

6. 平成27年度 第二回 研究班会議

厚生労働科学研究費補助金 健康安全・危機管理対策総合研究事業

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

平成27年度 第二回 研究班会議 プログラム

日 時：平成28年1月8日（金）13時00分から18時00分まで

場 所：国立感染症研究所共用第2会議室

*各発表時間には質疑応答10分程度を含みます。

1. 中田勝巳（厚労省）ご挨拶
2. (13.05-13.30) 佐多徹太郎（富山衛研）
本年度の研究班の活動—調査と体制について
3. (13.30-14.00) 小淵正次（富山衛研）
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について
4. (14.00-14.30) 木村博一（感染研）
シーケンス・分子系統樹解析(NJ法)に関する外部「精度管理」調査について
5. (14.30-15:00) 山下照夫（愛知衛研）
手足口病ウイルスに関する外部「精度管理」調査（案）について

<休憩 15.00-15.20>

6. (15.20-15.50) 森本 洋（北海道衛研）
昨年度のサルモネラ外部「精度管理」調査について（トラブルシューティングを中心に）
7. (15.50-17.20)
 - 1) 荒川英二（感染研）(20) 試料用コレラ菌株の特徴と選定について
 - 2) 大西 真（感染研）(20) コレラ菌の感染研から地衛研への発送について
 - 3) 勢戸和子（大阪公衛研）(30) コレラ菌に関する外部「精度管理」調査結果について
 - 4) 森本 洋（北海道衛研）(20) 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
8. (17.20-17.50) 磯部順子（富山衛研）
赤痢菌に関する外部「精度管理」調査（案）について
9. (17:50-18:00) 佐多徹太郎（富山衛研）
まとめと今後について

平成 27 年度 第二回 研究班会議 概要

日 時：平成 28 年 1 月 8 日（金）13 時 00 分から 18 時 00 分まで

場 所：国立感染症研究所共用第 2 会議室

<(Q)質問、(A)回答、(C)コメントを追加した>

1. 厚労省担当官（吉住）：地衛研は感染症法の改正の伴い、重要な位置づけとなってきている。今後の外部精度管理調査に関わる種々の書類に関するひな型を作成していただいているところで、重要な研究班であると認識している。
2. 佐多（富山衛研）：本年度の研究班の活動—調査と体制について（配付資料 1）。本年度の研究体制、昨年度の成果の概要、そして今年度の初めに提案した今年の課題（外部精度管理調査のテーマ、方式、運営や実施体制等の意見集約等）について説明。その後、ウイルスと細菌の小班会議、第一回班会議、トラブルシューティング研修 WG 会議、衛微協での発表概要、総会時の精度管理部会での報告と議論、今年の予定成果概要、今後の予定についてまとめて紹介した。
3. 小淵（富山衛研）：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について（配付資料 2）。昨年リアルタイム PCR をテーマとした外部精度管理調査の結果、10 地衛研担当者に集まってもらい、トラブルシューティング研修を行い、その評価を行った。さらに追加として、新人教育研修に関する調査を班会議参加者に依頼し、その概要を報告した。(Q)研修結果と経験年数との関連について、(A)今回の研修参加者では関連はなかった。(C)うまく結果が出なかった方は、種々の原因があるが、トラブルが自分の技術の問題として把握されていない場合も考えられる。研修を通じて、客観的に自分の検査技術に注意を向けられるようになることを期待している。(C)研修を受けたあと人事異動になる例が多いので、提言には人事異動についての配慮が必要と記載してほしい。これは自治体の問題でもあり、かつみずから検査体制を壊すようにしているとも思える。(C)OJT 担当者によって教え方も異なるので、研修マニュアルも必要と思われる。人事が固定しないよう研究所内での異動の必要もあろう。(A)この研修方法は良かったと思えるがこれを地衛研全体で行うのは難しい。
4. 木村（感染研）：シーケンス・分子系統樹解析(NJ 法)に関する外部「精度管理」調査について（配付資料 3）。本年実施したシーケンスと樹状解析の外部精度管理調査結果について報告。(Q)この研究班は今年が最後となるが、うまくいかなかった施設のトラブルシューティングはどうするのか。(A)次年度に研究が継続すればそこで研修の可能性はある。あるいは来年度はウイルス研修の年なので、簡単なトラブルシューティングができないかと考えている。(Q)うまくいかなかった施設は、決済をとおっているのか。トラブルシューティングができていないのか。(C)外部精度管理はやりっ放しが多いと言われている。(C)できれば次年度研修を実施していただきたい。担当者の教育に利用すればいい。(Q)施設として精度保証ができるところとできないところがあることに

- なるか。(C)所内決済時に生データを資料としているところはないのではないかと。
5. 山下(愛知衛研):手足口病ウイルスに関する外部「精度管理」調査(案)について(配付資料4)。手足口病の外部精度管理調査案の提示と種々の書類等を準備した。試料はRNA送付を予定しているが、室温でも輸送できないか検討したい。(C)FTAカードを使えば室温でRNAを送付できる。そのときは病原性がなくなるのでより楽。
6. 森本(北海道衛研):昨年度のサルモネラ外部「精度管理」調査について(トラブルシューティングを中心に)(配付資料5)。昨年の細菌(サルモネラ属菌)外部精度管理調査について研修が必要となるかどうかを検証した。議論の結果、試料の問題があるので、研修はしないことになった。(Q)細菌の精度管理体制はどうか。(A)民間のたとえば秦野研では特定病原体は取り扱わない。地衛研で実施する場合は予算やヒトの問題が大きいので病原体を使用した外部精度管理調査をどうするかという問題がある。(Q)輸送時に病原体名を記載しなければならないので検体配付は無理とおもわれる。(A)今回の輸送時には危険物(病原体)と記載したので問題はない。日臨技や水製薬では病原体を用いた精度管理が行われている。郵送時に内容物の記載は封をしたままで入れて置き、トラブル時に必要に応じてわかるようにしておけばいい。(Q)今回の調査は目的が多すぎた。もっと単純化が必要と思われる。(A)今回の検体は、2つの血清型のサルモネラミックスで、特殊な血清型 *S. cerro* であるが *S. paratyphi A* と同じような性質を持っているため、精度管理検体としては、非常によい問題であったと思う。特殊な株は *Infantis* であった。(C)こういった外部精度管理調査課題を作る場合、WGをつくって皆で検討する必要がある。1人で企画実施するのは実際は難しいということと思われる。(C)臨床検体を模擬検体として用いる場合は実施側の考え方が重要と思われる。たしかに精度管理の目的を明確にする必要がある。また最低の検査技術の維持が大切。(C)使っている試薬にも問題がありそう。また試薬の使用期限の問題もあろう。
7. 大西(感染研):試料用コレラ菌株の特徴と選定および感染研から地衛研への発送について(配付資料6)。日本で「コレラ菌」とカタカナで記載した場合は、O1に凝集し、かつコレラ毒素を産生するか、コレラ毒素遺伝子を保有するとの条件を満たした株を指す。つぎに、細菌名である *Vibrio cholera* とコレラ菌の違いについて説明。これを踏まえて試料の菌株選択を行った。次に検体(菌株)の発送手順について、バイオセーフティ室と協議のうえ、現行の感染研の規定を簡略化した業務の実施状況を説明した。(Q)感染研の業務がかなり大変であったことがよくわかった。(A)すべての地研への菌株の送付については、送付に係る部署との周知な打ち合わせと準備及び協力と書類の工夫により、可能であることが判明。専門の事務方がいたので対応可能であった。ただし村山庁舎からの発送は、マンパワーの問題として困難であろう。(C)この輸送の規定が作られた時から状況は変化し、経験も積んだので、これを機会に全体を簡略化の検討をしてもよさそうに思う。
8. 勢戸(大阪公衛研):コレラ菌に関する外部「精度管理」調査結果について(配付資料

7)。(Q)マニュアルに複数のプライマーを記載して欲しいという要望があった。(A)稲葉型に対する血清は経験から、力価が落ちるのが他より早いように感じている。今回の凝集を確認できなかった地研も稲葉型では未確認なので、血清が古いことが原因かも知れないし、またそのように思っている地研もある。(Q)血清型 O1 コレラで両方陰性だった3施設はどう扱うのか。(A)血清型別が難しい、ラフなコロニーを拾った可能性がある。また、血清が古いと特に稲葉の血清で判定が難しくなることを経験しているので、結果の解釈については注意が必要である。(Q)血清の保存・保管については、維持も大変なので、どうするか検討すべきではないか。(A)陽性コントロールとして、加熱死菌を作製しチェックして使用することを考えている。コレラ菌の場合、加熱死菌が長期間保管できないと聞いている。(Q)ブロックでまとめて抗血清を購入し、小分けするという対応はできないか？(C)陽性コントロール菌株のチェック(バリデーション)など、難しい問題もある。ブロックでの小分けという対応は、精度管理として、機関で対応することは許されるのか？(A)小分けすると、何か問題が起きた時にどこが責任をとるかなど、問題がある。(C)行政検査に期限の切れた抗血清(試薬)を使用すること自体、問題である。(C)しかしながら、すべての抗血清を期限内で対応するには費用がかかりすぎる。(A)陽性反応では問題はないが、陰性としたときの問題は危惧される。抗血清については予算のこともあり、今回、PCRでの結果が良好だったので、O1、O139の確認は、PCRで行うことでもよいかと。(Q)結果が出せなかった機関について、その菌株を送り返してもらおうなど、原因の追及が必要であるとおもうが。(A)とりあえず、新しい抗血清での凝集を確認してもらおうことを依頼する。

9. 森本(北海道衛研): 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(配付試料8)。(C)輸送中の温度変化と検査結果の因果関係について、検討したデータはこれまでないということが前提でまとめさせていただいた。記録計の不備により、データとして集計できなかったところが複数存在する。機械による記録のバリデーションはどうすればよいか?全体温度の均一性については、難しいところもあると思われるが。(C)記録計のバリデーションは、温度のバリデーションとして標準温度計を使う、次はこの標準温度計の検定が必要となる。感染症体制のアンケートでは、これらの検定は予算がないために実施していない機関が多かった。(A)検体が到着してから、すぐに冷蔵庫に保管した機関で温度差が大きかったようである。コレラ菌の場合、この温度差が、結果に何らかの影響を与えた可能性は大いに考えられる。(Q)来年も温度調査は実施するか?(C)温度計を持っていない機関も多かった。(C)食品を搬入する保健所では保有しているが衛研では必要ない?(C)研修はブロック毎にすべきではないか。

10. 磯部(富山衛研): 赤痢菌に関する外部「精度管理」調査(案)について(配付試料9)。コレラ菌の外部精度管理調査を下敷きにして赤痢菌の調査案を作成し紹介した。(Q)本当に赤痢菌で実施しますか?(A)いつかはやらなければいけないのではないかと思う。

問題は何を目的として、どの菌株を選ぶかではないかと思う。(C) 赤痢菌は、もはや大腸菌なのではないか？

11. 佐多（富山衛研）：まとめ。活発な議論を有難うございました。外部精度管理調査は地衛研の検査技術維持向上および検査担当者の教育研修にも役立つことは明かとなった。ただ地衛研の経験者が何人かで WG を作って主体的に計画を立てて行う必要がある。もちろん感染研には手伝ってもらうが感染研だけではできない。新規配属職員の OJT 教育にもやや不安がありそうなので、地衛研として全体を考え、地衛研の経験者が主導してガイダンスを作り、検査担当者の技術の維持向上とともに、発生動向調査や健康危機管理対応としても役立つようにしていく必要がある。今後ともご協力をお願いしたい。

「外部精度管理調査」研究班 各位

お忙しいところ、年末ぎりぎりになって申し訳ありませんが、下記に関する調査にご協力をお願いします。この研究班でお願いするのはこれが最後になろうかと思えます。

来年1月8日の班会議では、次年度以降の外部精度管理調査の作業手順書(一次案)として、ウイルス関係は「手足口病」を、細菌関係は「細菌性赤痢」について、ご担当の方に発表していただく予定です。以下の2点について、ウイルス小班の方は手足口病、細菌小班の方は細菌性赤痢について、班会議の前にご意見を伺いたいと思えます。勿論、たとえばウイルス小班の方が細菌性赤痢についてご意見いただける場合も歓迎します。また逆も同じです。

質問は下記の2点です。

1. 今後さらに検討し調査の完成にむけて議論していくこととなりますが、手足口病あるいは細菌性赤痢について、「外部精度管理調査」の「検討項目(外部精度管理として検討したい、すべき調査内容、ポイント等)」について、箇条書きでお知らせ下さい。

【ご回答】→手足口病あるいは細菌性赤痢(どちらかを消して下さい)

2. 「外部精度管理調査」を行うにあたり、上記の案を完成させるには、経験のある、ないし知識があって興味もあるなどの地衛研の方々、10名以内、WG委員として参加していただくことが大変重要です。そこで、手足口病あるいは細菌性赤痢について適切と思われる方を、必ず、1名以上ご推薦ください。勿論、自薦でも構いません。

【ご回答】→手足口病あるいは細菌性赤痢(どちらかを消して下さい)

勝手ながら、研究班会議では上記2点の結果についてまとめて報告させていただきますので、必ず、ご回答を、12月25日金までに、いただきたく、重ねてお願い申し上げます。

佐多徹太郎

富山衛研

2015.12.18

平成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
(26190601→H26-健危-一般-001・2年目)

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)
岸本壽男(岡山県環境保健センター) 宮崎義継(国立感染症研究所)
山本容正(大阪府公衆衛生研究所) 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) 木村博一(国立感染症研究所)
猿木信裕(群馬県衛生環境研究所) ?
協)水野哲宏(横浜市衛生研究所) (敬称略)
協)田原なるみ(東京都健康安全研究センター)
協)香月 進(福岡県保健環境研究所)
協)佐野一雄(名古屋衛生研究所)

研究協力者: ほかに地衛研および感染研の関係者

分担表

2015.8.24

担当小グループ	とりまとめ	担当(研究分担者と協力者)
体制小班 「精度管理」要綱 案作成 報告書	佐多 (富山) 14名	佐野(名古屋) 香月(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) 猿木(群馬) 倉根・宣嶋・梅山・大石・村上(感染研)
ウイルス小班 「精度管理」実施 要領・手順(案)作成 報告書	調 (山口) 24名	木村・野田・長澤・高橋(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・小淵(富山) 勝見(仙台市) 皆川・山下(愛知) 濱崎(福岡) 清水・松島(川崎)、水越(栃木)、小澤(横浜) 宣嶋・駒瀬・影山・吉田(感染研)
細菌小班 「精度管理」実施 要領・手順(案)作成 報告書	山本 (大阪) 17名	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) 望月(兵庫) 倉園(埼玉) 黒木(神奈川) 大石・大西・荒川・鈴木・(松井)・緒方(感染研)
総括・総合研究報告書作成	佐多 (富山)	各小班担当者(分担、協力)全員

のべ58名:ご協力ありがとうございました。報告書もよろしく。

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)

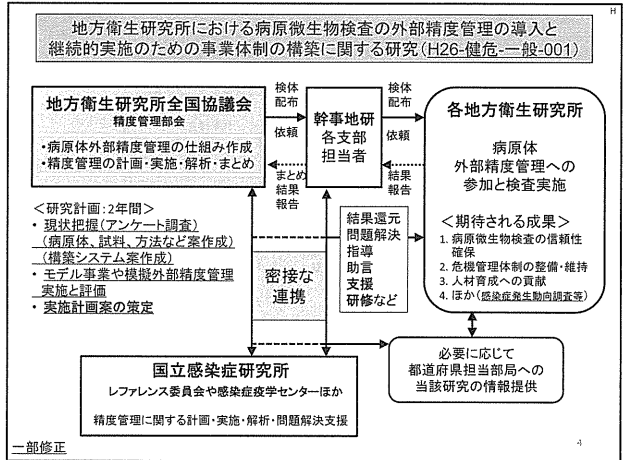
1. 研究代表者: 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)
2. 研究分担者: (地全協精度管理部会、感染研レファレンス委員会等)

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(また、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

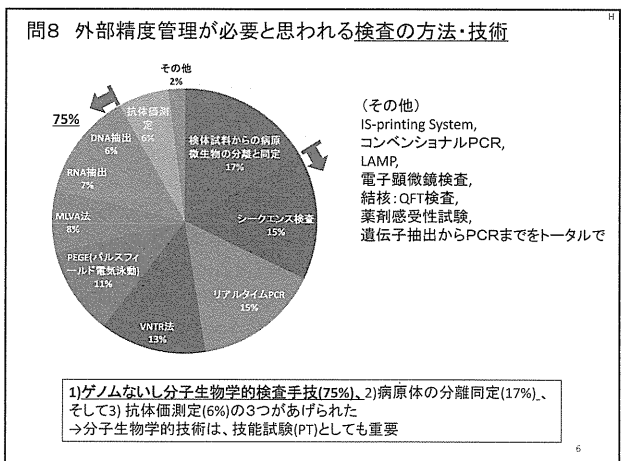
■ 地方衛生研究所の微生物検査の技術水準を維持・向上させるために、外部精度管理の手法を導入し、全国的な仕組みを構築し、地衛研全国協議会が主体となって、継続的に実施することの体制整備・構築およびその妥当性評価を目的。



C. 外部精度管理の対象感染症について

問6 地衛研が検査可能な(している)感染症対象疾患(→30疾患)
地衛研のおよそ80%以上ができる感染症を下記にリスト

疾患	検出可能		検査可能		検査不能		検査不能	
	できる	できない	できる	できない	できる	できない	できる	できない
二類 5疾病	61	15	80	38	8	83	16	3
三類 5疾病	78	1	99	47	0	100	18	1
四類 43疾病	70	6	92	46	1	98	18	1
五類 (定)	61	13	82	43	3	93	17	0
指定 感染症	67	9	87	47	0	100	17	0



