

201525007A

厚生労働科学研究費補助金
健康安全・危機管理対策総合研究事業

地方衛生研究所における病原微生物検査の
外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の
構築に関する研究(H26-健危-一般-001)

平成27年度 総括・分担研究報告書

平成28年3月

研究代表者

佐多 徹太郎

(富山県衛生研究所)

厚生労働科学研究費補助金
健康安全・危機管理対策総合研究事業

地方衛生研究所における病原微生物検査の
外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の
構築に関する研究(H26-健危-一般-001)

平成27年度 総括・分担研究報告書

平成28年3月

研究代表者

佐多 徹太郎

(富山県衛生研究所)

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」班
班員名簿

氏名	所属	職名
佐多 徹太郎	富山県衛生研究所	所長
調 恒明	山口県環境保健センター	所長
猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所	所長
岸本 壽男	岡山県環境保健センター	所長
山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所	所長
岡野 素彦	北海道立衛生研究所	所長
倉根 一郎	国立感染症研究所	所長
宮崎 義継	国立感染症研究所・真菌部	部長
大石 和徳	国立感染症研究所・感染症疫学センター	センター長
木村 博一	国立感染症研究所・感染症疫学センター	室長

研究協力者

香月 進	福岡県保健環境研究所
佐野 一雄	名古屋市衛生研究所
四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
田原 なるみ	東京都健康安全研究センター
水野 哲宏	横浜市衛生研究所
荒川 英二	国立感染症研究所
泉谷 秀昌	国立感染症研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所
梅山 隆	国立感染症研究所
太田 嘉	横浜市衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
緒方 喜久代	国立感染症研究所
小澤 広規	横浜市衛生研究所
小渕 正次	富山県衛生研究所
影山 努	国立感染症研究所
勝見 正道	仙台市衛生研究所
岸本 剛	埼玉県衛生研究所
北川 和寛	福島県衛生研究所
倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
児玉 洋江	石川県保健環境センター
小林 美保	群馬県衛生環境研究所
駒瀬 勝啓	国立感染症研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
柴田 伸一郎	名古屋市衛生研究所
清水 俊一	北海道立衛生研究所
清水 英明	川崎市健康安全研究所
末吉 利幸	山口県環境保健センター
鈴木 里和	国立感染症研究所
勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
塚越 博之	群馬県衛生環境研究所
長澤 耕男	国立感染症研究所
野田 雅博	国立感染症研究所
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
藤井 理津志	岡山県環境保健センター
松島 勇紀	川崎市健康安全研究所
水越 文徳	栃木県保健環境センター
皆川 洋子	愛知県衛生研究所
村上 光一	国立感染症研究所
望月 利洋	兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター
森本 洋	北海道立衛生研究所
山下 照夫	愛知県衛生研究所
吉田 弘	国立感染症研究所
綿引 正則	富山県衛生研究所

ほか、調査等にご協力いただいた地衛研の担当者の方々

各小班の担当者リストを示す

* 下線は小班長
重複があります

体制小班

大石 和徳	国立感染症研究所
岡野 素彦	北海道立衛生研究所
香月 進	福岡県保健環境研究所
岸本 壽男	岡山県環境保健センター
倉根 一郎	国立感染症研究所
佐野 一雄	名古屋市衛生研究所
猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所
末吉 利幸	山口県環境保健センター
田原なるみ	東京都健康安全研究センター
水野 哲宏	横浜市衛生研究所
宮崎 義継	国立感染症研究所
村上 光一	国立感染症研究所
山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所
<u>佐多徹太郎</u>	富山県衛生研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所
小淵 正次	富山県衛生研究所
綿引 正則	富山県衛生研究所

ウイルス小班

小澤 広規	横浜市衛生研究所
影山 務	国立感染症研究所
勝見 正道	仙台市衛生研究所
岸本 剛	埼玉県衛生研究所
岸本 壽男	岡山県環境保健センター
北川 和寛	福島県衛生研究所
木村 博一	国立感染症研究所
児玉 洋江	石川県保健環境センター
小林 美保	群馬県衛生環境研究所
駒瀬 勝啓	国立感染症研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
清水 英明	川崎市健康安全研究所
<u>調 恒明</u>	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
塚越 博之	群馬県衛生環境研究所
長澤 耕男	国立感染症研究所
野田 雅博	国立感染症研究所
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
藤井理津志	岡山県環境保健センター
松島 勇氣	川崎市健康安全研究所
水越 文徳	栃木県保健環境センター
皆川 洋子	愛知県衛生研究所
宮崎 義継	国立感染症研究所
山下 照夫	愛知県衛生研究所
吉田 弘	国立感染症研究所
佐多徹太郎	富山県衛生研究所
小淵 正次	富山県衛生研究所

細菌小班

荒川 英二	国立感染症研究所
泉谷 秀昌	国立感染症研究所
大石 和徳	国立感染症研究所
太田 嘉	横浜市衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
緒方喜久代	国立感染症研究所
倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
清水 俊一	北海道立衛生研究所感染症部
鈴木 里和	国立感染症研究所
勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
村上 光一	国立感染症研究所
望月 利洋	兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
森本 洋	北海道立衛生研究所感染症部
<u>山本 容正</u>	大阪府立公衆衛生研究所
佐多徹太郎	富山県衛生研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所
綿引 正則	富山県衛生研究所

目 次

I. 総括研究報告書「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究」	
佐多徹太郎（研究代表者、富山県衛生研究所） 1
II. 分担研究報告書	
1. 精度管理に関する技術的支援 —シーケンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理調査—	
木村 博一（国立感染症研究所）ほか 17
2. 昨年度のリアルタイム PCR 外部精度管理調査後のトラブルシューティング研修	
小淵 正次（富山県衛生研究所）ほか 41
3. 手足口病ウイルスに関する外部「精度管理」調査（案）に関する研究	
山下 照夫（愛知県衛生研究所）ほか 83
4. 平成 26 年度に実施したサルモネラ外部精度管理調査について —トラブルシューティングを中心に—	
森本 洋（北海道立衛生研究所）ほか 107
5. 試料発送から検査実施までの温度変化における検査結果への影響について	
森本 洋（北海道立衛生研究所）ほか 113
6. 全国の地方衛生研究所を対象にしたコレラ菌検査の外部精度管理調査	
勢戸 和子（大阪府立公衆衛生研究所）ほか 123
7. 平成 28 年度精度管理調査「細菌性赤痢」に関する事前調査	
磯部 順子（富山県衛生研究所）ほか 181
8. 病原体検査の信頼性保証の取り組みについて	
吉田 弘（国立感染症研究所）ほか 191
9. 外部精度管理調査の実施体制について	
佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）ほか 209
III. 研究成果に関する刊行一覧表 239

IV. 資料

1) 第一回ウイルス小班会議資料 (2015.5.20 感染研) (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料)	241
2) 第一回細菌小班会議資料 (2015.5.29 感染研) (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料)	263
3) 地全協臨時総会 (2015.6.5 都健安研) (パワーポイント配布資料)	269
4) 第一回研究班会議資料 (2015.6.12 感染研) (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料)	293
5) 地全協精度管理部会会議資料 (2015.11.3 長崎) (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料)	319
6) 第二回研究班会議資料 (2016.1.8 感染研) (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料)	327

I . 総括研究報告書

総括研究報告書

研究代表者：佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究要旨 地方衛生研究所（地衛研）の微生物検査の技術水準を維持するために、外部精度管理の手法を導入し、地方衛生研究所全国協議会（地全協）として継続的に実施することの妥当性評価を目的として研究を行った。本年度は1) ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査、2) ウイルス外部精度管理調査後のトラブルシューティング研修、3) 手足口病と細菌性赤痢についての外部精度管理調査のたたき台案の作成、4) 病原体検査の信頼性確保の取組み、および5) 外部精度管理調査の実施体制について検討した。1) ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査では、ノロウイルスのPCR産物を試料としてシーケンスと樹状解析、およびコレラ菌の生菌を配付し同定検査を行った。シーケンスには62機関が参加し、75.8%で適切に解読され、相同性解析では遺伝子型は100%一致したが、いくつかの問題も明らかとなった。コレラ菌の調査では74機関が参加しおよそ正しい同定結果を回答した。良い調査モデルとなった。2) 昨年実施したリアルタイムPCRの外部精度管理調査後、うまく結果を出せた機関とそうでなかった機関に依頼し10機関の参加を得て、小グループで発表と討論の後、トラブルシューティング研修を行ったところ、良好な評価を得た。3) 手足口病の外部精度管理調査案として、CODEHOP PCRによる遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。細菌性赤痢の原因菌である赤痢菌の検査についても検査法の精度と実施体制を確認する手順書等を作成した。可能ならば、次年度以降に作業班を設けて実施したい。4) WHOによる実験室評価指標と比較すると、外部精度管理調査は検査施設内の質の改善には有効な指標であるが、検体採取から検査、報告までの一連のフローの中で、信頼性を保証する必要がある。そのための評価の指標を今後、開発していくことが必要である。5) これまでの検討結果から外部精度管理調査の実施に当たっては、内部精度管理調査支援とトラブルシューティング研修を一体化させて実施すること、外部精度管理調査を継続的に実施可能な予算や人員のある組織が必要で、運営組織には地全協と感染研や厚労省が、実施組織には感染研を中心とすることが望ましいとの結論を得た。すなわち感染研に事務局といったものを設置するのが適当である。また検査の経験ある地衛研職員の積極的参加が必須である。以上から、定期的継続的な外部精度管理調査の実施が地衛研の微生物検査の技術水準の維持や感染症検査の質確保および地衛研担当者の人材育成に役立つと考えられ、ひいては国や自治体の感染症発生動向調査や健康危機管理対応に役立てられるので事業化を強く要望したい。

研究組織

研究代表者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究分担者 岡野素彦（北海道立衛生研究所）、岸本壽男（岡山県環境保健センター）、猿木信裕（群馬県衛生環境研究所）、調 恒明（山口県環境保健センター）、山本容正（大阪府公衆衛生研究所）、倉根一郎、宮崎義継、大石和徳、木村博一（国立感染症研究所）

研究協力者 香月 進（福岡県保健環境研究所）、水野哲宏（横浜市衛生研究所）、田原なるみ（東京都健康安全研究センター）、佐野一雄（名古屋市衛生研究所）ほか別紙記載。

A. 研究目的

地方衛生研究所（以下地衛研）の微生物検査の技術水準を維持するために、外部精度管理の手法を導入し、全国的な仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会（以下地全協）として継続的に実施することの妥当性評価を目的とする。

地衛研の予算・定員は年々削減されており、検査精度の維持が困難となっている。地方分権の推進に伴い、自治体の認識の差により、各地衛研間の技術力にも格差が生じている。平均水準の低下と格差の拡大により、一部地衛研では必要最低限レベルの確保も難しい。一方、健康危機管理体制として、病原体検出技術の維持は不可欠であるが、食品以外、地衛研全体における感染症検査に関する精度管理の仕組みは存在しない。また、微生物検査の分野では、分子生物学的手法の導入により、検査技術は高度化し、検査機器も日進月歩で、レベルを維持することは容易ではない。これらの課題の解決を各地衛研任せにせず、全国規模で実行しなければ、地域によっては修復不能な技術の低下等を招く危険性がある。緊急事態への危機管理対応として、知事等による自治体間の協定があるが、制度化された検査の広域連携はない。地衛研の検査水準を確保するためには外部精度管理が必要であるものの、各自治体が独自に実施することは困難で、また、国が直接に指示し実施することにも問題がある。そこで、地全協が主体となって、地衛研の臨床検体に係る微生物検査の外部精度管理を統一的に全国で実施する体制を整え、専門的評価として行うことは有効であると考えらる。

本研究は病原体検査水準の維持と向上を図るために、地全協が主体となって国立感染症研究所（以下感染研）と連携して、外部精度管理のシステムを構築し、継続的に実施しうる事業化

が可能となるような研究を行い、健康危機管理体制や感染症発生動向調査の整備や地衛研の人材育成に役立てられるよう立案し提言に結び付けたい。

B. 研究方法

本年度は、体制小班、ウイルス小班、細菌小班、および必要に応じてさらに作業班を設けて検討した。作業班の検討事項はそれぞれの小班に照会し意見を求めて完成させ、班会議で議論した。本年度は下記の5点について検討した。1) ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査では、ノロウイルスのPCR産物を試料としたシーケンスと樹状解析をテーマとし、近年実施されることの多い検査技術とした。また、三類感染症のコレラについては、コレラ菌の生菌を参加地衛研に配付し同定検査を行った。2) 外部精度管理調査後の関連研修として、職場でのOJT (On the Job Training) を模した小グループミーティング形式を試みた。昨年実施したりアルタイムPCRの外部精度管理調査後、うまく結果を出せた機関とうまく結果を出せなかった機関のいくつかに参加を要請し10機関の参加を得て、二つの小グループに分かれて発表と討論を行い、さらに検査のデモや講義も加えて実施した。各担当者のトラブルシューティングとともに、全体でトラブルシューティングのまとめを作成した。また研修期間中、およびその後もフォローアップ調査をおこなった。3) 手足口病の外部精度管理調査案は、CODEHOP PCRによる遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。細菌性赤痢の原因菌である赤痢菌の検査について地衛研を対象にアンケート調査を行い、検査法の精度と実施体制を確認する手順書等を作成した。4) 感染症発生動向調査における病原体検査の信頼性確保の取り組みについて、世界保健機構(WHO)による実験室評価指標と比較し、応用可

能性について考察した。5) これまでに得られたデータと資料から外部精度管理調査の実施に当たっては、体制小班のみならず、研究班に参加している方々にアンケート調査を実施し、案を煮詰めた。その後、研究班会議等で提示しさらに意見を求めて案を作成した。

(倫理面の配慮)

個人情報を取り扱わない。

C. 研究結果

1. ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査

1) ウイルスのシークエンスと樹状解析外部精度管理調査 (木村分担報告書 1 参照)

地衛研におけるウイルス検査の精度管理を試行的に行うため、ノロウイルス(NoV)の模擬検体を用いたシークエンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理調査を行った。特にシークエンス解析および分子系統樹解析は、種々のウイルスの詳細な遺伝学的特性を把握するうえで極めて重要で、分子疫学解析として日常的に実施されている。模擬検体には、GII.4 の PCR 産物を用いた。また、各機関における測定機器、測定条件および試薬管理状況などに関する詳細なアンケート調査も行った。本研究においては、塩基配列リードミスの有無、解析長、プライマー配列の有無、塩基配列相同性解析結果、アミノ酸配列相同性解析結果、系統樹上の解析株の位置、系統樹解析法の精度、遺伝子型の精度、計 8 項目を各 1 点とし、合計 8 点で判定を行った。本研究参加機関 62 機関の平均は 7.0 点 (最高 8 点、最低 3 点) であった。全項目とも適切 (8 点) であった機関は 30 機関 (48.3%) であった。事後アンケートは 50 機関 (80.6%) から回収できた。シークエンス解析機器は、45 機関 (90.0%) が Applied Biosystems 社製で、シークエンス反応試薬は全機関がメーカー純正品を使用していた。約半数の機関は試薬使用期限内で使用していると思われたが、残りの機関は、使用期限外の試薬も使用していた。さらに、シークエンスのマニュアルを 29 機関が「理解している」と答えたのに対し、19 機関が「読んだ事はない」、「理解していない」と解答した。今後、

改正感染症法が施行されたのちに、内部精度管理調査の実施状況については是非比較してみたい。さらに本研究を発展させ、地研におけるウイルス検査精度の確保・改善に資する詳細な検討と技術支援を行う必要がある。

2) 細菌のコレラ菌外部精度管理調査 (a)森本分担報告書 5 および b) 勢戸分担報告書 6 参照)

a) 試料発送から検査実施までの温度変化における検査結果への影響について (森本分担報告書 5)

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

b) 全国の地方衛生研究所を対象にしたコレ

ラ菌検査の外部精度管理調査（勢戸分担報告書 6 参照）

地衛研で実施する細菌検査の信頼性確保のため、外部精度管理調査を実施し、検査能力の実態を把握するとともに、継続的な実施に必要な手順や問題点を検証した。74 機関の参加を得た。多くの地衛研が三類感染症の検査を実施していた。また、「防疫対象となるコレラ菌の決定は地衛研における検査によって行う」（昭和 63 年 9 月 28 日健医発第 1133 号）と明記されていることから、実施項目を「三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定」とした。検査試料は感染研の保存株から、事前に 4 箇所の地衛研で性状を確認した上で 3 株（試料 1: *Vibrio cholerae* O1 稲葉型 コレラ毒素 (CT) 陽性、試料 2: *V. cholerae* O1 小川型 CT 陰性、試料 3: *V. cholerae* O139 CT 陽性）を選び、感染研から発送した。検査報告書の集計の結果、正答は試料 1: 72 施設、試料 2: 66 施設、試料 3: 74 施設で、試料 2 では正しい同定結果（O1 抗原陽性、CT または CT 遺伝子陰性）であったが「コレラ菌陽性」と判定した施設が 7 施設あった。検査経過記録書や事後アンケートから、全体として地衛研では概ね適切にコレラ菌検査が実施されていた。特に、届出基準のひとつである CT 産生あるいは CT 遺伝子の確認については、74 施設で一致した結果が得られていた。試料 1 および 2 では O1 抗原陰性と判定した機関が 3 箇所あり、原因については、使用した免疫血清やラテックスの劣化、凝集反応に供した菌株が不適切（ラフ型）等の要因が考えられた。血清凝集反応で判定不能の場合、特に CT 産生あるいは CT 遺伝子陽性の場合、PCR 法による O1 抗原あるいは O139 抗原の確認を実施すべきであると考えられた。大規模な外部精度管理調査を実施するにあたって、配付株の選定には検体の保存条件を考慮する必要がある。また、検査経過記録書やアンケート等については、多様な回答を想定し記入しやすい様式を作成することが課題である。参加施設から提出される各種文書のとりまとめには、集計に至るまでの事務作業に相当の時間が必要であり、未記入や記載ミスと考えられる回答を提出元に確認するなど、実施結果の集計や解析には専従の担当者を

おくことが望ましい。

2. 研修

1) ウイルス外部精度管理調査後のトラブルシューティング研修（小淵分担報告書 2 参照）

昨年度のノロウイルスリアルタイム PCR に関する外部精度管理調査をフォローし、検査の質確保および人材育成につなげるための研修を実施した。昨年度の調査より判定基準値をもとに参加機関を 3 群に分け、各群から代表を選んで 10 機関を研修の対象とした。平成 27 年 9 月 10、11 日のおよそ 1 日半の日程で、On the Job Training (OJT) を模したトラブルシューティング研修を行った。参加者 5 名とファシリテーター 1 名からなる計 2 グループに分け、グループミーティング形式で各トラブルシューティングを行い、次いで全体討論により全体のトラブルシューティング集をまとめた。具体的な方法や準備等は分担報告書を参照してほしい。さらに、ラボ実習と講義により、各自トラブルシューティングを完成させ、さらに全体をまとめてトラブルシューティング集を作成した。研修後、参加者にアンケートならびにトラブルシューティング集を送付し、職場での復命や研修の効果についてのフォローアップ調査も行った。その結果、職場での技術向上につながったことが確認できた。今回の研修を通して、職場で OJT による検査技術の伝達は行われているものの、十分な知識と経験がある中堅職員が少ないことが部署内でトラブルシューティングできないことの一因であることが明らかになった。一方で、今回の研修やアンケート等を通して検査の質を確保するためには、新規職員の教育研修が重要であることがわかった。

2) 平成 26 年度に実施したサルモネラ外部精度管理調査について（森本分担報告書 4 参照）

平成 26 年度の外部精度管理調査（試料：2 種類のサルモネラ属菌を添加した模擬便）結果について、総括・分担研究報告書（平成 26 年度）及び北海道立衛生研究所における結果より推察された事象を基に問題点等を検証した。外部精度管理実施機関側の検証を行った結果では、配付試料の妥当性評価が困難だった。また、参加機関側の検

