をcopies/μlに補正

使用測定機器

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

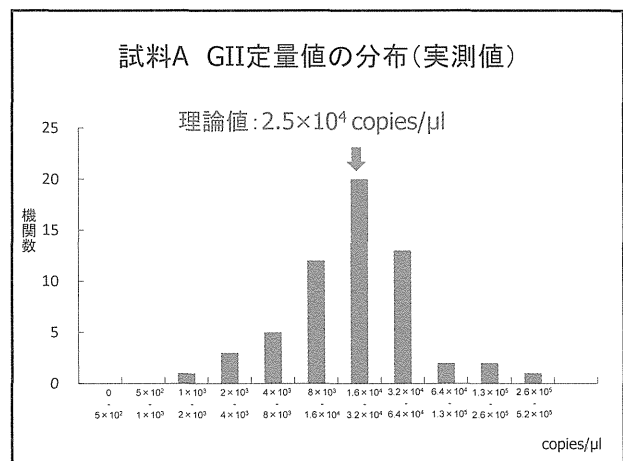
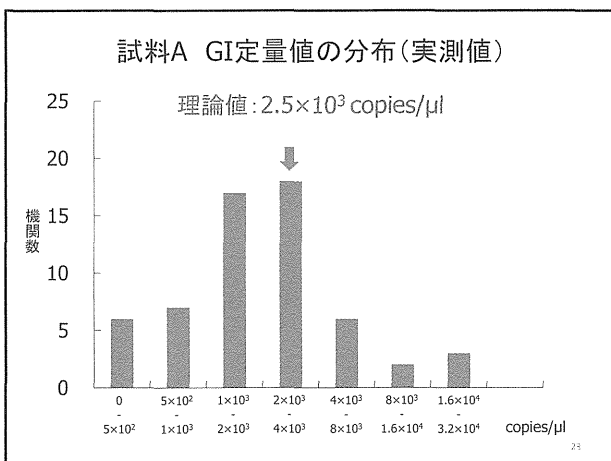
使用試薬

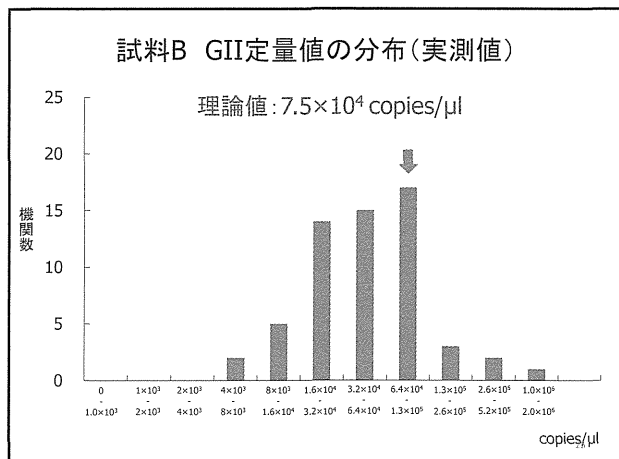
試薬名	使用機関数
TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®)	45
TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems®)	2
TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems®)	1
Premix Ex Taq (Perfect Real Time or Probe qPCR) (TakaraBio®)	3
QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN®)	2
EagleTaq Master Mix with ROX (Roche®)	1
FastStart Universal Probe Master (RoX) (Roche®)	1
FastStart Essential DNA Probes Master (Roche®)	1
Realtime PCR Master Mix (TOYOBO®)	1
THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO®)	1

実測値統計解析結果

一般的には、

- データ分布が正規分布か否か？
- 精密度の測定誤差許容限界(±CV%)
= 生理的変動SD / 生理的平均変動幅 × (1/2) × 100

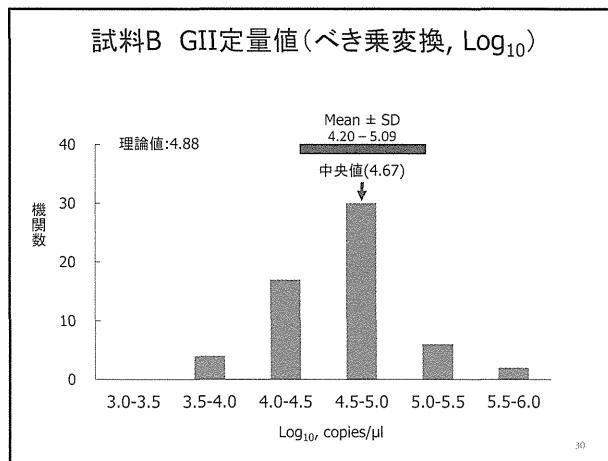
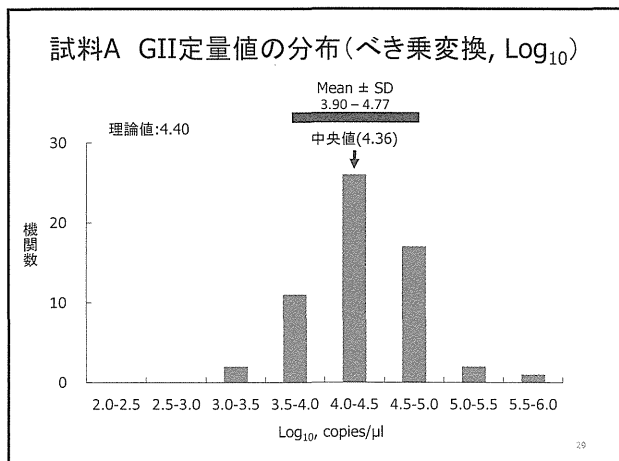
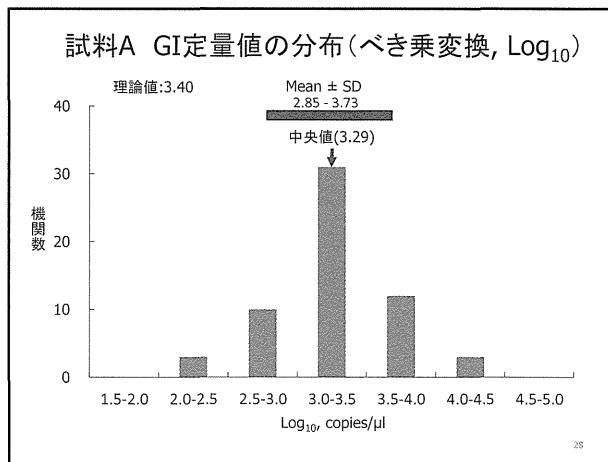