ウイルスおよび細菌の外部精度管理調査の実施 (H26)

1. ウイルス

- リアルタイムPCR法によるノロウイルス遺伝子定量
- NoV遺伝子挿入プラスミド配布し、定量値、Ct値、標準曲線、相関係数、試薬、機器、ほかを報告
- 59地衛研が参加し報告(37/47, 8/19, 14/14)

2. 細菌

- 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
- 試料として人由来糞便(胃腸炎患者を想定)対象病原体はSalmonella Infantis, Cerro
- 11地衛研(精度管理部会機関)
- 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

試料A GI定量値の分布(べき乗変換, Log₁₀)

種別	検出数
Salmonella Infantis	11
Salmonella Cerro	0
Salmonella	11

種別	検出数
Salmonella Infantis	3
Salmonella Cerro	0
Salmonella	8

- 20機関(33.9%)の定量値の一部あるいはすべてが1SD基準値範囲外であった。
- 検査検用の標準物質の劣化、ピペ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。
- さらに事後のアンケート調査・解析中。
- 標準品の再配布を行った。

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 表1
「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(神奈川衛研) H9(1997)年3月(最終年度)

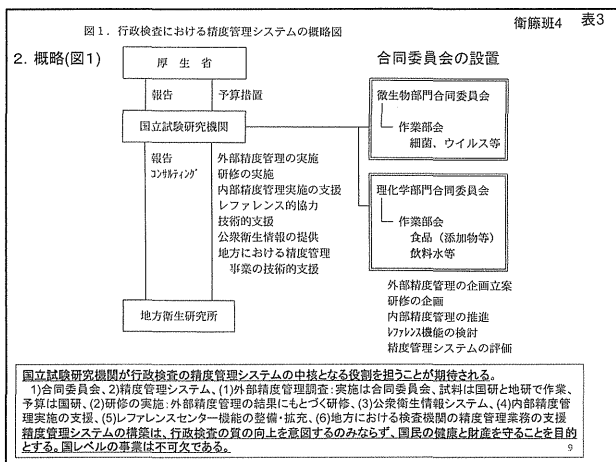
目次

PDF化し配布

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(総論) 51
5. 外部精度管理調査「微生物部門:細菌系」 55
6. 外部精度管理調査「微生物部門:寄生動物系」 70
7. 外部精度管理調査「理化学部門:食品添加物」 83
8. 外部精度管理調査「理化学部門:農薬」 95
9. 内部精度管理マニュアル作成(総論) 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的な考え方 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. 研修 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、供試菌株参考表
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、参考調査票
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、参考調査票
理化学部門(農薬)外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考調査票
2. 研修資料
研修に関するアンケート調査集計結果
希釈アムール、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



H26年度のまとめ 1 (20150401) H26研究報告書から一部修正

- 地衛研の検査技術・正確性の維持に不安(人および予算の減少による)
- 感染症の検査には、これまで検査基準も外部精度管理もなかった
- 感染症検査は、人由来臨床検体で、可能な限り、種々の方法を用いて病原体を検出し、診断治療や発生動向調査に役立てるもの
- 感染症検査は、定性的なものである(定量的なものではない)
→食品等の「精度管理」と同じではない(精度=precision,個々の分析値のばらつき)
- 近年、迅速性の観点から病原体の遺伝子検査が多くなった
- 遺伝子検査は、定性的であるとともに、半定量的な検査法にもなる
- 検査手技・技術のほか、試薬や、検査機器の管理等が重要
→いわゆる「内部精度管理」の実施が必要
- 迅速化
省力化
安定性
- および検査担当者のレベルの維持および向上(人材育成)
→教育・研修(OJT)は難しくなっている
- 感染症法改正(平成26年11月) 感染症に関する情報の収集体制の強化 病原体検査指針に準拠(基準や「精度管理」が含まれる) 平成28年4月施行。
→H9にも「行政検査における精度管理システム構築に関する研究」が行われたが事業化にはいたらなかった(??予算、組織?)
→今回は感染症法改正・病原体サーベイランスに保わる「精度管理の導入」?

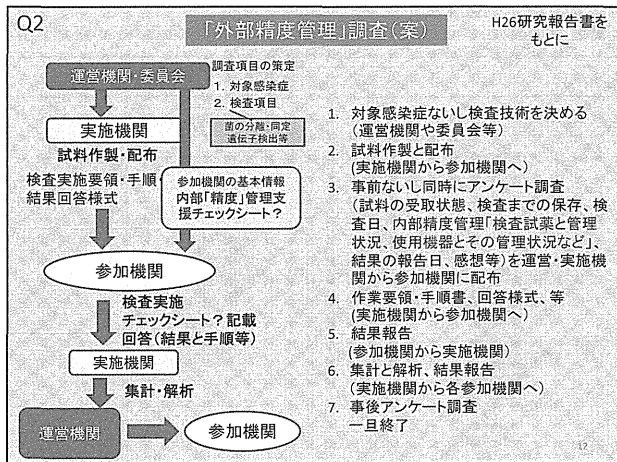
Q2 まとめ から 提案 (20150401) H26研究報告書から改変20160108

<対応案>

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、

1)「外部精度管理」、2)「内部精度管理支援」、3)「研修」の3つを関連・一体化させた導入が役立ち、ひいては人材育成に役立ることが重要

- 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
→外部機関による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
- 3)トラブルシューティング研修は、検査担当者の知識・技術の補完と問題解決能力を向上させ、検査能力を高める



Q2*6 外部「精度管理」調査と関連した研修(案)

検査担当者等による
トラブルシューティング研修

これまでの研修等は、座学 or 座学と実習
一人材育成、OJTとの関連から—

- 検出良好な機関代表と検出に不都合があった機関代表を実施機関でWGの選出(計10名以内:少ない方がいい)
- 報告結果と事後アンケート調査をもとに振り返り調査を各自事前にプレゼン資料作成
- 半日程度の研修に集合(日帰り?)
- プレゼン、質疑応答、議論(これを研修とする、同じ正解はない?)
- 内容を各自まとめ直し、実施機関に報告
- 実施機関のファシリテータが最終検討報告書を作成
- 別の研修会ないし衛生微生物協議会で実施機関の代表が報告し、報告資料を配付
- 必要に応じて次の調査に生かす

経費の予算額次第で
1. 各支部で実施?
2. 1カ所のみ複数のWG?
3. 実習を追加?
4. HPの活用など

検査担当者等による
解析検討を含む研修
昨年度の調査について
(ノロウイルス、サルモネラ菌?)

計10名以内
振返り調査・検討
結果良好参加機関
結果不都合参加機関
結果・手順・チェックシートの参加者各自再検討と
プレゼン資料作成

OJTの補完
地衛研・感染研
ネットワーク維持

研修会(半日程度) →1.5日
実習
参加各機関で報告をまとめる
(復命に利用・職場等への裨益効果)

実施機関
外部「精度管理」の総括
運営しない実施機関による報告
(研修会や衛協協等)
報告資料配布・蓄積、WEB公開

20150422→0612 Q1-Q8について 第一回研究班会議にむけて

Q1: 外部「精度管理」にかかわる文言案「精度」以外に何が考えられるか?
→精度管理、検査の精度、精度評価、品質保証、適格性、信頼性評価、信頼性確保、検査の質、検査の質の優良性評価、検査の「品質管理」

Q2: 外部「精度管理」調査、内部精度管理、研修の一体化?
→おおよそ良い

Q3: 外部「精度管理」の対象とすべき感染症の選択優先基準?
→適切であるが、問題もある

Q4: 外部精度管理調査の運営組織と実施組織の案?
→運営組織は、地全協と感染研(と厚労省)
→実施組織は感染研
→経費は厚労省か、参加費負担も可
→実施時期は9-10月
→回数は年1回(ウイルスと細菌を交互に?)

Q5: 外部精度管理検討項目は→概ね可

Q6: 研修案P26についてのご意見→概ね可

Q7: 担当者追加募集→意見あり

Q8: 自由意見→多くの意見あり

→整理したのち、報告書等に記載予定。

Q4 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」調査の導入と継続的実施のための事業体制の構築-6月案-

厚生労働省
↓ 事業費等?
↓ 運営組織
↓ 実施組織

一部改変

候補:
地衛研を対象とする
外部「精度管理」調査委員会
国立感染症研究所(4フレックス室)
(疫学センター5、6室)、ほか
地衛研全国協議会精度管理部会
地衛研の代表
外部機関(法人、会社等)

継続的に実施可能な組織・予算・人員
(感染症発生動向調査の維持にも重要)

2015.6.12班会議での結果
1. 地全協・精度管理部会2
2. 地全協と感染研の委員会
(厚労省)10
3. 感染研・フレックス委員会0
4. NPO法人1
5. ほか?1

「外部精度管理」調査
1. 試料配布
手順書
内部精度管理調査
支援・確認等
→
2. 結果報告
←
3. 結果還元
集計報告
→
4. 研修
⇔
5. 報告
改善
⇔

各地方衛生研究所
1. 外部精度管理参加
2. 内部精度管理実施
3. 研修参加

シネゲスとコレラ

<期待される成果>
1. 病原微生物検査の信頼性確保
2. 危機管理体制の整備・維持
3. 人材育成への貢献
4. ほか(感染症発生動向調査)

検査担当者等による
解析検討の研修

必要に応じて
都道府県担当部局への
情報提供

Q3 「外部精度管理」調査の対象とすべき感染症(優先性の基準)

- 法的行動制限等が必要になるもの(一類、二類、新、指定感染症)
- 感染拡大の可能性が高い
- 重症化する
- 社会的な影響が大きい
- 頻度が高く、多くの地衛研で検査が行われているもの
- 症候群でどの病原体かを明かにする必要があるもの(感染性胃腸炎等)
- 調査試料として配布できるもの(特定病原体等の運搬基準)
- など

ほか
1) 感染症検査に必要な技術(技能試験など)は必須
1. 遺伝子検査に係るもの
2. 病原体の分離・同定、ほか

2) 研究班で継続的に行われているものは当面对象外
ウイルス: インフルエンザ、麻疹、風疹、狂犬病 等
細菌: レジオネラ、下痢原性大腸菌、結核VNTR 等

3) 発生が稀で、発生したときは感染研が担当すべきものとして対象外
一類、四類感染症の一部が相当

→最終的な整理が必要

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

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

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)」

平成27年度 第一回ウイルス小班会議

日時: 平成27年6月20日(水)13時30分から17時30分まで
場所: 国立感染症研究所共用第3会議室

プログラム(変更しました)
1. 佐多徹太郎(富山衛研): 本年度の研究班について
2. 吉田 弘(感染研): 病原体検査指針(仮題)の準備状況について
3. 木村 博一(感染研): 本年度の外部精度管理調査について-1
4. 皆川 洋子(愛知衛研): 本年度の外部精度管理調査について-2
5. ほか

配布資料
1. 佐多、2. 吉田、3. 木村、4. 皆川、5. プログラムと出席者リスト、6. ウイルス小班回答集計、7. 分担表(2015.5.20時点)

ウイルス小班(20150520)

パワポアンケートの回答結果および小班会議結果まとめ

1. 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

→ 手足口病

2. 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
→ (昨年度はノロウイルスでリアルタイムPCR)なので、
シーケンス

→2.木村、3.山下プレゼン参照

19

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)」

平成27年度 第一回細菌小班会議

日 時:平成27年5月29日(金)13時30分から17時30分まで
場 所:国立感染症研究所共用第3会議室

プログラム

1. 佐多徹太郎(富山衛研):本年度の研究班について
2. 吉田 弘(感染研):病原体検査指針(仮題)の準備状況について
3. 森本 洋(北衛研):
1)「昨年度の外部精度管理調査を振り返って」
2)「本年度の外部精度管理調査への一提案」
4. 勢戸 和子(愛知衛研):本年度の外部精度管理調査について
5. ほか

配布資料

1. 佐多、2. 吉田、3. 森本、4. 勢戸、5. プログラムと出席者リスト、6. 細菌
小班回答集計、7. 分担表(2015.5.29時点)

20

細菌小班(20150529)

パワポアンケートの回答結果および小班会議結果まとめ

1. 対象感染症について(細菌)

→3番目までの集計として

1)細菌性赤痢7、2)EHEC6、3)コレラ4、4)チフス3

2. 検査技術(細菌)

→3番目までの集計、

- 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

→4.森本、5.勢戸プレゼン参照

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)」

平成27年度 第一回 研究班会議

日 時:平成27年6月12日(金)13時00分から17時30分まで
場 所:国立感染症研究所共用第2会議室

1. (13.00-13.50)
佐多徹太郎(富山衛研):本年度の研究班の活動—体制と調査
2. (13.50-14.40)
木村 博一(感染研):本年度の研修案と外部精度管理調査案
3. (14.40-15.30)
山下 照夫(愛知衛研):外部精度管理調査案の検討
<休憩 15.30-15.40>
4. (15.40-16.30)
森本 洋(北海道衛研):昨年度の外部精度管理調査と研修案
5. (16.30-17.20)
勢戸 和子(大阪公衛研):本年度の外部精度管理調査案
6. (17.20-17.30)ほか

22

第36回衛生微生物技術協議会 2015.7.24 仙台

感染症法改正と病原体検査指針

④検査の信頼性確保

～研究班の活動報告と感染症法改正～

地方衛生研究所の皆様のご協力ありがとうございます

調恒明座長

1. 富川昭二
2. 皆川洋子
3. 吉田弘
4. -----

富山県衛生研究所
佐多徹太郎

第66回地方衛生研究所全国協議会総会・精度管理部会

日時:平成27年11月3日(火) 12:20～13:10
場所:ベストウエスタンプレミアホテル長崎 3F ホワイエ
(長崎県長崎市宝町2-26 095-821-1111)

議題:1)厚生労働科学研究進捗状況報告

1. これまでの活動について
 2. ウイルス小班研修WG—グループミーティング・実習等
 3. ウイルス小班調査WG—シーケンス調査
 4. 細菌小班WG—コレラ菌の同定
 5. 「外部精度管理」実施体制について
 6. 今後の予定について
- 2)精度管理部会について
3)その他

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)」

平成27年度 第二回 研究班会議

日時:平成28年1月8日(金)13時00分から18時00分まで
場所:国立感染症研究所共用第2会議室

タイトルは短くしてあります

1. 中田勝巳(厚労省):挨拶
2. 佐多徹太郎(富山衛研):本年度の研究班の活動—調査と体制
3. 小淵正次(富山衛研):トラブルシューティング研修
4. 木村 博一(感染症研):シーケンス解析等
5. 山下 照夫(愛知衛研):手足口病の外部精度管理調査案
6. 森本 洋(北海道衛研):昨年度のサルモネラ外部精度管理調査
7. 1)荒川英二(感染症研):コレラ菌試料の発送
2)大西 真(感染症研):コレラ菌試料の発送
3)勢戸和子(大阪公衛研):コレラ菌の外部精度管理調査
4)森本 洋(北海道衛研):試料発送中の温度変化と検査結果
8. 磯部順子(富山衛研):赤痢菌の外部精度管理調査案
9. 佐多徹太郎(富山衛研):まとめほか

25

H26、27年度の研究結果の概要

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
→10月8日から21日まで調査実施。全79地衛研から回答。報告資料配付。
2. ウイルスのWG会議と外部精度管理実施
→ノロウイルスのリアルタイムPCRで実施。10月上旬に公募し59地衛研の参加。
→シーケンス・系統樹解析調査実施、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検討
3. 細菌のWG会議と外部精度管理実施
→サルモネラ属菌分離同定について実施。11地衛研参加。
→コレラの調査実施、74地衛研参加。
→赤痢菌の調査案の検討
4. 外部精度管理実施要綱(案)の作成→提言?
→これまで地衛研で行ってきた研究資料を収集し、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
→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

26

平成27年度の予定表

1. 研究班員の異動にともなう変更 平成27年4月
2. 交付申請書提出:平成27年4月24日金(22日夕方終了)
3. 小班会議 ウイルス:5月20日水 細菌:5月29日金の午後1:30(感染症研共用第3)
4. 第一回研究班会議 平成27年6月12日 午後1時から 感染症研共用第2会議室
5. 研究実施 体制小班はメール、ウイルスと細菌の調査実施 9月頃-10月
6. 精度管理部会 11月3日 長崎市 総会前1時間程度 進捗状況報告と議論
7. 事後評価資料の提出 12月28日
8. 第二回研究班会議 平成28年1月8日(金) 午後1時から 感染症研共用第2会議室
9. 報告書締切 平成28年1月15日(金)
10. 評価会用資料締切 ワードとパワポファイル 平成28年1月15日(金)
11. 研究評価会 平成28年2月22日 国立保健医療科学院

27

D. 感染症等の検査方法

問9 地衛研で行う感染症検査における標準作業手順書(SOP)の有無を教えてください。

問10-1 SOPを作成している感染症/リスト(多かつた順)

原位	番号	疾病名	県数
1	15	腸管出血性大腸菌感染症	16
2	82	感染性胃腸炎	16
3	12	鳥インフルエンザ(H5N1)	14
4	14	細菌性赤痢	13
4	16	腸チフス	13
4	17	パルチフス	13
7	78	風しん	12
8	77	風しん	11
9	31	重症熱性血小板減少症候群	9
10	38	チンギ熱	7
11	9	結核	6
11	20	A型肝炎	6
12	11	重症呼吸器症候群	5
12	36	チンギニア熱	5
12	37	つつが虫病	5
12	58	レジオネラ症	5

「一部あり」を加えると44%にあり SOPありは比較的大きい地衛研

問10-2 SOP作成の基となる根拠は何ですか。

WHO/CD Cなど 3%
論文 0%
地衛研独自方法 3%
病原体検査マニュアル 74%
その他 20%

「その他」
厚労省通知、国衛研マニュアル(ノロ)、
食品衛生検査指針、結核検査指針、
微生物検査必携

「病原体検出マニュアル」が大部分
→更新や維持管理は重要!