証では、試料の妥当性評価ができなかったため、最終的に問題点の絞り込みができなかった。このことから、今回の調査に関しては、事後研修を実施せず、国立保健医療科学院などの座学と実習を伴った通常行われる研修会において、検査意識とともに精度管理の向上につながるような、機会を持つことが望ましいと思われた。外部精度管理調査実施機関側は、参加機関に求める結果を想定し、そのことを達成するための安定した配付試料を作製することが不可欠である。また、参加機関側は自ら、内部精度管理ができるシステムを導入し、日常検査における精度の担保や外部精度管理の結果が思わしくなかった場合に迅速かつ適切な検証ができるよう体制を整える必要がある。全国的な公的外部精度管理調査を継続的に行うためには、施設、人員、予算などを確保し、安定した実施母体を構築する必要があると思われた。

3. 手足口病と細菌性赤痢についての外部精度管理調査のたたき台案の作成

1) 手足口病（山下分担報告書3参照）

5類定点把握対象疾患である手足口病は、毎年流行するウイルスの血清型が異なり、それらを把握することは重要である。手足口病病原体の対象ウイルスはエンテロウイルス(A、B、CおよびD)で、検査方法はRD、Vero、HeLa細胞等を用いて分離培養し中和法で同定するが、抗血清の入手が困難な場合は、遺伝子を検出しPCR産物の塩基配列により型別する場合がある。今回、手足口病病原体の外部精度管理案としてCODEHOP PCRによる遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。分離株から抽出したRNAを送付して行うことを目的として輸送方法の違いによる温度の影響を調べ、問題なく実施されることを確認した。BLAST検索以外の解析法としてNJ法による系統樹作成のためのデータベースを作成した。エンテロウイルスの同定はウイルス分離と中和反応によることが基本である。生きたウイルスの輸送方法の問題を解決する必要があるが、中和反応による血清型別は精度管理が必要な項目と考える。また、分離ウイルスを用いた各施設の細胞感受性評価も今後必要で

ある。

2) 細菌性赤痢（磯部分担報告書7参照）

細菌性赤痢を外部精度管理調査の対象とした理由は、細菌性赤痢は三類感染症であり、感染者が食品関連業務に従事している場合は就業制限がかかるなど、検査結果の影響は大きい。しかしながら、原因菌である赤痢菌を同定するための感染症検査の基準はなく、また、類似菌だけでなく、血清型・菌種の同定が困難である事例もしばしば経験され、最終的な同定が地衛研に求められる状況にある。この問題は10年以上前から、地衛研の中でも指摘されているが、これまで解決していない。本年度（平成27年度）に赤痢菌検査に関する実態調査を、コレラ菌のアンケートとともに実施した。細菌性赤痢を対象として精度管理調査を行うための検討項目について意見を求め、まとめて検査実施手順書案を作成した。赤痢菌検査に関する現状調査結果から、およそ6割の地衛研で糞便検体を用いて検査が実施されていたが、その大部分の検査数は10検体以下であった。検査経験があったのは地衛研のおよそ半数であった。配付試料を模擬臨床検体ないし高層寒天培地で作成する、あるいは臨床検体からの分離同定では、他の菌や複数の血清型の菌を混在させること、型別が正しくできること、類似菌の選択が重要であること、鑑別上の問題、その他検証すべき課題が明らかとなった。試料としての菌株選定、調査項目等の検討を踏まえて、複数回にわけて実施することが望ましい。

4. 病原体検査の信頼性確保の取組み（吉田分担報告書8参照）

平成28年4月1日からの感染症法改正の施行に伴い、感染症発生動向調査における病原体検査の信頼性確保の取組みについて、世界保健機構(WHO)による実験室評価指標と比較し、応用可能性について考察した。指標としては、1) 報告までの日数、2) 年間検査数、3) 正確性、4) レファレンス体制、5) 精度管理（外部、内部）、6) 認定と査察、7) ウイルス分離率（認定条件外）、8) エンテロウイルス検査の施設間の比較の試み、があり、これらの項目について検討した。改正感

感染症法では感染症情報収集強化のため、サーベイランス体制と検査体制について、感染症発生動向調査実施要綱と病原体等検査の業務管理要領にて一定の基準が示されている。地方公共団体が行う病原体検査は独自の取り組みにより信頼性を保証してゆくことになり、外部精度管理調査は、検査施設内の質の改善には有効な指標である。他方、今般の法改正では病原体収集体制の見直しも含まれている。よって病原体サーベイランスとして捉えた場合、検査施設の改善のみでは不十分であり、検体採取から検査、報告までの一連のフローの中で、信頼性を保証する必要がある。そのため評価の指標を今後、開発していくことが必要である。

5. 外部精度管理調査の実施体制(佐多分担報告書9参照)

平成9年にまとめられた衛籐班の報告書がいまでも基本的に適切と考えられたので重要参考資料とした。ほか、昨年度に実施した「感染症検査の実態に関するアンケート調査」や外部精度管理調査実施後のデータを参考に検討案を作成し研究班で議論のうえ、調査を実施し検討した。前回の報告書はおそらく2期6年に亘って地全協と感染研や国衛研とともに、理化学や微生物検査の外部精度管理調査を検討し、平成9年3月にまとめられた。内容的には現在でも通用する部分が多い。ただし、その後、遺伝子検査が迅速検査として広く行われるようになったこと、病原体の運搬が規制されたこと、そして、この間に地衛研を取り巻く状況や地衛研自体の問題、たとえば予算や人員の削減、団塊世代の経験者の大量退職、2-3年間隔という短期間での人事異動等から、なかにはOJTの実施が困難となってきたことなどの変化がある。外部精度管理調査を行う場合は、内部精度管理調査支援と、検査担当者を対象とした調査後の研修、中でもトラブルシューティング研修までを一連の事業として、一体化させて実施することが望ましい。そして、外部精度管理調査を継続的にまた定期的にも実施可能な、予算や人員のある中心的な組織の存在が必要である。運営組織には地全協と感染研および厚労省が、実施組織には

感染研を中心とすることが望ましいという結論に至った。すなわち感染研に事務局といったものを設置することが適切である。地衛研における外部精度管理調査の実施は、発生動向調査等における感染症検査の質確保、そして地衛研の人材育成にも役立つこと、そして国の感染症対策に重要な事業と位置づけられるので、今後、さらに調査内容の詳細を経験豊富な地衛研職員の参加によって検討しつつ、最低年一回、継続的にかつ定期的に実施していくことが必要である。

なお、本年度の研究班評価会(H28.2.22)の抄録とパワーポイント配布資料を報告書に添付した。

D. 考察

地衛研全体を対象とする外部精度管理調査は、地衛研の検査技術維持向上に重要で、しかも人材育成にも関わるものであり、継続的に実施していくことが必要という根拠となるデータが得られた。運営組織には地衛研と感染研そして厚労省担当課、実施組織には感染研という結論は、期せずして平成9年の衛籐班の結果とほぼ同じ提言になる。とくに実施組織は、継続的に実施可能な組織、予算、人員があることが大前提で、これがないと機能しないのは現状をみても明かである。すなわち事務局機能が必要である。そして地衛研職員が豊富な検査経験をもとに自らの問題として積極的に企画、運営、調査に参加すること、そして感染研が組織としてどう対応するかにかかっている。種々の知恵を生かして実施し、継続していかなければいけない時期にきた。幸い厚労省には新年度から関連予算がつくようであるが、感染研と地衛研のネットワークを維持しさらに向上させ、感染症発生動向調査および健康危機管理に役立てられる対応を望みたい。なお、外部精度管理調査は全体に対して行うべきものであるが、企画や運営等の一部として地全協の支部の役割については今後の検討に委ねたい。

ウイルスの外部精度管理調査は、昨年リアルタイムPCR検査と本年度のシーケンスと樹状解析を対象とした。期せずして遺伝子検査技術が対象となった。現在では、種々のウイルス検査で分子

生物学的技術を用いた迅速検査を行うにあたり、これらは重要な基本技術となっている。トラブルシューティング研修で明らかになったのは、試薬の管理・使用法、反応液の混合・希釈といった調整、使用器具や機器に関する使い方等、基本的実験手技に関する知識と経験が不十分であることがさまざまなトラブルに関係していたことである。職場で若手担当者が多くなり、OJTを担う経験の豊富な中堅以降の職員が減少していることも一因と考えられた。今回のトラブルシューティング研修は6人と少数でしかも2グループで行われ、高い効果があったと評価したが、多人数の研修となると、予算、人員、準備等で、難しい点が多々あるろうかと思われた。従来の研修ではほとんどが座学で情報提供であるが、今回の細菌の調査ではあまりトラブルシューティング研修の必要性が低かったため、どのようにこの研修方法を利用するかを検討する必要がある。

細菌検査では分離・同定が正しくできることが重要である。ほぼ全地研対象に四種病原体の生菌を送付状に明記して配付し外部精度管理を実施することが可能となった。ただ数が多いと作業量も増え大変だったと聞いている。コレラ菌は地研が検査するものであること、および三類感染症としてのコレラ菌の定義を再認識できたことは意義がある。そして平成28年2月の希少感染症研修会で解説する機会を得て、今後の成果につながることを期待した。また今回のWGによる進め方および種々作成した書類等は今後の参考になる基礎資料ができたと考える。

手足口病や細菌性赤痢の外部精度管理調査のたたき台案は次年度以降の対応に役立つ。また、今回の外部精度管理調査に含めた内部精度管理支援調査からは、平成28年4月から実施される感染症検査の質保証の導入の事前調査結果となるとともに、現在も対応準備中といった状況が窺われた。それぞれの地衛研での検査手順書の書き方とも関連し検討が必要と思われる。また次年度も同じ内部精度管理支援調査が可能であれば、是非実施して新年度の対応状況を把握し対応支援につなげていきたい。

E. 結論

地衛研の感染症検査に係わる外部精度管理調査は、実際に有意義で重要であり、かつ地研の人材育成にも役立つが、これまで感染症検査にはその仕組みがない。地研の検査機能と質を維持向上させるためには、継続的に実施することが大事で、そのためには継続実施を可能とする運営および実施組織、予算、人員が必要不可欠である。感染症研に事務局を設置するのが適切である。外部精度管理調査の内容については基礎ができたが、今後さらに検討項目を議論しつつ調査案を検討していくこと、さらに病原体の分離同定をテーマとした調査が必要である。外部精度管理調査と内部精度管理支援調査そしてトラブルシューティング研修を一体となって実施することで、地衛研の抱える問題と感染症検査の課題について解決に近づけると考える。なお、「精度管理」は感染症検査の場合、適切とはいえないが便宜上使用した。

G. 研究発表

1) 論文発表

吉田弘, 伊藤俊之, 梅木和宣, 中嶋健介.
H26年5月に実施した病原体サーベイランス等に関する調査より-地方衛生研究所における検査実施体制について 病原体検出情報 36: 114-116, 2015

2) 学会発表

1. 佐多徹太郎 感染症法改正と病原体検査指針 ④検査の信頼性確保。衛生微生物技術協議会第36回研究会 (2015.7.24 仙台)
2. 勢戸和子 コレラ菌の検査と精度管理。希少感染症診断技術研修会 (2016.2.18 感染研)

H. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

研究課題：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

課題番号：H26-健危-一般-001

研究代表者：佐多徹太郎（富山県衛生研究所・所長）

要旨：地方衛生研究所全国協議会が主体となって外部「精度管理」のシステムを試験的に構築し、継続的に実施可能な事業を立案・提言することを目的とした。体制、ウイルス、細菌小班および各作業班で検討した。外部「精度管理」と内部「精度管理」調査そして研修の一体化実施と、継続的実施が可能となる運営や実施組織が必要である。外部「精度管理」を導入することで感染症検査の質確保および地研の抱える技術的問題の解決に効果的と考えられた。

1. 研究目的

地方衛生研究所の病原微生物検査の技術水準を維持し向上させるためには、外部「精度管理」の手法を導入することが必要と思われる。しかし、細菌及びウイルス検査において、食品以外の外部「精度管理」の仕組みはない。本研究は、地方衛生研究所全国協議会(地全協)が主体となって外部「精度管理」のシステムを試験的に構築し、継続的に実施可能な事業を立案し提言することが目的である。

2. 研究方法

研究分担者と、地研精度管理部会員、地研職員、感染研職員計 53 名に研究協力を依頼し、体制、ウイルス、細菌の小班に分かれて検討した。本年度は、さらにワーキンググループ(作業班、WG)を作り、試料作製、実施計画の立案と書類等の作成、輸送、結果集計、事前事後アンケート調査の作成および集計解析等の実務を担当した。

1) 体制小班では、外部「精度管理」の文言、外部「精度管理」と内部「精度管理」調査そして研修の一体化、外部「精度管理」調査の運営組織と実施組織、経費、実施時期、回数、研修の 7 点について意見照会し議論し、調査結果を加えてまとめた。

2) ウイルス小班では、シーケンスおよび分子系統樹解析を課題とした。試料はノロウイルスゲノム PCR 増幅産物とし、実施要領、実施手順書、測定結果記入ファイル、系統樹作成参照株データとともに参加 62 機関に配付した。事後アンケートは内部「精度管理」支援調査と事後調査を作成し回答を求めた。トラブルシューティング研修は、昨年のノロウイルスリアルタイム PCR の外部「精度管理」調査の結果から計 10 機関を選び、了解を得て対象とした。参加者 5 名とファシリテータ 1 名からなる計 6 名、2 グループに分けた。参加者には事前にパワーポイントの様式(所属の状況、外部「精度管理」調査提出結果、標準曲線図、受け取った評価、考えられる原因、新規配付標準物質を使用した結果)を配付した。各参加者は記載した資料をもとにグループミーティングで発表し、皆で問題点を抽出した。最後に一枚のトラブルシューティング集を作成した。翌日は、ラボでリアルタイム PCR の講義とデモを行った。毎日の研修終了後、1 ヶ月後、2 ヶ月後にもフォローアップアンケート調査を行った。また新人研修に関する調査について、班会議参加者を対象として行い、意見を集約した。

3) 細菌小班で、昨年度のサルモネラ属菌の検出同定に関する外部「精度管理」調査の結果をもとに検証した。コレラ菌調査は、コレラ菌 17 株をチェックし 3 株を試料とした。74 地研が参加した。試料発送は、感染研バイオセーフティ管理室と打ち合わせて準備し、参加地研から感染研に送られた温度記録計入りの輸送容器に感染研で試料を入れて参加施設へ送付した。調査実施案内、申込書、輸送容器および送付方法説明書、

検査手順書、検査結果報告書、検査経過記録書、感染症検査全般および内部「精度管理」支援調査を含むアンケート、温度記録報告書を作成送付した。結果を集計した後、事後アンケート調査も行った。

6) 今後の外部「精度管理」調査として、昨年度実施したアンケート調査結果から小班で検討した結果、手足口病と細菌性赤痢について検討するたたき台を作成した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体は取り扱わない。

3. 研究結果・考察

1) 体制小班：感染症検査の結果は定性的で、数字で表さない。また検査対象不明病原体の検査が頻繁に行われている等から、「精度」ではなく、外部「品質保証、信頼性評価、検査の質、ないし検査の質の優良性評価」といった表現がのぞましい。外部「精度管理」と内部「精度管理」調査そして研修の一体化については良い考えとされた。外部「精度管理」調査の運営組織と実施組織は、継続的に実施可能な組織で、予算と人員があることが前提で、運営組織は地全協と感染研（と厚労省）の合同委員会、実施組織には感染研という意見が多かった。

2) ウイルス小班シーケンス調査：シーケンス配列の読み違いやプライマー配列を外さずに系統解析が行われており、研修の必要性が考えられた。トラブルシューティング研修は、討論を通して問題点の気づきにつながり、参加者からは好評であった。参加者が多い場合の検討が必要である。またフォローアップ調査で、職場や関連部署でも内容が紹介され波及効果があった。一部では経験者が減り、基礎的な実験手技の継承や新規配属職員への研修も不十分と思われた。

3) 細菌小班：昨年度の外部「精度管理」調査は配付試料の妥当性評価が困難で、実施前の検討がより必要と考えられた。コレラ菌調査は、三種類のコレラ菌を配付して同定検査した結果、1問は72機関、2は66機関、3は74機関全部が正答で、おおむね良好な結果であった。生菌の発送や輸送配付手続きと実施、菌の定義の確認および作成した書類は今後の参考資料となる。

4) 今後の外部「精度管理」調査案：手足口病と細菌性赤痢のたたき台を作成し、意見照会した。今後、実施する機会が得られれば、さらに検討して、実施案をまとめ調査を行い評価したい。

6. 結論

地研の感染症検査に係わる外部「精度管理」調査は実際に有意義でかつ地研の人材育成にも役立った。地研の検査機能と質を維持向上させるためには、継続実施を可能とする運営および実施組織、予算、人員が必要不可欠である。外部「精度管理」調査の内容については今後さらに検討していくこと、さらに臨床検体からの病原体の分離同定をテーマとした調査が必要である。外部「精度管理」調査と内部「精度管理」支援調査そしてトラブルシューティング研修を一体となって実施することで、感染症検査の質確保と地研の抱える技術的問題解決に役立つと考える。

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)

1. 研究代表者: 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)
2. 研究分担者: (地全協精度管理部会、感染研レファレンス委員会等)

背景

- 地衛研の定員・予算の削減→技術低下による検査精度の維持困難
- 検査技術の高度化・機器の進歩→検査技術の維持困難
- 健康危機管理体制における病原微生物検査技術の維持向上は不可欠
- 感染症法に関連する感染症診断検査には精度管理の仕組みがない
- 地衛研の検査水準の確保、健康危機管理体制の維持、地衛研の人材育成に役立てる(さらに、感染症発生動向調査、地衛研-感染研のネットワークの維持にも役立てる)

研究目的

- 地方衛生研究所の微生物検査の技術水準を維持・向上させるために、外部精度管理の手法を導入し、全国的な仕組みを構築し、地衛研全国協議会が主体となって、継続的に実施することの体制整備・構築およびその妥当性評価を目的。

H26、27年度の研究成果の概要

1. 地衛研の感染症に関する精度管理の実態についてのアンケート調査
→全79地衛研から回答。現状の把握。
2. ウイルス小班とWGで外部精度管理等を実施(ウイルス24名)
→ノロウイルスのリアルタイムPCRで実施。59地衛研の参加。
→シーケンス・系統樹解析の調査実施、62地衛研参加。
→リアルタイムPCRのトラブルシューティング研修実施、10地衛研参加。
→手足口病の調査案の作成
3. 細菌小班とWGで外部精度管理等を実施(細菌17名)
→サルモネラ属菌分離同定について実施。11地衛研参加。
→コレラ菌の調査実施、74地衛研参加。
→赤痢菌の調査案の作成
4. 外部精度管理実施要綱(案)の作成から提言(体制13名)
→これまで地衛研で行ってきた研究資料を収集し、素案の作成を行った。
→研究班参加者に意見照会し概要をまとめた。
5. 参加者へのご意見照会(全53名)
→1)体制・調査等、2)新人教育研修、3)手足口病や細菌性赤痢調査検討項目

検 討 課 題 (20150401)

改変20160201

地衛研で行う検査技術およびその正確性を維持・向上させるためには、外部「精度管理」、内部「精度管理」支援、研修の3つを関連・一体化させた導入が役立ち、人材育成に役立てる。

- 1)外部「精度管理」は、第三者機関により他の地衛研との(検査レベルの)比較を目的とし、地衛研の検査の質評価(EQA)。
- 2)内部「精度管理」を支援し、個々の地衛研で検査結果の再現性を担保できるようにする。迅速検査が導入され必要性増加。
- 3)トラブルシューティング研修は、検査担当者の気づき、知識・技術の補完と問題解決能力を向上させ、検査能力を高め、人材育成に役立てる。

- いわゆるEQA(外部による質保証)には、a.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、あるいは特定の病原体の検査技術を評価で対応可)、b.ブラインドテスト(難しい)、c.検体提出による方法も可能。