データ解析結果のまとめ(実測値)

	試料A GI	試料A GII	試料B GII
理論値	2.5×10^3 copies/ μ l	2.5×10^4 copies/ μ l	7.5×10^4 copies/ μ l
平均値	3.35×10^3	3.74×10^4	7.82×10^4
中央値	1.86×10^3	2.27×10^4	4.68×10^4
最小値-最大値	$2.53 \times 10^2 - 3.06 \times 10^4$	$1.38 \times 10^3 - 4.32 \times 10^5$	$5.61 \times 10^3 - 8.43 \times 10^5$
最小/最大	121.1	312.8	150.2
標準偏差	5.00×10^3	6.36×10^4	1.24×10^5
標準誤差	6.51×10^2	8.28×10^3	1.61×10^4
95%信頼区間	$2.28 \times 10^3 - 4.63 \times 10^3$	$2.12 \times 10^4 - 5.37 \times 10^4$	$4.66 \times 10^4 - 1.10 \times 10^5$
95%信頼区間外	40機関	36機関	37機関
99%信頼区間	$1.67 \times 10^3 - 5.03 \times 10^3$	$1.61 \times 10^4 - 5.88 \times 10^4$	$3.66 \times 10^4 - 1.20 \times 10^5$
99%信頼区間外	33機関	28機関	31機関

べき乗変換統計解析結果



べき乗変換後の統計解析値(Log ₁₀)			
	試料A GI	試料A GII	試料B GII
理論値	3.40	4.40	4.88
平均値	3.29	4.32	4.67
中央値	3.29	4.36	4.67
標準偏差	0.44	0.46	0.42
最小/最大 (最小-最大)	1.87 (2.40-4.49)	1.79 (3.16-5.64)	1.58 (3.75-5.93)
平均値±標準偏差	2.85 - 3.73	3.90 - 4.77	4.20 - 5.09
平均値+1SD以上の機関数	8	7	6
平均値-1SD以下の機関数	6	8	5

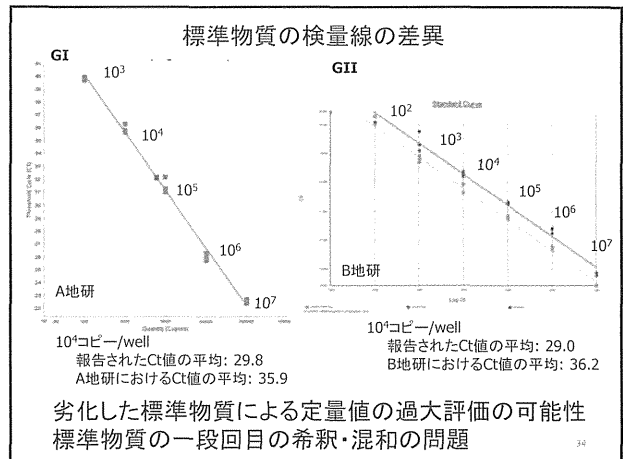
95%信頼区間外あるいは平均値±1SD外の機関(実測値)

3データ: 18都道府県、8政令指定都市・特別区、5中核市
2データ: 3都道府県、1政令指定都市特別区、1中核市
1データ: 8都道府県、2政令指定都市・特別区

平均値 ± 標準偏差外の機関(べき乗変換値)

3データ: 4都道府県、2政令指定都市・特別区、4中核市
2データ: 2都道府県、1政令指定都市・特別区
1データ: 3都道府県、4政令指定都市・特別区、1中核市

配布試料定量値の過大評価に関する考察



配布試料定量値の過小評価に関する考察

- ・配布試料の混和の問題?
- ・器具(ピペットの精度)の問題?
- ・測定機器のメンテナンスの問題?
- ・配布試料の劣化?

その他

陰性となるはずの試料BのGIにおいて、
実測値(Ct値:44.8473と44.3129)を報告(A県)

陰性となるはずのサンプル2のGIIにおいて、実測値
(Ct値: 42.11)を報告(B県)

試験前の内部事前調整が不十分?

