

図5 ウイルスの非親水化・親水化による
染色の差異と1スクエア当たりの観察数

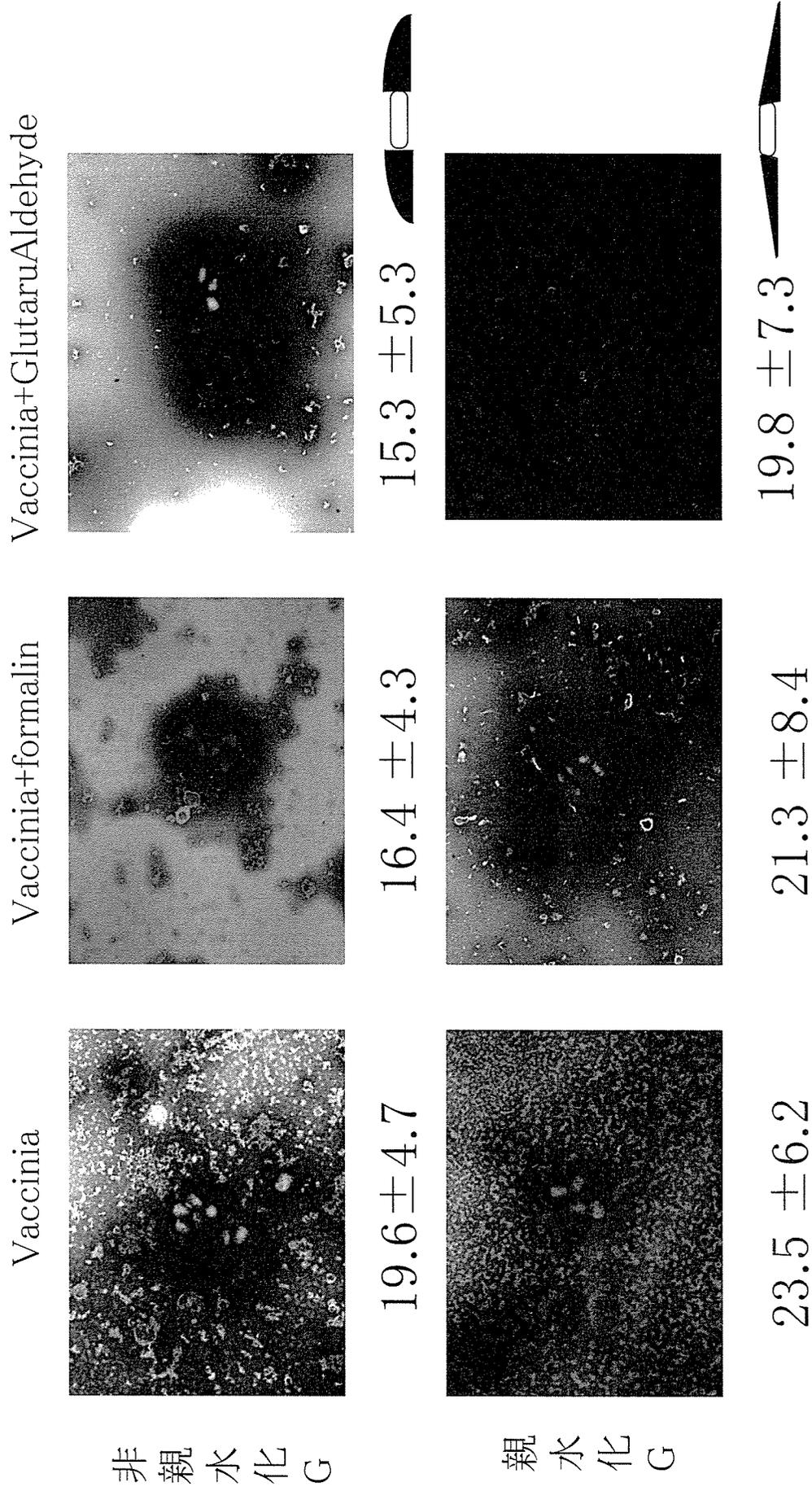


表1. 電子顕微鏡検査に関するアンケート結果

全76地方衛生研究所(以下、地研)を対象としてアンケート調査を行ったところ、全ての地研から回答があった。

・電子顕微鏡を所持している地研	52地研/76地研
・電子顕微鏡担当者がいる地研	42地研
担当者の人数が1人	25地研
担当者の人数が2人	13地研
担当者の人数が3人	3地研
・電子顕微鏡検査を日常的に実施している	21地研
・ドイツKoch研のウイルス診断外部精度管理 (EQA-EMV)に参加している地研	3地研
・電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理について (電子顕微鏡を所持し、研究協力者のいる愛媛県、大阪府、岡山県を除く49地研)	
参加を希望する地研	33地研/49地研
サンプル分与のみを希望する地研	2地研