3

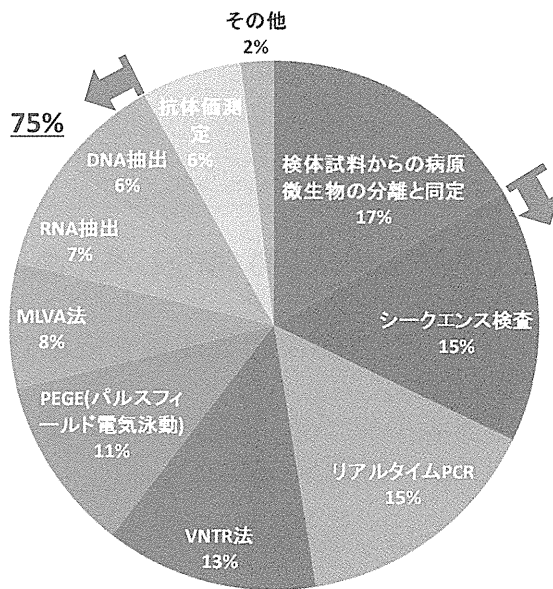
問6 地衛研が検査可能な(している)感染症対象疾患

地衛研のおよそ80%以上ができる感染症を「順に」下記にリスト、数字は2013年検査数
 * 一類、二類、指定感染症および鳥・季節性インフルエンザを除く

<p><ウイルス></p> <p>四 ウエストナイル熱 902</p> <p style="padding-left: 20px;">A型肝炎 157</p> <p style="padding-left: 20px;">重症熱性血小板減少症候群 54</p> <p style="padding-left: 20px;">デング熱 372</p> <p>五 後天性免疫不全症候群 18,532</p> <p style="padding-left: 20px;"><u>先天性風しん症候群</u> 169</p> <p style="padding-left: 20px;"><u>風しん</u> 3,766</p> <p style="padding-left: 20px;"><u>麻疹</u> 3,421</p> <p>五 RSウイルス感染症 2,107</p> <p>定 咽頭結膜熱 2,327</p> <p style="padding-left: 20px;">感染性胃腸炎 13,436</p> <p style="padding-left: 20px;">手足口病 3,401</p> <p style="padding-left: 20px;">ヘルパンギーナ 2,049</p> <p style="padding-left: 20px;">流行性耳下腺炎 264</p> <p style="padding-left: 20px;">急性出血性結膜炎 116</p> <p style="padding-left: 20px;">流行性角結膜炎 595</p> <p style="padding-left: 20px;">感染性胃腸炎(病原体がロタウイルスであるものに限る) 1,148</p> <p style="padding-left: 20px;">無菌性髄膜炎 1,976</p>	<p><細菌></p> <p>三 コレラ 351</p> <p style="padding-left: 20px;">細菌性赤痢 1,045</p> <p style="padding-left: 20px;">腸管出血性大腸菌感染症 9,983</p> <p style="padding-left: 20px;">腸チフス 800</p> <p style="padding-left: 20px;">パラチフス 692</p> <p>四 <u>レジオネラ症</u> 806</p> <p>五 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎 990</p> <p><リケッチャ></p> <p style="padding-left: 20px;">つつが虫 211</p> <p style="padding-left: 20px;">日本紅斑熱 211</p>
--	--

4

問8 外部精度管理が必要と思われる検査の方法・技術



(その他)
IS-printing System,
コンベンショナルPCR,
LAMP,
電子顕微鏡検査,
結核:QFT検査,
薬剤感受性試験,
遺伝子抽出からPCRまでをトータルで

迅速検査の導入

1)ゲノムないし分子生物学的検査手技(75%)、2)病原体の分離同定(17%)、
そして3) 抗体価測定(6%)の3つがあげられた
→分子生物学的技術は、技能試験(PT)としても重要

5

ウイルス小班(20150520) アンケートの回答結果および小班会議結果まとめ

- 対象感染症について(ウイルス)
→(3位以内の集計)デング熱7, 手足口病5, 無菌性髄膜炎4、感染性胃腸炎3
- 検査技術(ウイルス)
→ シーケンスと樹状解析 4、リアルタイムPCR 4

細菌小班(20150529) アンケートの回答結果および小班会議結果まとめ

- 対象感染症について(細菌)
→1)細菌性赤痢7、2)EHEC6、3)コレラ4、4)チフス3
- 検査技術(細菌)
→1)疫学的解析法(IS-printing, MLVAなど)6
2)リアルタイムPCR5 3)シーケンスと樹状解析5 4)分離3、ほか

6

H27年度のシーケンス・系統樹解析精度管理調査

1) 材料・方法:

・NoVPCR産物(300bps程度)

1) 材料の塩基配列解析(シーケンス解析)

2) 近隣結合法(NJ法)による系統樹解析

精度管理調査内容:

1) 塩基配列解析の精密度

2) 塩基配列解析長

3) 解析試料の系統樹上の位置

4) 標準株との塩基配列相同性

2. 相同性検索

・適切な塩基配列株を選択: 47/62施設 (76%)

・適切なアミノ酸配列株を選択: 43/62施設(69%)

3. 適切な系統樹解析: 59/62施設 (95%)

4. 適切なgenotyping(GII.4): 62/62施設(100%)

2) 参加機関: 62機関

3) 解析結果

1. シーケンス解析

・適切なシーケンス解析: 47/62施設(76%)

・ミスリード: 5施設 (1~8塩基)

・含プライマー配列: 14施設

・320bp以下: 4施設

・Reverse配列送付: 1施設→再提出:30bp短, 含プライマー配列

4) シーケンス解析ミスと対処法

1. 機器: シーケンサーの不良(レーザーの出力低下、光軸のズレなど)

→ 機器のメンテナンス

2. 試薬: 反応試薬・精製試薬の劣化

→ 陽性コントロールによる確認、使用期限確認、保存状態確認

3. 手技: 手技的不良による反応性の低下

→ 手技の統一・習熟、結果見直し、再検査

平成27年度コレラ菌の外部精度管理調査

調査目的

- ・ 三類感染症であるコレラの原因となるコレラ菌の同定 (患者または無症状病原体保有者の決定は地衛研の検査による) (性状と血清型、毒素産生性、届出基準が正答できるか)
- ・ 生きた菌株を用いた精度管理体制構築(発送、輸送、温度管理等)、
- ・ 菌株の安定性の確認と課題解決(菌株選択)

結果の要約

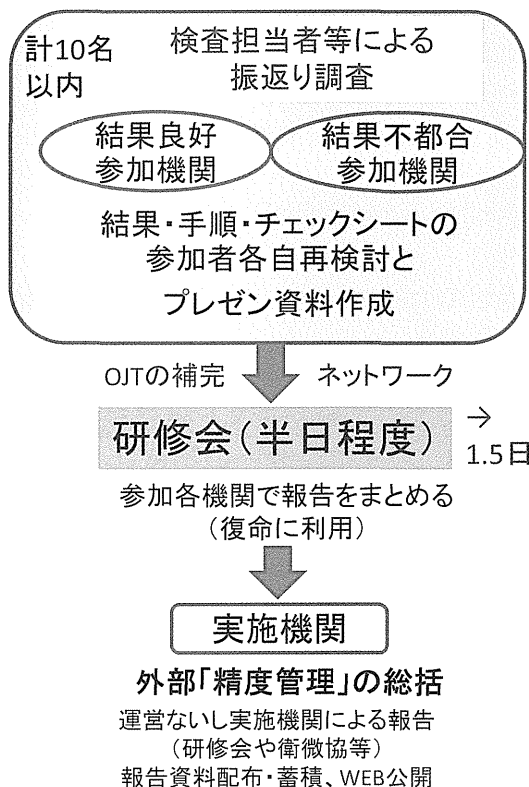
結果提出機関	74/74(100%)		
送付試料の状態	良好72	一部不良2	
温度記録	データ提出 53	機器入忘れ 1	記録なし 20
検査結果	試料1	試料2	試料3
陽性回答	72	7	74
陰性回答	2	66(1*回答根拠誤)	

課題

菌株	<ul style="list-style-type: none"> ・生きた菌株での外部精度管理の課題が明らか ・発送する菌株を決定するために時間を要する ・Vibrio属である問題(表現形の変異)
回答シート	回答欄の選択肢の一部不備。自由記載欄設定不足等

平成27年度 外部精度管理調査実施後研修(ウイルス検査)

➤ これまでの研修等は、座学 or 座学と実習



目的

昨年度の外部精度管理調査(ノロウイルスリアルタイムPCR法)をフォローし、検査の質確保および人材育成につなげる。

実施内容(1グループ6名の少人数)

- ・OJTを模したグループミーティング形式でリアルタイムPCR法のトラブルシューティングを行う
- ・実習・講義や全体討論を通して問題への気づきや問題解決方法に対する理解を深める
- ・研修後、トラブルシューティング集と研修担当者のコメントを追加したワークシートを送付し、参加者は職場で研修が問題解決に役立ったか後日回答(フォローアップ調査)

参加機関

昨年度の外部精度管理参加機関から、下記の各群より選出した代表10機関

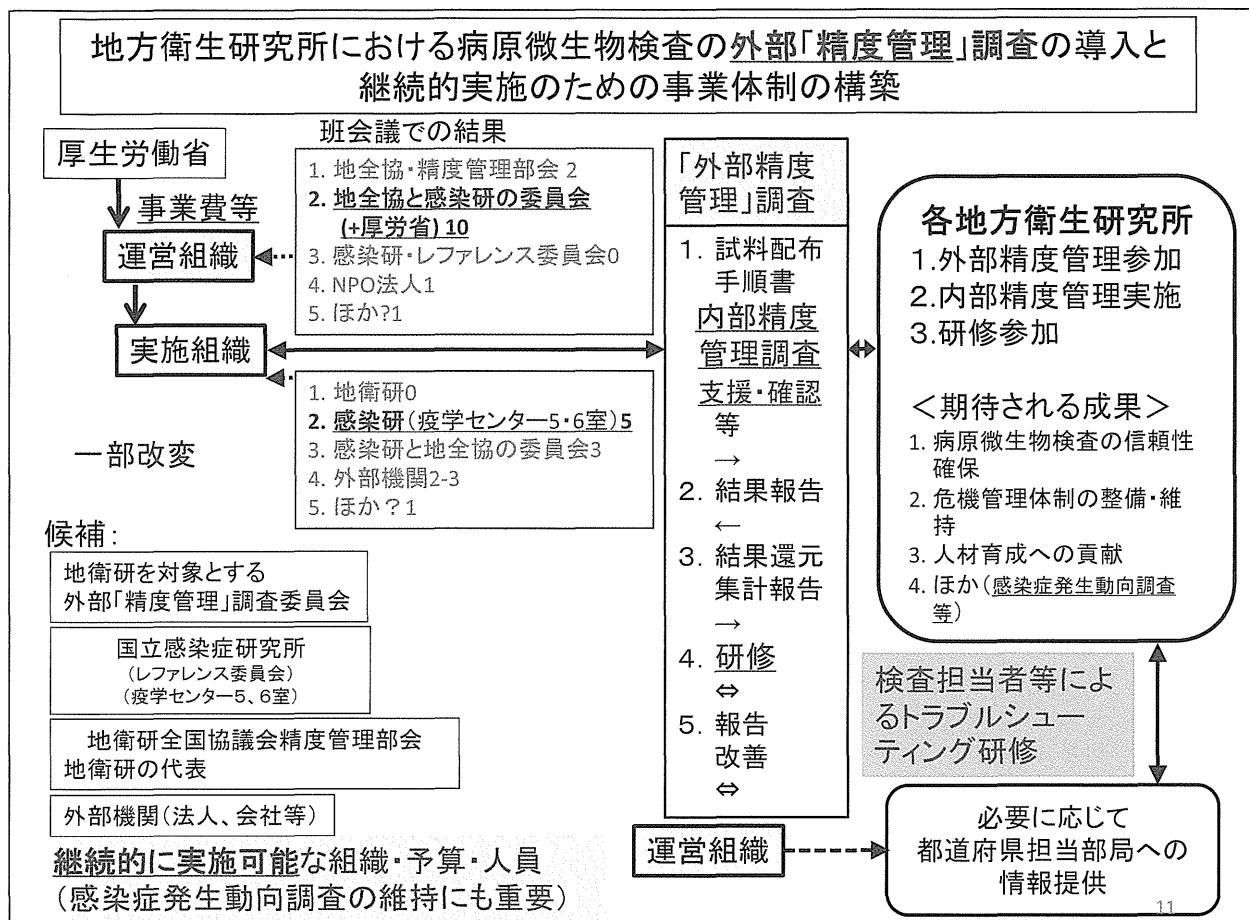
- A: 3つ全ての測定値がべき乗変換後1SD範囲外の機関(10機関)→4機関
- B: 1つの測定値のみがべき乗変換後1SD範囲外の機関(8機関)→4機関
- C: 3つ全ての測定値がべき乗変換後1SD範囲内の機関(38機関)→2機関

9

今回のリアルタイムPCR法のトラブルシューティング集

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
●陰性コントロールのウェルが陽性になる	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質のコンタミネーションによるピペッター、チューブ類の汚染 ◆標準物質のコンタミネーションによる試薬類の汚染 	<ul style="list-style-type: none"> ■ピペッター、チューブ類、試薬類の交換(汚染物質の除去) ■実験室レイアウトや動線の見直し(試薬調製と標準物質の添加を別室で行うなど汚染物質を持ち込まない) ■作業工程の見直し(反応液→検体サンプル→標準物質の順で調製) ■作業工程ごとに専用のピペッター、チューブ類を使用 ■同一安全キャビネット内で全操作を行う場合は十分なUV照射 ■オートクレーブの使い分け(試薬調製用と汚物用) ■標準物質や検体由来核酸の分取・分注時は安全キャビネットのファンを止める(エアロゾル発生防止)
●低濃度(10コピーや10 ² コピーDNA)の標準物質が検出不能	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペッター操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペッター操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の水冷
●標準曲線の傾きが急(各希釈のCt値の間隔が3.3以上)	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペッター操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペッター操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の水冷
●標準物質のCt値が低め、あるいは高め(濃度が理論値とは異なる)	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆試薬類の管理が不適切(反応試薬、プライマー&プローブ) ◆不適切なピペッター操作による希釈の誤差 ◆濃度計算ミス 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質、試薬類の管理の見直し(保管温度、使用期限、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペッター操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈の各段階でチップを交換(キャリーオーバー防止) ■作業記録をつける(ダブルチェック)
●標準物質間(GIとGII)でCt値に差	<ul style="list-style-type: none"> ◆プライマー・プローブの劣化 ◆プライマー・プローブプレミックスの劣化 	<ul style="list-style-type: none"> ■新たに合成したプライマー・プローブの使用 ■試薬の使用期限を順守
●標準物質の測定値がばらつく(相関係数R ² が0.990以下)	<ul style="list-style-type: none"> ◆不適切なピペッター操作による試料添加量の誤差 ◆標準物質不適切な希釈操作 ◆測定機器の温度ブロックの汚染 ◆測定機器の不具合 	<ul style="list-style-type: none"> ■ピペッター操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈系列の調製時に液の攪拌とスピンドダウンを確実に実施(ピペッティングはしない) ■測定機器の温度ブロックの清掃 ■測定機器の定期点検の実施

10



平成26、27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)

まとめと結論

1. 地方衛生研究所全国協議会が主体となって、感染症検査の外部「精度」管理のシステムを試験的に構築し、継続的に実施可能な事業を立案し提言を目的。
2. 地研の「精度管理」実態調査、および、リアルタイムPCR、シーケンス解析、サルモネラ属菌やコレラ菌の同定をテーマにした外部「精度」管理調査、リアルタイムPCRのトラブルシューティング研修等を、多くの地研や感染研の研究協力者を得て、企画・実施し、関連書類等を作成。
3. 感染症検査の外部「精度」管理は調査は質の保証に有意義で、さらに地研の人材育成にも役立てられる。
4. 外部「精度」管理・内部「精度」管理・研修を一体化して実施することが効果的。
5. 外部「精度」管理を継続的に実施するには、恒常的な運営組織や実施組織・予算・人員が必要不可欠で、案を提示。
6. 臨床検体からの病原体の分離同定をテーマとした調査等が必要。

Ⅱ. 分担研究報告書

1. 精度管理に関する技術的支援

—シーケンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理調査—

研究分担者	木村 博一、大石 和徳	国立感染症研究所
研究協力者	塚越 博之、小林 美保	群馬県衛生環境研究所
	貞升 健志	東京都健康安全研究センター
	小渕 正次	富山県衛生研究所
	皆川 洋子	愛知県衛生研究所
	松島 勇紀、清水 英明	川崎市健康福祉局健康安全研究所
	勝見 正道	仙台市衛生研究所
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	藤井理津志、岸本 寿男	岡山県環境保健センター
	濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
	宮崎 義継、駒瀬 勝啓、影山 努、野田 雅博、長澤 耕男	国立感染症研究所

研究要旨 地方衛生研究所（地研）におけるウイルス検査の精度管理を試行的に行うため、ノロウイルス(NoV)の模擬検体を用いたシーケンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理を行った。模擬検体には、GII.4 の PCR 産物を用いた。また、各機関における測定機器、測定条件および試薬管理状況などに関する詳細なアンケート調査も行った。本研究においては、塩基配列リードミスの有無、解析長、プライマー配列の有無、塩基配列相同性解析結果、アミノ酸配列相同性解析結果、系統樹上の解析株の位置、系統樹解析法の精度、遺伝子型の精度、計 8 項目を各 1 点とし、合計 8 点で判定を行った。本研究参加機関 62 機関の平均は 7.0 点（最高 8 点、最低 3 点）であった。全項目とも適切（8 点）であった機関は 30 機関（48.3%）であった。今後、さらに本研究を発展させ、地研におけるウイルス検査精度の確保・改善に資する詳細な検討と技術支援を行う必要がある。

A. 研究目的

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

近年、病原微生物の検出・同定検査には遺伝子学的手法が幅広く取り入れられている。その中でも、特にシーケンス解析および分子系統樹解析は、種々のウイルスの詳細な遺伝学的特性を把握するうえで極めて重要である。また、これらの解析データは、ノロウイルス、インフルエンザウイルスおよび麻疹ウイルスなど分子疫学解析として日常的に実施

されている。

いうまでもなく、これらの検査診断における外部精度管理は、各機関における検査精度の確保・向上のためだけでなく、地研全体での検査水準の確認および確保のためにも必要であると思われる。しかしながら、地研において、継続的かつ実務的な外部精度管理は、ほとんど行われていないのが実情であると思われる。このような背景から、地研におけるウイルス検査診断に関する外部精度管理の一環および地方衛生研究所全国協議会として外部精度管理を行う場合の課題を抽出する目的でノロウイルス遺伝子シーケンス解析および分子系統樹解析に関する外部精度管理を行った。

B. 研究方法

地方衛生研究所全国協議会加盟機関（80 機関）を対象として、NoV ウイルスシークエンスおよび分子系統樹検査解析に関する精度管理を実施した。参加の形態は任意とし、本研究の参加案内は、地全協のメーリングリストを用いた。まず、精度管理を行うにあたり、当該研究班による外部精度管理実施要領と外部精度管理実施手順を作成した（別添資料 2 および 3）。また、測定時の詳細なデータ記入ファイル（別添資料 4）およびアンケート（別添資料 5）も作成した。

次に、模擬検体試料として、GIL4 の PCR 産物を作成した。同 PCR 産物をアガロースゲル電気泳動後、単一のバンドを切り出し精製し、100 倍希釈したものを今回の解析用試料として配布した。また、系統樹作成用参照株のデータセットも併せて配布した。COG2F および G2-SKR をプライマーとして用い、試料を常法による PCR 増幅、シークエンスを施行し、その塩基配列、相同性解析結果、近隣結合法で作成した系統樹、模擬検体試料の遺伝子型をデータとして回収した。

得られたデータを以下の 8 項目（1-a: ミスリードの有無、1-b: 解析長、1-c: プライマー配列の有無、2-a: 塩基配列相同性解析結果、2-b: アミノ酸配列相同性解析結果、3-a: 系統樹上の解析株の位置、3-b: 系統樹解析法の制度、4: 解析株の遺伝子型の精度）を各 1 点、合計 8 点として判定を行った。さらに、各試薬の管理状況や機器定期点検の実情などに関する詳細なアンケート調査も実施した。