各機関からの意見など(1/3)

- ① 実施要領では「試料Aおよび試料B」、実際の試料には「キャップに「1」、胴部分に「A」、『キャップに「2」、胴部分に「B」と記載されており、報告用エクセルファイルでは「サンプル1、サンプル2」となっていたので、混乱を避けるためにも表記は統一するべきだと思います。(A県)
- ② GIの3とGIIの2,3については、最小濃度のコントロールDNA(10コピー)が検出されませんでした。他の6点で検量線を描き、定量しました。(A県)
- ③ 今回のサンプルのコピー数の算出に用いた検量線はコピー数 $10^1 \sim 10^7$ までのすべてのPCのCt値を用いた。コピー数 10^1 、 10^2 のPCはコピー数 10^3 以上のPCと比べてばらつきが大きくなった。そのため、コピー数 10^3 以上の濃度のPCを用いて検量線を描くことで、より正確に検体の定量ができると考えられる。(A県)
- ④ 当施設のSOPでは、検体を1ウエルあたり2.778 μ L加えることになっておりますので、配付試料の量が足りず、試料AのGIは2ウエルで行いました。(A市)
- ⑤ 質問:ノロウイルスの測定に「TaqMan Universal PCR Master Mix II」を使用することは可能でしょうか。(A市)
- ⑥ 各濃度の平均をもって検量線を作成しましたので、相関係数は1つになります。(A県)

37

各機関からの意見など(2/3)

- ⑦ 職員数名で数回実施しましたが、G2よりもG1の方が感度も精度も悪いのが気になりました。また、100コピー以下は検出できていない感度というのにも気になります。陽性コントロールの希釈はDDWを使用しております。アドバイス等ありましたら、ぜひご教授承りたいと存じます。よろしくお願いたします。(A市)
- ⑧ 当市では、便検体の場合25 μ 系で検査を行っておりますが、今回は別添資料2表1にならって実施しました。(理由:試料の凍結融解の繰り返しを避けるために、受取時3等分した後-80 $^{\circ}$ C保存をすると、1回当り15 μ L使用する25 μ 系では試料が不足する不安があったため)検査は、ノロウイルス検査を行う職員3名が、1回ずつ実施しました。(A市)
- ⑨ GIIについては相関係数を0.9以上にするため、いくつかのウエルをomitした。10 7 のコントロールについては、ルーチンで使用していないため添加しなかった。(A区)
- ⑩ サンプル量について
・今回、実施要領によると、サンプルが100 μ Lずつ送付されるとのことだったので、当所では当該検査法によるノロウイルスの検査を担当している2名がそれぞれ実施してみることとした。
・当方の検査系では、1回・1サンプルあたり5 μ L \times 3ウエル \times 2(GIとGII)、すなわち30 μ Lを使用する。ところが、2人目が実施しようとしたところ、サンプルAは30 μ Lをなんとか採取することができたが、サンプルBについては、30 μ Lを採取することはできなかった。つまり、送付されたサンプルは、当方において封封した時点で100 μ Lは入っていないということになる。以上のことから、今回は、最初に実施した担当者の結果を入力した。(A市)

18

各機関からの意見など(3/3)

- ⑪ 検量線作成時、G1の10 7 及びG2の10 5 を棄却した。(R 2 0.99以上確保のため)(A市)
- ⑫ 精度管理試験結果入力ファイルおよび検量線の写しを添付ファイルで送ります。なお当所では通常ノロウイルスの定量は生かき(反応容量5 μ L総量50 μ Lの系)のみで実施しております。糞便検査は定量せず、反応容量2.5 μ L総量25 μ Lの系として実施しております。(A区)
- ⑬ 5 μ L測定のため2回測定できませんでした。G1の相関係数が0.98ですが、報告いたします。通常は定量検査は実施していないため、相関係数等の処理までは行っていません。そのため、個々の相関係数の出し方がわからず、エクセルの統計にて算出した数値を記入しました。(A区)
- ⑭ 反応系の試料添加量は2 μ Lですが、陽性コントロールを1 μ Lあたりで希釈しているため、コピー数は1 μ Lあたりで計算しました。(A市)

39

各機関からの意見など(抜粋)

- ① 職員数名で数回実施しましたが、G2よりもG1の方が感度も精度も悪いのが気になりました。また、100コピー以下は検出できていない感度というのにも気になります。陽性コントロールの希釈はDDWを使用しております。アドバイス等ありましたら、ぜひご教授承りたいと存じます。よろしくお願いたします。(A市)。
- ② GIIについては相関係数を0.9以上にするため、いくつかのウエルをomitした。10 7 のコントロールについては、ルーチンで使用していないため添加しなかった(A区)。
- ③ 検量線作成時、G1の10 7 及びG2の10 5 を棄却した。(R 2 =0.99以上確保のため)(A市)。
- ④ 反応系の試料添加量は2 μ Lですが、陽性コントロールを1 μ Lあたりで希釈しているため、コピー数は1 μ Lあたりで計算しました(A市)。

40

検 討 課 題

1. 各機関への結果還元について
2. 配布試料定量値の過小評価の原因について(各機関へアンケート調査?)
3. 報告書の記載について

41

まとめ(ウイルス検査精度管理)

1. リアルタイムPCR法によるノロウイルス遺伝子定量に関する精度管理を行った。
(取得データ数:3データ 試料A:2データ、試料B:1データ)
2. すべての参加機関(59機関)のデータ解析が可能であった。
3. 各定量データをべき乗変換後、平均値 \pm 1SDを基準とした判定を行った。その結果、20機関(33.9%)の定量値の一部あるいはすべてが上記基準値範囲外であった。
4. 基準値外の結果が得られた理由として、検量線用の標準物質の劣化、ピペッティングのばらつきおよび機器保守点検の問題などがあげられた。

42

今後の課題(ウイルス検査精度管理)