28

病原体検出マニュアル(平成15年12月9日発刊)

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

<前書き 吉倉元所長>
法律に基づいて、感染症の報告がなされる場合、報告は一定の基準に依らなければならない。又、感染症の報告は科学的な証拠、即ち、病原体検査、で裏打ちされたものである必要があるが、そうであれば、少なくとも日本の中では標準化したものを使うべきである。

<国立感染症研究所Web site>
病原体検出マニュアルは、感染症法に基づいて感染症の報告がなされる際の検査の標準化のために、国立感染症研究所と全国地方衛生研究所の共同作業で作成されたものであり、感染症対策に係る行政対応における大きな根拠となっております。本マニュアルを使用し、常に評価し、科学の進歩にあつたものに改善していくことが常に求められています。

→検出マニュアルは「日本の感染症法にもとづいた標準的な検査法」
→検査結果は正確で信頼に値する方法による
→感染症の検査の根拠にできるもの
→科学的進歩にあつたものに改善していくことが求められる。

29

G. 感染症検査の外部精度管理実施に関する課題等

V.4 (2015028Final)

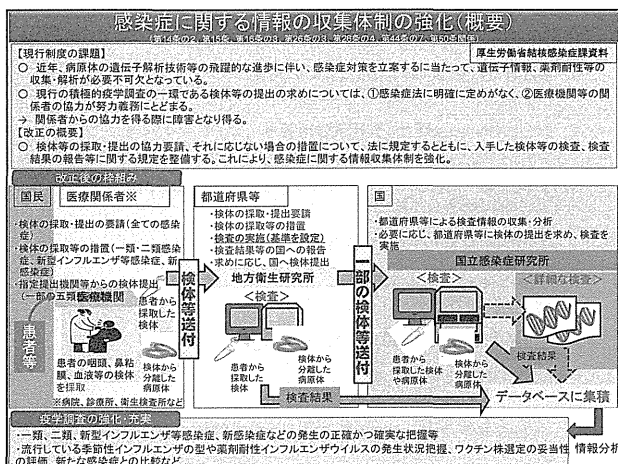
問28 感染症検査に関する外部精度管理への参加意向について

問29-1 細菌検査

「目的が明瞭であればほとんどが参加の意向」

→70%程度は現在の外部精度管理は不十分。研修とセットに。

30



H28年 厚生労働科学研究費補助金公募要項 20151222

<http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000107217.html>

IV 健康安全確保総合研究分野

4. 健康安全・危機管理対策総合研究事業

① 地域保健基盤形成分野

近年、国民の生活スタイルの変化、健康課題の変化、大規模な自然災害、食中毒事案の広域化、新型インフルエンザ等の新たな感染症の脅威など地域保健を取り巻く状況は大きく変化しており、地域保健行政は、多様な役割が求められるようになってきている。

こうした多様化する健康危機事象に対し、地域において適切かつ迅速な対応が可能となるよう、健康危機管理対策の研究を推進する。また、地域保健行政の方向性を明確化し、人材の育成、情報収集・情報共有体制や対応する組織の整備等に関する研究を推進する。

○ 地方衛生研究所における包括的な外部精度管理調査のひな形の作成、及び機能強化のための保健所等の他機関との連携のあり方についての提案により、地方衛生研究所の機能強化に資する。(P178, 181)

(1) 研究課題名

地方衛生研究所における精度管理の向上と機能強化に関する研究(28210201)

平成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
平成28年1月8日 第2回班会議

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

富山県衛生研究所 ウイルス部
小淵正次

1

昨年度のリアルタイムPCR外部精度管理調査の結果

参加機関: 59機関
配布試料: 試料A (NoV GIとGIIの混合試料)
試料B (NoV GIIのみ)
基準値: べき乗変換後の定量値→平均値±1SD

3データとも基準値外→10機関
2データが基準値外→3機関
1データのみが基準値外→8機関

試料A GI定量値の分布(べき乗変換, Log₁₀)
Mean ± SD: 2.85 ± 0.71
中央値(3.29)

試料A GII定量値の分布(べき乗変換, Log₁₀)
Mean ± SD: 3.90 ± 0.77
中央値(4.36)

試料B GI定量値(べき乗変換, Log₁₀)
Mean ± SD: 4.23 ± 0.99
中央値(4.67)

試料B GII定量値(べき乗変換, Log₁₀)
Mean ± SD: 4.40 ± 0.77
中央値(4.86)

昨年度の外部精度管理調査後の追加アンケート (自由記載の抜粋)

<問題なし>
・普段実施している方法で、精密性・正確性ともに良好な結果が得られた。

<基準値内でも低値>
・「試料AのG1定量値は基準値内ではあったものの、集計データより低い値であった。試薬の管理等見直しをしていきたい。」

<基準値内、コメント>
・今回はA判定でしたが、検査方法(PCRのプログラムやウェルの配置、検体数)、試薬の種類、保管方法など課題があると感じました。今後、検査レベルの維持・向上のためにも改善していく必要があると思います。感染症の先生方が推奨される方法等をご教授いただければ幸いです。

<基準値外、低値、希釈、検討中>
・当研究所の定量結果は、試料A、Bのいずれの定量値も基準値を1SD以上下回っていた。原因の一つとして、ピペットの精度異常でコントロールの段階希釈時に正しく希釈できず、想定よりも濃い濃度のコントロールを用いたことで相対的に試料の定量値が下がったことが考えられた。そのため、段階希釈に使用したピペットを蒸留水と天秤を用いて簡易的に精度測定をしたところ、P1000で450μl測った平均が440mg、P200で50μl測った平均が50mgであった。従って、これらのピペットを用いて段階希釈をしたことでコントロールの濃度が高くなったとは考えにくい。

3

<基準値外、原因不明>
・3測定値とも基準値外で、低い値になりましたが、このような結果になった原因についての明確なトラブルシューティングには至りませんでした。
・判定結果は判断できたが、べき乗変換を行った際の定量値の分布が中央値でなかった場合に、どこが不備で結果に反映したかの判断ができない。当所は中央値よりやや低かったが、改善すべき点が不明である。インフルエンザウイルスの外部精度管理のときのようにトラブルシューティングのような解説がほしい。

ウイルス精度管理研究小班追加コメント

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

4

平成27年度 外部精度管理調査実施後研修会(ウイルス検査)

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ための研修を行う。

実施内容
・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(第1日目)→参加者のパワポ発表、ブレインストーミング、ワークシートの活用
・実習・講義や全体討論を通して問題解決方法に対する理解を深める(第2日目)
・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→参加者は職場で研修が問題解決に役立ったが後日回答
・研修後のアンケート調査により今後の研修について検討する

実施日時および実施場所
平成27年9月10、11日(1.5日間) 国立感染症研究所村山庁舎講義室および実習室

参加機関
昨年度の外部精度管理参加機関から、判定結果に基づく下記分類基準の各群より選出した代表10機関

分類基準
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

研修担当者
研究班 ウイルス小班WG(進行役: 小淵、貞升、チューター: 塚越、水越、木村、長澤、総括: 佐多)

研修のポイント

1. 参加者のプレゼン内容(パワポのテンプレート6頁分を事前に配布し、記載依頼)
 - 1) 所属の状況
 - 2) 外部精度管理調査の提出結果データ
 - 3) 外部精度管理調査の標準曲線の図
 - 4) 外部精度管理調査の評価(受け取ったもの)
 - 5) 原因とおもわれるところ
 - 6) 自由意見(あらたな標準物質によるデータがあれば添付)
2. グループミーティング・ワークシート A4紙1枚(各自記入して完成)
 - 1) トラブル、2) 考えられる原因、3) 解決のための処置
→第1日目でわかったこと
→第2日目でさらに気づいたこと
3. 実習・講義
 - 1) 模範例および手技的失敗例のデモ、OJTの体験
 - 2) リアルタイムPCRの基礎講座
4. 全員で討論してリアルタイムPCRトラブルシューティング集の作成
→各参加者に配付し確認依頼
5. 研修後のアンケート調査
→第1日目が終わった後
→ひと月が経過した後(職場での研修内容の伝達など)
→さらにひと月後の対応まで調査(職場での改善は?)

6

グループミーティングシナリオ(第1日目)

A~C群を2分して、最初にグループ討論で昨年度の精度管理調査でうまくいかなかった原因や問題点を抽出し、進行役(員小、小淵)が意見を集約してトラブルシューティングをホワイトボードにまとめる。グループ内でまとめたホワイトボードを発表し、全体討論を行ってトラブルシューティングを完成させる。

- | 項目 | ポイント |
|-----------------------------------|--|
| 1. 問題点の抽出
(参加者パワポ発表 1人10分) | <ul style="list-style-type: none"> 標準曲線は正しく描かれているか一定量の取り扱い、定量値の持つ意味 作業手順書の流れ図→自分の原因がどのあたりだったか明示 試薬や試料(標準物質)等の保管方法、調製方法、使用方法に問題はないか。 ピペットの使用法、管理方法、点検方法のチェック。 |
| 2. トラブルシューティングの作成
(グループ討論 60分) | <ul style="list-style-type: none"> グループ内で抽出した問題点について、トラブルシューティングを作成する 参加者は自身のトラブルシューティングをまとめる(ワークシート)。 |
| 3. 各グループの発表(代表)
(全体討論 60分) | <ul style="list-style-type: none"> 復用に持ち帰りができるトラブルシューティングを目指す。 トラブルシューティングは正解ではなく、バラバラか。 職場でのトラブルシューティングやOJTを構築するもの。 検査の質の向上への動機付けと問題解決能力を高める。 |
| 4. 総括 | |
| 5. 研修後アンケート(1日目の実施) | |

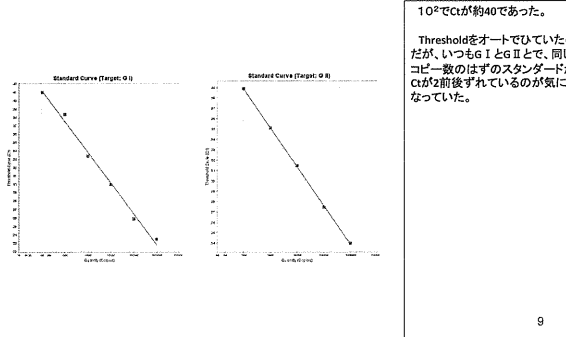
参加者パワポの事前確認(研修担当者間で問題点・解決法など共有)

分類	機関	当事者のコメント	研修担当者のコメント
A群	a	測定機器の不具合、PCの劣化	<ul style="list-style-type: none"> PC希釈系列の調製にはピペットによる誤差は避けること 希釈コントロールの機材はしっかり行うこと、場合によっては複数回実施 PC値の閉鎖、波形、サンプルの場所などはよく見ておく必要がある 「-20℃冷凍庫から新ししPC...」とあるが、PCの保存温度は-80℃が望ましい
	b	標準物質の希釈→チューブ、チューブを低吸着製品へ変更 解析一値の外れたものは標準曲線から外す	<ul style="list-style-type: none"> PCのCT値が高い(GI)→管理に問題あり 希釈後のPCにおいても同一希釈でCT値に多少のばらつきがみられる→測定チューブ(プレート)への追加に問題あり? PCでばらつきがあるということは検体に問題がある可能性がある 新しいPCで測定結果にばらつきが、全体的に強い気になっている。再度、原液から調製すべきと思う
	c	試料全ての測定値が高い→チューブ、チップが低吸着製品でなかったため(低吸着製品へ変更)。	<ul style="list-style-type: none"> PCのCT値が高い→管理に問題あり EOA標準曲線の同一希釈(高い濃度でも)でやばらつき→測定チューブ(プレート)の追加に問題あり? 希釈後のPCにおいて、GI、GIいずれもCT値が3.32以上離れている希釈ポイントがある→希釈に問題 PCのCT値をいくつかの濃度で見えておくと変化が気付きやすい PCでCT値が高くなってしまえば、管理、使用の注意に問題 希釈後のPCにおいても同一希釈でCT値にばらつきがみられる→測定チューブ(プレート)への追加に問題あり? リアルタイムPCRではチューブをオートグループする必要がある PCの増幅を都度確認していない 「増幅コントロールを作成する量が多く、作成後の検体に注意が必要 H11だけだけでなく、H23もNGが懸念になるのなら、コンタミネーションの可能性が高い PCを扱う器具や場所を別にする、などの対策を早急にすべきである
	d	EOAでは小分け分注したPC濃度が2倍高かったため、全て倍の測定値となった。	

昨年度の調査結果に対する参加者の自己評価例(参加者パワポより)

平成26年度厚生労働省研究費補助金(健康安全・危機管理対策)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-健康一般-001)
平成27年度 外部精度管理調査の研修モデルの評価

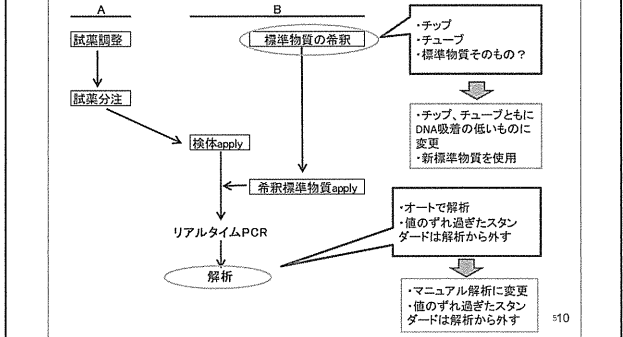
2. 外部精度管理調査の提出結果-2 (標準曲線の図)



参加者の自己分析例(参加者パワポより)

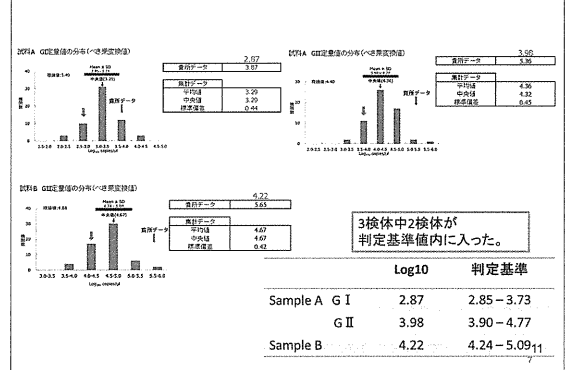
平成26年度厚生労働省研究費補助金(健康安全・危機管理対策)研究事業
「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施のための事業体制の構築に関する研究」(H26-健康一般-001)
平成27年度 外部精度管理調査の研修モデルの評価

5. 外部精度管理調査の結果について原因と思われること



参加者の検計例(参加者パワポより)

平成26年度厚生労働省研究費補助金(健康安全・危機管理対策)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-健康一般-001)
平成27年度 外部精度管理調査の研修モデルの評価



3検体中2検体が判定基準値内に入った。

グループミーティングによるトラブルシューティング

参加者のパワポ発表とプレインストーニング
ホワイトボードへまとめ
各グループの発表と全体討論
参加者各自のトラブルシューティング作成

実習・講義シナリオ(第2日目)

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

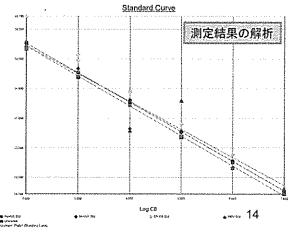
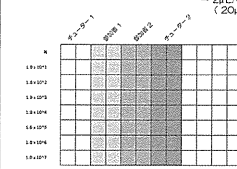
項目	ポイント
1. リアルタイムPCRのデモ (グループ見学、実技体験)	<ul style="list-style-type: none"> 試薬、試料(陽性コントロール)の取り扱い ピベットの正しい操作、段階希釈法 →OJTの体験
2. リアルタイムPCRについての講義 (講義、全体討論 120分)	リアルタイムPCRの原理、解析、メンテナンス、トラブルシューティングなどの基本を理解させる。
3. データ解析 (全体討論 60分)	段階希釈時の失敗が解析結果にどのように反映されるかを検証する。
4. 総括 (全体 30分)	2日間の研修のまとめ(チューターと参加者双方からの自由意見、感想など)

ラボ実習



標準物質の10倍希釈の調製
 チューター1: DW45 μ L+標準物質5 μ L
 参加者1: DW15 μ L+標準物質2 μ L
 参加者2: DW45 μ L+標準物質5 μ L
 チューター2: DW45 μ L+標準物質5 μ L (10²と10³の順が逆
 →2 μ Lのwell (20 μ L反応系))

失敗例

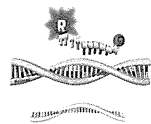


リアルタイムPCR基礎講座

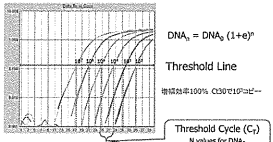
リアルタイムPCR法の基礎と応用

国立感染症研究所
感染症疫学センター
木村 博一

TaqMan ProbeによるリアルタイムPCR法の原理



Ct値と標準曲線の目安



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℃)
 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℃)
 適切な濃度と温度管理
 繰り返し凍結融解をしない