C. 研究結果

参加希望機関は 62 機関であり、その全機関が本研究に参加した。参加機関の所属自治体の内訳は、都道府県 41 機関、政令指定都市 15 機関、中核市 6 機関であった。

送付データを解析した結果、解析全参加機関の平均点は 7.0 点であった。所属自治体毎では都道府県 7.2 点、政令指定都市 7.1 点、中核都市 5.8 点であった（図 1）。全項目適切（8 点）であった機関は 30 機関（都道府県: 23、政令指定都市: 7）であり、最低点は 3 点の 2 機関（都道府県: 1、政令指定都市: 1）であった。また、ブロック別の比較では、全 6 ブロック中平均 7 点以上のブロックが 4 ブロックある一方で、5 点台のブロックも認めた（最高 7.6 点、最低

5.6 点）。

シークエンス解析では、47 機関（75.8%）が適切に解読できていた一方で、リードミス 5 機関（8.1%）、解析・送付した塩基配列にプライマー配列を含んでいた機関が 14 機関（22.6%）、解析長が不十分と思われる機関が 4 機関（6.5%）あった（表 1）。

BLAST による相同性解析では、塩基配列解析においては 47 機関（75.8%）、アミノ酸配列においては 43 機関（69.4%）が適切であった。近隣結合法による系統樹作成は概ね適切であった（59/62 機関、95.2%）。試料株の遺伝子型（GIL4）は全機関とも適切であった。今回の解析において、試料株の遺伝子型の推定は、BLAST 検索単独、系統樹解析単独、あるいは BLAST+系統樹でも行える。BLAST 検索では、数十ベース程度のキャプシド遺伝子の塩基配列、たとえシークエンスデータに数塩基程度のリードミスが含まれていても遺伝子型の推定が可能であると思われる。よって、十分なシークエンスデータが得られなかった機関でも供試株の遺伝子型の推定が可能だったと思われる。

次に、本研究の参加機関 62 機関のうち、アンケートが回収できたのは 50 機関（80.6%）であった。まず、シークエンス解析機器は、45 機関（90.0%）が Applied Biosystems 社製であった（図 2）。シークエンス反応試薬は全機関がメーカー純正品を使用していた。また、約半数の機関は試薬使用期限内で使用していると思われたが、残りの機関は、使用期限外の試薬も使用していた（図 3-5）。さらに、シークエンスのマニュアルを 29 機関が「理解している」と答えたのに対し、19 機関が「読んだ事はない」「理解していない」と解答した。

D. 考察

本研究においては、NoV GIL4 株の PCR 産物を模擬検体として、シークエンス解析・分子系統樹解析（8 項目）に関する外部精度管理を実施した。その結果、8 項目とも適切に解析できたのは 30 機関（30/62 機関、48.3%）であった。

今回の精度管理に適用したノロウイルス遺伝子解析法は、地研において、既に確立されている方法であり¹⁾、ほとんどすべての地研において、行政検査のみならず、ノロウイルス感染症の分子疫学に関する調査研究にも用いられていると思われる。BLAST 検索と適切な参照株を用いた系統樹解析による NoV

遺伝子型推定は感染源調査などにおいて重要であることはいうまでもない。よって、適切な技術を基盤とし、かつ一定期間の経験を有する技術者であれば、今回の解析項目においては適切なデータが得られると思われる。その一方で、今回得られたデータにおいては、本解析データの中核である塩基配列のミスリードが5機関(8.1%)に見られた。解析時に得られた各塩基配列の蛍光曲線から、この原因の一つとして、PCR産物の精製が不十分であった可能性が高いと思われた。また、BLASTによる塩基配列解析とアミノ酸解析に矛盾がみられた機関も12機関(19.4%)あった。加えて、シーケンスデータのトリミングが不十分で、プライマーの塩基配列もBLAST解析や系統樹解析データとして含めた機関も14機関(22.6%)あった。これらのことを解決するためには、各機関において、本法における基本的技術および知識に関するon the job training(OJT)をさらに徹底していく必要があると思われた。

また、本研究にかかわるアンケートは、参加機関62機関中50機関(80.6%)から回収できた。45施設(90.0%)が、特定のシーケンサー(Applied Biosystems社製)を使用していた(図2)。また、全機関で測定機器メーカーが販売している試薬を使用しており、機関ごとで使用している試薬には差は認めなかった。半数の機関が期限内の試薬を使用しているものの、半数では期限外の試薬でも測定結果のばらつきがなければ使用すると解答した(図3-5)。予算の関係上、期限切れの試薬でも使用せざるを得ないとのコメントが多く、各機関が限られた予算内での検査を求められている実情が明らかになった。一方で、19機関がシーケンスのマニュアルを「読んだことがない」「理解していない」と解答しており、やはり基礎知識に関するOJTの徹底が必要と思われた。アライメントおよび系統樹解析は38施設(76%)がMEGAを使用していた。シーケンスおよび系統樹解析を実行可能な職員が複数名いる施設は48施設(96%)であった(図6)。1年に1回程度、7-9月にノロウイルスリアルタイムPCRの精度管理を希望する施設が多く(図7)、精度管理の業務量は適切と解答した施設は47施設(94%)であった(図8)。1年に1回程度、ノロウイルス流行開始前の7-9月ごろであれば、日常業務への負担を抑えながら、外部精度管理を継続していくことができるのではないかと考えられた。

地研における微生物検査は、予算・定員などの検査資源が年々削減されており、職員の技術水準と検査精度の維持が困難となっていると思われる。また、熟練技術者の退職時の際の技術の伝承も十分に行われていない可能性がある。さらに、地研の重要度に関する地方自治体の認識にも差があり、地方分権推進により、各地研間の人的資源・技術力に大きな格差が生じている可能性もある。したがって、今後もこのような状況が続けば、検査精度を十分に担保した行政検査が各自治体で行うことが困難になる可能性がある。今後、このような状態を改善するための取り組みとともに、地研における微生物検査の外部精度管理を継続的に実施できるような体制整備が極めて重要であると思われる。

F. 参考文献

1. ノロウイルスの検出法について、食安監発第1105001号。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
関連論文はなし
- 2) 学会発表
関連発表はなし

H. 知的財産の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

謝辞 本研究にご協力いただきました各衛生研究所に深謝します。

(機関数)

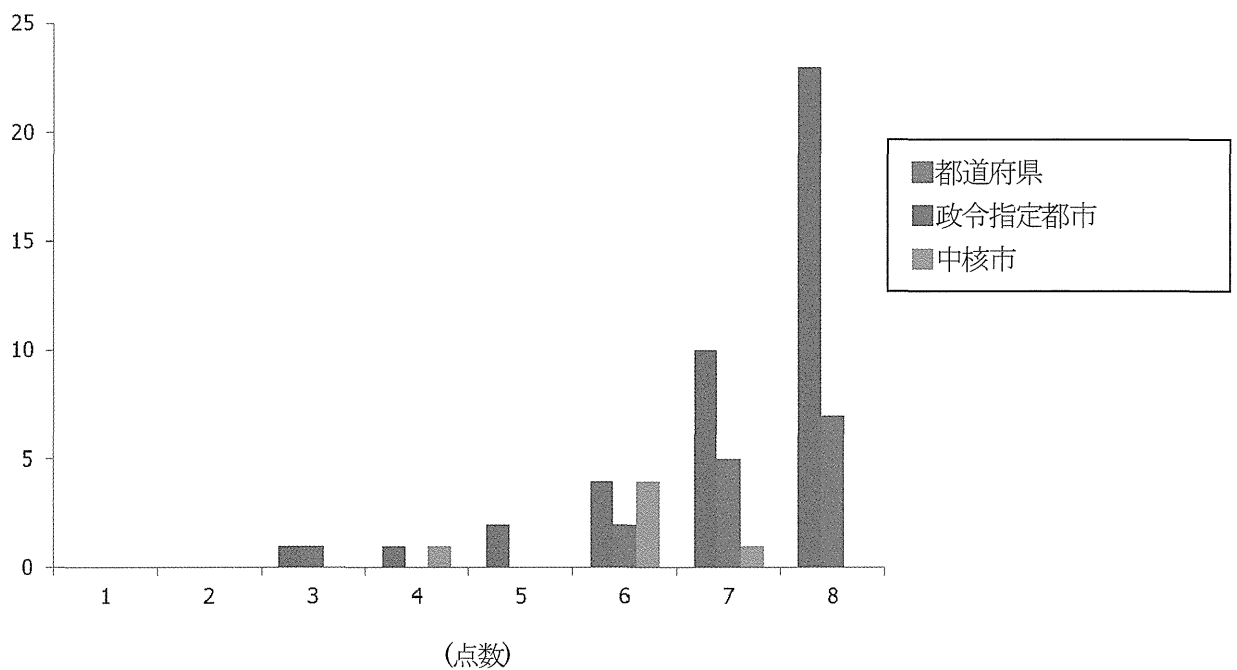


図1. 平成27年度ウイルス検査外部精度管理シーケンスおよび系統樹解析結果

表1. 項目別判定結果

	判定項目	適切	不適切
1-a	ミスリードの有無	57	5
1-b	解析長	58	4
1-c	プライマー配列の有無	48	14
2-a	塩基配列相同性検索	47	15
2-b	アミノ酸配列相同性検索	43	19
3-a	系統樹上の位置	60	2
3-b	系統樹の解析法	61	1
4	解析株の遺伝子型	62	0

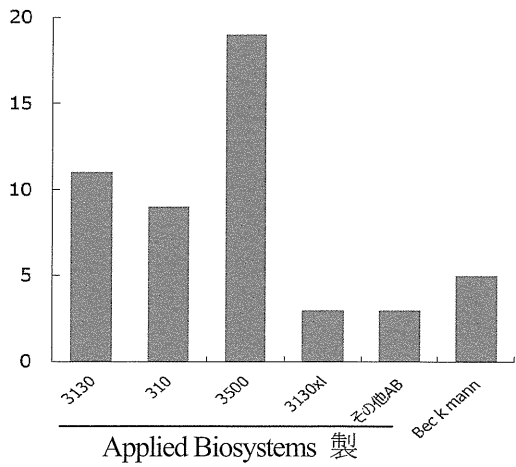


図2. 所持しているシーケンサー

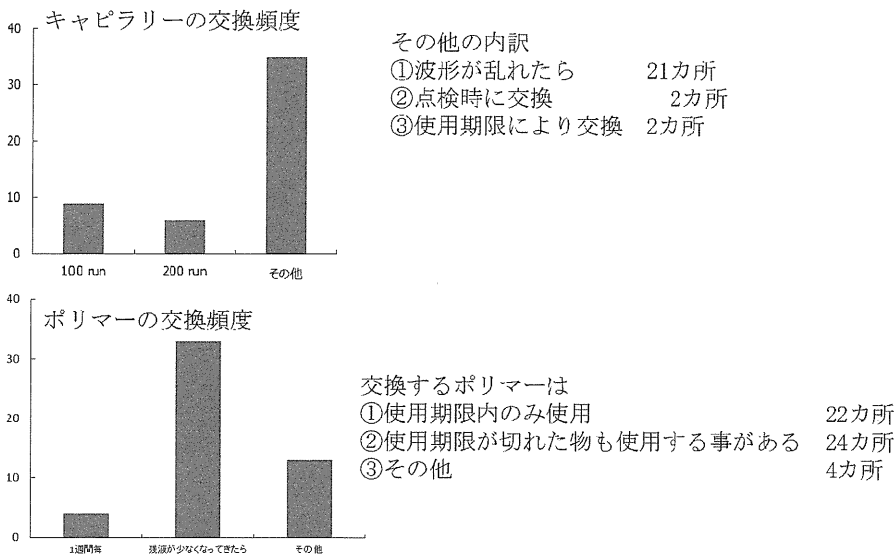
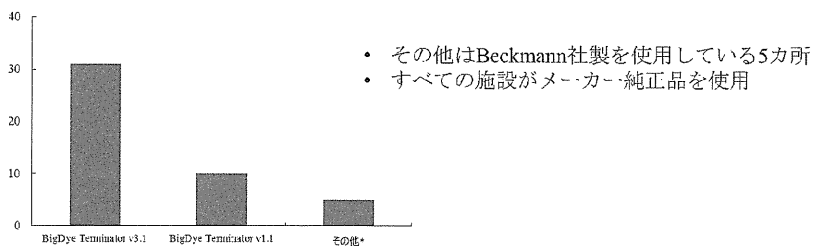


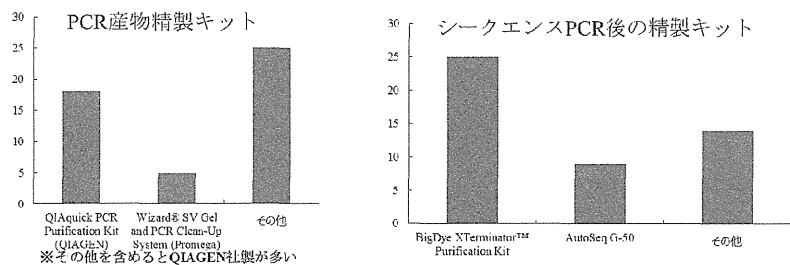
図3. シーケンサーに使用する試薬



試薬の使用法

試薬は分注しているか ①1回分毎に分注 2カ所 ②数回分毎に分注 31カ所 ③その他 7カ所	試薬の凍結融解の回数 ①1回のみ 3カ所 ②3回程度まで 14カ所 ③4-5回 2カ所 ④10回以下 1カ所 ⑤決まり無し 29カ所	試薬の使用期限 ①使用期限内のみ 21カ所 ②使用期限が切れも使用 21カ所 ③その他 8カ所
--	--	---

図4. シーケンス反応試薬



試薬の使用期限

- ①使用期限内のみ 20カ所
- ②使用期限が切れも使用 25カ所
- ③その他 5カ所

マニュアル

- ①読んだことがありほぼ理解している 40カ所
- ②読んだことはあるがあまり理解不十分 6カ所
- ③読んだことがない 2カ所
- ④その他 2カ所

試薬の使用期限

- ①使用期限内のみ 22カ所
- ②使用期限が切れも使用 22カ所
- ③その他 5カ所

マニュアル

- ①読んだことがありほぼ理解している 34カ所
- ②読んだことはあるがあまり理解不十分 9カ所
- ③読んだことがない 3カ所
- ④その他 3カ所

図5. 使用精製キット

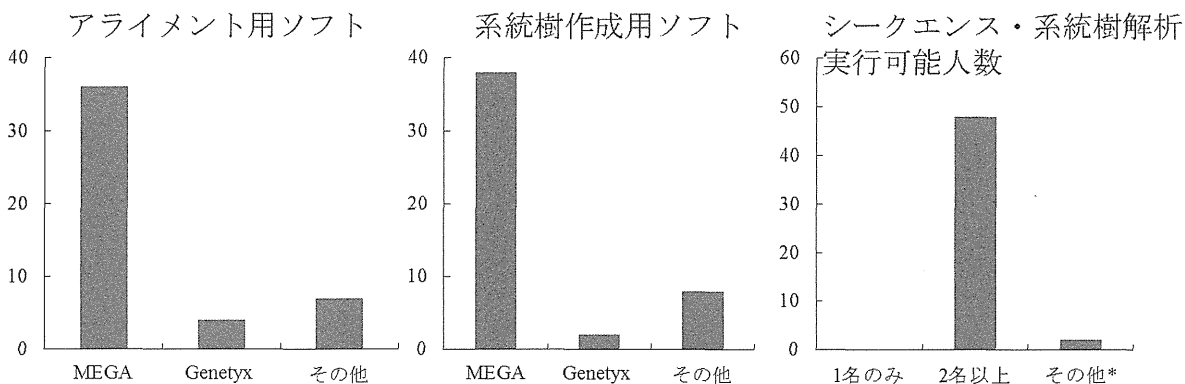


図6. 系統樹解析

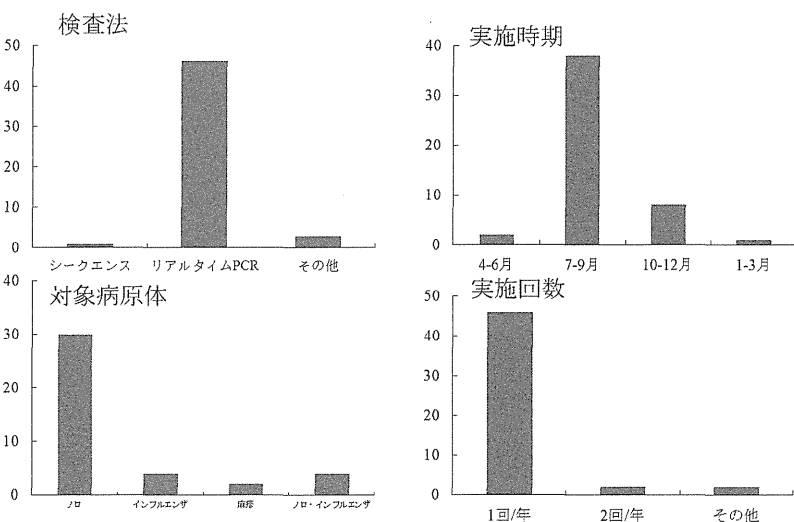


図7. 精度管理の対象と実施時期

検査に要した時間：15.2±13.5時間（平均値±標準偏差）
最短5.5時間，最大72時間

精度管理に関する業務を分担して行ったか 精度管理に関する業務量はどうか

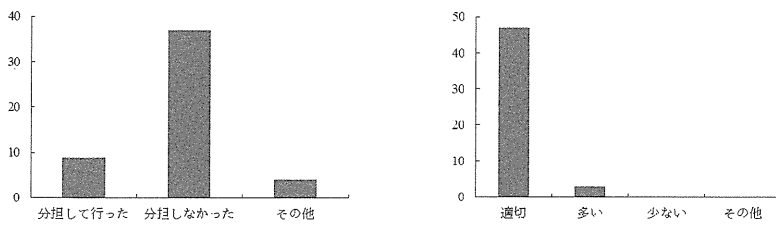


図8. 精度管理の実施

平成 27 年 9 月 XX 日

各衛生研究所所長 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会
厚生労働「精度管理研究」班
佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

地方衛生研究所精度管理研究班および精度管理部会による
平成 27 年度外部精度管理（ウイルス検査）実施について

初秋のころ、貴職におかれましては、ますますご健勝ことと拝察いたします。

さて、ご承知のとおり、昨年度より、厚生労働科学研究（健康安全・危機管理対策総合研究事業）の一環として、地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究—「精度管理研究」（研究代表者 佐多徹太郎）を開始いたしました。

本事業は、各衛生研究所の微生物検査の技術的水準を維持・向上させるために、外部精度管理の手法を導入するとともに、全国的な精度管理の仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築およびその妥当性の評価を目的とする「精度管理研究班」の研究として、地衛研精度管理部会とともに、外部精度管理の導入に向けて種々の課題の抽出と整理を行うことを目的としております。

今回、下記および別添資料のとおり、ウイルス検査精度管理実施機関の募集および実施について、ご案内いたしますので、参加へのご検討とともに、ご協力につきましてよろしくお願いいたします。

記

1. 精度管理実施項目 ノロウイルスキャプシド遺伝子解析
(シーケンス解析・分子系統樹解析)
2. 募集期間 9月25日(金)まで
3. 精度管理検体送付日(検体数) 10月上旬(1検体)
4. データ報告期日 平成27年11月13日(金)必着
5. 応募連絡先

厚生労働「精度管理研究班」・研究分担者
国立感染症研究所 感染症疫学センター第6室長 木村博一
TEL: 042-848-7133 (直通)
E-mail: kimhiro@nih.go.jp および adpa2753@nih.go.jp