電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理をすることに関する意見 (重複あり)

参加: 33地研(愛媛県、大阪府、岡山県を除く)

・電子顕微鏡観察技術の伝達をしてほしい	5地研
・精度管理を行うことで電子顕微鏡を活用したい	1地研
・通常の検査法で、検査を行いやすい時期に実施してほしい	3地研
・今回の精度管理を発展させたり、継続させる方法を考えてほしい	2地研
・ウイルス検査を電顕と他の方法とを併用して行っている場合、精度管理は 不必要では	1地研

不参加: 16地研(電子顕微鏡を所持しない24地研を除く)

・バイオテロ対策として電子顕微鏡をどのように用いるかについての研修 が必要	3地研
・精度管理検査の必要が生じれば参加したい	1地研
・担当者の電子顕微鏡観察技術が向上すれば参加したい	2地研
・精度管理には参加しないが、技術向上のためサンプル分与は希望する	2地研
・電子顕微鏡は所持しているが、ウイルス検査に活用していない	1地研
・電子顕微鏡が老朽化しており、使用できない	1地研
・電子顕微鏡を所持していないため不参加だが、信頼性を確保するためには、 精度管理が必要であると考え	1地研

表2. ノロウイルス検査に関するアンケート結果

全76地研を対象としてアンケート調査を行ったところ、57地研から回答があった。

・感染性胃腸炎ウイルスの診断法(複数回答あり)

PCR	48地研/57地研
real time PCR	38地研
電子顕微鏡	21地研
免疫学的方法	13地研
Lamp法	3地研
TRC法	2地研

・PCR、real time PCR法が陰性の場合の対応、検査法(複数回答あり)

検査を終了する	23地研/57地研
協議次第で検査を終了する	4地研
他ウイルス用PCR	30地研
後日まとめて、他ウイルス用PCRを行う	1地研
電子顕微鏡を併用	20地研
免疫学的方法	18地研

表3. 精度管理試料 ABC のVLP観察結果

固定処理と親水化処理によるVLP観察結果

	試料A 固定VLP	試料B Negative Cont.	試料C 生VLP
非親水化	凝集したVLP少数観察・PTAがはじく	ND/PTAが島状にはじく	少数観察・PTAがはじく
親水化	凝集したVLPが点在・PTAは均一	ND/PTAは均一	スクエア当たりのVLP計数可・PTAは均一

表4. 精度管理の回答結果

精度管理に参加希望の33地研の全て、およびサンプル分与のみ希望の1地研から回答があった。

観察結果

・固定化VLP液からウイルス様粒子を観察できた地研	24地研/34地研
・固定化VLP液からウイルス様粒子を観察できなかった地研	10地研
・生VLP液からウイルス様粒子を観察できた地研	34地研
・生VLP液からウイルス様粒子を観察できなかった地研	0地研
・希釈液(陰性対照)からウイルス様粒子が観察された地研	5地研
・希釈液(陰性対照)からウイルス様粒子が観察されなかった地研	29地研

全34地研中、固定化VLP液の正解は24地研(70.6%)、生VLP液の正解は34地研(100%)であった。培養液(陰性対照)については5地研(14.7%)から極微量のウイルス様構造物の混入がみられたという指摘があった。