15

チューターによる検討事例の解説

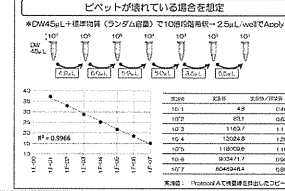
様々なエラーによる標準曲線への影響

目的と方法

様々な要因で、標準曲線に不具合が生じる。そこで、ピベットの不具合、不適切な操作などを想定し、標準曲線のデータに与える影響を検討した。

- Test-1 ピベットの故障などを想定とする場合 (3/10ターン)
- Test-2 検査する者のテクニカルエラーの場合 (3/10ターン)

Protocol D



結果と考察

特にProtocol E, Gで、標準曲線に不具合が生じる

標準物質を意図的にデタラメな希釈をしても、まますますの検出限界(POD)になる

「標準曲線が正確でない」問題に対しては、ピベットや手技的な理由よりも、機器や試薬の方に原因を追究する可能性が高い (各定検時の不具合や標準物質の劣化による)

※PODなどとしても、正しい測定値(Copies)が得られない場合もある。

今回のリアルタイムPCR法のトラブルシューティング集 (10月15日参加者へ送付)

トラブル	考えられる原因	解決のための措置
●陽性コントロールのフェルムが陽性になる	<ul style="list-style-type: none"> 標準物質のコンタミネーションによるピベーター、チューブの汚染 標準物質のコンタミネーションによる試薬瓶の汚染 	<ul style="list-style-type: none"> ピベーター、チューブ類、試薬瓶の交換(汚染物質の除去) 凍結融解レオットや乾燥の発生し(試薬瓶試薬の希釈を回避して凍結融解を完全回避) 作業工程の発生し(反応液-検体サンプル-標準物質の順で調製) 作業工程ごと(専用のピベーター、チューブ類を使用) 陽性安全キャビネット内で操作を行わずに十分な換気 オートクレーブの密閉(試薬瓶蓋用と検体用) 標準物質や検体サンプルの取り分けは安全キャビネットのフロンを止め(エアロソール発生防止)
●経濃度(10コピーや10 ² コピーDNA)の標準物質が出ない	<ul style="list-style-type: none"> 標準物質の劣化 不適切なピベット操作による希釈の誤差 溶液の濃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、凍結融解回数のための小分け分注保存) ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) 標準物質希釈の注意
●標準曲線の傾きが低くなる(各濃度のCt値の間隔が3以上)	<ul style="list-style-type: none"> 標準物質の劣化 不適切なピベット操作による希釈の誤差 溶液の濃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、凍結融解回数のための小分け分注保存) ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) 標準物質希釈の注意
●標準物質のCt値が低め、あるいは高めで標準曲線に不具合がある	<ul style="list-style-type: none"> 標準物質の劣化 試薬瓶の管理が不適切(反応試薬、プライマーブロープ) 濃度計算ミス 	<ul style="list-style-type: none"> 標準物質、試薬瓶の管理の見直し(保管温度、使用期間、凍結融解回数などの小分け分注保存) ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) 標準物質希釈の注意(検体用と試薬用を区別し、練習する) 標準物質希釈の注意(ダブルチェック)
●標準物質の間隔(GE)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/レオット/試薬の劣化 	<ul style="list-style-type: none"> 標準物質、試薬瓶の管理の見直し(保管温度、使用期間、凍結融解回数などの小分け分注保存) ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) 標準物質希釈の注意(検体用と試薬用を区別し、練習する)
●標準物質の測定値がばらつく(相対誤差率が90%以下)	<ul style="list-style-type: none"> 不適切なピベ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"> ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) 標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回数などの小分け分注保存) 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

17

参加者ワークシート例(最終版)

項目	問題点	考えられる原因	解決のための措置
1日目	標準物質の10 ² コピーが検出されない	濃度(量)の誤差が原因の可能性	標準物質の管理
	0.1, 0.5と10 ² の間隔が大きい	標準物質の劣化 ピベーターの不具合 標準物質の劣化 濃度の計算ミス	標準物質の管理 ピベーターの交換 標準物質の管理 濃度の計算ミス
	0.1が検出されない	標準物質の劣化	標準物質の管理
2日目	標準物質の10 ² コピーが検出されない	濃度(量)の誤差が原因の可能性	標準物質の管理
	0.1, 0.5と10 ² の間隔が大きい	標準物質の劣化 ピベーターの不具合 標準物質の劣化 濃度の計算ミス	標準物質の管理 ピベーターの交換 標準物質の管理 濃度の計算ミス
	0.1が検出されない	標準物質の劣化	標準物質の管理
3日目	標準物質の10 ² コピーが検出されない	濃度(量)の誤差が原因の可能性	標準物質の管理
	0.1, 0.5と10 ² の間隔が大きい	標準物質の劣化 ピベーターの不具合 標準物質の劣化 濃度の計算ミス	標準物質の管理 ピベーターの交換 標準物質の管理 濃度の計算ミス

赤字部分: 参加者に研修後約2か月に職場で行ったことを記載してもらい、11月末までに返送

研修後アンケートのまとめ

第1日目 グループミーティングについて

- ・グループ(参加者5名、進行役1名)→適切な人数で良かった。
- ・自分と同じ問題が出され、その対処法が聞けて良かった→参加者同士の話し合いは有意義
- ・他施設の問題点や対応など、とても参考になった。
- ・今回のトラブルシューティングは役に立つと思う。

- 理由:①評価されるだけでなく、改善すべき点が明確になる。
②どのトラブルも心当たりがあり、今後も起こるかもしれないので吸収できた。
③トラブル時のチェックポイントが参考になり、職場に持ち帰りたい。
④機材の管理、試薬、ピペットのことまで議論できてよかった。
⑤基本的なことを再確認でき、新たに得られた知見もあった。

第2日目 実習・講義について

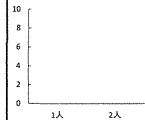
- ・試薬調製等の基本的手技がわかった→(少人数のため)デモ中にディスカッションできて良かった。
- ・リアルタイムPCR法の基本が理解できた。

研修全体について

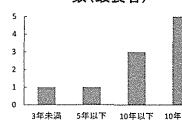
- ・リアルタイムPCR法に対する理解が深まった。
- ・試薬調製や機材の操作の技術が向上した。
- ・適切なトラブルシューティングが期待できる。
- ・手技などにおいて改善点がたくさん見つかった。
- ・研修内容は復命書の他、担当者間での打合せにより職場へ伝達(伝達講習会も2名あり)→職場での技術向上につながった。

参加者の所属状況

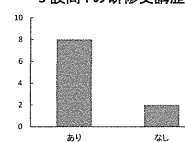
1 ノロウイルスPCR実施可能な職員数



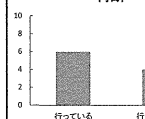
2 設問1の衛研経験年数(最長者)



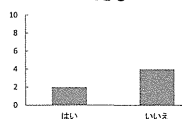
3 設問1の研修受講歴



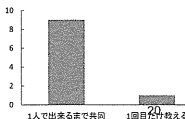
4 検査・結果確認・最終判断



5 最終判断者もノロ検査できる



6 未経験者の内部研修方法



今後の課題

・地研における新人の教育研修

新人向け研修

研修内容

研修マニュアル

トレーナーの研修

研究指導

外部精度管理調査研究班参加者へのアンケート 2015.12.2-14

～新規配属職員のOJTないし教育研修について～まとめ

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

職場の同じ部署に経験者がおられるときは1対1でOJTで検査指導、職場での教育研修に関する取り決めはない。新人研修の機会が必要と感じていて、指導者で決まるのは良くないので、マニュアル等があるといい。
(アンケートの内容と回答数、コメントは別紙、報告書に掲載します)

H27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
木村 博一
大石 和徳

H27年度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:調恒明(山口県)
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)
小淵正次(富山県)
皆川洋子(愛知県)
松島勇紀 清水英明(川崎市)
勝見正道(仙台市)
柴田伸一郎(名古屋市)
藤井理津志 岸本寿男(岡山県)
濱崎光宏(福岡県)
大石和徳 宮崎義継 駒瀬勝啓 影山努 野田雅博 長澤耕男 木村博一(感染研)

・今年度の新規精度管理調査

内容:地研で頻繁に行われているシーケンス・系統樹解析の
精度管理を行う。

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

精度管理(シーケンス・系統樹解析)実施手順

・ウイルス検査精度管理対象ウイルス:NoV
下記要領などを作成し、昨年度と同様に実施する。

- 1) 精度管理実施要領
- 2) 精度管理実施手順
- 3) 精度管理データファイル
- 4) 精度管理アンケート

1)~4)は9月までに作成済

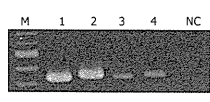
・9月参加募集
・10月中旬試料送付
・11月下旬データ回収
・12~1月データ解析
・1月中旬結果報告

H27ウイルス検査精度管理実施体制

- ・精度管理実施要領作成
- ・精度管理実施手順作成
- ・精度管理データファイル作成
担当:◎塚越・○長澤・貞升・野田・木村
- ・解析試料作製
担当:◎長澤・○小林・木村
- ・データ解析
担当:◎塚越・○清水(松島)・小林・長澤・野田・木村
- ・総括
担当:調・皆川・岸本・佐多・大石

配布試料について

- ・常法により、RNA抽出・RT-PCR(COG2F/G2-SKR)
- ・PCR産物を切り出し精製後、100倍希釈
- ・電気泳動上、非特異産物なし



H27年度 精度管理結果
-NoVシーケンス系統樹解析-

7

H27ウイルス検査精度管理応募実施機関

- 参加希望機関: 62機関
- 精度管理実施機関数: 62機関
- 精度管理参加およびデータ解析機関数62機関
(都道府県41機関, 政令指定都市15機関, 中核市6機関)

8

NS7(RdRp)のほぼ最後の部分で1塩基フレームシフト

NS7(RdRp)の一部分を共用かつ一塩基フレームシフトにより、ORF2が翻訳

9

本精度管理での解析領域の特徴

NS7(RdRp)の一部分を共用かつ一塩基フレームシフトにより、ORF2が翻訳

10

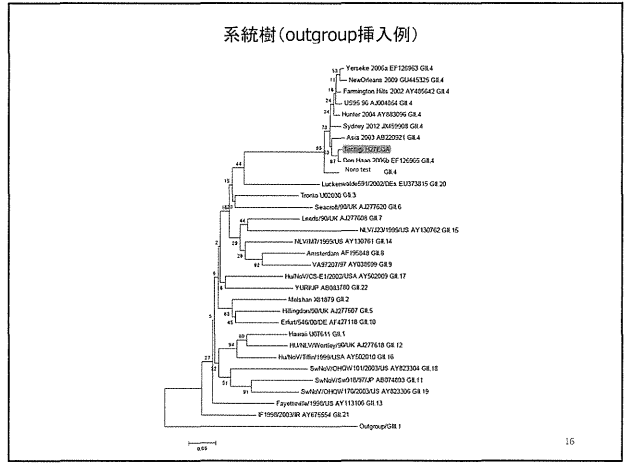
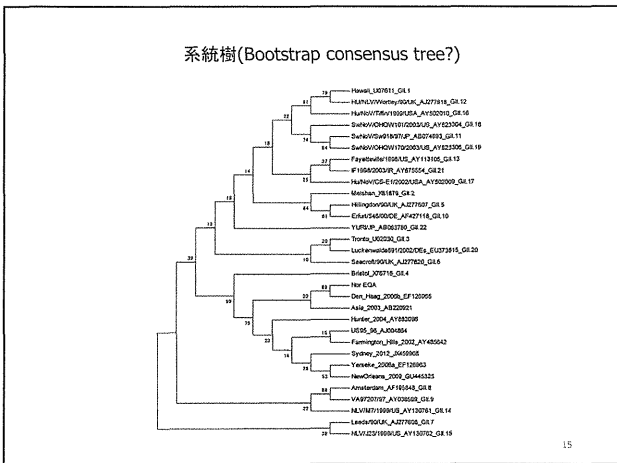
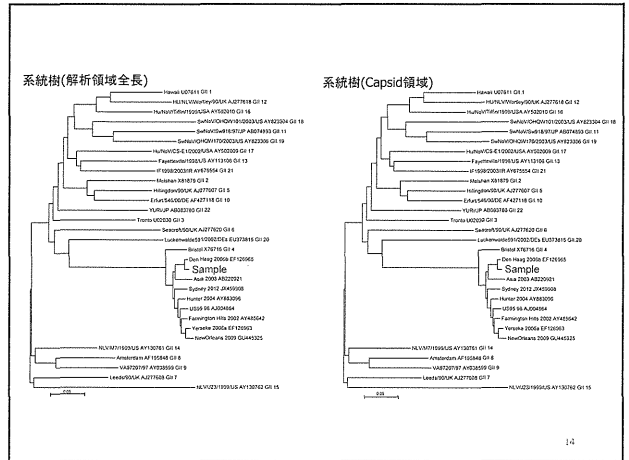
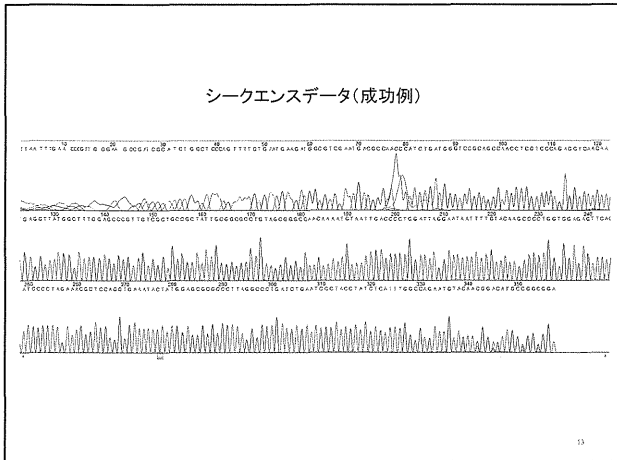
評価項目

1. シーケンス解析の精度
(解読塩基数、ミスリードやプライマー配列の有無)
2. 相同性検索の精度(塩基配列・アミノ酸)
3. 系統樹作成の精度(解析株の位置など)
4. Genotypingの精度

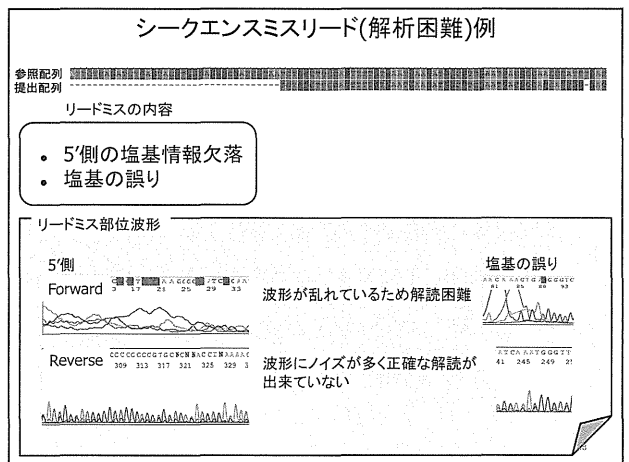
11

シーケンスデータ(失敗例)

12



- ### 解析結果
- シーケンス解析(理論値最大:338bp, 252~338bp)
 - 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
 - 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%)
 - 適切な系統樹解析: 59/62施設(95%)
 - 適切なgenotyping(GII.4): 62/62施設(100%)



シーケンス解析ミスと対処法

✓ 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

✓ 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

✓ 手技

精製など手技的不良による反応性の低下
→ 手技の統一・習熟、結果の見直し、再検査

19

判定基準(案)

1. シーケンス精度
 - a. ミスリードの有無 (1点)
 - b. 解析長 (320bp以上 or 280bp以上) (1点)
 - c. プライマー配列の有無 (1点)
2. 相同性解析
 - a. 塩基配列 (1点)
 - b. アミノ酸配列 (1点)
3. 系統樹解析精度
 - a. 解析株の位置 (1点)
 - b. 解析法の精度 (1点)
4. 解析株の遺伝子型の確度 (1点)

合計8点満点とする

20

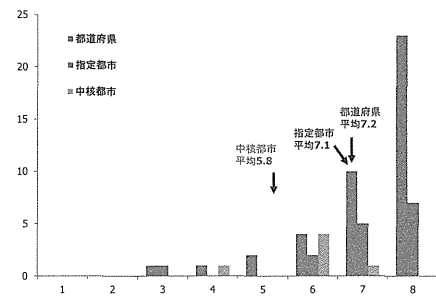
判定結果

- 8点: 30機関 (都道府県: 23, 政令指定都市: 7, 中核市: 0)
7点: 17機関 (都道府県: 10, 政令指定都市: 5, 中核市: 2)
6点: 9機関 (都道府県: 4, 政令指定都市: 2, 中核市: 3)
5点: 2機関 (都道府県: 2, 政令指定都市: 0, 中核市: 0)
4点: 2機関 (都道府県: 1, 政令指定都市: 0, 中核市: 1)
3点: 2機関 (都道府県: 1, 政令指定都市: 1, 中核市: 0)