「地衛研精度管理研究班」による
平成 27 年度外部精度管理（ウイルス検査）調査実施要領

1. 目的

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

2. 実施主体

外部精度管理の実施は、平成 27 年度厚生労働科学研究班（健康安全・危機管理対策総合研究事業）における「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施のための事業の体制の構築に関する研究」（略称「地衛研精度管理研究班」）に基づいて、ウイルス小班が主体となって実施する。なお、本研究班は地方衛生研究所全国協議会精度管理部会と国立感染症研究所の関連部から研究分担者ないし研究協力者で構成されている。

3. 今回の検査項目

ノロウイルス(NoV)キャプシド遺伝子解析（シークエンス解析・分子系統樹解析）

4. 配付試料の概要

試料到着時期：平成 27 年 10 月上旬(予定)

試料名：NoV ゲノム逆転写反応生成物または NoV ゲノム PCR 増幅産物

量：おおよそ 30 μ l

個数：1 バイアル

備考：T₁₀E₁ 緩衝液（Tris10mM/EDTA1mM）に生成物を溶解・凍結

5. 試料解析

1) 試料の保存及び検査方法

試料はマイナス 80℃で保存し、解析方法は精度管理実施手順を参考に実施する。

なお、精度管理実施手順は、参加機関のみに送付する。

2) 試料名

NoV ゲノム逆転写反応生成物または NoV ゲノム PCR 増幅産物

なお、精度管理試験実施者は、日常の当該項目の試験検査担当者とする。

6. 地衛研精度管理研究班による精度管理報告書等の提出

精度管理参加各機関は、試験検査およびデータ解析終了後、以下の資料を作成し、提出すること。

1) 地衛研精度管理研究班による精度管理報告の電子ファイルデータおよび印刷物を提出する。なお、参加機関には、電子メールにて、別途、試料と同時期にファイルを送付する。送付されたファイルに、各機関における測定試薬、反応条件および測定装置などの必要事項を入力後、下記宛にファイルを送付する。

2) 解析した塩基配列(FASTA 形式)および参照株・解析株による分子系統樹を提出する。系統解析法は、MEGA6 を用いた近隣結合法(NJ 法)とする。

また、作成した系統樹を A4 サイズに形式を揃え、PDF ファイルで提出する（系統樹原本は各機関で保存す

別添資料 2

ること)。

なお、精度管理報告書および測定ファイルの様式の変更をしないこと。

3) なお、関連するアンケート調査を行う場合は対応方、よろしくお願ひします。

7. 地衛研精度管理研究班による精度管理報告提出期限および送付先

平成27年11月13日(金) 必着

8. 研究班員

研究代表者 佐多徹太郎	富山県衛生研究所
水越文徳	栃木県保健環境センター
小林美保 塚越博之	群馬県衛生環境研究所
貞升健志	東京都健康安全研究センター
山下照夫 皆川洋子	愛知県衛生研究所
小沢正次	富山県衛生研究所
藤井理津志 岸本壽男	岡山県環境保健センター
濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
勝見正道	仙台市衛生研究所
小澤広規	横浜市衛生研究所
松島勇氣 清水英明	川崎市健康安全研究所
柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
長澤耕男 影山務 野田雅博 吉田弘 駒瀬勝啓 宮崎義継 木村博一	国立感染症研究所

9. 解析データ送付先・問い合わせ先

国立感染症研究所感染症疫学センター 木村博一

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所感染症疫学センター第6室

E-mail: kimhiro@nih.go.jp, TEL: 042-848-7133 (直通)

平成27年10月19日

地衛研精度管理研究班による
平成27年度外部精度管理（ウイルス検査）実施手順

【精度管理内容】

地衛研精度管理研究班による平成27年度外部精度管理（ウイルス検査）実施要領に基づき、送付した試料に含まれる NoV キャプシド遺伝子の塩基配列解析および分子系統樹解析を実施する。

【操作法】

PCR 法による NoV キャプシド遺伝子増幅、ダイレクトシーケンス法および近隣結合法(NJ 法)により、配布試料中に含まれる NoV ゲノムのキャプシド遺伝子の塩基配列解析および分子系統樹解析を下記の手順を参考に実施する。なお、解析試料は、急性胃腸炎患者由来検体から核酸抽出および RT-PCR により得られた NoV キャプシド遺伝子産物(amplicon)である(配布量：約 30 μ l)。以下の大まかな手順により、試料の解析を行う。

1. 試料中に含まれる NoV キャプシド遺伝子増幅
- ↓
2. Sequencing Sample の調製
- ↓
3. シークエンサーセットアップ・解析
- ↓
4. 相同性解析と分子系統樹解析

1. PCR 法による試料中に含まれる NoV 遺伝子増幅法

下記のプライマーを用い、配布試料中の NoV キャプシド遺伝子を増幅する。なお、試料添加量、プライマーおよび PCR 条件(温度、反応時間など)以外の試薬・機器などについては、各機関で使用している試薬・機器を使用してもよい。

1.1. 使用プライマーと配列

配布試料の NoV キャプシド遺伝子増幅には下記のプライマーを使用する(図 1, 2)。

COG2F: 5'-CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG-3'

G2-SKR: 5'-CCR CCN GCA TRH CCR TTR TAC AT-3'

1.2. PCR

下表を参考に PCR を実施する。

表 1. PCR-Mix の組成

DNase/RNase free water	18 μ l
COG2F (25 μ M)	1 μ l
G2-SKR (25 μ M)	1 μ l
PerfectShot [®] Ex Taq	25 μ l
配布試料	5 μ l
計	50 μ l

2) PCR 反応

増幅は 94 $^{\circ}$ C 3分を 1 サイクル、94 $^{\circ}$ C 1分・50 $^{\circ}$ C 1分・72 $^{\circ}$ C 2分を 40 サイクル、72 $^{\circ}$ C 15分を 1

別添資料 3

サイクル行う。

3) 電気泳動

PCR 産物 8 μ l を 1.5%アガロースゲルで泳動する。

4) アガロースゲル染色

泳動後ゲルをエチジウムブロマイド染色液で染色する(TAE 溶液 100 ml にエチジウムブロマイド 10 mg/ml を 10 μ l 添加、20 分間染色)。

5) NoV キャプシド遺伝子増幅産物の確認

染色したゲルを UVB 照射・写真撮影後、増幅産物の確認を行う。

2. シークエンス試料の調製

2-1. Templates の調製 —PCR products の精製—

PCR products の精製は、PCR 反応液から酵素、ヌクレオチド、塩類、その他不純物を除去し、目的の PCR 産物だけを得るための操作である。現在、精製のためのキットは複数市販されている。ここでは QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) を用いた方法を紹介する。

(1) 試薬・器具

QIAquick PCR Purification Kit : QIAGEN, Cat.No. 28104

エタノール

Distilled water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free) 以下「DW」

マイクロピペット

マイクロチップ

1.5 ml マイクロチューブ

高速遠心機

(2) QIAquick PCR Purification Kit による PCR products の精製

1) 1.5ml チューブに PCR 産物 1 容量に対して 5 倍量の Buffer PB を加えて混合する。

(PCR 産物の量は電気泳動のバンドの濃さで決める)

2) 溶液の色が黄色 (PCR 産物添加前の Buffer PB の色と同様) であることを確認する。

Buffer PB は pH7.5 の時、黄色。溶液の色がオレンジ色あるいは紫色の場合は、3M 酢酸ナトリウム(pH5.0) を 10 μ l 添加して混和すると、溶液の色が黄色になる。

3) Spin Column の中央に 1) を加える。

4) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)。

5) 濾液を捨てる。Spin Column を再びコレクションチューブにセットする。

6) Spin Column の中央に 750 μ l の Buffer PE (96-100% エタノールを 24 ml 添加) を加える。

7) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)。

8) 濾液を捨てる。Spin Column は再びコレクションチューブにセットする。

9) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)

10) Spin Column を新しい 1.5 ml チューブに移す。

11) Spin Column の中央に 30 μ l の Buffer EB を加え(添加量で濃度調整)、1 分間静置する。

12) 13,000 rpm、1 分間遠心(室温)

13) Spin Column を捨て、得られた精製物をシークエンスに用いる。

(3) 精製 PCR 産物の濃度確認

1) 精製 PCR 産物 3 μ l と 6 \times BPB 1 μ l を混合し、1.5%アガロースゲルで電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド等の核酸染色試薬で染色する。

2) UV 照射下で写真撮影する。

別添資料 3

分子量マーカーと比較し、バンドの濃度確認を行い、Cycle Sequence 反応 mixture 調整時に加える精製 DNA 量を決定する。ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit では、PCR 産物が 200~500 bp のとき精製 DNA が 3~10 ng 必要である。

- ・分子量マーカーとほぼ同等：精製 DNA を 1~3 μl 使用
- ・分子量マーカーより薄い：精製 DNA を 3~6 μl 使用
- ・分子量マーカーより濃い：精製 DNA を DW で希釈して使用または精製 DNA を 1 μl 使用

2-2. Cycle Sequence 反応 —Dye Terminator 法—

ddNTPs に蛍光が標識されている Dye Terminator 法を利用した ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequence Kit を用いて行う。

(1) 試薬・器具

ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit : Applied Biosystems Cat.No. 4337455(100 反応)

Distilled water (Deionized, Sterile, autoclaved, DNase free, RNase free) 以下「DW」

マイクロピペット

マイクロチップ

0.2 ml マイクロチューブ

(2) ABI PRISM BigDye Terminator V3.1 Cycle Sequencing Kit を用いた Cycle Sequence 反応

1) 反応液の調整をおこなう。

DW	X μl
5 × Sequencing Buffer	2 μl
Primer (2.5pmol/ μl) [*]	2 μl
2.5 × Big Dye Ready Reaction mix	4 μl
精製 amplicon	Y μl
Total	20 μl

* : Primer は PCR で用いたものを使用し、Forward primer と Reverse primer を別々の反応系に分けて行う。

X : DW で Final Volume (20 μl) になるように調整する。

Y : 精製 DNA は電気泳動 (3 μl)し、バンドの濃さを確認後、反応に用いる量を定める。

2) Cycle Sequence 反応

ミスアニールを防ぐため、90°C以上を上昇してからサーマルサイクラーにチューブをセットする。

96°C 1 min
96°C 10 sec ─┐
50°C 5 sec 25cycle
60°C 4 min ─┘
4°C hold

なお、サーマルサイクラーの機種により上記条件が異なる場合がある(キット添付文書を参照)。

2-3. シークエンス産物の精製 —スピンカラム精製—

余剰な Dye Terminator を除くため、エタノール沈殿または、カラム精製を行う。精製は多くの方法があり、またキットも多数市販されている。通常のノロウイルスのシークエンス検査で使用している方法を用いてよい。ここでは Performa® DTR Gel Filtration Cartridges (Edge Bio) を用いた方法を紹介する。

別添資料 3

(1) 試薬・器具

Edge Bio Performa® DTR Gel Filtration Cartridges

Cat.No. 98780 (36 カラム)

Cat.No. 42453 (108 カラム)

マイクロピペット

マイクロチップ

1.5 ml マイクロチューブ(Edge Bio)

高速遠心機

(2) Performa® DTR Gel Filtration Cartridges を用いた未反応ダイターミネーターの除去

- 1) カラム内には、滅菌水で膨潤済みのゲルが充てんされているゲルカートリッジが入っている。カラムが装着されたチューブを遠心機に入れ、3,000rpm で3分間遠心（室温）。
- 2) 遠心によって落ちた滅菌水が入ったチューブを捨て、カラムを新しい1.5ml チューブに移しかえる。
- 3) サンプルをゲル中央に添加する。その際、ピペットの先端をゲルにつけないようにする。
- 4) 3,000rpm、3分間遠心（室温）。
- 5) チューブに精製産物が落ちていることを確認し、カラムを捨てる。

3. シークエンサーセットアップ・解析 —ABI PRISM 3500 Genetic Analyzer によるシークエンス—

(1) サンプルのセット

- 1) ABI PRISM 本体のドアが閉じられており、電源が入っていることを確認する。電源が入っている場合は、本体前面左下の緑色のLEDが点灯している。
- 2) コンピューターの電源を入れ、Windowsにログオン (INSTR-ADMIN)する。
- 3) コンピューターが完全に起動 (3500 Server Monitor が起動し、画面右下の☑の表示を確認)したのち、デスクトップ上のショートカットから「3500series」を起動させる。
- 4) 「DashBoard」上で、消耗品のステータスが有効であることを確認する。経過している場合は必要に応じて交換する。。
- 5) 「Tray」ボタンを押し、オートサンプラーを手前に異動させる。動作が停止したら、ドアを開け、プレートを取り出す。
- 6) 各ウェルにサンプルを添加する。サンプルを入れないウェルには、Hi-Di™ Formamide を10 µl 添加する。オートサンプラーにサンプルをセットしたサンプルトレイをのせる (右奥が A1 の位置になり、逆向きにセットするとトレイがきちんとはいらないようになっている)。
- 7) 装置の扉を閉める。
扉が開いている場合は本体前面左下のオレンジ色のLEDが点灯している。
(装置は50℃に達するまでRunを開始しないため、あらかじめDashBoardにある「Start Pre Heat」を押し、温度を上げておくとすぐにRunを開始する。)

(2) サンプルシートの作成

- 1) 「DashBoard」から「Creat Plate from Template」を選択すると「Open Plate Template From Library」ダイアログボックスが現れる。
- 2) 事前に用意したテンプレートのうち、サンプルの長さに応じて適切なモードを選択し「Open」をクリックする。

Run Module	Run time	解読鎖長
Short Read Seq	≤30 分	>300bp

別添資料 3

Rapid Seq	≤40 分	>500bp
Fast Seq	≤65 分	>700bp
Std Seq	≤125 分	>850bp

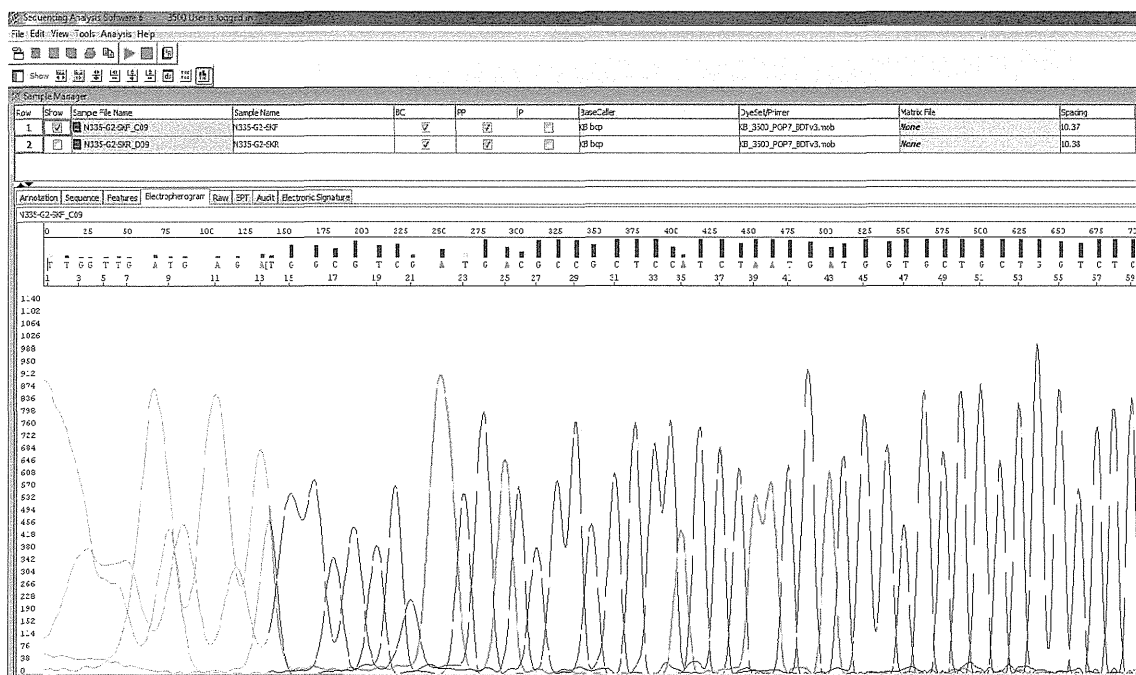
3) 「Plate Details」のページにて、プレートに名前を付け（のちにサンプルファイルフォルダ名に利用される）ウェルのタイプ（96 ウェル）を選び、「Assign Plate Contents」をクリック。

(3) インジェクションリストの作成

- 1) ウェルに対応するサンプル名を入力する。
- 2) 各ウェルの Assay（「Assay」→「Action」→モードの選択（反応試薬のバージョンや精製方法に注意し読みたい長さに合わせたモードを選択）、File Name Convention、Results Group を指定し「Link Plate for Run」をクリック。
- 3) 「Injection List」にて、Run の詳細（モード、サンプルネーム、プレートの位置等）を確認。
- 4) 「Run」ボタンをクリックする。50℃に達すると作動する。
装置が作動しているときは本体前面左下の緑の LED が点滅している。

(4) データ解析

- 1) デスクトップ上のショートカットから「SeqA6」を起動させる。
- 2) 「File」→「Add samples」をクリックし、Sample Manager に加えたいファイルを選ぶ。
- 3) ファイルを全て加えたら「OK」ボタンをクリックする。選んだサンプルファイルは Sample Manager に加えられる。
- 4) サンプルファイル名をダブルクリックすると Electropherogram (下図) が表示される。



5) 「Analysis」→「Start Analysis」したのち、「save」で保存する。データは、「¥Computer¥AB SW&DATA(D)¥DATA」内に保存される。

6) Raw Data より Peak1 Location (解析時に蛍光色素の違いによるモビリティシフトの補正を行うための基準点)を確認する。

Raw Data に表示されている波形の最初のピークの立ち上がりカーソルをあわせ、クリックしたままにすると、位置を示すラインが現れ、上部にデータポイント数が表示される。この数値を「Peak1 Location」カラム

に再入力し再解析を行う。このとき「Start Point」カラムの値も Peak Location に再入力した値と同じ値を再入力する。余剰な Dye Terminator 等により始めに高いピークが現れたときは、ピークの終わった後の最初のピークの立ち上がりにあわせる。

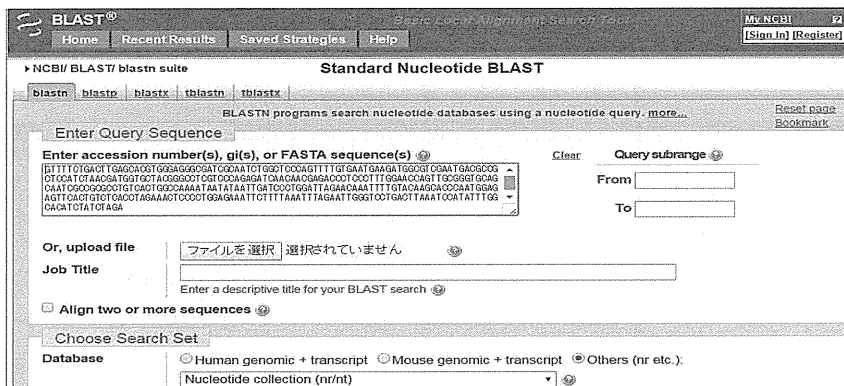
Raw Data の終わりの方を表示させ、波形が終わっておりフラットな状態(Electropherogram では塩基「N」が表示される) になっていれば、ピークの最後にあわせ、データポイント数を「Stop Point」に再入力する。なお、再解析は必要な場合、「A」チェックボックスにチェック後、「▷Start」ボタンをクリックする。

- 7) 必要に応じて解析結果を印刷する。
印刷は、「P」チェックボックスにチェック後、「▷Start」ボタンをクリックする。
- 8) 解析後の塩基配列のテキストファイルを作成する。
「Factura Settings File」のポップアップメニューから、「Seq Txt」を選択し、「F」チェックボックスにチェック後、「▷Start」ボタンをクリックする。
- 9) 解析終了後、「310 Data Collection」、「Sequencing Analysis」を終了させる。
- 10) データはデスクトップ上の Run フォルダのショートカットに保存されている。
CD-R や FD にデータをコピーする。
- 11) 本体装置の扉を開け、左側にある「Tray」ボタンを押し、オートサンプラーを手前に移動させる。サンプルトレイを外し、サンプルは廃棄する。装置の扉を閉める。