親水化法

・イオンスパッター	24地研/34地研
・UVランプ処理	8地研
・親水化処理をしない	2地研

ネガティブ染色法

・リンタングステン酸	32地研/34地研
・酢酸ウラン	2地研

サンプルの観察状態に関する意見

固定化VLP液について

ウイルス様粒子を観察できた地研:24地研

・観察は容易または問題なかった	7地研
・観察は困難であった	17地研

ウイルス様粒子を観察できなかった地研:10地研

・観察は容易または問題なかった	4地研
・観察は困難であった	6地研

生VLP液について:全34地研でウイルス様粒子を観察できた

・観察は容易または問題なかった	33地研
・観察は困難であった	1地研

培養液(陰性対照)について

ウイルス様粒子が観察された地研:5地研

・観察は容易または問題なかった	1地研
・観察は困難であった	4地研

ウイルス様粒子が観察されなかった地研:29地研

・観察は容易または問題なかった	24地研
・観察は困難であった	5地研

その他の意見

固定化VLP液について

- ・試料がグリッドに載らずに苦労した。
- ・観察できる試料が少なく、観察不十分であった。
- ・コロジオン膜が破れやすかった。
- ・サンプル量が少ない。
- ・サンプル量が少なすぎる。
- ・粒子のコントラストがはっきりせず探しにくい。
- ・ウイルス粒子数が少なかった。
- ・メンブランが非常に破れやすい。
- ・なかなかサンプルがグリッドに載らなかった。
- ・ウイルス量が少なく、探すのに時間を要した。
- ・粒子数が少なく、探すのに時間がかかった。

生VLP液について

- ・試料がグリッドに載らずに苦労した。
- ・試料が薄かったため、試料の染色時間を約10分と長くした。
- ・サンプル量が少ない。

希釈液(陰性対照)について

- ・試料がグリッドに載らずに苦労した。
- ・観察できる試料が少なく、観察不十分であった。
- ・サンプル量が少ない。
- ・ウイルス粒子数がきわめて少ない。
- ・極少量異物が混入している。
- ・メンブランが非常に破れやすい。
- ・膜が破れるため、続けて観察できない。

平成17年度分担研究者海外調査報告

分担研究者 小倉 肇 (岡山県環境保健センター所長)

平成17年6月12日から平成17年6月23日までの12日間にわたって海外渡航した。6月14日から6月18日までは、研究協力者の一人であるH. Gelderblom教授のいる、国立コッホ研究所(ベルリン)、6月20日から22日まではパスツール研究所(パリ)を訪問した。訪問の主な目的は、電子顕微鏡によるウイルス診断、特にバイオテロ等に関連するウイルス診断の外部精度管理の現状を調査し、そのシステムを地方衛生研究所に導入して、より良い検査の精度管理体制を構築することであった。

I. ドイツ国立コッホ研究所

対応職員

Prof. Dr. R. Kurth所長、Prof. Dr. R. Burger副所長、H. Gelderblom教授、N. Bannert博士

職員数は約800人である。5年後を目標にBSL4施設を作る予定がある。

ドイツのコッホ研究所においては1994年から国際的に電子顕微鏡ウイルス診断外部精度管理[External Quality Assurance in Electron Microscopic Virus Diagnostics (EQA-EMV)]を行っている。ドイツ国内だけではなく各国へ固定失活させたウイルス検体を送付し、診断解答させた上で精度管理をしている。精度管理への参加はアメリカのCDCを含めて32ヶ国で115の研究所が含まれている。ドイツ国内では、30の研究所・大学が加盟している。

また、コッホ研究所では 2002年からEuropean Network for Diagnostics of Imported Viral Disease (ENIVD) を通して、PCR法によるバイオテロ時のウイルス迅速診断外部精度管理をヨーロッパを中心とした17ヶ国28の研究所に対して行っている。

このドイツにおける精度管理の実際を視察し、担当職員と問題点等について討論し、このEQA-EMVシステムの地方衛生研究所(地衛研)への導入の参考とするものであった。

研究所のバイオセキュリティ対策:

職員は各自のカードキーで戸を開閉し、また、エレベーターに乗ることのできる仕組みになっていた。外部者は玄関にある受付で氏名、訪問目的、訪問相手を書くようになっていたが、常に担当するH. Gelderblom教授が付き添っていてくれたので、特にチェックを受けることはなかった。

電子顕微鏡グループ

写真室の人員を含めて約20名の職員がいた。電子顕微鏡を操作できるのは8人であった。他には、技術員等がサンプルの調整、ネガティブ染色などを担当していた。

この電子顕微鏡グループの担当者と討論をし、標本作製実習、外部精度管理の運営方法等を見せてもらった。

培養等で得られたウイルスの電子顕微鏡用失活固定は、ホルマリンまたはパラフォルムアルデヒドでおこない、150～250 micro litterをサンプルとしてエッペンドルフチューブに入れ、普通航空便で郵送する。まず、6ヶ所のレファレンス研究所に送付して、5ヶ所の研究所から正解が得られたものを精度管理用サンプルとして使用している。