平均: 7.0点

21

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



プライマー配列、解析長、ミスリードの有無、アミノ酸、塩基、系統樹、サンプルの位置についてそれぞれ1あるいは0点で評価。全部正解であれば8点となる。

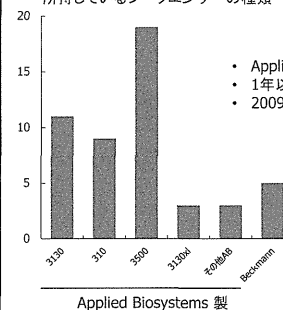
22

アンケート解析結果(50機関, 回答率81%, 50/62)
H27.12.17現在

23

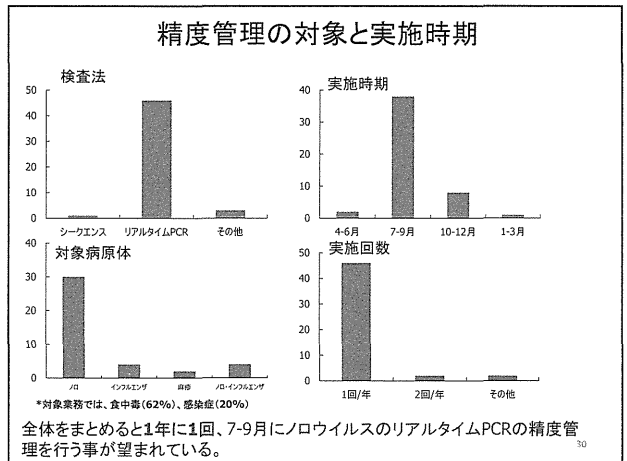
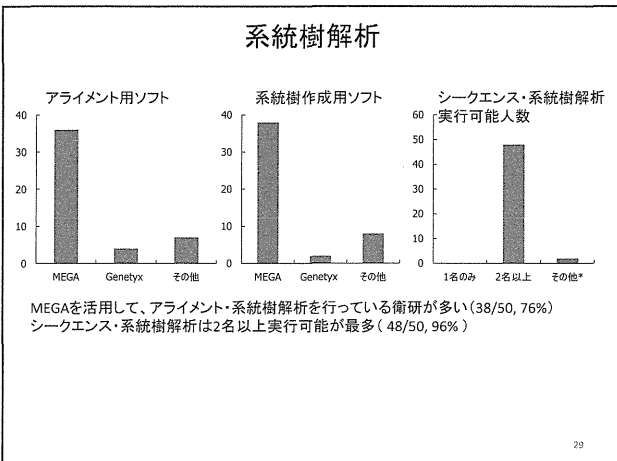
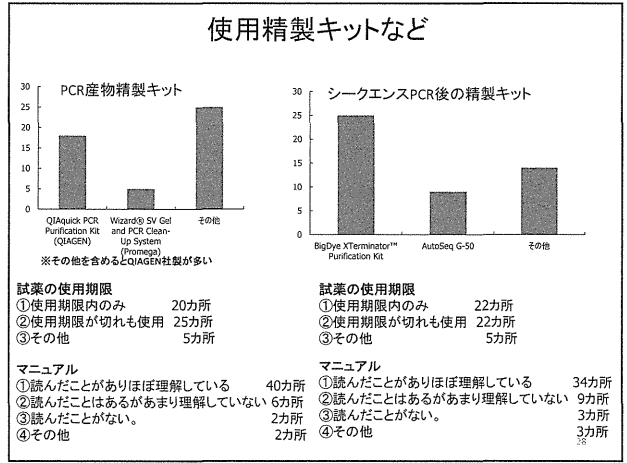
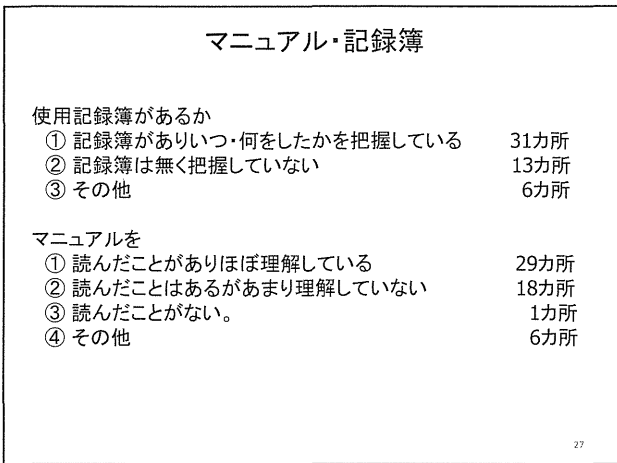
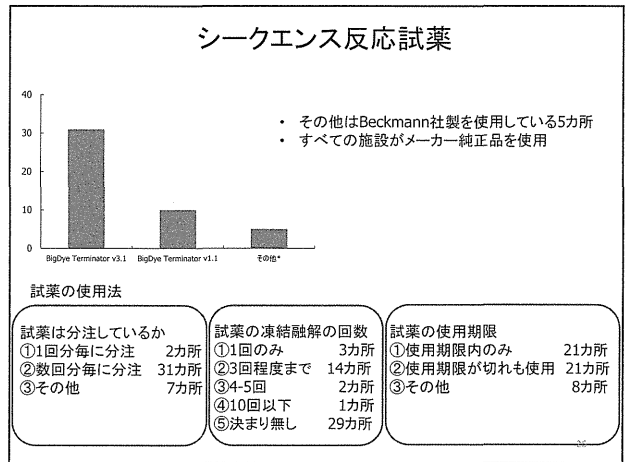
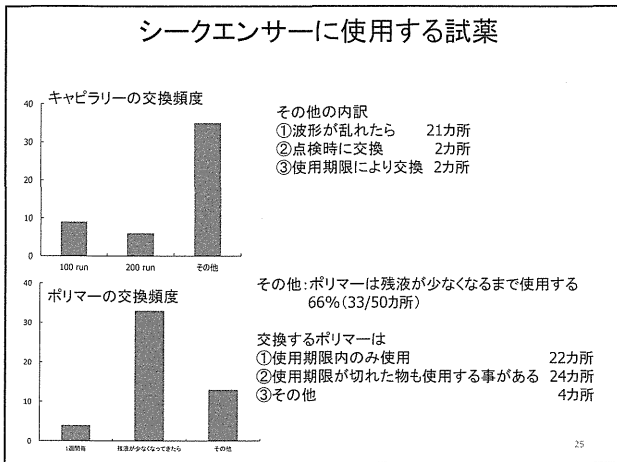
所持しているシーケンサー

所持しているシーケンサーの種類



- Applied Biosystems 社製が全体の90% (45/50)
- 1年以内の購入が6カ所、3年以内の購入が7カ所
- 2009年あたりで購入が多い

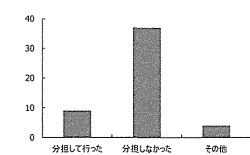
24



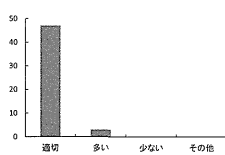
精度管理の実施

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



精度管理に関する業務量は適切で他の職員と分担せずに実施している。

31

コメント抜粋(1)

- 年度により、検体数に極端な多寡があり、計画的な試薬調達・使用ができていないことがよくわかった。すべての試薬、キャピラリー等の消耗品を規定の使用期限内の中で使い切ることができないのであるからDye Terminatorなど、特に希釈することなく使用してもよいのではないかと見直しているところである。せめて、BigDye添付のpGEM controlを毎回1つ入れてきちんとサイクルシーケンス以降の流れが実施できていることを確認するようにしたいと考えている。(A県)
- 使用頻度とコストの面からシーケンスにかかるすべての試薬を使用期限内のもので実施するのは困難。(B県)
- 全国の状況を見ることで試薬の保管温度や機器メンテナンス等、自所の方法の見直しにつながり、新たな気づきも多く、大変参考になります。行政依頼検査(食中毒・感染症)の検査についてはできる限り、期限内の試薬等を用いて検査を実施していますが、予算の関係上期切れでも使用せざるをえないのが現状です。(C県)
- シーケンスの基本的な操作、原理などの研修機会があるといいと感じました。(A市)
- 精度管理後の結果について、問題点が認められた場合、トラブルシューティングについて、指導、助言してもらえるようなサポート体制が必要だと思います。結果がよくなかった場合、当然、自分たちでトラブルシューティングは実施しますが、色々検討してもダメだった原因が突き止められないこともあります。(例えば、前回の精度管理で行われたノロウイルスのリアルタイム定量検査では原因の追究ができませんでした。)(B市)

32

コメント集(2)

- 精度管理の評価後にコメントしたい。(C市)
- 他にもシーケンスにかける検体が有ったので、それらと一緒にまとめて、シーケンスPCR産物の精製からシーケンスにかけるところまでをもらった。(D県)
- 通常の業務では型別まで行うことはなかなかないので、今回の精度管理はよい機会だった。(E県)
- シーケンス関係の試薬、特にポリマーは使用期限が短く、高価であるため、期限切れでもデータが読めれば使用しているのが現状である。当所ではSOPを整備中だが、試薬等の管理、使用に関しての規定は試薬等の性能に問題ないことを確認してから使用する等の規定を盛り込むことは可能なかご教示願いたい。(F県)
- マニュアルに従ってシーケンスを使った場合、コストが非常にかさむので、データに問題がなければカラムや試薬類は使用期限を越えて使用することが多い。(G県)

33

事後アンケートコメント抜粋(1)

- 基本的な検査技術(RNA抽出、リアルタイムPCR、コンベンショナルPCR、シーケンス解析)の確認を、各年でウイルスを変えて実施すれば地研でのウイルス検査技術がさらに向上すると考えます(年によってインフルエンザ、ノロウイルス、麻疹、風疹など)。感染研HP記載の病原体検出マニュアルについて検査機会の多い類については、基本的な検査の指針として全ての疾患について記載していただきたい(感染性胃腸炎にはロタウイルスだけでなく他の下痢症ウイルスの記載もおねがいしたい)。(H県)
- ウイルス検査の主流になりつつあるPCR法+Seq法は高感度ゆえのコンタミの問題を除き大きなツールとなっています。しかし、系統樹解析解析による遺伝子型別、得られた塩基配列情報の疫学的解釈等についても、最新の情報に基づくガイドラインが必要と思います。(D市)
- ノロウイルスの定量リアルタイムPCRの結果で行政処分が決定されるので、精度管理はノロウイルスのリアルタイムPCRが良いと思います。一方、ノロウイルス以外でも遺伝子解析結果が重要視されるようになってきているため、シーケンス解析の精度管理も必要と考えますので、ノロウイルスのリアルタイムPCRの精度管理と他のウイルスでも良いのでシーケンスの精度管理が交互に実施されれば良いと思います。(I県)

34

事後アンケートコメント抜粋(2)

- あまり濃すぎる陽性検体は必要ないと思います。(O県)
- 今回の精度管理は、通常ノロウイルスの検査に携わる4名で各々実施しました。シーケンスの結果は全員一致しました。今後とも外部精度管理の機会があればぜひ参加させていただきたいです。(K県)
- シーケンスの結果解析については、不慣れなため時間がとてもかかりました。(E市)
- Q10の「精度管理の頻度」については、同一項目は2年に1回とし、ノロウイルスとインフルエンザウイルスやシーケンスとリアルタイムPCRなど、内容を変えて交互に実施する形が良いと思われます。(L県)
- 実施時期については、感染性胃腸炎やノロウイルスの流行時期を外した年度前半にしてほしい。今後何らかのウイルスの外部精度管理を毎年1回、全国規模で実施してもらいたい(特にリアルタイムPCRを使用した精度管理)。(M県)
- 今後食中毒検査などにおいて、遺伝子解析を依頼されることも十分に想定されるので、今回のような遺伝子解析に関連する精度管理も、2~3年に1回程度実施していただきたいと思います。(N県)
- 当所では、ウイルスも細菌も同じ職員で担当しているため、この他に細菌部門の精度管理もあるので頻度としては、現在行われているインフルエンザウイルスとノロウイルスそれぞれ年1回が適当だと思います。(F市)

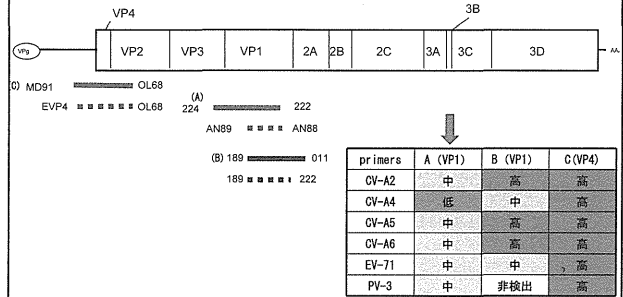
手足口病ウイルスに関する「外部精度管理」調査(案)について

愛知県衛生研究所
山下照夫、皆川洋子

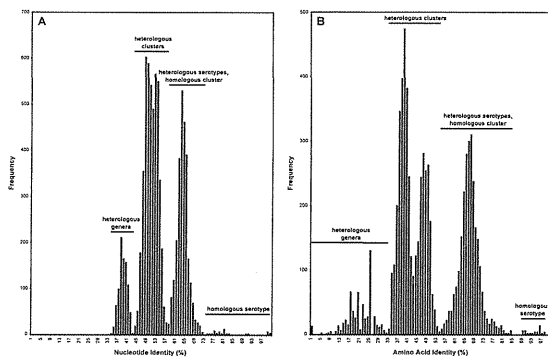
2016. 1. 8

1

RT-PCRのエンテロウイルス標的的部位



Frequency distribution of pairwise identity scores for comparison of VP1 nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences.



M. Steven Oberste et al. J. Virol. 1999;73:1941-1948

Journal of Virology

Journals.ASM.org | Copyright © American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

手足口病ウイルスの同定作業手順書概要案

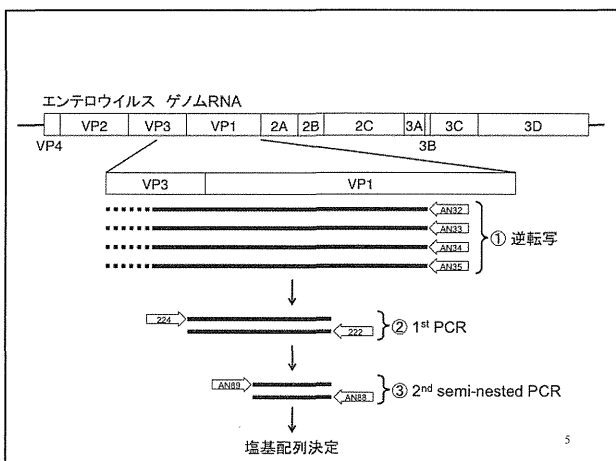
【精度管理内容】

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

【概要】

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

4



5

1. 試薬と実験器具

共通の実験器具

RNA抽出用試薬

電気泳動用試薬・機器

塩基配列解析用試薬

逆転写プライマー

PCR/シーケンスプライマー

逆転写・PCR試薬

6

逆転写プライマー
AN32 GTYTGCCA
AN33 GAYTGCCA
AN34 CCRTCRTA
AN35 RCTYTGCCA

PCR プライマー
224 GCIATGYTIGGIACICAYRT
222 CICCIGGIGGIAYRWACAT
AN89 CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG
AN88 TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT

7

逆転写プライマー
AN32 GTYTGCCA
AN33 GAYTGCCA
AN34 CCRTCRTA
AN35 RCTYTGCCA

PCR プライマー
224 GCIATGYTIGGIACICAYRT
222 CICCIGGIGGIAYRWACAT
AN89 CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG
AN88 TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT

8

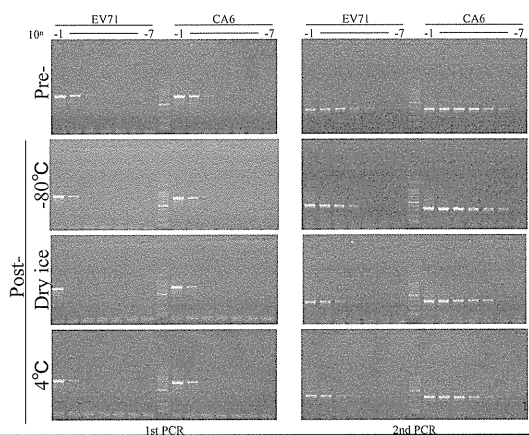
2. 操作

- 1) cDNAの合成
- 2) 1st PCR
- 3) 2nd PCR
- 4) 電気泳動
- 5) PCR産物の精製
- 6) シークエンス反応
- 7) シークエンス反応物の精製およびシークエンサーによる塩基配列解析
- 8) 塩基配列の相同性検索

9

- 1) cDNAの合成(1.5時間)
22°C 10 min
42°C 60 min
95°C 5 min
- 2) 1st PCR 以下の温度で、40 サイクル反応(約2時間)
95°C 30 sec
42°C 30 sec
(Ramp 0.4°C/sec)
60°C 45 sec
- 3) 2nd PCR(1.5時間)
95°C 6 min
以下のサイクルを40回
95°C 30 sec
60°C 20 sec
72°C 15 sec

10

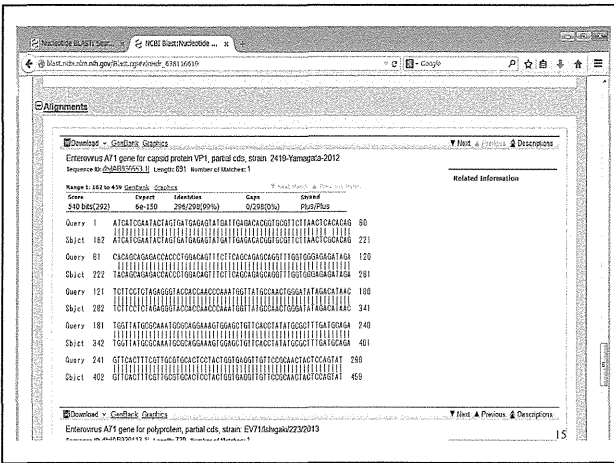
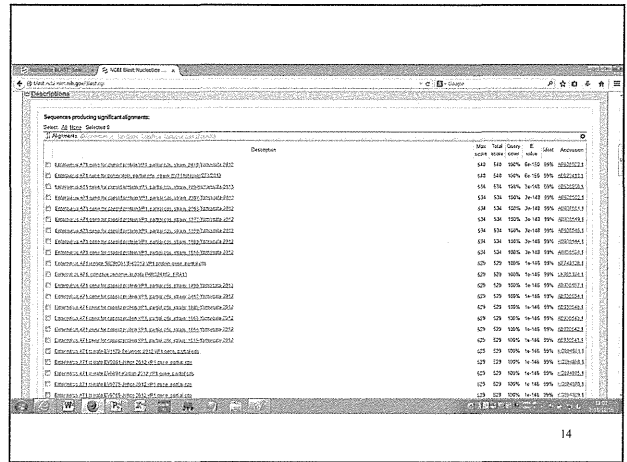
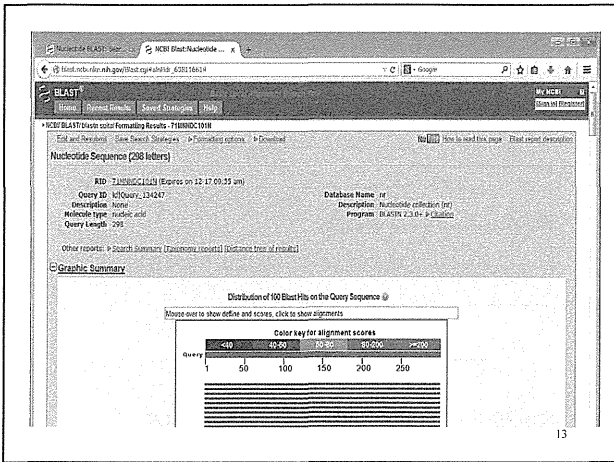