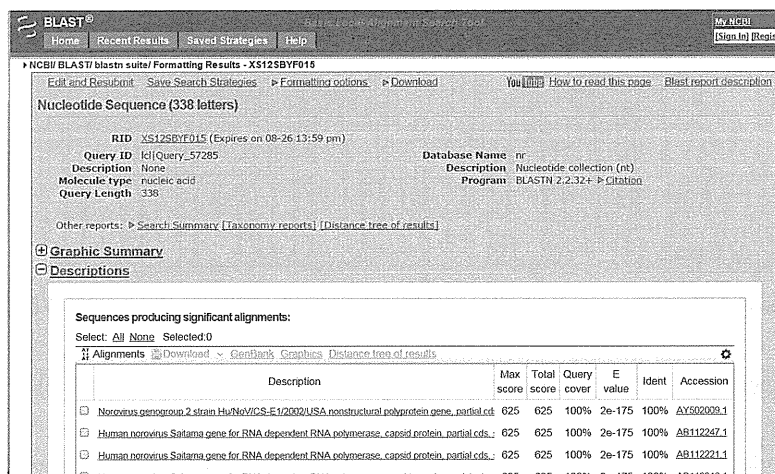
4. 塩基配列およびアミノ酸配列相同解析

塩基配列が決定されたら、キャプシド遺伝子の約 340 塩基長について BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 検索により相同性解析を行う。

- 1) 塩基配列を入力し、画面下の「BLAST」をクリックする。



- 2) 検索が終了すると、検索結果ページに画面が移り、類似性の高い配列がスコア順にリス



アミノ酸配列に関しても、「protein BLAST」にて同様に解析を行うことができる。

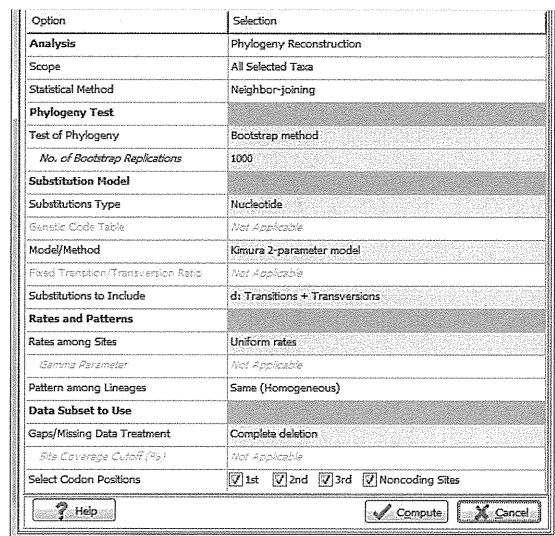
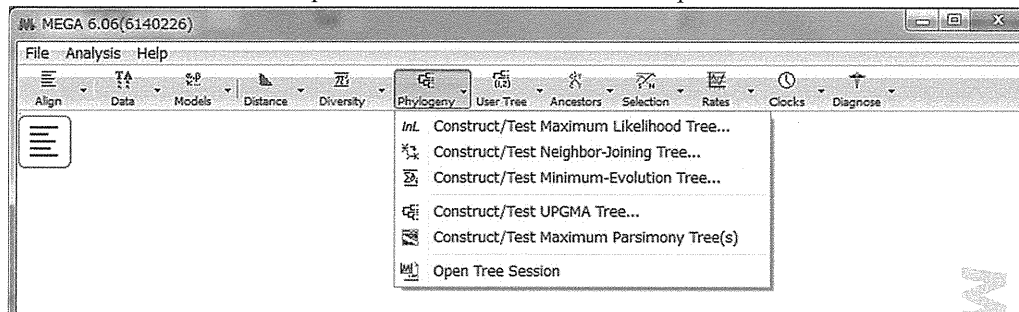
5. 分子系統樹解析 —MEGA6 による NJ 法での系統樹作成—

分子系統樹解析は、MEGA (<http://www.megasoftware.net/>)あるいは市販のソフトウェア (例: GENETYX など)やインターネット上に公開されている Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)などを使用し、得られた試料の塩基配列とともに配布した参照株の塩基配列のアライメントを行ったのち、近隣結合法 (Neighbor-joining 法, NJ 法)によって分子系統樹を作成する。ここでは MEGA による NJ 法による系統樹作成方法を紹介する。なお、前バージョンの MEGA5 で解析を行うことも可能である。

- 1) シークエンス解析で得られた塩基配列が相補的であることを、MEGA6 を用いて確認する。
- 2) 検出された塩基配列と Genbank に登録してある既知の塩基配列データ (リファレンス株)をまとめたファイル (FASTA 形式ファイル)を作成する。
- 3) MEGA あるいは DDBJ のホームページ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)から、Clustal W を用い、アライメントを行う。
- 4) 「Data」 → 「Phylogenetic analysis」を行う。
- 5) メイン画面「phylogeny」 → 「Construct/Test Neighbor Joining Tree」を選ぶ。
- 6) Test of Phylogeny – Bootstrap Method

No. of Bootstrap Replications – 1000

Model/Method – Kimura 2 – parameter model を選択し、Compute をクリックする



- 7) Tree Explorer で分子系統樹が表示される。リファレンス株とのクラスターの位置を基に供試株の genotype を推定する。

6. 解析結果の送付

解析結果は、解析データファイルに、以下のデータを入力する。

1. FASTA 形式による塩基配列
2. BLAST 検索による塩基およびアミノ酸配列の相同解析結果(最も相同性が高い参照株名も入力する)。

なお、解析株および配布参照株の塩基配列を基とした NJ 法による分子系統樹は、PDF ファイルに変換後、メ

別添資料 3

ールにて別途送付する (送付期限：平成27年11月27日必着)。

解析結果送付先

国立感染症研究所 感染症疫学センター第6室 木村 博一
データ一式を下記の2つのメールアドレスに送付すること。

送付先: kimhiro@nih.go.jp および adpa2753@nih.go.jp

なお、不明な点は、メールあるいは下記電話番号にて問い合わせしてください。

TEL: 042-748-7133(直通)

測定結果記入用(例)

別添

施設名 A 研究所

判定結果

推定genotype	GII.1
推定理由	系統樹、BLASTを総合的に判断

塩基配列

>A研究所

ATTCTCTGACCTCAGCACATGGGAGGGCGATCGCAATCTTGCTCCCGAAGGTGTGAATGAAG
 ATGGCGTCAATGACGCTACCCCATCTGATGATGGTGCAGCCGGCCTCGTACCAGAGATCAA
 CAGTGAGGTTATGGCTCTTGAACCCGTGCTGGGGCCTCCATTGCAGCCCCCGTAGTCGGC
 CAACAGAATATAATTGATCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCTGCTGGTGAATTCA
 CAGTTTCCCCTAGAACTCTCCTGGAGAACTTCTACTTGATTTGGAATTGGGTCCTGAACTTAA

精度高く解読できた塩基数 (QV20以上など精度高く解読できた塩基数)	COG2F	201-300
	G2-SKR	201-300

BLAST解析結果

	最も相同性が高い参照株名	相同性
塩基	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US.(M87661)	99%
アミノ酸	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US.(M87661)	99%

測定条件

PCR産物精製試薬※	QIAquick PCR Purification Kit (切り出し精製を実施)		
シーケンスPCR試薬	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit		
反応容量※※	10 µL		
その他追記事項			
反応プログラム	°C	秒	25 サイクル
	96°C	60秒	
	96°C	10秒	
	50°C	5秒	
	60°C	240秒	
シーケンスPCR産物精製試薬	AutoSeq G-50		

※電気泳動後に切り出し精製を行っている場合には括弧にその頻度を記入

※※試薬を希釈するなど試薬を組み合わせで行っている場合には、その他へ記入してください。

測定機器

測定機種	Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer
シーケンスの陽性コントロールの有無	無

その他

検査に要した時間	10 時間
----------	-------

備考<ご意見等ご記入ください>

--

別添資料5

ウイルス検査精度管理実施後アンケート

機関名・担当者名(記入者名)・職名

精度管理への対応

Q1 検査に要した時間

回答
おおよそ 時間

Q2 検査の分担

- ① 分担して行った
- ② 分担しなかった(Q3は回答不要)
- ③ その他*

回答
()

Q3 検査を分担した理由

回答

Q4 検査結果の最終確認者について

Q4-1 最終確認者

- ① 部署長(係長など)
- ② 同じ部署の同僚職員
- ③ 確認者なし
- ④ その他

回答
()

Q4-2 確認方法

- ① 捺印のみ
- ② 最終結果の報告のみ
- ③ 生データを見せて討議
- ④ その他*

回答
()

精度管理全般

Q5 今回の精度管理は担当者一人の業務量として時間的に適切か。

- ① 適切
- ② 多い
- ③ 少ない
- ④ その他*

回答
()

Q6 最も精度管理が必要な検査はどれか。

- ① シークエンス
- ② リアルタイムPCR
- ③ その他*

回答
()

Q7 特に精度管理が必要と思われる分野はどれか。

- ① 感染症
- ② 食中毒
- ③ その他*

回答
()

Q8 特に精度管理が必要と思われるウイルスは何か。

回答
()

Q9 精度管理を行う時期はいつ頃が良いか。

- ① 4-6月
- ② 7-9月
- ③ 10-12月
- ④ 1-3月

回答
()

Q10 精度管理を行う頻度はどれくらいが良いか。

- ① 1回/年
- ② 2回/年
- ③ その他*

回答
()

Q11 その他

※コメントを自由を記入してください。

* 選択した場合には、記入例を参考にして、内容を記入してください。

内部精度管理に関するアンケート'

機関名・担当者名(記入者名)・職名

測定機器(シークエンサー)

Q1	測定機器名		回答 機種名 メーカー
Q2	購入日	① 1年以内 ② 3年以内 ③ その他*	回答 ()
Q3	定期点検	① 行っている* ② 行っていない	回答 ()
Q4	使用キャピラリー	① 36cm ② 50cm ③ その他*	回答 ()
Q5	キャピラリー交換頻度	① 100 run ② 200 run ③ その他*	回答 ()
Q6	使用時点検について		
	Q6-1 緩衝液の交換頻度	① 検査毎に毎回交換 ② 数回の検査毎に交換* ③ その他*	回答 ()
	Q6-2 緩衝液の使用期限 (②の場合、許容する期間 についても記載してくださ い)	① 使用期限内のみ ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* ③ その他*	回答 ()
	Q6-3 ポリマーの交換頻度	① 1週間毎 ② 残液が少なくなってきたら ③ その他*	回答 ()
	Q6-4 ポリマーの使用期限 (②の場合、許容する期間 についても記載してくださ い)	① 使用期限内のみ ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* ③ その他*	回答 ()
Q7	点検記録	① 記録簿があり、いつ・何をしたかを把握している ② 把握していない ③ その他*	回答 ()
Q8	取り扱い説明書	① 読んだことがあり、ほぼ理解している ② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 ③ 読んだことがない。 ④ その他*	回答 ()

Q9 機器使用時のルール・マニュアル ① 施設内で統一され、文書化されている。
 ② ある程度施設内で統一されているが、文書化はされていない
 ③ 統一されていない。 回答 ()
 ④ その他* _____

試薬

Q10 シークエンス反応試薬について

Q10-1 反応試薬 ① BigDye® Terminator v3.1(Applied Biosystems) 回答 ()
 ② BigDye® Terminator v1.1(Applied Biosystems) 試薬名
 ③ その他* メーカー _____

Q10-2 反応容量 ① 20µl
 ② 10µl 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-3 保存温度 ① -20 ~ -30℃
 ② -80℃ 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-4 保存方法 ① 1回分毎に分注して保存
 ② 数回分毎に分注して保存 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-5 凍結融解 ① 1回のみ
 ② 3回程度までは使用 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-6 使用期限 ① 使用期限内のみ
 ((2)の場合、許容する期間 ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* 回答 ()
 についても記載してください) ③ その他* _____

Q10-7 試薬の説明書 ① 読んだことがあり、ほぼ理解している
 ② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 回答 ()
 ③ 読んだことがない。 _____
 ④ その他* _____

Q11 PCR産物精製法について

Q11-1 使用キット ① QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 回答 ()
 ② Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) 試薬名
 ③ その他* メーカー _____

Q11-2 使用期限 ① 使用期限内のみ
 ((2)の場合、許容する期間 ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* 回答 ()
 についても記載してください) ③ その他* _____

Q11-3 キットの説明書 ① 読んだことがあり、ほぼ理解している
 ② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 回答 ()
 ③ 読んだことがない。 _____
 ④ その他* _____

Q12 シークエンスPCR産物精製について

Q12-1 使用キット ① BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) 回答 ()
② AutoSeq G-50 (GEヘルスケアバイオサイエンス) 試薬名
③ その他* メーカー

Q12-2 使用期限 ① 使用期限内のみ
(②の場合、許容する期間 ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* 回答
についても記載してください) ③ その他* ()

Q12-3 キットの説明書 ① 読んだことがあり、ほぼ理解している
② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 回答
③ 読んだことがない。 ()
④ その他*

Q13 検査毎のシークエンス用 ① 毎回行っている*
陽性コントロールの確認 ② とどきき行う(2-5回の測定に1回) 回答
③ 行っていない ()

Q14 シークエンス反応・精製の ① 施設内で統一され、文書化されている。
手順 ② 施設内で統一されたものはあるが、文書化はされていない。
③ 統一されたものはない 回答
④ その他* ()

シークエンス解析

Q15 アライメント用ソフト ① MEGA
② Genetyx 回答
③ その他* ()

Q16 系統樹作成ソフト ① MEGA
② Genetyx 回答
③ その他* ()

シークエンス検査体制

Q17 シークエンス検査ができる ① 1名のみ
人数 ② 2名以上 回答
③ その他* ()

Q18 系統樹作成ができる人数 ① 1名のみ
② 2名以上 回答
③ その他* ()

Q19 シークエンサーの1年間の ① 100検体以下
検体数※ ② 101~200検体 回答
③ 200検体以上 ()
※ForwardとReverseの一組で1検体とし、
VNTRなど塩基配列を決定しないは含まない

精度管理全般について

Q20 その他 ※精度管理に対してのコメントを自由を記入してください。

* 選択した場合には、記入例を参考にして、内容を記入してください。

2. 昨年度のリアルタイム PCR 外部精度管理調査後の トラブルシューティング研修

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

研究要旨 昨年度のノロウイルスリアルタイム PCR に関する外部精度管理調査をフォローし、検査の質確保および人材育成につなげるための研修を実施した。昨年度の調査より判定基準値をもとに参加機関を3群に分け、各群から代表を選んで10機関を研修の対象とした。平成27年9月10、11日のおよそ1日半の日程で、On the Job Training (OJT)を模したトラブルシューティング研修を行った。参加者5名とファシリテーター1名からなる計2グループに分け、グループミーティング形式で各トラブルシューティングを行い、次いで全体討論により全体のトラブルシューティング集をまとめた。さらに、ラボ実習と講義により、各自トラブルシューティングを完成させた。研修後、参加者にアンケートならびにトラブルシューティング集を送付し、職場での復命や研修の効果についてのフォローアップ調査も行った。その結果、職場での技術向上につながったことが確認できた。一方で、今回の研修やアンケート等を通して検査の質を確保するためには、新規職員の教育研修が重要であることがわかった。

A. 研究目的

昨年度、本研究班でノロウイルス (NoV) の模擬検体を用いた定量リアルタイム PCR 法に関する外部精度管理調査を実施した。その結果、測定値3つのいずれも判定基準値外となった機関が参加59機関中10機関、測定値2つが判定基準値外だった機関が3機関、測定値1つが判定基準値外だったところは7機関であった。

調査後の追加アンケートの結果から、各機関における試薬や標準曲線作成用標準物質の保存条件や使用方法は多種多様であり、それが判定基準から外れた原因の一つと考えられた。実際に、参加機関の中には試薬や標準物質の管理の見直しを図ったところもみられた。一方で、明確なトラブルシューティングに至らなかった機関や改善すべき点が不明で、トラブルシューティングの解

説がほしいとの意見も寄せられた。そこで、昨年度の外部精度管理調査をフォローし、検査の質確保および人材育成につなげるための研修を実施した。

B. 研究方法

昨年度の外部精度管理調査参加機関から、判定基準に基づいてA～Cの3群に分類し、各群より無作為に選んだ10機関を研修の対象とした。すなわち、A群(3つ全ての測定値が判定基準外の機関)10機関から4機関、B群(1つの測定値のみが判定基準外の機関)8機関から4機関、C群(3つ全ての測定値が判定基準内の機関)38機関から2機関とした。参加の可否について個別に訊いたところ快諾を得た(資料1)。

On the Job Training (OJT)を模したトラブルシューティング研修として、第1日目はA～C群が均等になるように、参加者5名とファシリテーター1名からなる計2グループに分け、先ずグループミーティング形式でトラブルシューティングを行った。事前にパワーポイントのプレゼンファイル(所属の状況、外部精度管理調査提出結果、標準曲線図、受け取った評価、考えられる原因、新規配付標準物質の測定結果等の自由記載)を参加者に配付し(資料2-a,b)、必要事項を記入後に返送してもらった。当日、それを配布資料とするとともに、参加者は各自のパワーポイントを発表した。これにより、グループ内で問題点を抽出し、原因や対処法を議論しながら、ファシリテーターがホワイトボードにトラブルシューティングをまとめた(資料3-a,b)。同時に、参加者はワークシート(資料4)を用いて、グループミーティングのなかで各自のトラブルシューティングを作成した。次いで、参加者および担当者全員が集まり、各グループの代表がホワイトボードのまとめを発表し、全員で議論してトラブルシューティング集(資料5)を作成した。

第2日目はラボ実習と講義を行った。研修担当者2名がリアルタイムPCRの標準曲線作成の模範例と手技的失敗例について質疑応答を交えながらデモを行い、一部参加者も標準物質の希釈調製法を体験した。測定結果の解説時に、ピペッターの不具合や不適切な操作の標準曲線に及ぼす影響についての検討事例も紹介した(資料6)。講義では、リアルタイムPCR法の原理、解析のポイントや試薬の保存管理に関する注意点などの基礎講座を実施した(資料7)。参加者は実習・講義を通して気づいた点をワークシートにさらに追記して自身のトラブルシューティングを完成させた。

第1日目および2日目終了時に、今回の研修と職場での復命などに関するアンケート調査を行った(資料8-a,b)。さらに、研修1か月後に参加者へトラブルシューティング集と参加者のワークシートまとめを個別に送付して、研修後約2か月半の間に研修内容の理解度や職場での対応状況を中心にフォローアップ調査を行った(資料9参照)。

さらに、新規配属職員(新人)のOJTと教育研修に関して、本研究班参加者を対象としてアンケート調査を行い、研究班内の意見を集約した(資料10)。

今回作成し配付した様式等の書類は、トラブルシューティング研修案内申込書(資料1)、プレゼンファイル(6ページ、資料2)、各自の回答シート様式(資料3)、研修プログラム(資料10)、ワークシート(資料4)、トラブルシューティング集(資料5)、ワークシートまとめ(資料9参照)、研修参加者へのアンケート用紙(第1日目および第2日目)(資料8-a,b参照)、本研究班参加者へのアンケート(資料13参照)である。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体ならびに個人情報を取り扱わない。

C. 研究結果

平成27年9月10日午後から11日15時までの日程で、国立感染症研究所村山庁舎講義室ならびに実習室にて研修を実施した。研修担当者打合せ会議(平成27年7月28日、国立感染症研究所村山庁舎)やメール等により、1)シナリオの作成(資料11-a,b,c)、2)参加者の昨年度調査結果における問題点や解決方法の指摘(資料12)を事前に行って担当者間で意見統一を図ったため、研修はほぼ予定通り実施できた。2)の担当者指摘事項は参加者各自のワークシートまとめにも参照として載せた。