PCR法による診断グループ

各種のポックスウイルス、出血熱ウイルスであるフィロウイルスやラッサウイルス等に対して、PCR法による診断経験のある国関係または軍関係の研究所に対する精度管理が中心であった。PCR用のプライマー等は各自で開発(既発表ないしは未発表のもの)したものを用いていた。精度管理用ウイルスサンプルの失活は、56C1時間の後30kGyのガンマー線照射による。日本においてはこれらウイルスを入手することは無理であり、地方衛生研究所における検査内容とは思われなかった。なお、国立感染症研究所は、この精度管理に参加している由である。

II. パスツール研究所

対応職員

A.Gouyette副所長、 M.Marchand副所長、M.d'Arbigny品質部長

パリに本部があるパスツール研究所は職員数約2500人でアジア、アフリカ等に合計22の支所を持ち、総計職員数は8500人となる。特記すべきは、ベトナムに3カ所、カンボジアに1カ所の支所を持っている。この一部は現地国の国立研究所を兼ねている。

パリ本部では公衆衛生に係わる大学院レベルを持つ15の研修コースを設けている。

運営は、政府補助金30%、特許・ワクチン接種等の収入40%、献金30%である。

ウイルス分離、診断等の業務を行っているが外部精度管理は行っていない。内部精度管理として、関係する支部間でサンプルを交換してクロスチェックを行うほか、パリ本部へサンプルを遅らせてチェックする。各支部による感染症サーベイランスのネットワークを構築している。天然痘ウイルスはアメリカとロシアにしか存在しないので、「ポックスウイルス検査担当者はおいていない。出血熱ウイルスの疑いのあるサンプルは当所ではなく、BSL4施設を持つリオンにある国立研究所インセラムに送られて診断される。我々の所にBSL4施設を作る計画はない。」とのことであった。

研究所におけるバイオセキュリティ対策：

研究所に入り口で、氏名・誰に面会する予定かを質問され、IDカードの提示を求められた。パスポートを提示すると、首掛け式面会票が交付され、パスポートは帰るときまで預かると取り上げられた。

以上のように、コッホ研究所ではウイルス検査の精度管理体制がある程度確立されており、国際的に活発な活動がなされていた。一方、パスツール研究所ではウイルス検査の精度管理はなされておらず、必要性は認めるものの実施の困難さを感じさせた。

両研究所共にバイオセキュリティに関しては非常に気を遣っており、バイオテロに用いられかねない病原微生物の盗難に備え、外来者の管理を厳しくしていることが印象的であった。国立感染症研究所でも、入退所者の管理体制を整備したばかりと聞くが、地方衛生研究所においても早急に整備しなければならない。岡山県環境保健センターでは、早速窓口に入退所者記録簿を作り、外来者には名札を胸に付けてもらうようにした。

別紙 2

平成17年度厚生労働科学研究費補助金

「健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制の現状把握と
検査等の精度管理体制に関する調査研究」今井班

分担研究「バイオテロ等健康危機発生時の電子顕微鏡的ウイルス検査の
精度管理」小倉班

電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス

固定法及び染色法マニュアル

電子顕微鏡的ウイルス診断のためのウイルス固定法及びネガティブ染色法

I. 膜張りグリッドの用意

支持膜の作り方は種々の方法があるが、例として湿式法コロジオン膜と乾式法ホルムバル膜の作製法を示す。

1、コロジオン支持膜(湿式法)の作製

- 1) VECO 400mesh Cu / オランダ製を用意する。
- 2) バイヤルに上記グリッドを移し、アセトンで3回洗浄する。
- 3) ドラフトで濾紙上に広げ、乾燥する。
- 4) グリッドを1枚ずつピンセットで掴み、ネオプレンW液に浸けて濾紙上に叩きつけコーティングする。(接着剤を必ずしも使用しなくても可)
- 5) ドラフトでそのまま乾燥する。
- 6) 市販のコロジオン膜張器(日新 EM 650)にステンレスの網板を沈める。
- 7) 約40℃の蒸留水を満たす。
- 8) ステンレス網板の上に400メッシュの銅製グリッドを表を上に向け50枚程度並べる。
- 9) 2%コロジオン液(酢酸アミル溶液)(日新 EM 601)をパスツールピペットで1滴静かに滴下する。
- 10) 10分程度静置し酢酸アミルが揮発するのを待つ。
- 11) 膜張器の下のコックを緩め、静かに水を抜いて水位を下げ、銅製グリッドにコロジオン膜を張り付かせる。
- 12) ステンレス網板ごと取り出し、濾紙上で水切りした後、室温で一夜乾燥させる。
- 13) カーボン蒸着してコロジオン膜を補強する。カーボンの蒸着量は、銅製グリッドの側に置いた濾紙が薄く着色する程度が良い。