シーケンスの結果

```
ATCATCGAATACTAGTGATGAGAGTATGATTGAG
ACACGGTGCGTTCTTAACTCACACAGCACAGCAG
AGACCACCTGGACAGTTTCTTCAGCAGAGCAGG
TTTGGTGGGAGAGATAGATCTTCTCTAGAGGGT
ACCACCAACCCAAATGGTTATGCCAACTGGGATA
TAGACATAACTGGTTATGCGCAAATGCGCAGGAA
AGTGGAGCTGTTACCTATATGCGCTTTGATGCA
GAGTTCACTTTCGTTGCGTGCACTCCTACTGGTGA
GGTTGTTCCGCAACTACTCCAGTAT
```

↓
BLAST検索

12



結果(例)	
施設名:	愛知県衛生研究所
判定結果:	エンテロウイルス71型
塩基配列:	ATCATCGAATACTAGTGATGAGAGTATGATTGAGACACGGTGCCTTCTAACTCACACAG CACGACGAGACACCCTGGACAGTTCTTTCAGCAGAGCAGGTTTGGTGGGAGAGATAG ATGTTCTCCTCTAGAGGGTACCACCAACCCAAATGGTTATGCCAAGCTGGGATATGACATAA CTGGTTTATGGCAAATGGCGAGGAAGTGGAGCTGTGACCTTATGCGCTTTGATCGAG AGTTGACTTTCGTTGGTGCACCTCCTACTGTTGAGGTTGTTCCGCAACTACTCCAGTAT
使用機種:	PCR ABI Veriti
	シーケンス ABI 3130 Genetic Analyzer

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

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

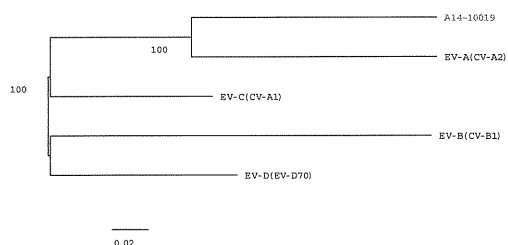
エンテロウイルス標準株のVP1(CODEHOP)領域データベース

- 種別用ファイル(1)
- 型別用ファイル(A~D)

種別用ファイル

- CV-A2 (EV-A)
- CV-B1 (EV-B)
- PV-1 (EV-C)
- EV-D68 (EV-D)

19



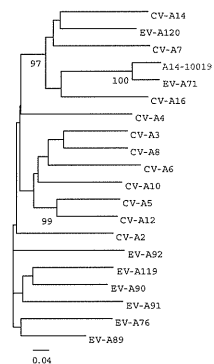
種別用データベースを用いた系統樹解析(NJ法)

20

型別用ファイル

EV-A (21型)	EV-B (60型)	EV-C (60型)	EV-D (4型)
CV-A2	CV-B1	E-28	PV-1
CV-A3	CV-B2	E-29	PV-2
CV-A4	CV-B3	E-30	PV-3
CV-A5	CV-B4	E-31	CV-A1
CV-A6	CV-B5	E-32	CV-A11
CV-A7	CV-B6	E-33	CV-A13
CV-A8	CV-A9	EV-B69	CV-A17
CV-A10	E-1	EV-B73	CV-A19
CV-A12	E-2	EV-B74	CV-A20
CV-A14	E-3	EV-B75	CV-A21
CV-A16	E-4	EV-B77	CV-A22
EV-A71	E-5	EV-B78	CV-A24
EV-A76	E-6	EV-B79	EV-C95
EV-A89	E-7	EV-B80	EV-C96
EV-A90	E-8	EV-B81	EV-C99
EV-A91	E-11	EV-B82	EV-C102
EV-A92	E-12	EV-B83	EV-C104
EV-A114	E-13	EV-B84	EV-C105
EV-A119	E-14	EV-B85	EV-C109
EV-A120	E-15	EV-B86	EV-C113
EV-A121	E-16	EV-B87	EV-C116
	E-17	EV-B88	EV-C117
	E-18	EV-B89	EV-C118
	E-19	EV-B97	
	E-20	EV-B98	
	E-21	EV-B100	
	E-24	EV-B101	
	E-25	EV-B106	
	E-26	EV-B107	
	E-27	EV-B111	

21



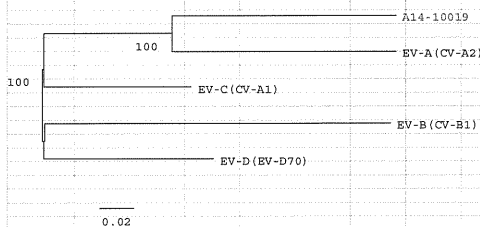
型別用データベースを用いた系統樹解析(NJ法)

22

(オプション)

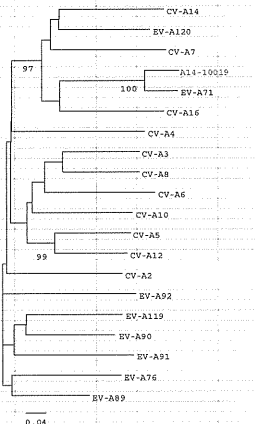
解析ソフト:	系統樹	Genetyx (ver.10.1)		
	相同性	Genetyx (ver.10.1)		
相同性:	最も高い標準株	%	2番目に高い標準株	%
	EV-71	86.8	CV-A16	65.9

種別用系統樹解析結果



23

型別用系統樹解析結果



24

まとめ

- ・ウイルスRNAを送付してRT-PCR法で増殖・遺伝子解析を実施する。
- ・VP1領域を標的とするCODEHOP PCR法の実施手順書案を作成した。
- ・オプションとしてCODEHOP PCR法で増殖される領域についてエンテロウイルス標準株のデータベースを作成し系統樹解析により同定する。

25

「手足口病」外部精度管理検討項目

1	送付検体の性状1	・ウイルス分離を行う？ ・感染性物質？RNA？ ・室温？クール？	備考
2	送付検体の性状2	・咽頭拭い液模擬検体？ FTAカード？	
3	精度管理を行う項目(手技)	・分離？→行う場合は次スライド ・遺伝子検査→次スライド参照 エンテロウイルス検出まで？ 遺伝子型別まで？中和？ 疫学解析まで？	
4	精度管理を行う項目(個票等)	模擬個票をつける？	
5	実施時期・事後研修について		
6	その他(下記参照)		

先行事例を参考にする：
・インフルエンザ(リアルタイムRT-PCR)
・麻疹(リアルタイムRT-PCR)

26

感染研担当者と地研の連携

「手足口病」外部精度管理検討項目(追加)

- 細胞培養法による分離・同定
 - (1)培養細胞の準備(細胞の種類・略歴、継代法や検体接種用プレートの調製)
 - (2)使用する培地(増殖用培地、維持培地の調整)
 - (3)ウイルス分離方法(検体接種法、接種後の観察法、ウイルス回収法)
 - (4)ウイルスの同定(ウイルス力価の測定法・中和試験法、または解析した遺伝子部位と相同性検索法)
- RT-PCR・ダイレクトシーケンス法によるウイルス遺伝子検出
 - (1)検体からの遺伝子抽出法
 - (2)RT-PCR法(増幅部位、増幅方法)
 - (3)遺伝子解析法

27

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

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

北海道立衛生研究所 森本 洋
H28.1.8 第二回研究班会議

1

昨年度供試試料

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



感染研保有の菌株から供試するのは
困難だった、とコメントされていた。

(ヒト由来株では、倫理審査の問題が発生する可能性?)

H26年度トラブルシューティング(TS)ポイント

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

3

昨年度の外部精度管理調査について-検討課題-

(石岡先生H26年度第二回班会議スライドより)

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

4

報告書には(1)

- 全国70以上の地衛研に同時に同一条件で臨床検体を送付することは現状の体制では難しい。
(石岡先生報告書結論)
- 感染研での実施においては、
* BS室への届け出、審査、当日のチェック、梱包
* 対象11機関→7機関、4機関の2回に分け発送
* 79地衛研へ対応する場合、安定した大量の試料を作製し、同一期日に到着するよう発送するのはかなり困難。

5

報告書には(2)

- まずは、精度のしっかりした試料を作製することが必要であり、そのためには素性のはっきりした菌株の収集も重要であることが示唆された。
(石岡先生報告書結論)

6

微生物学調査試料の作製

➢ 微生物学検査用調査試料の最大の問題点は、添加菌の増殖、死滅、変異をいかに抑えるのか

➢ 定性検査で結果に影響を及ぼさないことを前提とした場合には、いかに死滅させないか
⇒調査試料中の添加菌の均一性、安定性の担保

➡ **妥当性評価**

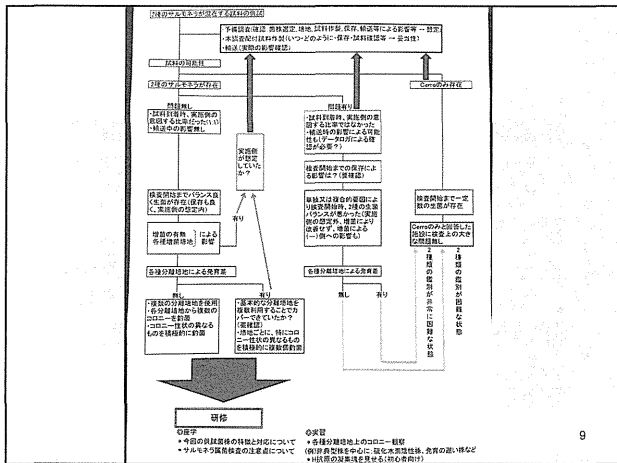
これらは定量検査では結果のばらつき、定性検査では誤判定につながる可能性がある

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

➡ **実施側の想定**

7

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



- ### 実施側のTS①
- 予備調査は行ったか。
* 行っていた場合、①菌株選定、②選定菌株と各種培地との相性、③実際の実施をどこまで想定し確認したか(試料作製直後、試料到着時及びそれ以降、輸送による影響:分割・温度・時間、適切な保存法等)。→ 確認後の想定
 - 本調査配付試料作製
→ ③と同等の確認による妥当性評価
特に接種ミスが無いかわり2人以上での確認
 - 輸送:実際にどのような影響があるか確認が必要か?
- 10

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

- ### 実施側のTS②
- 今回は、実施側が想定していたこと(推定)が複雑だったこと、それに基づく配付試料の妥当性評価が困難だったことから、
* 実施側は、
 - ①外部精度管理調査として参加機関に求める結果の適切な想定。
 - ②適切な妥当性評価が可能な配付試料の作製。
- 以上のことを踏まえて調査を実施することが必要。
- 12

検査結果のTS&研修②

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

検査結果のTS&研修③

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

まとめ1

- 本課題は、総括・分担研究報告書(平成26年
度)及び北海道立衛生研究所の結果より推察
された事象を基に問題点等を検証した。
 - 結果、配付試料の妥当性評価が困難であり、
問題点の絞り込みが難しい場合があった。
- 15

まとめ2

- 外部精度管理調査実施機関側は、参加機関
に求める結果を想定し、そのことを達成する
ための安定した配付試料を作製することが不
可欠である。
 - また、参加機関側は、内部精度管理ができる
システムを導入し、日常検査の精度担保や外
部精度管理の結果が思わしくなかった場合
の適切な検証ができるよう、体制を整える必
要があると思われた。
- 16

コレラ菌(2015 EQA)の感染研から地衛研への発送について (候補株の選定含む)

病原体検出マニュアルの改定と公開 (7月～、9月1日公開)
配付菌株の確認と決定 (7月～9月)
感染研内書類の確認 (病原体分与・輸送)
輸送容器の事前確認 (9月29日)
菌株の発送 (10月1・2日)

細菌WG 堀川英二 (国立感染症研究所)
大西真 (国立感染症研究所)
桂芳喜久代 (国立感染症研究所)
堀本圭 (北海道立衛生研究所)
森田清志 (埼玉県衛生研究所)
磯野綾子 (富山県衛生研究所)
野村和子 (大阪府立公衆衛生研究所)

菌株選定一プレチェック (7月～9月)

コレラ: 多量の水様性下痢を主な症状とする急性感染性腸炎 脱水により死に至る場合がある。

原因: コレラの原因となる細菌をコレラ菌と呼ぶ = コレラ菌

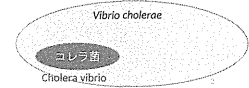
コレラ毒素: コレラの主症状である多量の水様性下痢が起きる機序は、コレラ毒素によって説明される。

コレラ毒素 (CT) を産生する *Vibrio cholerae* のうち O 血清群 1, 139 (O1, O139) のみが公衆衛生学的には重要とされている。

生物種としての名前

コレラと正しく診断するには、コレラ菌を正しく同定することが求められる

- 1 *Vibrio cholerae* としての同定
- 2 O 血清群の決定
- 3 CT 毒素産生性 (あるいは CT 毒素遺伝子の確認)



Vibrio cholerae El Tor O1 Inaba CT(+/-)

Vibrio 属用選択分離培地(発育) コレラ菌の性状 生物型 O 血清群 血清型

EQA 後 参照株として利用価値があるものを選定

菌株選定一プレチェック (7月～9月)

1 *V. cholerae* の同定の鍵となる性状は、以下となる。

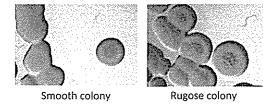
- 1) *Vibrio* 選択分離培地での増殖
- 2) 白糖の分解
- 3) リジン脱炭酸陽性
- 4) 無塩ブイヨンでの発育

2 O 血清群の決定 (O1, O139)

3 CT 毒素産生性 (あるいは CT 毒素遺伝子の確認)

今回は試験菌株として、

- 選択分離培地での発育性、生化学的性状、O 抗原血清に対する反応性について、性状が明瞭であるものを選択
- 選択分離培地での発育の悪いものやコロニー形態の異常なもの、VP 試験 (*V. cholerae* の生物型を決める重要な性状) 陰性の株は除く。



菌株選定一プレチェック (7月～9月) チェックポイント

Vibrio cholerae El Tor O1 Inaba CT(+/-)

Vibrio 属用選択分離培地(発育) コレラ菌の性状 生物型 O 血清群 血清型

TCBS 寒天培地 (+)
Chromagar Vibrio 寒天培地 (+)
X-VP 寒天培地 (+)
PMT 寒天培地 (+)
ピブリオ寒天培地 (+)

TCBS 寒天培地 (Ⓜ)
Chromagar Vibrio 寒天培地 (Ⓜ)
X-VP 寒天培地 (Ⓜ)
PMT 寒天培地 (Ⓜ)
ピブリオ寒天培地 (Ⓜ)

VP 試験 (+)
PCR
Hly-ET (+)

O1 混合血清 (+)
PCR
O1wba (+)

型血清 (+)

TSI 高層 (Ⓜ)
LIM (運動性+)
オキシダーゼ (+)

TSI 斜面 (Ⓜ)
LIM (LDC+) (Ⓜ)
LIM (インドール+) (Ⓜ)
無塩ブイヨン (+)

PCR
atpA (+)

菌株選定一プレチェック (7月～9月)

送付する菌株

- V. cholerae* O1 コレラ毒素産生
- V. cholerae* O1 コレラ毒素非産生
- V. cholerae* O139 コレラ毒素産生

STEP 1: 保存株のなかから計 17 の候補株を感染研で確認。

STEP 2: 9 株を 3 回にわたり北海道衛研、埼玉県衛研、富山県衛研、大阪府衛研に送付。各所で性状を確認。

最終的な 3 株を選定。

保存株は新鮮分離株ほどコロニー性状、生化学的性状、血清型別が明確にでないことがある。

配付作業に実施困難なことがあるのか確認が必要。
希望する施設には全て配付することとした（上限を決めず）。

74施設が参加

感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領

感染研 病原体等の分与等に関する

書類が参加施設ごとに必要。その整理・書類管理のための事務局機能が必要。

感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領

参加申込書からリスト作成が必要

感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領

今後、EQIに関する依頼検査はWHOCCと同等とする検討を実施。

外部精度管理調査の研究班がおこなった事務局機能を担う部門が必要

感染研 病原体輸送に関する手続き、提出書類

担当者が細色、チェックシートを用いて確認
管理運営委員が点検、確認のサイン
発送場所（総務部庶務）
バイオセーフティ管理室員が最終確認、サイン
運搬業者へ渡す

外部精度管理の導入と継続実施のための事業体制の構築に関する研究
平成27年度第二回班会議

コレラ菌に関する外部精度管理調査の結果

- コレラ菌検査・診断マニュアルを作成
- 精度管理株の選定
- 外部精度管理調査の実施
- 感染症検査体制アンケートの実施
- コレラ菌外部精度管理事後アンケートの実施