研修後のアンケート調査(資料8-a,b)より、参加者からはグループミーティングでは他機関の様子がわかり、参加者同士の話し合いができたことがよかったという声が寄せられた。また、多くの質問と討論を通して、昨年度の調査結果に対する疑問の解消につながり、戻ってすぐにも試してみたいという意見が多かった。一方で、グループミーティングの時間がやや足りなかったと感じた参加者もいた。また、研修後のフォローアップ調査では(資料9)、復命等により職場や関連部署でも研修内容が紹介され、今回の研修が職場でのOJTに役立つと期待できる効果も得られた。今後の研修については、

今回のように7～9月の時期に2～3日の期間で実施して欲しいとの要望が多かった。また、研修内容は講義と実習の両方がよいという意見が多数を占めた。

参加者の所属状況を分析した結果、いずれの機関もNoVリアルタイムPCRができる職員が3名以上いるものの、その中の地衛研での職歴最長者が10年以上の機関は半数にとどまっておらず、5年以下も2機関あった。最長者のなかには国立保健医療科学院主催の「短期研修ウイルスコース」や「新興再興感染症技術研修」の受講歴がない職員もいた。検査、結果確認、最終判断を別々の職員が行っているところは6機関で、残り4機関は行っていなかった。最終判断者がNoVリアルタイムPCR検査可能なところは2機関にとどまった。さらに、新人等未経験者に対する職場での検査手技のOJTについては、1人で出来るまで先輩等が共同して行う機関がほとんどであったが、最初だけ教えるというところも1機関あった。これに関連して、本研究班参加者にアンケート調査(資料13)を行った結果、上述のように1対1のOJTにより検査指導するものの、教育研修に関する取り決めはないとの回答が多かった。さらに、そういった研修の機会が必要と感じているが、研修内容がトレーナーによって決まってしまうのはよくないので、研修マニュアル等があるとよいとの回答が寄せられた。

D. 考察

地衛研技術職員を対象としたウイルス検査の技術研修として、「短期研修ウイルスコース」や「新興再興感染症技術研修」が隔年で実施されている。これら研修では30名ほどの参加者数であるが、今回の研修ではグループミーティング形式を取り入れたことにより参加者は10名と少数で、しかも2グループに分かれて実施した。また、参加者同士の討論によってトラブルシューティングできるように、昨年度測定値の分類群A～C全てが入るグループ構成とした。これにより、参加者が受身にならずに積極的に意見交換する研修となり、職場に戻ってからのトラブルシューティングが期待できた。しかしながら、このような形式の研修を希望者全員に

対して行うとなると、予算、人員、準備などや効果の面も含めて、難しい点が多々あるかと思われた。今後、どのようにこの研修方法を活用するか検討が必要である。

現在、リアルタイムPCR法はウイルス検査には不可欠な遺伝子検出技術となっている。今回のトラブルシューティング研修において、参加者の発表・意見、感想などから、試薬や標準物質の管理・使用法、反応液の混合・希釈・分注といった調製法、微量ピペッターやチップの使い方などの基本的実験手技に関する知識と経験が不十分であることが様々なトラブルに関係していたことが判明した。基本的知識・経験不足の一因として、職場では若手担当者が多くなり、OJTを担う経験豊富な中堅以上の職員が減少していることがあげられる。本研究班参加者へのアンケート調査結果からも、地衛研における新人職員の教育研修が検査の質確保において重要な課題であることが明らかになった。教育研修の実施機関、研修内容、研修マニュアルの作成や研修トレーナーの研修など検討すべきことは多い。

E. 結論

今回の研修を通して、職場でOJTによる検査技術の伝達が行われているものの、十分な知識と経験がある中堅職員が少ないことが部署内でトラブルシューティングできないことの一因であることが明らかになった。したがって、今後は新人の教育研修が検討課題になると思われる。

F. 研究発表

- 1) 論文発表
なし
- 2) 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

平成 27 年 8 月 13 日

〇〇衛生研究所 所長 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会
厚生労働科学研究「精度管理研究」班
研究代表者 佐多徹太郎
(富山県衛生研究所長)

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会について (ご案内)

平素より全国地研協議会の活動にご協力いただきありがとうございます。

昨年度に実施しました「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究 (研究代表者 佐多徹太郎)」に係るリアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス遺伝子定量について、本年度は下記および別紙プログラムのとおり検査の質確保および人材育成のための研修会を開催いたします。

つきましては、貴所施設で外部精度管理 (ウイルス検査) を担当された方の本研修会への参加をご配慮くださいますようお願いいたします。

なお、参加者には本研究班より旅費が全額支給されます。

記

1. 実施項目：外部精度管理実施後研修会 (ウイルス検査)
2. 開催日時：平成 27 年 9 月 10、11 日
3. 参加申込：平成 27 年 8 月 20 日締め切り
4. 参加申込先：厚生労働科学研究「精度管理研究」班 ウイルス小班 研修 WG

富山県衛生研究所 ウイルス部 小渕正次

〒939-0363 富山県射水市南太閤山 17-1

電話 0766-56-8143 (直通) FAX 0766-56-7326

メールアドレス:masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp

平成 27 年 8 月 13 日

〇〇衛生研究所
ウイルス検査担当者 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会
厚生労働科学研究「精度管理研究」班
研究代表者 佐多徹太郎
(富山県衛生研究所長)

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会について (ご案内)

平素より全国地研協議会の活動にご協力いただきありがとうございます。

昨年度に実施しました「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究(研究代表者 佐多徹太郎)」に係るリアルタイムRT-PCR法によるノロウイルス遺伝子定量について、本年度は下記および別紙プログラムのとおり検査の質確保および人材育成のための研修会を開催いたします。

つきましては、貴部署で外部精度管理(ウイルス検査)を担当された方の本研修会への参加をご配慮くださいますようお願いいたします。

なお、参加者には本研究班より旅費が全額支給されます。

記

1. 実施項目：外部精度管理実施後研修会(ウイルス検査)
2. 開催日時：平成 27 年 9 月 10、11 日
3. 参加申込：平成 27 年 8 月 20 日締め切り
4. 参加申込先：厚生労働科学研究「精度管理研究」班 ウイルス小班 研修 WG

富山県衛生研究所 ウイルス部 小渕正次

〒939-0363 富山県射水市南太閤山 17-1

電話 0766-56-8143 (直通) FAX 0766-56-7326

メールアドレス:masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp

資料 1-b

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会（ウイルス検査）プログラム

日時：9月10日（木）13：30～17：00

9月11日（金）9：00～15：00

場所：国立感染症研究所村山庁舎 講義室および実習室（6号棟6階）

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

第1日目

13：30～17：00

講義室

- ・開会の挨拶（研究代表者、富山県衛生研究所：佐多）
- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：グループミーティング、全体討論（富山県衛生研究所：小淵、東京都健康安全研究センター：貞升）
- ・研修後アンケート

第2日目

9：00～10：30

実習室

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

10：30～12：00

講義室

- ・リアルタイム PCR 基礎講座：講義（国立感染症研究所：木村）

13：00～15：00

講義室

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

資料 1-b

※研修参加予定者には、事前課題として研修プレゼンファイル（パワーポイント）をお送りします。ファイルは資料として研修第 1 日目に参加者全員に配布しますので、研修 1 週間前までに作成して小渕までご返送ください。

※尚、研修結果は研究班報告書として、参加者と施設名は匿名でまとめさせていただきます。

研修参加予定機関

平成 26 年度外部精度管理（ノロウイルスリアルタイム PCR）参加機関から、判定結果に基づいて選出された代表 10 機関

研修担当（ウイルス小班の研修 WG に属する研究分担者および協力者）

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

問合せ先

富山県衛生研究所 ウイルス部 小渕 正次
〒939-0363 富山県射水市南太閤山 17-1
電話 0766-56-8143（直通）
メールアドレス:masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp

平成27年度 外部精度管理実施後研修会（ウイルス検査）参加申込書

参加する 参加しない (○印をお願いします)

貴所施設名： _____

参加者氏名	所属	住所	連絡先 (メール、TEL)
			メール:
			TEL:

FAX (0766-56-7326) またはメール (masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp) にて、富山県衛生研究所ウイルス部 小渕までご回答願います。

微生物検査を行う係の構成メンバーを職名で記入してください。回答者のセルは黄色で塗りつぶしてください。

年齢をプルダウンメニューから選んでください。

受講したことのある研修に○を入れてください。

ノロウイルスのリアルタイムPCRが単独で実施可能な者に○を入れてください。

検査の担当を選んでください。

検査体制

構成 (職名)	年齢	衛研 経験 年数	研修受講歴				検査体制			
			ウイルス コース	新興再興 (ウイルス)	細菌 コース	新興再興 (細菌)	担当検査	ノロウイルス リアルタイム PCR実施可 能	前年度の精 度管理での 対応・役割	
係長	50代	10年以上			○		細菌		結果の最終判断	
主幹	40代	5年以下	検査の担当を選んでください。				細菌			
主任	30代	10年以上	○				ウイルス	○	検査結果確認	
技師	20代	5年以下	○	○			ウイルス	○	検査	
技師	20代	5年以下	○	○			両方	○		
技師	20代	5年以下			○		細菌			
			衛研での通算の経験年数を選んでください。							
感染症 検体数	細菌	101-200	担当者(所属)		塚越博之(群馬県衛生環境研究所)					
	ウイルス	201-400	連絡先(メール、電話)		tsuka-hiro@pref.gunma.lg.jp 027-232-4881					
検査未経験者に対する研修			研修方法:一通りの検査が出来るようになるまで先輩と共同して検査を行う							

平成26年度の感染症検体の数を選んでください。

職場で新人に対応する場合の指導方法を記入してください。

平成26年度に行った精度管理への対応について、役割を記入してください。

ノロウイルスリアルタイムPCR トラブルシューティング(Aグループ)

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
●希釈通りの Ct値でない	◆標準物質(PC)の劣化	■新たに配付(サイクルコピー数を記載、モニタリング)
●検出限界以下(10^{-10^2} コピー)が出ない	◆標準物質(PC)の劣化	■10コピーDNAは1/2程度の検出率 ■Ct値:10サイクル3.3を目安 ■ 10^3 コピーで30サイクルが目安 ■ 10^7 コピーで17-18サイクル
●Ct値が高め(ないし低め)に外れている	◆技術的問題(人、試薬、測定機器) ◆ピペッター採取量、精度 ◆凍結融解の回数(プライマープローブも) ◆プライマーの劣化 ◆測定機器の故障(潜在的で気づかない)	■定期点検(保守) ■メンテだけで無く自分の目を大事に ■全ウエルで一定濃度を測定(一定濃度とはどれくらい?) ■計画的にメンテする

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

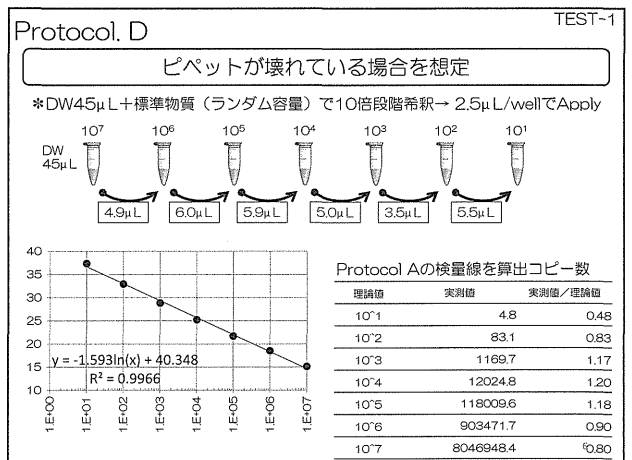
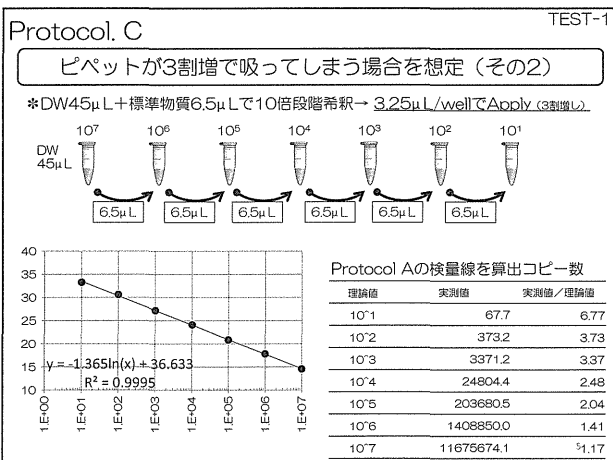
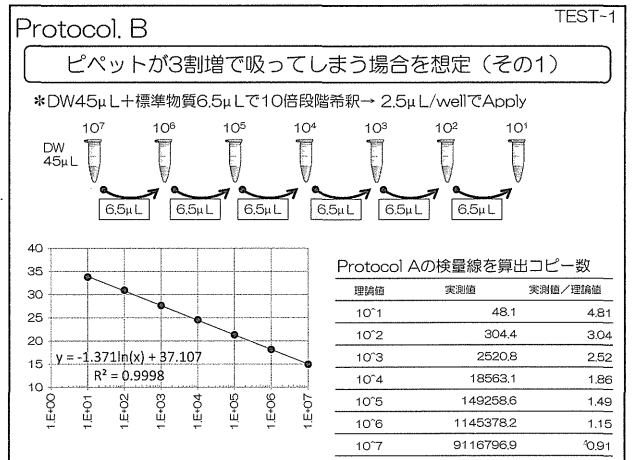
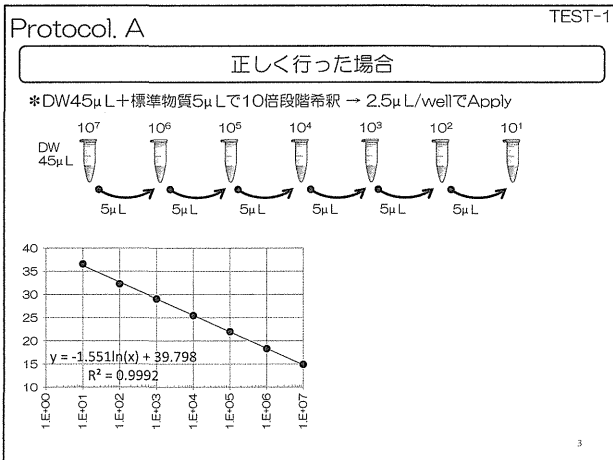
トラブル	考えられる原因	解決のための処置

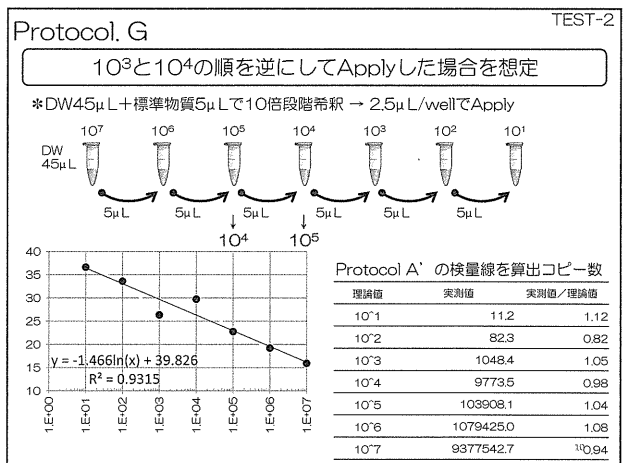
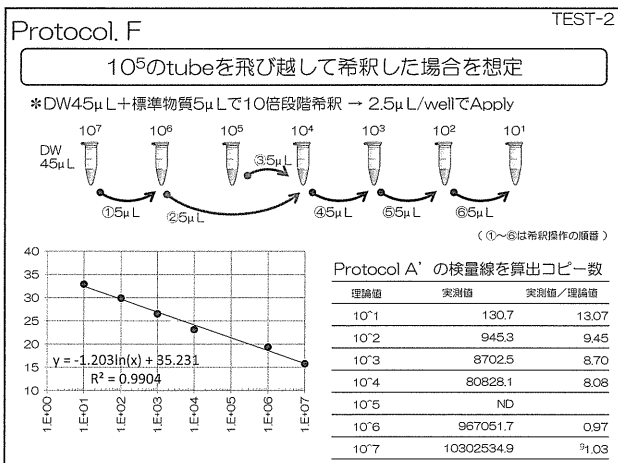
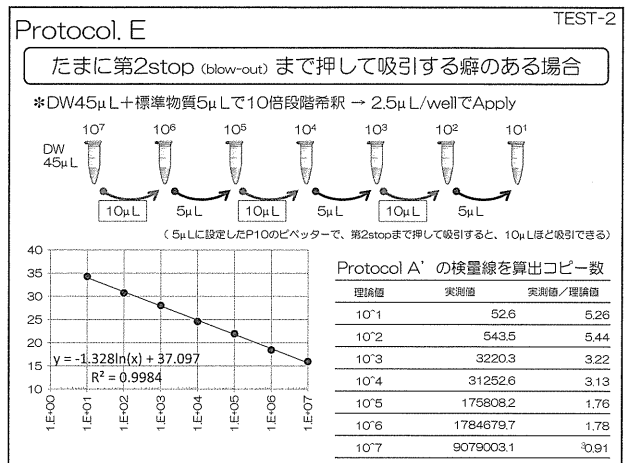
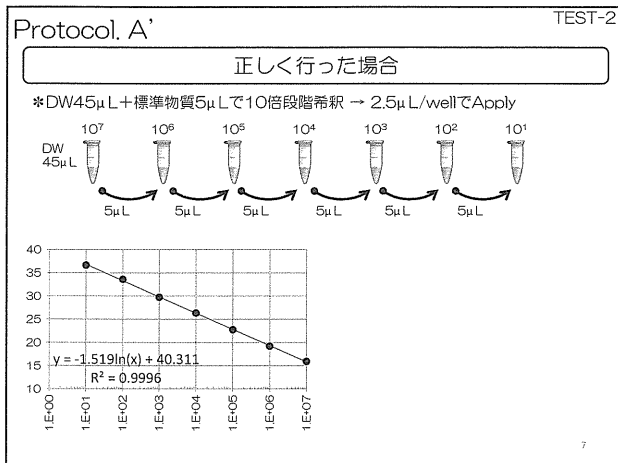
ノロウイルスリアルタイムPCR トラブルシューティング集

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
●陰性コントロールのウェルが陽性になる	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質のコンタミネーションによるピペッター、チューブ類の汚染 ◆標準物質のコンタミネーションによる試薬類の汚染 	<ul style="list-style-type: none"> ■ピペッター、チューブ類、試薬類の交換(汚染物質の除去) ■実験室レイアウトや動線の見直し(試薬調製と標準物質の添加を別室で行うなど汚染物質を持ち込まない) ■作業工程の見直し(反応液→検体サンプル→標準物質の順で調製) ■作業工程ごとに専用のピペッター、チューブ類を使用 ■同一安全キャビネット内で全操作を行う場合は十分なUV照射 ■オートクレーブの使い分け(試薬調製用と汚物用) ■標準物質や検体由来核酸の分取・分注時は安全キャビネットのファンを止める(エアロゾル発生防止)
●低濃度(10コピーや10 ² コピーDNA)の標準物質が検出不能	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の氷冷
●標準曲線の傾きが急(各希釈のCt値の間隔が3.3以上)	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の氷冷
●標準物質のCt値が低め、あるいは高め(濃度が理論値とは異なる)	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆試薬類の管理が不適切(反応試薬、プライマー&プローブ) ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆濃度計算ミス 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質、試薬類の管理の見直し(保管温度、使用期限、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈の各段階でチップを交換(キャリーオーバー防止) ■作業記録をつける(ダブルチェック)
●標準物質間(GIとGII)でCt値に差	<ul style="list-style-type: none"> ◆プライマー・プローブの劣化 ◆プライマー・プローブレミックスの劣化 	<ul style="list-style-type: none"> ■新たに合成したプライマー・プローブの使用 ■試薬の使用期限を順守
●標準物質の測定値がばらつく(相関係数R ² が0.990以下)	<ul style="list-style-type: none"> ◆不適切なピペット操作による試料添加量の誤差 ◆標準物質不適切な希釈操作 ◆測定機器の温度ブロックの汚染 ◆測定機器の不具合 	<ul style="list-style-type: none"> ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈系列の調製時に液の攪拌とスピンドウンを確実に実施(ピペティングはしない) ■測定機器の温度ブロックの清掃 ■測定機器の定期点検の実施