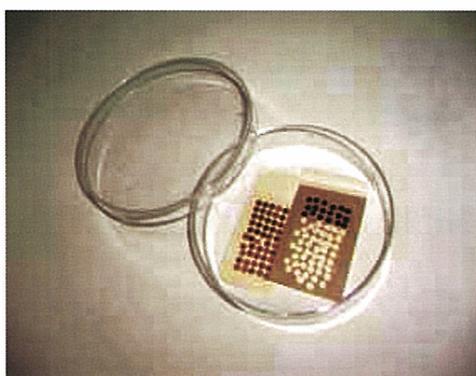
(応研商事の真空蒸着膜比較版セットの150-200Aの厚み)

コロジオン膜の厚さは、滴下する水面の面積、水温、溶液の濃度、滴下量によって決まる。作製条件や使用する器具は一定にし、膜の厚さは滴下量で調整するのがよい。適当な口径のビペットを選び常に同じものを使用するようにする。

2、ホルムバル支持膜(乾式法)の作製

- 1) VECO 400mesh Cu / オランダ製を用意する。

- 2) バイアルに上記グリッドを移し、アセトンで3回洗浄する。
- 3) ドラフトで濾紙上に広げ、乾燥する。
- 4) グリッドを1枚ずつピンセットで掴み、ネオプレンW液に浸けて濾紙上に叩きつけコーティングする。(接着剤を必ずしも使用しなくても可)
- 5) ドラフトでそのまま乾燥する。
- 6) 市販のホルムバル膜張器(日新 EM 652)に新しい清浄なスライドグラスを入れる。(古いスライドグラスは不可)
- 7) 1%Formbal-1,2-dichloroethane の液面を上げて下げることでスライドグラスをホルムバル液で濡らせる。(日新 EM 602)
- 8) スライドグラスの1,2-dichloroethane が揮発するのを待つ。
- 9) スライドグラスのホルムバル膜の四辺にカミソリで切れ目を入れる
- 10) 清浄なビーカー(500ml)に蒸留水を9分目程度入れる。
- 11) 切れ目を入れたスライドグラスを斜めにして水に沈めホルムバル膜をはがし水面に浮かせる。
- 12) ホルムバル膜に洗浄コーティング済み 400 メッシュの銅製グリッドを表を下に向け50枚程度、静かに載せる。
- 13) 清浄なケント紙の片側下面を膜面にあて、垂直に沈めホルムバル膜をケント紙に張り付ける。
- 14) 水滴を吸い取りシャーレに入れ、37℃ふらん器内で乾燥させる。
- 15) カーボン蒸着でホルムバル膜を補強する。
カーボンの蒸着量は、銅製グリッドの台紙が薄く着色する程度が良い。
(応研商事の真空蒸着膜比較版セットの 150-200A の厚み)
- 16) デシケータ保存



[市販のカーボンコーティング済の膜張りグリッドとして、日本電子データムの

400mesh(カタログ上には200meshまでしかないが、400meshを特注可能)等を利用可能]

II. 膜張グリッドの親水処理法(特に固定ウイルスサンプルの場合は必要)

1. Ion sputter AC 500V 5mA 15~20sec



2. Ion sputter のない場合はUVランプ処理でも良い
(6~10cm 離して 20 min 照射)

3. さらなる親水処理法としては次のものがある

1) Alucianblue(SERVA)液を用いる方法

stock solution 2% in bi-dest(使用時には bi-dest で 1%とすると
4°Cで一ヶ月は安定している)

a) パラフィルム上に Alucianblue 液 1 滴をつくり、グリッドを 5~10
min 浮かべる。

b) パラフィルム上に bi-dest を 5 滴つくり、グリッドをピンセットでつかみ
Alucianblue を洗うように順次浸す(少し青みがある程度まで)。濾紙片で
残りの液を吸い取る(少しはぬれている程度まで)

c) 素速くサンプルをグリッドに乗せて、適当な時間吸着させる。

2) 0.01% poly-l-lysin または 25ug/ml Bacitracin をもちいる
方法もあるが、研究班としてはあまり勧めない。

親水化の効果は 1-2 日でなくなるので出来るだけ早く使う。数日後使用する場合は再処理する。

III. ウイルスサンプル固定法

1、試料

- 1)培養細胞液(そのまま、または濃縮、場合により固定してから濃縮)
- 2)水疱液(そのまま固定液の入ったシリンジに取る)
- 3)糞便材料(超遠心濃縮精製した Gastroenteritis virus)