1. 基準値範囲外のデータに関する詳細な解析が必要である。
(追加調査実施中)
2. ピペティング技術、精度の高いPCR検査実施のための技術
研修導入が必要である。
3. 機器保守点検などに関する制度確立が必要である。

43

H26年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と
継続的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)
研究代表者 佐多徹太郎

研究分担テーマ:精度管理に関する技術的支援
(細菌検査部門について)

国立感染症研究所
感染症疫学センター第五室
石岡 大成
2015.01.09

平成26年度
地衛研外部精度管理(細菌検査)実施状況

平成26年度課題
地衛研精度管理体制(細菌検査)の構築
・精度管理対象病原体:平成26年度はサルモネラ属菌
・菌種に応じた精度管理実施要領の作成(平成26年度はサルモネラ属菌のみ)
・サルモネラ属菌検査に関する標準的な精度管理実施手順の作成(検査結果報告書、検査経過記録書などの様式を含む)
・検体管理簿の作成(試料の受領から廃棄まで)
各地衛研における精度管理(細菌検査)に関する現状調査
・精度管理に関するアンケートの実施

外部精度管理実施方法
・対象:地方衛生研究所全国協議会加盟機関
→本研究班を構成する機関(11機関)
・実施形態:参加希望調査の上検討
・実施時期:平成26年12月～
検体発送日12/5および12/8
・搬送方法:ゆうパック(チルド便)を利用し、臨床検体(病原体)として感染研村山庁舎から発送
・実施方法:精度管理実施要領、精度管理実施手順または各機関で実施している方法に準じて実施した

細菌検査精度管理用試料作製(1)
・材料:人由来糞便(胃腸炎患者を想定)
・対象病原体:サルモネラ属菌
添加血清型:
Salmonella Infantis (鶏肉由来)
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

細菌検査精度管理用試料作製(2)
人由来糞便の選定
・食中毒事例において地衛研で検査対象とされている病原細菌(サルモネラ属菌、腸管出血性大腸菌、カンピロバクターなど)およびノロウイルスが陰性であることが確認できた糞便を選択した
・上記糞便群の中で、予備実験で実際にサルモネラ属菌が安定して添加回収できる糞便を選択した

細菌検査精度管理用試料作製(3)

サルモネラ属菌の調整
S. Cerro および *S. Infantis* を平板培養
 ↓
 McFarland 1に菌液を調整して段階希釈
 ↓
 選択糞便に定量的に添加、混合
 ↓
 平板(DHL)における発育状況を観察
 ↓
 添加量を決定(便1gあたり 10^5 cfuとした)
 これを試料1とした(試料2は無添加)

細菌検査精度管理用試料作製(4)

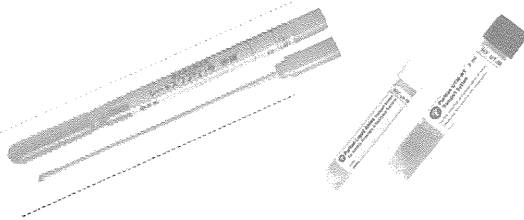
送付用(採便)容器の選択
 ・採便容器は緩衝液(剤)入りプラスチック容器が主
 ・付属または指定の綿棒スティックで採取
 ・便の表面の複数箇所を採取
 ・便中では腸内細菌、プロテアーゼで分解されやすいので、すみやかに冷所に保存する
 ・長時間になる場合は凍結保存する

(臨床検査新興協議会より)

細菌検査精度管理用試料作製(5)

送付用(採便)容器の決定

- ・シードスワブ(栄研化学社)・・・固形培地
- ・LAHTransportシステム(ピューリタン社製)・・・細菌採取・輸送用液体培地



精度管理試料の送付方法

感染研からの送付の前に・・・

- ・バイオセキュリティ管理室との交渉および申請書類の煩雑性

ゆうパックを使用

- 1 一次容器
シードスワブを使用(パラフィルムでシール)
- 2 二次容器、三次容器、四次容器(OVERPACK)
カテゴリ-B容器を用いて、吸収剤、緩衝材で固定



3 試料の発送と空容器返却

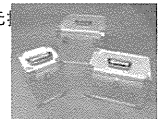
発送: 国立感染症研究所 村山庁舎からクール便(元)

返却: 各地衛研から普通便で送付(着払い)

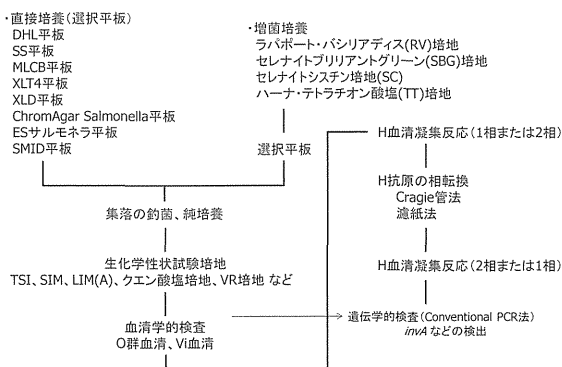
(参考)

平成26年度実績(運賃のみ)

感染研村山庁舎 ↔ 11機関(往復で約 3万円)



試料からのサルモネラ属菌分離培養検査フロー



結果について

- ・検査結果報告書(様式1)、検査経過報告書(様式2)または各機関で使用している様式を使用してe-mailで報告
- ・報告内容として、検出結果の他、増菌培地、選択平板の使用状況および組み合わせ、使用試薬名およびメーカー、機器使用の場合は当該機種およびメーカーなど