Test Design	
Test-1 ピペットの故障などを原因とする場合	
Protocol. A	正しく行った場合
Protocol. B	ピペットが3割増で吸ってしまう場合を想定 (その1)
Protocol. C	ピペットが3割増で吸ってしまう場合を想定 (その2)
Protocol. D	ピペットが壊れている場合を想定
Test-2 検査する者のテクニカルエラーの場合	
Protocol. A'	正しく行った場合
Protocol. E	たまたま第2stop (blow-out) まで押して吸引する際のある場合
Protocol. F	10 ⁵ のtubeを飛び越して希釈した場合を想定
Protocol. G	10 ³ と10 ⁴ の順を逆にしてApplyした場合を想定

	Test 1				Test 2			
	A	B	C	D	A'	E	F	G
Ct値 (実測値)								
10 ⁻¹	36.58	33.79	33.26	37.37	36.6	34.3	32.9	36.6
10 ⁻²	32.26	30.93	30.61	32.94	33.6	30.7	29.9	33.6
10 ⁻³	29.07	27.65	27.20	28.84	29.7	28.0	26.5	26.4
10 ⁻⁴	25.47	24.55	24.10	25.23	26.4	24.6	23.1	29.7
10 ⁻⁵	21.99	21.32	20.84	21.68	22.8	22.0	ND	22.8
10 ⁻⁶	18.31	18.16	17.84	18.53	19.2	18.4	19.4	19.2
10 ⁻⁷	14.91	14.94	14.56	15.14	15.9	16.0	15.8	15.9
検量線	$y = -1.551 \ln(x) + 39.798$ 38.798	$y = -1.371 \ln(x) + 37.107$ 37.107	$y = -1.365 \ln(x) + 36.633$ 36.633	$y = -1.593 \ln(x) + 40.348$ 40.348	$y = -1.510 \ln(x) + 40.311$ 40.311	$y = -1.328 \ln(x) + 37.097$ 37.097	$y = -1.203 \ln(x) + 35.231$ 35.231	$y = -1.469 \ln(x) + 39.826$ 39.826
R ² 値	0.9992	0.9998	0.9995	0.9966	0.9996	0.9984	0.9904	0.9315
Protocol A (for A')で検量線を算出コピー数								
10 ⁻¹	8.0	48.1	67.7	4.8	11.2	52.6	130.7	11.2
10 ⁻²	128.7	304.4	373.2	83.1	82.3	543.5	945.3	82.3
10 ⁻³	1008.4	2520.8	3371.2	1169.7	1048.4	3220.3	8702.5	9773.5
10 ⁻⁴	10301.0	18563.1	24804.4	12024.8	9773.5	31252.6	80828.1	10484.4
10 ⁻⁵	96950.0	149258.6	203680.5	118009.6	103908.1	175808.2		103908.1
10 ⁻⁶	1039009.9	1145378.2	1408850.0	903471.7	1079425.0	1784679.7	967051.7	1079425.0
10 ⁻⁷	9328541.2	9116796.9	11675674.1	8046948.4	9377542.7	9079003.1	10302534.9	9377542.7





結果と考察

* 研修の失敗例は、Protocol F、もしくは、Gが候補

Protocol	R ² 値	検量線	備考
F	Good (0.99)	No Good	R2値はgoodだが、検量線が不正になる。
G	Bad (0.93)	OK	R2値は低くなるが、検量線は正確に近い状態になる。

* 見ている人に気が付かれずに実行するには、工夫が必要。
(別のことに注目させているうちに済ませる等) (特にProtocol Fの場合は、特に)

* Protocol Gでは、決定係数から検量線の妥当性が担保できないが、最終的なコピー数の算出に影響がなくなる。

(感想) いくつかのパターンを想定しても、失敗例にはならず、驚きました。検量線が引けない理由の殆どが、テクニックやピペットではなく、測定機器等の不具合や標準物質の失活などが多いのではと、感じました。

追記 (余談ですが、最近、リアルタイムPCR関連で当センターで問題になっていることを記載します。皆様のラボでも同じようなことが発生して、解決したなどの話題がありましたら、ご教示いただくと幸いです。)

* 昨年度から、当センターでは、下記の理由からリアルタイムPCRに8連tubeを導入しました。
・ 96 well-plateより低コスト
・ 検体と陽性Controlを、同時進行で、別の人が準備が可能 (汚染防止と時間短縮)

* しかし、頻繁に濡れる (参照; 下記の写真)

* メーカーと相談しても解決せず

* ブロックが汚染する心配
→ 主にPlateを使用する方針に戻すことを検討中。

リアルタイムPCR法の基礎と応用

国立感染症研究所
感染症疫学センター
木村 博一

1

地方衛生研究所の機能強化について (平成9年3月14日厚生省発健政第26号)

地方衛生研究所設置要綱

I. 設置の目的

地方衛生研究所は、地域保健対策を効果的に推進し、公衆衛生の向上及び増進を図るため、都道府県又は指定都市における科学的かつ技術的中核として、関係行政部局、保健所等と緊密な連携の下に、調査研究、試験検査、研修指導及び公衆衛生情報等の収集・解析・提供を行うことを目的とする。

II. 業務

一 調査研究

(1) 地方衛生研究所は、次のような調査研究を行うものとする。

1. 疾病予防に関する調査研究
2. 環境保健に関する調査研究
3. 生活環境施設に関する調査研究
4. 食品及び栄養に関する調査研究
5. 医薬品等に関する調査研究
6. 家庭用品、化学物質等に関する調査研究
7. 健康事象に関する疫学的調査研究
8. 健康の保持及び増進に関する調査研究
9. 地域保健活動の評価に関する調査研究
10. 試験検査方法に関する調査研究
11. その他必要な調査研究

2

PCRの考案者と歴史

考案者: Kary Banks Mullis

1983年ドライブ中に原理を考案

Sci Am. 262(4):56-61, 64-5, 1990.

1987年最初の論文発表

Mullis KB, Faloona FA. Methods Enzymol. 155:335-50, 1987.

1988年Science誌発表

Saiki RK et al., Science. 239(4839):487-91, 1988.

1993年ノーベル化学賞受賞

Kary Banks Mullis

1944年12月28日生

ジョージア工科大卒・UCLA大学院修了

PCR開発時シータス社勤務



3

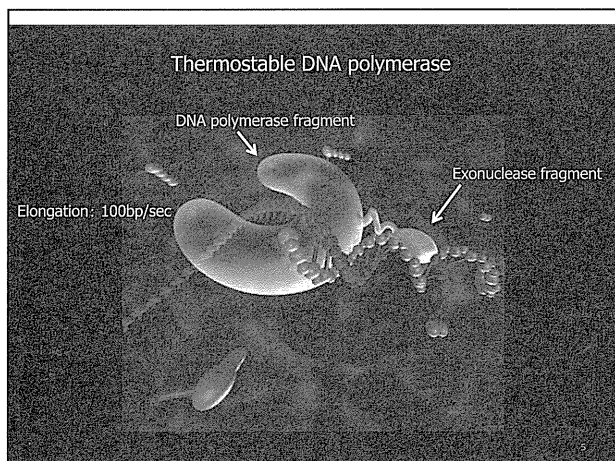
PCR法の特徴

- ・ (標的) DNAを特異的に増幅
- ・ 迅速(数時間)
- ・ 反応系と実験プロセスが単純



広範囲の医学研究・検査に応用可能

4



リアルタイムPCR法の測定原理

6

PCR産物(amplicon)増幅効率について

$$[DNA \text{ (amplicon)}] = [DNA]_0(1+e)^C$$

[DNA]₀=初期鋳型DNA量(数)

e=増幅効率

C=サイクル数

サイクル数	相対量 (増幅効率:100%)	相対量 (増幅効率:85%)
10	1,024	~500
20	1,048,576	~200,000
30	1,073,741,824	~100,000,000
40	~1,099,511,628,000	~50,000,000,000

7

Real-time PCR法の特徴と応用範囲

特徴

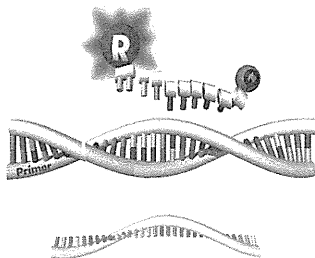
- ・高感度 (Nested PCRとほぼ同等)
- ・定量的
- ・特異的 (hybriprobe, TaqMan Probe)
- ・多検体同時検出
- ・迅速

応用範囲

- ・種々のウイルスゲノムの検出・定量など
- ・SNPs (single nucleotide polymorphisms)検出など

3

TaqMan ProbeによるリアルタイムPCR法の原理

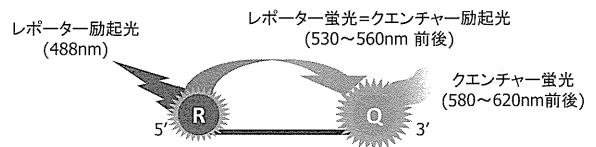


From: Applied Biosystems, modified

TaqMan Probe の構造・性質

- ・励起光照射によりTaqMan Probeのレポーター蛍光色素が蛍光を発する。
- ・レポーターの蛍光波長がクエンチャーの励起波長に近い場合、クエンチャー励起エネルギーとなり、レポーターの蛍光が抑制される。

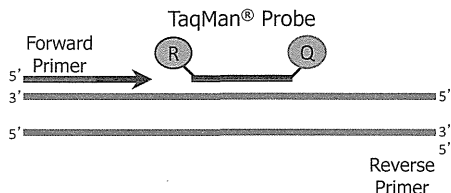
蛍光共鳴エネルギー転移現象 (FRET)



From: Applied Biosystems, modified

TaqMan ProbeとPrimerの設計

- ・目的の配列を含む領域でPrimer・TaqMan Probeを設計する



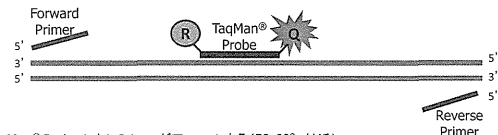
PCR primer (T_m=58~60°C)
目的配列を含む150bp程度の領域を増幅するように設計

TaqMan Probe(T_m=68~70°C)
5'末端側にレポーター蛍光色素、3'末端側にクエンチャーを色素を付加

From: Applied Biosystems, modified

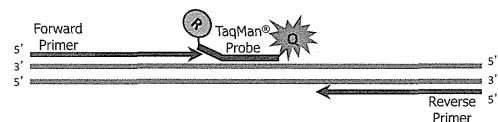
TaqMan PCR Assay

TaqMan® ProbeはPrimerよりも先にアニールする(68-70°C付近)



TaqMan® Probeの次にPrimerがアニールする(58-60°C付近)

Primer部位にTaq DNA polが結合して伸長反応が進む



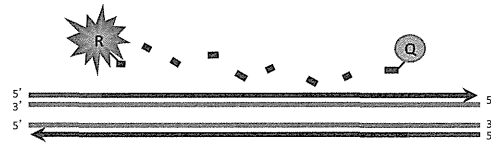
From: Applied Biosystems

TaqMan PCR Assay

DNA Polの伸長方向にDNAがあると、分解される(5'-3' exonuclease activity)



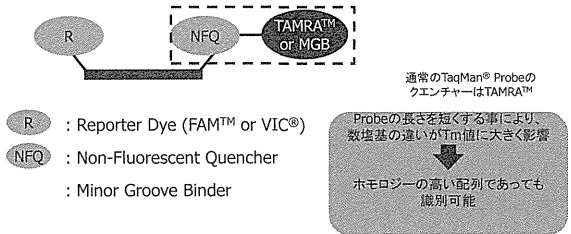
TaqMan®Probeが分解されるとレポーターの蛍光が発せられる



From : Applied Biosystems, modified

TaqMan MGB Probeの特徴

- Tm EnhancerであるMGBを付加し、より短いProbeを設計可能
- 短いProbe長により1塩基置換でもTm値の差が顕著
- NFQの採用により、バックグラウンドを低く抑えることが可能

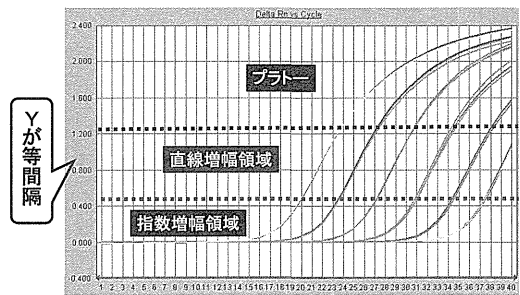


Summary of TaqMan Chemistry

- TaqMan Probeが分解されることによって生じる蛍光を検出する
- 従来のPCR反応より、特異性が高い
- 蛍光量がPCRの増幅量を正確に反映する
- 2種類の蛍光を用いて2 probeアッセイを行えば、サンプルの有効利用やコストダウンが可能(SNPsのタイピング)。
- Primer/Probe濃度の検討は不要(シングルプレックスの場合)

From : Applied Biosystems, modified

リアルタイムPCR増幅曲線

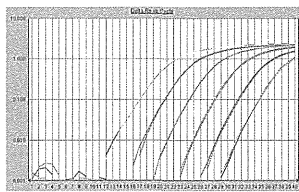


16

Principles of Real-time PCR

PCR: theoretical...
 $DNA_n = DNA_0 (1+e)^n$

n : Cycle No.
 DNA_n : PCR products at n cycles
 DNA₀ : initial copy No.
 e : PCR amplification efficiency



PCR産物が指数関数的増幅サイクルにおいては...
 PCR産物量と初期量とサイクル数の間には高い相関性がある
 ウイルス遺伝子定量:理論値で増幅効率100%になるよう設計
 増幅長(100bp程度)

17

Real-time PCR using Fluorescence Probes

- Real-time PCRでは、PCR産物量を蛍光データに変換し、蛍光強度を測定する
- PCR産物量を蛍光データに変換するための Probe

- SYBR® Green assay
- TaqMan® assay



18

標準曲線用プラスミドコントロール作成法

19

Ct値と標準曲線の目安

$DNA_n = DNA_0 (1+e)^n$

Threshold Line

増幅効率100%: Ct30で10³コピー

Threshold Cycle (C_T)
N values for DNA_0

20

Quantitation of Target Gene by Standard Curve

C_T value: 29

6424 copies (Initial No)

DNA_0 (Initial No)

21

反応条件の設定のための試験

22

Optimization of annealing temperature

56°C
58°C
60°C

23

Quantitation of Target Gene by Standard Curve

$DNA_n = DNA_0 (1+e)^n$

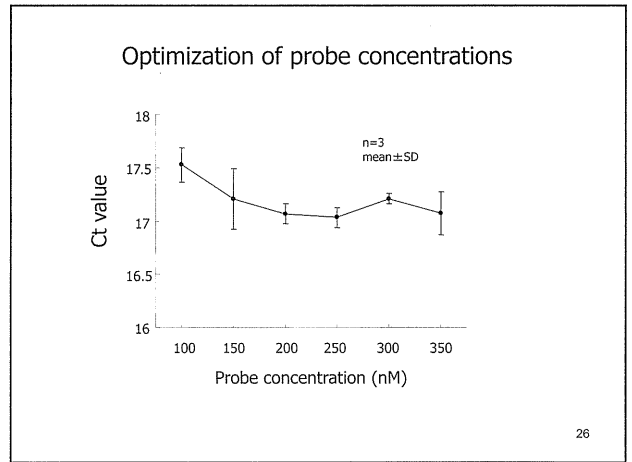
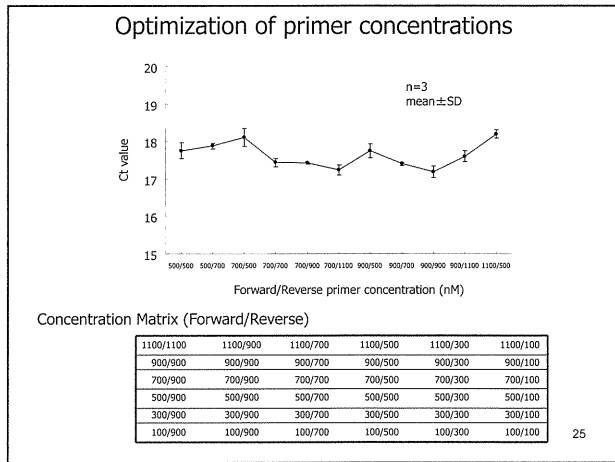
PCR効率が100%なら
 $DNA_n = DNA_0 \times 2^n$

↓
サイクル数の差が初期量の差を反映する
1サイクル→2倍
3.3サイクル→10倍

↓
サイクル数の差から初期量の差を求めることも可能

From: Applied Biosystems

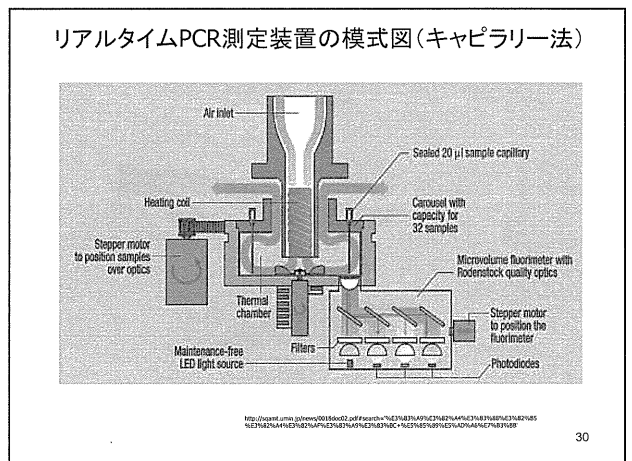
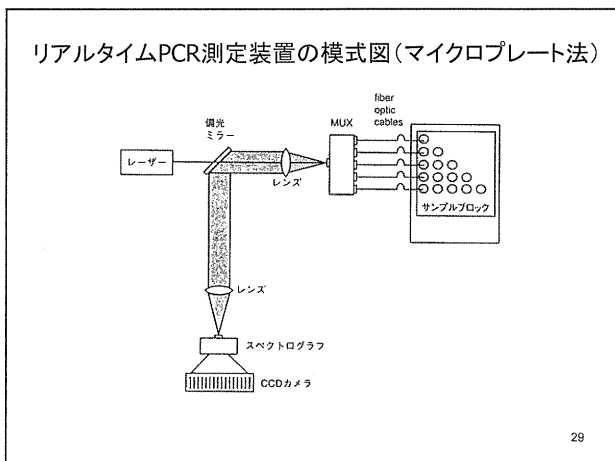
24



リアルタイムPCR測定装置について

27

- ### リアルタイムPCR測定装置のバリエーション
- ・光学(光源)系(レーザー、ハロゲンランプ、LED)
 - ・検出光学系(CCDカメラ、レンズ+蛍光強度計)
 - ・反応容器(マイクロプレート、キャピラリー)
- 28



測定装置のトラブルシュートと保守点検について

- ・光学系:光源の劣化、検出装置の劣化、光軸のずれ
- ・増幅系:測定容器の温度制御



定期的な機器保守点検が必要

31

試薬などに関する注意点

- ・プライマー、プローブの保存管理
適切な濃度と温度管理(-80°C)
繰り返し凍結融解を避ける
蛍光プローブの遮光保存
- ・陽性コントロールの保存管理の徹底(-80°C)
適切な濃度と温度管理
繰り返し凍結融解をしない
- ・エアロゾル発生をさせない
試料間とウエル間のコンタミネーションを回避

32

試薬取り扱い・コントロール希釈の注意点

- ・最初に、希釈液をチューブに入れ、テンプレートを加えてよく混合する
- ・スピンドウン操作とエアロゾル対策の徹底
チューブ間の検体由来鑄型やDNaseコンタミを避ける
- ・コントロール段階希釈時はチップを交換する

33