細菌WG 荒川英二(国立感染症研究所)
大西真(国立感染症研究所)
緒方喜久代(国立感染症研究所)
森本洋(北海道立衛生研究所)
倉園貴至(埼玉県衛生研究所)
磯部順子(富山県衛生研究所)
勢戸和子(大阪府立公衆衛生研究所)

1

外部精度管理調査の実施.....74施設が参加

実施項目: 三類感染症検査に係る「コレラ菌」の同定
 実施時期: 平成27年10月5日検体配付(参加施設に到着予定)
 平成27年10月26日結果提出締め切り

提出書類: 検査結果報告書
 コレラ菌検査経過記録書
 感染症検査体制アンケート
 温度記録ファイル

配付試料: 試料1 *Vibrio cholerae* O1 CT陽性
 試料2 *Vibrio cholerae* O1 CT陰性
 試料3 *Vibrio cholerae* O139 CT陽性

12月に事後アンケートを依頼し、70施設の回答を得た。

2

検査結果報告書の様式

平成 年 月 日

検査結果報告書

該当する結果を○で囲み、必要な情報を記載下さい	
結果	根拠とした検査結果 (血清型・毒素等)
例示	陽性 陰性 O1抗原(+), CT遺伝子(+)
コレラ菌の 同定結果	試料1 陽性 ・ 陰性
	試料2 陽性 ・ 陰性
	試料3 陽性 ・ 陰性

※なお、報告の正確性の向上を図るため、検査結果報告書には記載していただき、手回しによる
 変更や修正を依頼した場合は検査結果の誤りや不正確さを招く恐れがあります。

3

検査結果報告書の集計

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

4

コレラ(三類感染症)

【定義】コレラ毒素(CT)産生性コレラ菌(*Vibrio cholerae* O1)又は*V. cholerae* O139による急性感染性腸炎

【届出基準】分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌におけるコレラ毒素の確認(毒素産生の確認あるいはPCR法による毒素遺伝子の検出)

「コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取扱い等について」
昭和63年9月28日付

コレラ菌の中で行政上の防疫対策の対象となるのは*V. cholerae* O1(のちにO139追加)、かつ、コレラエンテロトキシンを産生する菌のみとし、コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取扱いについては特段の防疫措置は必要ない。

国内初発であるか否かを問わず、真性患者及び保菌者としての決定は地方衛生研究所における検査によって行うこと。

5

検査結果報告書のまとめ

- O抗原の決定
O1抗原について少ないながら陰性が見られた。
O139抗原の検出は一致していた。
- CT産生の確認あるいはCT遺伝子の検出
いずれの試料においても一致していた。
- 試料2では、正しい同定結果が得られたが「コレラ菌陽性」と判定した施設があった。

実施項目を『三類感染症の原因となる「コレラ菌」の同定』
としたほうがわかりやすかったとの意見をいただいた

↓

コレラの届出に必要なO抗原の決定とCTの確認について
検査経過記録書と事後アンケートから検査方法とその結果を解析

6

コレラ届出様式

【12 診断方法】

- ・分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌における次の①、②いずれかによるコレラ毒素の確認
 - (1)毒素産生 (2)PCR法による毒素遺伝子
- 検体:便・その他()
- 血清型: O1・O139
- O1の抗原型: 小川型・稲葉型
- O1の生物型: アジア型(古典型)・エルトル型
- ・その他の方法()
- 検体()
- 結果()

該当するものをすべて記載すること。

コレラ菌の血清型別試薬

- ・コレラ菌免疫血清

混合	混合陽性→単味血清で型別
小川型	小川型血清に凝集
稲葉型	稲葉型血清に凝集
	両方に凝集
	両方陰性
- ・コレラ菌AD(モノクローナル抗体)

感作ラテックスa	a, bが陽性	小川型
感作ラテックスb	a, cが陽性	稲葉型
感作ラテックスc	a, b, cが陽性	彦島型
対照ラテックス	aが陰性	V. cholerae non-O1
	対照が陽性	非特異凝集
- ・ピリオコレラ免疫血清 O139 "Bengal"

免疫血清のみ使用	45施設
免疫血清とラテックスキットの併用	26施設
ラテックスキットとO139免疫血清	3施設

コレラ菌の抗原因子と血清型の反応

血清型	抗原因子	コレラ菌免疫血清(各血清に含まれる因子抗体)		
		混合(A B C)	小川型(B)	稲葉型(C)
小川型	A B (C)	+	+	-(+)
稲葉型	A C	+	-	+
彦島型	A B C	+	+	+
O140:Hakata	C D	+	-	+

a 遅れて観察される凝集

B因子またはC因子を持つ海水ビブリオやV. fluvialis が確認されている。

コレラ菌免疫血清では「混合血清のみでコレラ菌の推定を行わないでください」

B因子は小川型の特異抗原であり、彦島型は小川型に結合されることが多い

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のため

試料1: V. cholerae O1 稲葉型 CT陽性

免疫血清	ラテックス	施設数	O1抗原陽性
生菌で稲葉型	稲葉型	24	64 (91.4%)
	判定不能	5	2
	未実施	27	2
加熱死菌で稲葉型	稲葉型	4	0
	判定不能	2	0
生菌で彦島型	彦島型	1	0
	判定不能	1	0
加熱死菌で彦島型	彦島型	1	0
	判定不能	1	0
加熱死菌で判定不能	未実施	1	0
	判定不能	1	0
混合のみ実施	判定不能	1	0

CT陽性の場合 O1抗原判定不能を陰性と判断して良いのか

O1抗原確認PCR 未実施 実施

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のため

試料2: V. cholerae O1 小川型 CT陰性

免疫血清	ラテックス	施設数	O1抗原陽性
生菌で小川型	小川型	26	69 (98.6%)
	判定不能	2	1
	未実施	28	0
加熱死菌で小川型	小川型	8	0
	未実施	4	0
混合のみ実施	小川型	1	0
判定不能(自己凝集)	判定不能	1	0

O1抗原確認PCR 未実施 CT陰性のため追及せず

【参考】対照(株)使用施設数

免疫血清	ラテックス	施設数
陽性対照	8	12
陰性対照 ^a	7	16

5施設は陽性対照・陰性対照ともに使用していなかった

試料1 彦島型(2)
O1抗原陰性(2)
試料2 O1抗原陰性(1)

a 生食水等を含む

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のため

試料2: V. cholerae O1 小川型 CT陰性

免疫血清	ラテックス	施設数	O1抗原陽性
生菌で小川型	小川型	26	69 (98.6%)
	判定不能	2	1
	未実施	28	0
加熱死菌で小川型	小川型	8	0
	未実施	4	0
混合のみ実施	小川型	1	0
判定不能(自己凝集)	判定不能	1	0

使用頻度を考慮すると、毎年血清や試薬を更新するのは困難

血清型別用の対照株を常時準備するのは難しく、抗原液も保存できない

血清凝集反応で判定不能の場合はPCR法で確認することが望ましい

【参考】対照(株)使用施設数

免疫血清	ラテックス	施設数
陽性対照	8	12
陰性対照 ^a	7	16

a 生食水等を含む

毒素産生性試験の結果

■ PCR法によるCT遺伝子検査実施 71施設 (95.9%)

マニュアルのプライマー	43	どの方法でも結果は一致していた
市販プライマー	20	
小林プライマー	5	
マニュアルと市販の併用	2	
市販と自家製の併用	1	

事後アンケートによると
70施設中22施設で複数のプライマーを準備している
(精度管理用に準備したものを含む)

■ RPLAによるCT産生試験実施 35施設 (47.3%)

試薬: VET-RPLA(デンカ生研) 事後アンケートによる(n=33)

毒素産生用培地: CAYE培地, CAYE-L培地	16
Syncase培地	8
酵母エキスブイヨン	2
AKI培地	1
BHIプロス	1
BHI寒天培地, 普通寒天培地	3
添付文書記載培地	1
未記入	1

検査記録経過書・事後アンケートの解析 検査担当者等について

■ 担当者情報 1名 24施設
2名 23施設
3名 27施設(合計 151名)

■ 担当の内訳と検査経験

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

^a 検査経験はトレーニングも含むとした

検査担当者の約3割はコレラ菌検査の経験がない

検査

■ 純培養の確認 74施設で実施

使用培地	非選択培地 1~2種類	40施設
	非選択培地 1種類 + 選択培地 1~4種類	12施設
	選択培地 1~3種類	22施設

↓
選択性のある培地だけ
使用して純培養が確かめられるのか

非選択培地	選択培地
• 普通寒天培地	• TCBS
• トロプトソイ寒天培地	• クロモアガー-Vibrio
• ハートインフュージョン培地 (食塩を追加したものも含む)	• ビブリオ寒天
	• PMT

■ 選択分離培地でのコロニーの観察 74施設で実施

使用培地	TCBS	21施設
	TCBS + クロモアガー-Vibrio	22施設
	TCBS + ビブリオ寒天/X-VP/PMT	11施設
	TCBS + クロモアガー-Vibrio + ビブリオ寒天	17施設
	TCBS + クロモアガー-Vibrio + ビブリオ寒天 + PMT/X-VP	3施設

分離菌性状検査(1)

検査項目	TSI	単糖代謝 確認培地	未実施
ブドウ糖	72	2	
乳糖	68	5	1
白糖	69	5	

検査項目	LIM	SIM	その他(培地・試薬名)
運動性	66	5	3 (半流動培地)
リジン脱炭酸	71		3 (メラーの培地等)
インドール	67	5	2 (市販キット)

VP試験	市販VP半流動培地	64	基本的な性状確認は 行われていた
	簡易同定キット	1	
	その他	7	
	未実施	2	

オキシダーゼ試験 市販ディスクまたは市販ろ紙 74

分離菌性状検査(2)

耐塩性試験 実施74施設

食塩濃度(%)	施設数
1種類 0	2
3種類 0, 3, 8	1
4種類 0, 3, 7, 10	2
5種類 0, 3, 8, 10	7
6種類 0, 3, 6, 8, 10	60
7種類 0, 3, 7, 8, 10	1
8種類 0, 1, 3, 6, 8, 10	1

無塩での発育確認は
必須と考えられている

その他: 約20施設が記載
簡易同定キット(アピ20E, ラピッドID32E, IDテストEB-20)
アルギニン、オルニチン
マンニット
Andrade培地(グルコース ガス産生)
O/129ディスク感受性
ポリミキシンB感受性、ヒツジ赤血球溶血性 など

コレラ届出様式

【12 診断方法】

- 分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌における
次の①、②いずれかによるコレラ毒素の確認
(①毒素産生 ②PCR法による毒素遺伝子)
- 検体: 便・その他 ()
- 血清型: O1・O139
- O1の抗原型: 小川型・稲葉型
- O1の生物型: アジア型(古典型)・エルトール型

その他の方法 ()
検体 ()
結果 ()

該当するものをすべて記載すること。

コレラ菌の生物型別_事後アンケート70施設のまとめ

実施した 31施設 エルトール型 (29), 判定不能 (2)
実施しなかった 39施設

鑑別性状	アジア型 (古典型)	エルトール型	実施 施設数 ^a	判定不能施設の 実施項目
溶血性(ヒンジ)	-	+	1	・VP試験
赤血球凝集性 (ニフトリ)	-	+	3	・VP試験と赤血球凝集性
ポリミキシンB 感受性	+	-	1	
VP試験	-	+	16	
ヘモリシン遺伝子 の鑑別 ^b			25	
rtx因子の有無	-	+	2	

a 複数実施した施設があり合計は48となる
b マニュアルに記載の生物型別用PCRなど

生物型別を実施している
施設は半数以下であった

19

対照(株)の使用状況_事後アンケート70施設のまとめ

検査項目	陽性対照		陰性対照	
	使用した	使用せず	使用した	使用せず
選択分離培地でのコロニー観察	12	58	5	53
生化学的性状の確認	10	59	5	52
血清凝集反応;コレラ菌免疫血清	12	58	16	42
血清凝集反応;コレラ菌AD	8	42	7	36
RPLA法によるCT産生 確認	21	14	15	18
PCR法によるCT遺伝子 確認	56	11	59	7
PCR法による <i>V. cholerae</i> 確認	26	9	29	5
PCR法によるO1, O139抗原 確認	38	12	40	7

血清凝集反応の陰性対照は多くが生食水
PCRの陰性対照は多くが滅菌水

20

行政報告に必要な検査項目_事後アンケート70施設のまとめ

検査項目	陽性判定に必要	陰性判定に必要
TCBSでのコロニー観察	65	66
TSI寒天培地の性状	61	54
LIM培地の性状	61	54
オキシダーゼ	54	47
無塩ブロスでの発育	52	47
VP試験	46	2施設でどちらも選択 していなかった
血清凝集反応	67	
PCRによるO1抗原, O139抗原の確認	27	27
CT遺伝子の確認	65	1施設でどちらも選択 していなかった
CT産生性の確認	25	
PCR法による <i>V. cholerae</i> 確認	15	19
生物型の確認	13	3

21

外部精度管理調査のまとめ

- コレラ菌の届出基準を正しく理解し、地衛研で診断できるよう準備しておくことが大切である。
- O1抗原の検出について、血清凝集反応で判定不能の場合はPCR法を実施することが望ましい。
- CT産生性またはCT遺伝子の確認については、どのような方法であっても検査能力に問題はないと考えられた。
- 行政への報告に必要な検査項目について、「コレラ菌検査・診断マニュアル」を周知する必要がある。
- 回答用紙およびアンケート等は空欄(未記入)のないよう工夫したが、空欄をゼロにはできなかった。
- 受領したファイルの整理(施設によってファイル名が様々)や内容の確認、集計作業はかなり時間を要する。
- 試薬の更新頻度や予算確保、検査マニュアルなどについて質問を受けており、WGで相談して回答する予定である。

22

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

北海道立衛生研究所 森本 洋
 H28.1.8 第二回研究班会議

1

目的

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

2

方法(事前調査)

- 試料発送:平成27年7月24日(金曜日)
 試料到着:平成27年7月27日(月曜日)
- 北海道衛研所有の自記温度記録計を供試試料へ同梱(3次と4次容器間)し、試料到着後、自記温度記録計を回収し、北海道、埼玉県、富山県、大阪府衛研への輸送中の温度変化を確認し、血清学的検査や毒素検査結果に対して影響を与えているかについて検討した。

3

結果(事前調査1)

事前調査での輸送中温度変化概要

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

基準温度:引受郵便局到着時温度

事前調査での輸送中温度変化(基準との比較)

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

4

結果(事前調査2)

事前調査での輸送中温度変化(最大温度差)

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

5

方法(本調査)

- 試料発送:平成27年10月1日(木曜日)
 岐阜県より東を中心とした38地衛研
 平成27年10月2日(金曜日)
 西日本を中心とした36地衛研
- 試料到着:平成27年10月5日(月曜日)

* 沖縄県のみ1日発送、2日着

6

方法(本調査)

各施設で使用している自記温度記録計を、発送試料中に同梱し、輸送中の温度記録の回答を求めた。また、後日追加データとして、輸送中の最高、最低、平均温度及び試料到着後すぐに検査しなかった場合の検査開始までの試料保管温度についても回答を求めた。
輸送中の温度変化を確認し、血清学的検査や毒素検査結果に対して影響を与えているかについて検討した。

7

結果(本調査1)

- 自記温度記録計の設定不備(5機関)、電源の入れ忘れ(2機関)、輸送中の故障(2機関)、作動せず・不具合(2機関)、電池切れ(1機関)、記録計入れ忘れ(1機関)のため、これら13機関からのデータは、ほとんど得ることができなかった。
- 追加データについては、ゆうパック送り状の「お問い合わせ番号」を記録していなかった機関、送り状を廃棄していた(依頼時期が遅れたことも影響)機関等が8機関あった。
- 計21機関から詳細データが得られなかった場合があった。

8

結果(本調査1)

本調査での輸送中温度変化概要

基準温度	1日発送	22.4~26.0	2日発送	25.3~26.1
最高	1日発送	20.2*~29.0	2日発送	25.1*~30.8
最低	1日発送	5.5**~24.3*	2日発送	8.4~25.7*
平均	1日発送	23.4	2日発送	24.0
機関到着	1日発送	16.05~29.0	2日発送	17.3~26.0
開封	1日発送	16.0~26.2	2日発送	19.0~26.5