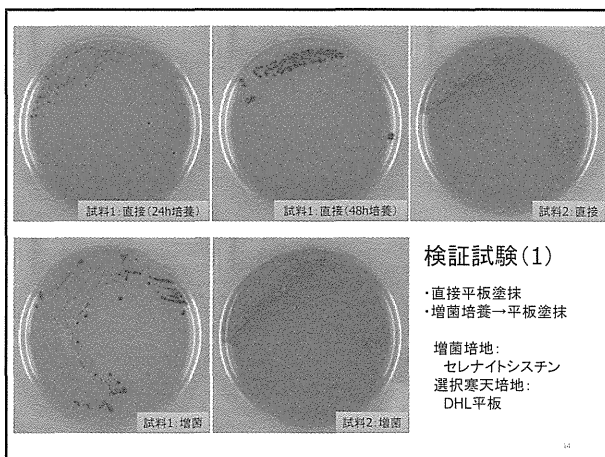
結果報告

実施期間：平成26年12月～

参加機関数：11機関

結果報告機関：10機関(平成27年1月7日現在)

15

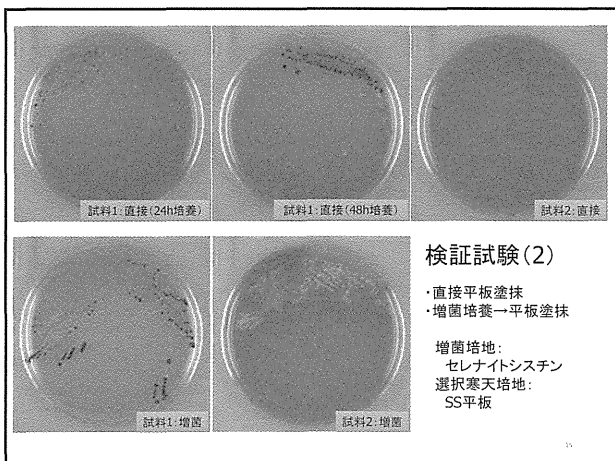


検証試験(1)

- ・直接平板塗抹
- ・増菌培養→平板塗抹

増菌培地:
セテナイトシステン
選択寒天培地:
DHL平板

16

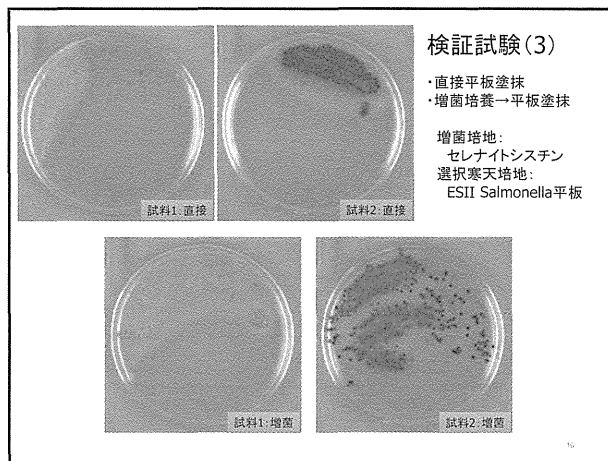


検証試験(2)

- ・直接平板塗抹
- ・増菌培養→平板塗抹

増菌培地:
セテナイトシステン
選択寒天培地:
SS平板

17

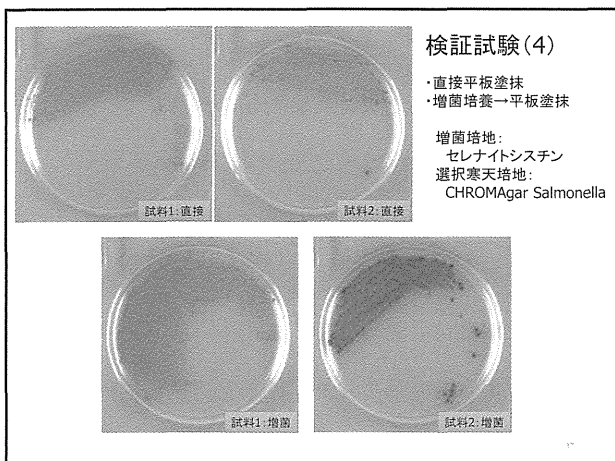


検証試験(3)

- ・直接平板塗抹
- ・増菌培養→平板塗抹

増菌培地:
セテナイトシステン
選択寒天培地:
ESII Salmonella平板

18



検証試験(4)

- ・直接平板塗抹
- ・増菌培養→平板塗抹

増菌培地:
セテナイトシステン
選択寒天培地:
CHROMAgar Salmonella

19

使用培地一覧

増菌培地	選択分離培地				
	H ₂ S(+)		H ₂ S(-)		
TTハーナ	2	SS	5	クロモアガー	7
RV	2	DHL	5	XLD	1
SBG	1	MLCB	4	ESサルモネラ II	1
SC	1	XLT4	1	SMDI	1
				BGA	1

増菌培地使用機関数：4

H₂S(+)選択分離培地の併用パターン

DHL + SS (1機関)、DHL + MLCB (2機関)

20

生化学性状試験使用培地状況

TSI および LIM	11機関
シモンズクエン酸塩培地	5機関
マロン酸塩培地	6機関
VP培地	4機関
酢酸塩培地	2機関
ズルシット培地	1機関
ウレア(尿素培地)	1機関
酒石酸培地	1機関

使用簡易キット一覧

5機関で簡易キットを使用

・ IDテスト(ニッスイ)	2機関
・ api 20E (バイオメリュー)	2機関
・ 不明	1機関

結果 (1)