2、固定法

1)サンプルを液の状態固定する方法

- a) 3%のホルマリン(Formalin) (新しい物を使用)で 20min 以上固定

1ml の試料に 37% Formalin(和光純薬 064-00406)を 88ul 加えると 3% になる。

- b) 3%グルタルアルデヒド(Glutaraldehyde)で 20min 以上固定

1ml の試料に 20% Glutaraldehyde(和光純薬 072-02262)を 176ul 加えると 3% になる。

- c) 3%パラフォルムアルデヒド(Paraformaldehyde)で 20min 以上固定

(特に免疫電顕)

Paraformaldehyde (応研 TAAB Paraformaldehyde EM Grade)を購入。

10～12% になるように HEPES buffer (pH7.2)に入れて 60～70℃に 保ち 10N NaOH 液を透明になるまで滴入する(約 2 滴)。

少量ずつ容器に分配し、-20℃に保存する。

使用時には室温でウイルス材料 3～4 : Paraformaldehyde 液 1 に混じり 20分固定する。最終濃度 3%位がよい。

2)グリッド上のサンプルを固定する方法

ウイルス液をグリッドにのせて空気乾燥させた場合は、1% グルタル アルデヒド 液中で 10 分固定し、水中(aqua bidest)で 2 回洗浄し、染色する。

IV. ネガティブ染色法

1. ネガティブ染色液

- 1) Phosphotungstic Acid (PTA)(日新 EM 3261)

2% Phosphotungstic Acid (PH 7.1) 1N KOH または 1N NaOH で調整

- 2) Uranyl acetate (UA) (ただし、「核原料物質、核燃料物質及び原子炉等の規制に関する法律」第61条の3第1項に基づき国際規制物資使用許可を受ける必要がある。)

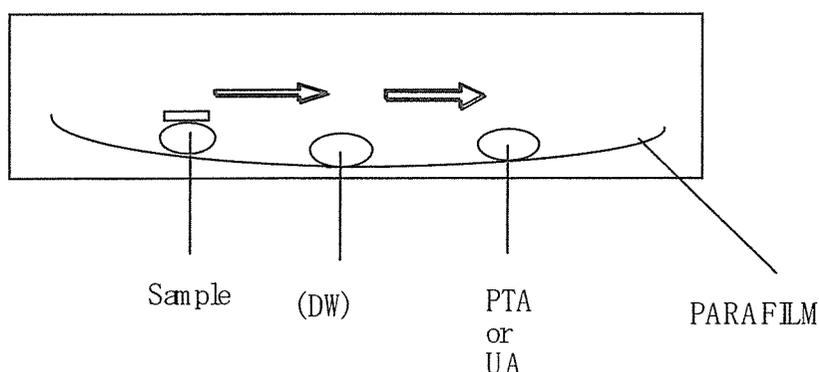
1～2% Uranyl acetate in bi-dist(PH 調整不要)

2. ネガティブ染色操作

[グリッド移動(フローティング)法 or グリッド固定法]