基準温度: 引受郵便局到着時温度
*: 基準温度ND
**: 日通航空利用

9

地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅	地衛研	振れ幅 +	振れ幅 -	振れ幅
沖繩県	5.0	18.5	19	滋賀県	2.2	7.0	
宮城県	0.0	12.8	13	埼玉県	6.1	3.0	
さいたま市	0.0	11.3	12	愛媛県	2.0	6.2	7
山口県	1.0	10.3	11	岐阜市	1.1	6.7	
大分県	3.9	9.2		長野県	0.0	6.8	
広島市	3.0	9.6		京都市	1.4	5.6	
鳥取県	2.0	9.4	10	足立区	0.9	5.8	
函館市*	0.9	9.5		東京都	0.9	5.7	
札幌市	0.0	9.1		杉並区	1.0	5.5	
和歌山市	1.5	9		東京都	0.9	5.4	
鳥取県**	4.9	8.9		宇都宮市	0.0	5.3	
広島県	1.5	8.1	9	札幌市	0.1	5.0	
仙台市	0.9	8.5		福井県	0.1	5.0	
北海道	0.0	8.9		岐阜県	0.2	4.7	
群馬県***	0.0	8.8		愛知県	0.5	4.5	5
岡山市	3~0	7.8~10.8	8~11	石川県	0.8	4.2	
佐賀県	4.0	7.7		新潟市****	0.18	4.59	
兵庫県	3.3	7.7		新潟県	0.2	4.3	
熊本県	2.2	8.0		静岡市	2.0	4.0	
北九州市****	2.6	7.6		神奈川県	2.2	3.7	4
長野市	2.3	7.2		横浜市	0.4	3.8	
福岡市	1.5	7.9	8	姫路市	0.0	3.9	
宮崎県	1.5	7.9		茨城県	2.1	2.4	3
奈良県	1.6	7.7		山梨県	0.0	2.8	
熊本市	1.2	7.6					
福岡県	1.1	7.6					
岡山県	1.1	7.2					
青森県	0.0	7.7					
秋田県	0.0	7.2					

***** 保存中振れ幅 -18: 検査日10/5
**** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7
*** 保存中振れ幅 -23: 検査日10/14
** 保存中振れ幅 -22: 検査日10/7
* 保存中振れ幅 -21: 検査日10/5

地衛研	最大温度差	地衛研	最大温度差
沖繩県	23.5	愛媛県	8.2
鳥取県*	13.8	岐阜市	7.8
大分県	13.1	青森県	7.7
宮城県	12.8	秋田県	7.2
広島市	12.6	京都市	7.0
佐賀県	11.7	長野県	6.8
鳥取県	11.4	足立区	6.7
さいたま市	11.3	東京都	6.6
山口県	11.0	杉並区	6.5
兵庫県	11.0	東京都	6.3
岡山市	10.8~13.8	東京都	6.0
和歌山市	10.5	静岡県	6.0
函館市**	10.4	神奈川県	5.9
熊本県	10.4	宇都宮市	5.9
北九州市***	10.2	札幌市	5.3
広島県	9.6	福井県	5.1
長野市	9.5	愛知県	5.0
仙台市		石川県	5.0
福岡市	9.4	岐阜県	4.9
宮崎県		新潟市****	4.77
奈良県	9.3	新潟県	4.5
滋賀県	9.2	茨城県	4.5
埼玉県	9.1	横浜市	4.2
北海道	8.9	姫路市	3.9
群馬県****	8.8	山梨県	2.8
熊本市	8.8		
福岡県	8.7		
岡山県	8.3		

* 保存中26.8(検査日10/7) ***** 保存中21.11
** 保存中16.6(検査日10/5) (検査日10/5)
*** 保存中24.4(検査日10/7)
**** 保存中22.1(検査日10/14)

まとめ(事前調査)

- 夏季に実施したため、特に高温側に大きく温度が振れる可能性を予想していたが、比較的安定した結果であり、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。
- 夏季に実施したことが良い方向に働き、輸送車及び配送中継所内が冷房等により安定した状態であったと思われる。

12

まとめ1(本調査)

- 輸送中、試料引受郵便局での温度を基準に大きな温度幅が認められた試料が複数あった。
- 特に輸送中及び試料到着後の一時保存温度を含め、20℃以上の高低差のある環境下に置かれた試料が5試料あった。
- このうち1施設の試料においては、最も高低差のある温度環境下(高低差26.8℃)にあった。

13

まとめ2(本調査)

- 輸送中外気温の影響を強く受けていることが示唆された。
- が、他の試料でも、長時間4℃保存環境下に置かれるなど、大きな温度変化があった場合でも適切な結果が得られており、今回の調査では、それぞれの温度変化が、試料菌株に対し影響を与えていたかについては、結論を出すのが難しいと思われた。

14

まとめ3(本調査)

- 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。
- シミュレーションを入念に行うのはもちろんのこと、基本的には、実施時期にかかわらず外気温の影響を受けにくく、また、試料到着後輸送中の温度と変わらない温度帯で一時保存しやすい、チルド輸送での対応が適当と思われた(沖縄県について要検討)。
- 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。

15

外部精度管理の導入と継続実施のための事業体制の構築に関する研究
平成27年度第2回班会議
富山県衛生研究所 細菌部 磯部順子

平成28年度地方衛生研究所 外部精度管理について

2年間の精度管理調査の実績

	平成26年度	平成27年度
参加機関	研究班と一部の地研	全国74か所の地研等
対象疾患	サルモネラ腸炎? (チフス)	コレラ
配付病原体	S. Cerro S. Infantis(硫化水素非産生)	V. cholerae O1(CT+)稲葉 O1(CT-)小川 O139(CT+)
検体の形態と数	模擬便 2	カジトン培地3
調査項目	サルモネラの検出と同定	三類感染症の報告 そのためのコレラ菌疑い株の同定
結果の解析	結果の解析 事後アンケート	結果の解析 事後アンケート 赤痢菌の検査の現状アンケート
その他	感染症検査の現状アンケート	感染症検査体制アンケート

今年度(以降)の実施内容について

平成27年度第1回班会議より

- 平成27年度はコレラで実施したい。
- 次年度は赤痢菌の必要性が高いのではないか。

H27年度 コレラ菌

- ワーキンググループで検査マニュアルを作成(旧版を手直し)
- 菌株の選定と実施要領・ワークシート作成
- 菌株の配布
- 結果の回収と実施後アンケート実施

赤痢菌検査の現状把握
(コレラ菌検査精度管理の実施後アンケートに含む)

H28年度 赤痢菌 コレラ菌検査トラブルシューティング

H29年度 (EHEC) 赤痢菌検査トラブルシューティング

平成26年度アンケート結果および必要性などから考えられる対象病原体候補

■ 3類感染症(腸管感染症)の原因菌(調査項目)

- コレラ菌(平成27年度に実施済)
- 赤痢菌(検査項目・手順・遺伝子検査等)
- 腸管出血性大腸菌(検査方法・IS-printing法)
- チフス菌
- パラチフスA菌

■ 5類感染症の原因菌

- A群溶血性レンサ球菌
 - カルバペネム耐性腸内細菌科細菌(CRE)
- 必要性和項目についてはレファレンスセンターと協議が必要

平成27年度第1回班会議より

精度管理対象の項目

検査項目

- 細菌の同定
 - 細菌の検出
 - 遺伝子の検出
 - 毒素産生性の検査
 - 分子疫学的解析
- PFGE
IS-printing

配付試料

- 分離菌
- 模擬臨床検体
- DNAテンプレート

細菌性赤痢の判定を調査項目とするか?


- 3類感染症である
- 食品関連業務に従事する人の場合、就業制限がかかる
- 原因菌を同定する公定法はない
- 原因菌の誤同定が他に比べると多い
- 腸管侵入性大腸菌との絶対的な鑑別点がない



医療機関や保健所からの同定依頼がしばしば発生する

地衛研での最終同定が求められる

赤痢菌同定の問題点



IASR Vol.24 No.9 (No.283) September 2003

赤痢菌の検査法の問題点と解決策
赤痢菌の同定に関する問題事例
医療機関で大腸菌が赤痢菌と誤同定された事例
下病患者から分離された*M. morganii*が赤痢菌と誤同定された事例
赤痢菌同定の問題点
赤痢菌同定における留意点
赤痢菌同定検査の問題点と現場からの提案

10年以上経っても問題点は解決していない

→ 一部の地研では検査数が減少し、希少感染症となりつつある

細菌性赤痢と診断することの難しさを理解していない地研もありうる

赤痢菌検査に関する現状調査のまとめ

(20160105時点)

糞便検査	ある	(その件数/年)			ない
		0-10	10-100	100-1,000	
食中毒や感染症発生動向調査等の糞便検査	41	15	11	15	25
赤痢患者の接触者検便や服薬後検便	40	32	8	0	26
その他	7				59

菌株同定検査	ある	(その件数/年)		その他の内容	件/年
		5以下	10-20		
菌株同定検査	35	33	2	外来・公立施設からの依頼	3,000
同定された菌名	菌数			行幸歴に係る検査	11
<i>Shigella dysenteriae</i>	6			一般依頼検査	10
<i>Shigella flexneri</i>	11			チフス患者の接触者検便や服薬後検査	10
<i>Shigella boydii</i>	4			一般依頼検査	100
<i>Shigella sonnei</i>	16			食品等従事者検便	870
EIEC	3			調理従事者からの依頼検査	900
EIEC以外の大腸菌	13				
<i>Morganella morganii</i>	5				
その他	6				8

赤痢菌検査に関する品質保証のポイント

届出基準: 検査材料 便
検査方法 分離・同定による病原体の検出

- 赤痢菌同定の根拠
 - 1) 性状
 - 2) 血清型
 - 3) 病原因子(腸管侵入性に関与する遺伝子)
- 赤痢菌同定の問題点
 - 1) 日常の検査項目では、「陽性」となる性状が少なく、同定困難
 - 2) 赤痢菌と決定するための性状があまりにも多様である。
 - 3) 重要な性状のひとつ「運動性」「ガス産生性」を自動同定機器や簡易同定キットでは検査不可能。(医療機関等で分離された菌株の鑑別依頼多い)
 - 4) 免疫血清がない、あるいは血清型が決まらない
 - 5) 病原因子(腸管侵入性に関与する遺伝子)を検出しても、EIEC(腸管侵入性大腸菌)との鑑別が必要。

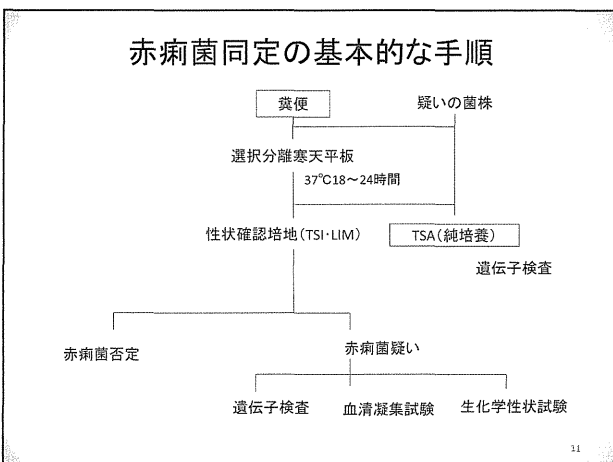
勢戸先生ファイルの改変 9

赤痢菌検査に関する品質保証ポイント

届出基準: 検査材料 便
検査方法 分離・同定による病原体の検出

- 赤痢菌同定の根拠
 - 1) 性状
 - 2) 血清型
 - 3) 病原因子(腸管侵入性に関与する遺伝子)
- 赤痢菌同定の問題点
 - 1) 日常の検査項目では、「陽性」となる性状が少なく、同定困難
 - 2) 赤痢菌と決定するための性状があまりにも多様である。
 - 3) 重要な性状のひとつ「運動性なし」を自動同定機器や簡易同定キットでは検査不可能。(医療機関等で分離された菌株の鑑別依頼多い)
 - 4) 免疫血清がない、あるいは血清型が決まらない
 - 5) 病原因子(腸管侵入性に関与する遺伝子大腸菌)との鑑別が必要。

届出の基準とはなっていない
普遍的な鑑別点はない
10



手順書に添付する参考資料

表2.赤痢菌のおもな生化学性状

性状	反応
インドール	d
メチルレッド	+
Voges-Orosukauer	-
硫化水素(TSI)	-
ウレアーゼ(christensen)	-
リジンデカルボキシラーゼ	d
アルギニンヒドラーゼ	d
オルニチンデカルボキシラーゼ	-
酢酸ナトリウム	d
ブドウ糖からのガス産生	d
糖(酸)	d
ブドウ糖	+
乳糖	d
白糖	d
マンニト	d
サリシン	-
β-ガラクトシダーゼ	d
運動性	-

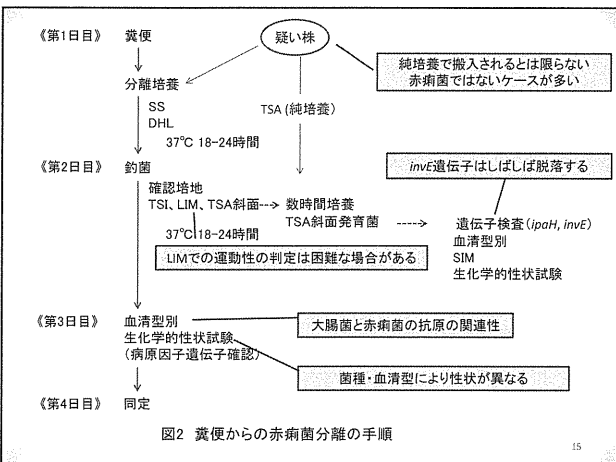
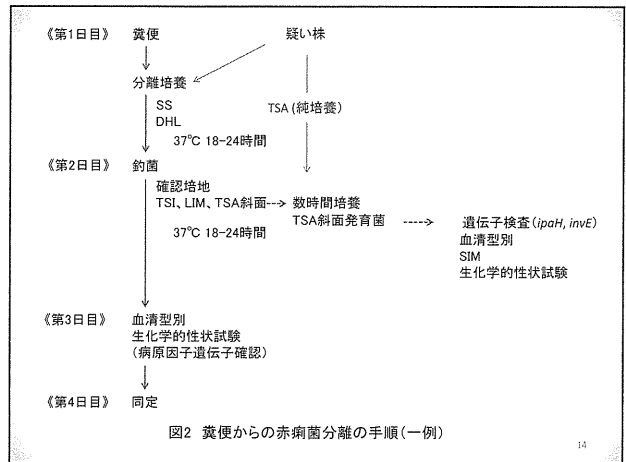
+.90%以上が陽性、-.90%以上が陰性、d:菌株によって異なる

手順書に添付する参考資料

表3.赤痢菌の鑑別性状

性状	<i>S. dysenteriae</i>	<i>S. flexneri</i>	<i>S. boydii</i>	<i>S. sonnei</i>	<i>E. coli</i>
インドール	d	d	d	-	d
β-ガラクトシダーゼ	d	-	d	+	+
オルニチンデカルボキシラーゼ	-	-	-	+	+
ブドウ糖からのガス産生	-	d	d	-	+
糖(酸):マンニト	-	+	+	+	+
乳糖	-	-	-	(+)	+(+)
白糖	-	-	-	(+)	d
ラフィノース	-	d	-	(+)	d
キシロース	d	d	d	-	+
ズルシット	d	-	-	-	d
酢酸ナトリウム	-	d	-	-	+(+)

dが多く、これだけでは判定できない



赤痢菌の調査項目のポイントをどこにするか？

1	運動性の確認	運動性がないということが全ての赤痢菌における唯一無二の絶対的な性状である。SIM培地を併用しているか？
2	遺伝子検査	ipaHを検出しているか？ invEが脱落する可能性を理解しているか？
3	血清型別試験	免疫抗血清の保有状況は？ 共通抗原に対する認識・・・ EIECを疑う場合の検査は？
4	類似菌との鑑別	<i>Morganella morganii</i> , <i>Plesiomonas shigelloides</i> との鑑別

どの段階で赤痢菌と決定するのか？

細菌性赤痢の精度管理調査の検討項目
(意見のまとめ)

- 模擬(臨床)検体からの菌の分離・性状確認・鑑別・同定・型別
- 菌株(非典型株を含む)を用いた赤痢菌の鑑別・同定
 - 1の場合もしくは2で菌を混合接種する場合
分離寒地培地から当該菌を選択できるか？
 - 1,2に共通な項目(通常どの範囲まで実施しているか/できるか?)
 - 生化学性状(検査項目)
 - 血清型別
 - 遺伝子検査の活用状況

point 類似菌との鑑別ができるか？(鑑別のポイントのチェック)
腸管侵入性大腸菌(EIEC)・*Plesiomonas shigelloides*・*Morganella morganii*

当面は判断困難な問題

- 鑑別不可能なEIEC
- 新血清型赤痢菌
- 報告されていない抗血清に凝集しない赤痢菌と同定される株
- Shigella boydii* 13病原遺伝子を保有しない赤痢菌の対応

その他
薬剤感受性試験・臨床症状からの判断を含む出題・誤同定の事例調査・自家調整培地の精度の担保？

今年度(以降)の実施内容について

- 平成28年度は細菌性赤痢で実施したい。
- 次年度はEHECの必要性が高いのではないか。

H28年度 赤痢菌

- 菌株の選定と実施要領・ワークシート作成
- 菌株の配布
- 結果の回収と実施後アンケート実施

コレラ菌検査トラブルシューティングは必要か？

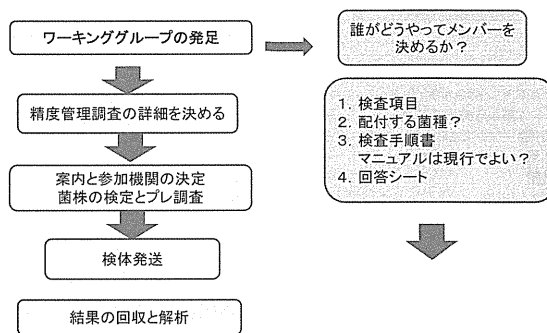
H29年度 (EHEC?) 赤痢菌検査トラブルシューティング

平成27年度に作成した書類等

1. 病原体検出マニュアル(改定版)
2. 実施予定案内文
3. 搬送容器の準備説明書
4. 搬送容器チェックシート
5. 参加申込書兼誓約書
6. 精度管理細菌検査実施手順書
7. 案内文(part2)
8. 結果報告書
9. 検査経過記録書
10. 検査体制アンケート
11. 事後アンケート
12. まとめ??

19

細菌性赤痢を対象とする精度管理調査



20