試料からのサルモネラ検出結果

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

結果 (2)

試料1から検出されたサルモネラの血清型

	<i>Salmonella</i> Cerro*のみ	<i>Salmonella</i> Infantisのみ	<i>Salmonella</i> Cerro* / Infantis
分離 機関数	3	0	8

* 推定およびO血清、H血清凝集パターンの表記を含む

サルモネラ血清型抗原表

Type	Antigenic formulas		
	Somatic (O) antigen	Flagellar (H) antigen	
		Phase 1	Phase 2
Group O:7 (G1)			
Infantis	6, 7, 14	r	1, 5
Group O:18 (K)			
Cerro	6, 14, 18	Z ₄ , Z ₂₃	[1, 6]
Aarhus	18	Z ₄ , Z ₂₃	Z ₃₄
II	18	Z ₄ , Z ₂₃	—
IIIa	18	Z ₄ , Z ₂₃	—

Kauffmann-White scheme
Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Second Edition) より抜粋

検討課題

- ・ 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および
- ・ 対象参加機関のおよび実施時期

6) 地方衛生研究所における感染症検査に係わる
精度管理実施要綱(案)作成について
(体制小班) 佐多徹太郎

そして?-3

V.3 (20150109)

➢ 健康被害拡大防止のための法に基づく措置(食中毒の行政処分含む)や治療法等、その後の対応に与える検査結果の影響が大きいもの及び検減を指している感染症については、特に、当該検査に係る信頼性確保は必須であり、そのシステムの構築要素として外部精度管理は重要であると思われる。

➢ 精度管理「事業」の実施により、検査精度の不備が指摘され、そのことにより本庁の主幹課に対し、検査精度向上のための予算獲得・確保や人員配置、異動への配慮などを要求する材料とするなど、庶務につながられるような事業として展開できれば、大きな意義が得られると考えます。つまり、所属内で完結・解決することにも一定の意気はありますが、厚生労働者の理解を得た上で、地衛研を所管する主幹課にも必要性を認知してもらい、「事業として適切・実施していただくことにより、広く次へ繋がる精度管理「事業」を実施することができるのではないだろうか。随分以前に同じような精度管理事業を行なった記憶があります。その際、検査技術の向上に寄与したと思われたものの、その後、継続されていません。そのことが本事業の遂行の難しさを物語っているようにも感じます。今後、継続的な実施を考える上では、その時の総括を生かされると良いと思います。

平成6-8年 地域保健対策総合研究事業 H6.1994+H6.1995
「行政検査における精度管理システム構築に関する研究」
研究代表者 衛藤繁男(神奈川県衛生研究所)

概要: 地衛研を対象とした外部精度管理を実施して方法論を確立し、また内部精度管理の導入と推進を図る。さらに外部精度管理事業を恒常的に実施するに必要な組織とその活動について検討し、システムの構築について提言をまとめる(原文)。

目的と必要性: 精度管理を試行することで検査情報、レファレンス、研修等が有機的に結合して一体となったシステムを構築することが必要(まとめる)。

これまでの研究状況: H3-5特別研究事業「衛生研究所および保健所における行政検査の質の向上に関する研究」で、実態把握し外部精度管理調査を実施し、内部精度管理マニュアルが提言の形でまとめられた。(以下略)

研究計画:

1. 外部精度管理調査の実施方法の検討と、実施。
2. 精度管理を支援するためのレファレンスや研修に関する組織と活動の検討。
3. 内部精度管理マニュアルの作成と実施(以下略)

結果等: 微生物系(10種の細菌、4種のインフルエンザウイルス、5種の寄生動物の検出と同定)、理化学系(食品や水道の化学物質)を配布。

はじめの試みで画期的。試料の安定性が大事、結果はほぼ満足、試験の未実施や同定が不完全なところもあった。恒常の実施体制整備が課題。(H6報告書)

厚生科学研究費補助金(保健医療福祉地域総合調査研究事業) 衛藤班1
「地方衛生研究所の機能強化に関する研究」分担研究
「行政検査における精度管理システム構築に関する研究」
分担研究者 衛藤繁男(神奈川県衛研) H9(1997)年3月(最終年度)

目次

1. 分担研究報告書	1
2. 行政検査における精度管理システムの構築に関する提言	5
3. アメリカ合衆国における Public Health Laboratories の役割と精度管理システム	9
4. 外部精度管理調査(総括)	51
5. 外部精度管理調査「微生物部門: 細菌系」	56
6. 外部精度管理調査「微生物部門: 寄生動物系」	79
7. 外部精度管理調査「理化学部門: 食品添加物」	85
8. 外部精度管理調査「理化学部門: 農薬」	94
9. 内部精度管理マニュアル作成(総括)	109
10. 内部精度管理の進め方と留意点(微生物部門)	111
11. 内部精度管理の進め方と留意点(理化学部門)	119
12. 業務管理文書作成のための一般考案方	123
13. 標準作業書作成のための標準作業書(案)	127
14. 寄生動物に対する抗体測定に用いる ELISA のための標準作業書(案)	131
15. 総括	135

資料

1. 外部精度管理調査資料
微生物部門細菌系外部精度管理調査票、配付試料調査票、供試菌株参考性状
微生物部門寄生動物系外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考回答
理化学部門(食品添加物)外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考答
理化学部門(農薬)外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考紙
2. 研修資料
研修に関するアンケート調査集計結果
赤網アムバ、クリプトスピリジウムを中心とした腸管寄生原虫の検査法