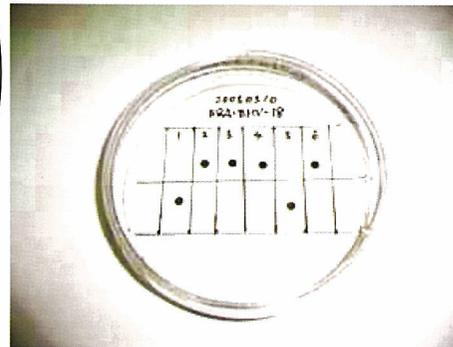
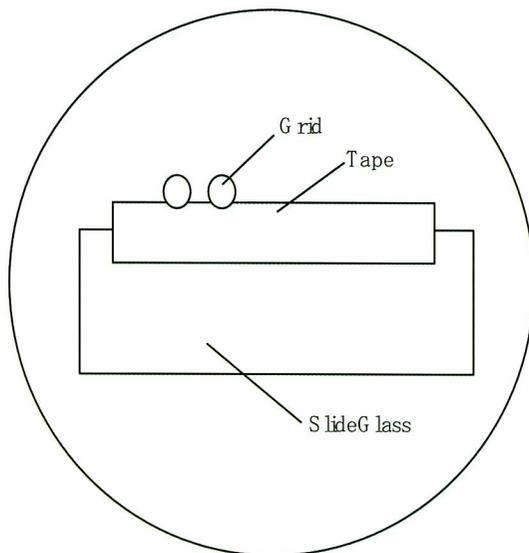
1)グリッド移動法(フローティング法)

- a)パラフィルムを用意し、その上に染色液滴を作り、グリッドのサンプル面を下にして浮かべることにより染色する。
- b)ウイルス溶液 (10ul)をパラフィルムにのせ、グリッドのサンプル面を下にして浮かべ、静置 1min～10min～
- c)裂いた濾紙で吸い取り
- d)試料の塩類含量が多い場合は、試料を吸い取った後、直ちに蒸留水1滴で洗浄してから染色すると良い。
- e)PTA 溶液 または UA 溶液(10ul)
パラフィルムにのせ、グリッドのサンプル面を下にして浮かべ、静置 1min
- f)裂いた濾紙で吸い取り(グリッド面が一様に濡れた状態)
- g)37～45℃ インキュベータで乾燥
- h)乾燥後、濾紙をひいたシャーレに移動する。



2) グリッド固定法

- a) スライドガラスとメンディングテープを使ったグリッドクランプを入れたシャーレを用意
- b) グリッドをサンプル面を上にしてグリッドクランプに接着。
- c) ウイルス溶液 (5ul) をグリッドにのせ静置 1min~10min~
- d) 裂いた濾紙で吸い取り(グリッド面が一様に濡れた状態が Best)
- e) PTA 溶液 または UA 溶液(5ul)(洗うときは2回)をグリッドにのせ静置 1min
- f) 裂いた濾紙で吸い取り(グリッド面が一様に濡れた状態が Best)
- g) 37~45°C インキュベータで乾燥
- h) 乾燥後、濾紙をひいたシャーレに移動する。



V. 観察・撮影・プリント

- 1、 EM (Transmission Electron Microscope) 倍率 $\times 40,000$ で観察
試料の観察は常に同一倍率で行うのがよく、4万倍を使用する。
1グリッドにつき少なくとも5スクエアは観察し・粒子の有無を判定する・試料の載りかたにより観察するスクエア数を調節する
- 2、 ウイルスを撮影し、フィルム現像。
- 3、 フィルムスキャナーを用いてデジタル化または倍率2倍でプリント

アンケート用紙 -1

研究所名()

担当者名()

(はい、いいえの前に○印を付して下さい)

1. 電子顕微鏡を所持しておられますか (はい、 いいえ)
2. 電子顕微鏡担当がおられますか (はい 人います。 いいえ)
3. 電子顕微鏡検査を日常的に実施されていますか (はい、 いいえ)
4. 電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理を実施するとしたら参加していただけますか (はい、 いいえ)
5. ドイツのKoch研究所が実施している、ウイルス診断外部精度管理(EQA-EMV)に参加しておられますか (はい、 いいえ)
6. 電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理をすることに関してご意見を伺います。自由にお書き下さい。

アンケート用紙 -2

さて、今年1月にはノロウイルス等感染性胃腸炎の集団発生があり、検査にご苦勞があったことと思いますが、貴所においてはどのような検査法でやられたかお伺いします。

(1)糞便・吐物中の感染性胃腸炎ウイルスの診断法(複数回答可)

PCR(), real time PCR(), 電顕(), エライザ等免疫学的方法(),
Lamp法(), TRC法(), その他()

(2)PCR, real time PCR法でノロウイルスが陰性の場合どうされますか(複数回答可)

- a) 検査を終了する。()
- b) 他のウイルスのPCRを行う。()
- c) 電顕を併用する。()
- d) 免疫学的方法を行う。()
- e) その他()