H9年度の報告書(3年目の総括研究報告書)から 衛藤班2

精度管理システムの目的は、地方衛生研究所の強化による公衆衛生への貢献で、内部精度管理活動推進の支援体制、外部精度管理事業、レファレンスシステム、研修・教育システムおよび情報システムから構成される。

1. 行政検査における精度管理システムの構築に関する提言
H9.3の地衛研設置要綱に試験検査業務に行政検査の精度管理が定められている。

A. 行政検査の特性(一般の検査と異なる特徴):

- 1) 社会性: 検査結果は個人にとどまらず一般社会や広く国内外社会にまで波及する(複数地域での発生、行政・法律上の処置、行政上・国際問題化の要素)。よって検査結果の再現性・整合性・信頼性が要求され、事例の解析には他地域の情報が不可欠。
- 2) 能動性: 検体の選択は結果に関わるので、検査実施側が被験者や物を選択する。
- 3) 集団性: 多くの場合集団を対象として検査する。
- 4) 多様性: 検体の種類がヒト由来のみならず、食品や環境由来のことまで多岐にわたる。よって処理法・検査の進め方が複雑になる。

B. 地衛研はレファレンス機能を担う

C. 地衛研の検査には、1)高度の技術・知識を要する検査、2)稀少事例の検査、3)研究レベルで行われる技術・手法を利用する検査があるため、精度管理の確立は困難な場合が多いが、こういった状況に応じた精度管理システムをめぐることが必要。

平成9年3月14日 厚生省発健政第26号 厚生事務次官
地方衛生研究所の機能強化について

地方衛生研究所については、昭和51年9月10日厚生省発第173号厚生事務次官通知により現行の設置要綱が示され、(略)公衆衛生の向上に重要な役割を果たしてきているところである。

地域保健法(昭和22年法律第101号)第4条に基づき策定された「地域保健対策に関する基本的な指針」(平成6年厚生省告示第374号)の中で、(略)地方衛生研究所設置要綱を別紙のように改正することとした。

- 1 今回の改正は、次のことに重点を置いたものであること。

(1) 略

(2) 地方衛生研究所の試験検査業務について、試験検査に不可欠な標準品及び標準株を確保・提供するなどレファレンスセンターとしての役割を担うとともに、行政検査等の精度管理を行うものとしていること。

(3) 略

2 地方衛生研究所の機能強化を図るため、その業務の実施に必要な技術系職員等の確保を図るとともに、その資質の向上に努めること。

3 以下略

2.2 試験検査

2.2.1 地方衛生研究所は、次のような試験検査を行うものとする。(以下略)

なお、地方衛生研究所は、研究要素の大きい試験検査、広域的な視野を要する試験検査、専門的かつ高度な技術や設備を必要とする試験検査を重点的に行うものとする。(以下略)

衛藤班2

H9年度の報告書(3年目の総括研究報告書)から

精度管理システムの目的は、地方衛生研究所の強化による公衆衛生への貢献で、内部精度管理活動推進の支援体制、外部精度管理事業、レファレンスシステム、研修・教育システムおよび情報システムから構成される。

1. 行政検査における精度管理システムの構築に関する提言
H9.3の地衛研設置要綱に試験検査業務に行政検査の精度管理が定められている。

A. 行政検査の特性(一般の検査と異なる特徴):
1) 社会性: 検査結果は個人にとどまらず一般社会や広く国内外社会にまで波及する(複数地域での発生、行政・法律上の処置、行政上・国際問題化の要素)。よって検査結果の再現性・整合性・信頼性が要求され、事例の解析には他地域の情報が不可欠。
2) 能動性: 検体の選択は結果に関わるので、検査実施側が被験者や物を選択する。
3) 集団性: 多くの場合集団を対象として検査する。
4) 多様性: 検体の種類がヒト由来のみならず、食品や環境由来のことまで多岐にわたる。よって処理法・検査の進め方が複雑になる。

B. 地衛研はレファレンス機能を担う

C. 地衛研の検査には、1) 高度の技術・知識を要する検査、2) 希少事例の検査、3) 研究レベルで行われる技術・手法を利用する検査があるため、精度管理の確立は困難な場合が多いが、こういった状況に応じた精度管理システムをめぐすことが必要。

衛藤班4

図1. 行政検査における精度管理システムの概略図

2. 概略(図1)

合同委員会の設置
微生物部門合同委員会
細菌、ウイルス等
理化学部門合同委員会
作業部会
食品(添加物等)
飲料水等
外部精度管理の企画立案
研修の企画
内部精度管理の推進
ノウハウ機能の検討
精度管理システムの評価

国立試験研究機関が行政検査の精度管理システムの中核となる役割を担うことが期待される。
1) 合同委員会、2) 精度管理システム、(1) 外部精度管理調査・実施は合同委員会、試料は国研と地研で作業、予算は国研、(2) 研修の実施: 外部精度管理の結果にもとづく研修、(3) 公衆衛生情報システム、(4) 内部精度管理実施の支援、(5) レファレンスセンター機能の整備・拡充、(6) 地方における検査機関の精度管理業務の支援
精度管理システムの構築は、行政検査の質の向上を意図するのみならず、国民の健康と財産を守ることを目的とする。国レベルの事業は不可欠である。

衛藤班6

提言(全体の概要)

1. 活動
1) 内部精度管理(個々の検査機関で実施)、2) 外部精度管理(内部精度管理の機能チェックと検査機能を第三者的立場から評価)、3) レファレンス(情報や標準株標準品、特殊項目の集中実施、試薬等の品質、検査法の検討など)、4) 研修・教育、5) 公衆衛生情報システム

2. 概略(図1)
国立試験研究機関が行政検査の精度管理システムの中核となる役割を担うことが期待される。
1) 合同委員会、2) 精度管理システム、(1) 外部精度管理調査・実施は合同委員会、試料は国研と地研で作業、予算は国研、(2) 研修の実施: 外部精度管理の結果にもとづく研修、(3) 公衆衛生情報システム、(4) 内部精度管理実施の支援、(5) レファレンスセンター機能の整備・拡充、(6) 地方における検査機関の精度管理業務の支援
精度管理システムの構築は、行政検査の質の向上を意図するのみならず、国民の健康と財産を守ることを目的とする。国レベルの事業は不可欠である。

3. 外部精度管理調査: 1. 実行委員会組織、調査、問題点指摘・実施方法の評価等、2. 試料作製配布は国立試験研究機関で調整し梱包し配布、3. 回答の回収、4. 結果の参加施設への還元(菌株は参考株として利用)、5. 調査票の配布(試料受領日、検査開始日と終了日、送付容器・試料の破損の有無、試料配布法、検査項目、回答期間、その他の問題点・意見など)。内部精度管理の重要性と外部精度管理調査の必要性が認められた。

4. 内部精度管理マニュアル作成と標準作業書案の作成(様式)

5. 研修: 恒常的実施。ブロックごとに実施。
国立公衆衛生院の特別コースと希少感染症検査技術研修会があるが分野すべてをカバーしているわけではない。限られた人数しか受講できない。そして新興再興感染症への対応が必要。見直しと新しい研修システムの構築が望まれる。

2014.11.4

「地方衛生研究所における感染症検査に係わる精度・品質管理実施要綱(案)」(体制小班)

1. 目的
項目だしと整理が必要→一次案作成
次年度には最終案を提示予定

2. 精度管理の実施内容:
1) 検査法、2) 検査精度、3) 参加地衛研への指導、4) 精度管理に関する情報提供、5) その他

3. 精度管理の実施手順: 別途定める(外部および内部精度管理について)

4. 精度管理にかかる結果の報告等:
1) 検査機関への結果通知等、2) 各自自治体への報告等、3) 厚生省担当課への報告等

5. 精度管理の実施体制等:
1) 実施管理組織(地衛研全国協議会など、厚生省健康局結核感染症課・地域保健室、国立感染症研究所などと連携を図りつつ実施?)、
2) 実施作業組織(専門機関?、地全協?、感染研?、地全協と感染研?、ほか?)

6. 厚生省と感染研が主催する研修会・事業等との連携
関連組織・学会等との連携?

7. 付則等

8. 日付

地衛研内部の組織体制?

別途定める: 「感染症検査に係わる精度管理実施手順」について詳細な案を作成する?
公布・公募(HIP等)、参加地衛研決定(全部?)、精度管理方法(感染症、症候群、検査手法・技能、ほか)、検体試料作成、輸送法、標準検査法(統一? 精度管理のため?) 病原体検査マニュアル等由来ほか、SOPの作成方法、対照検体、検査機器・メーカー等、評価・解析法、費用負担・予算、実施時期、結果還元、報告書、問題点の克服の方法、報告会・研修などなど、

今後1

2. 外部精度管理実施要領(案)ないし精度管理実施要綱(案)体制小班
→ 要綱案の素案の項目の提出依頼: 6月27日まで
→ 11月4日の精度管理部会で項目議論→その後了承 その後立案予定(メール等)
→ これまで地衛研で行ってきた精度管理に関する研究報告の収集・まとめ
→ 平成9年の報告書を手直し、本日供覧、ここまでのまとめを行う

これから-1

1. これまでに地衛研が行ってきた精度管理に関する記録を精査しまとめる。
2. まとめとH9の報告書を現状に合わせて改訂する。
3. 今回実施したモデル外部精度管理の結果を考慮し、外部精度管理実施手順(案)を作成する。
4. これらをもとに、精度管理実施要綱(案)をまとめる。

これから-2

H9の報告書をPDFファイルで地衛研班員にCDROMで配布
地衛研の関与した研究班報告書から精度管理実施状況をまとめ配布
上記にご意見を集約
→2015年春の第一回班会議までを予定
→その後、秋頃までに案をまとめて、班員の意見を聴取し、集約、まとめ

今後2

● 本外部精度管理事業は、地衛研における微生物検査の技術的水準の維持・向上のために、外部精度管理の手法による全国的な仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築し、その妥当性を評価する

● 外部精度管理の導入に向けて種々の課題の抽出と整理を行う

H26年度感染症の精度管理に関する実態調査結果を踏まえて、

1. 外部精度管理実施案の作成と一部の実施・解析および調査、そしてまとめ
→細菌小班とウイルス小班で各互選? 推薦? で2-3グループを設立
→外部精度管理の対象として、1) 感染症(富嶺研究班の対象外のもの、a) 地衛研のニーズが高い、b) 季節柄注目されている、c) 重症化・社会への影響大・感染拡大が懸念(1-2類感染症か?)、2) 感染性胃腸炎などの症候群、3) 検査技術や方法が候補

3. 精度管理に関する動向調査?

4. 研修等との連携?

5. ブロックとの関連?

ほか: 調疫学小班<佐多班>; ご意見聴取・まとめ・議論→病原体検査指針案へ