平成17年12月9日

地方衛生研究所
電頭担当者 各位

厚生労働科学研究分担者
岡山県環境保健センター 所長
小倉 肇

ウイルス診断精度管理の結果について

初冬の候、ますますご清祥のこととお喜び申し上げます。

「健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制の現状把握と検査等の精度管理の体制に関する調査研究」の分担研究「電子顕微鏡的ウイルス検査の精度管理」に参加いただき有り難うございました。

第1回目の精度管理として、サンプルを3検体作製し、内容はノロウイルスの組み替え体ウイルス(VLP;国立感染症研究所・武田先生提供)で、チューブ内に以下のとおり入っていました。

- A: パラフォルムアルデヒドで固定したVLP
- B: ネガティブコントロール
- C: 生のままのVLP

参加した34地研中、Aの正解は24地研(70.6%)、Cの正解は34地研(100%)でありました。Bについては極微量のウイルス様構造物の混入がみられたという指摘があり、今回の精度管理から除外させていただきました。また、A、Cには同濃度のVLPを入れておりました。

Aは固定化したため、Cに比較してより強い凝集傾向がみられました。今回は貴重な少量のサンプルであったため各地研への配布量が微量(25 μ l)であり、凝集傾向の強い固定化VLPは各地研間で粒子数のばらつきがあったかもしれないと考えられます。また、一部の地研からメッシュの膜が破れやすいとの指摘がありました。これらのことをふまえ、次回の固定化ウイルス液を使用した精度管理を行う場合には、以下のような改善が必要と考えられました。

1. サンプル量は、できるだけ多く配布する(100~200 μ l以上)。
2. メッシュを自作する場合は、コロジオンよりフォルムバールの方がより劣化が早いことに注意し、カーボン補強を行う。
3. 親水化後は、できるだけ早く使用する。
4. Alcianblue液で更なる親水化を試みる。
5. PTA液に少量の(10mlに1~2滴)BSA溶液を添加してみる。

今回は、VLPを検査材料としましたが、次回は数種類のウイルスを使用して精度管理を行う予定です。その際にはバイオハザード防止のため、検査材料を固定化して送付する必要があり、今回の試行結果はそのための基礎データとして貴重なものでありました。この結果をご参考にしていただければ幸甚に存じます。

平成17年度厚生労働科学研究費補助金(健康科学総合研究事業)

健康危機発生時の地方衛生研究所における調査及び検査体制
の現状把握と検査等の精度管理体制に関する調査研究

分担研究報告書

欧米諸国の地方衛生研究所相当機関における危機管理対策の一環としての
精度管理制度の調査と本邦への導入に関する検討(欧米諸国調査)

分担研究者 吉村健清 福岡県保健環境研究所長

研究要旨:

本研究は欧米諸国の危機管理対応システムを調査し地方衛生研究所に適したシステムを検討するため、まず「国と地方の連携」、「精度管理」ならびに「積極的疫学調査」について、情報の収集、整理を行った。調査対象とした諸外国のほとんどがあらかじめテロの対象としている感染性微生物や有害化学物質を明確にし、標準化された電子媒体でのネットワークシステムを組み、公衆衛生情報の収集、共有ならびに活用を迅速に行い、お互いの役割分担と協力関係の質の向上を目指している。また検査精度を維持する上において、アメリカはInternational Organization for Standard (ISO)、Good Laboratory Practice (GLP)やEnvironmental Protection Agency (EPA)による認証制度を進めており、イギリスは外部精度管理機関として世界最大規模のFood Analytical Performance Assessment Scheme (FAPAS)、Food Examination Performance Assessment Scheme (FEPAS)、Genetically Modified Material Analysis Scheme (GeMMA)、Laboratory Environmental Analysis Proficiency Scheme (LEAP)による認証制度を進めている。さらに感染症や食中毒などの健康危機管理事例が発生した場合に積極的疫学調査を行う専門家養成機関として、アメリカはCDCにEpidemic Intelligence Service (EIS)にField Epidemiology Training Program (FETP)を、ヨーロッパ連合(EU)もEuropean Programme for Intervention Epidemiology Training (EPIET)を持っている。以上の文献情報をもとに、次年度は、危機管理先進国であるアメリカおよびイギリスにおける最新のテロ対策システム、精度管理ならびに積極的疫学調査システム等を調査することが適切であると考え。さらにアメリカ、イギリスの調査結果をもとに、地方衛生研究所の健康危機管理に対する機能向上のため、どのような事態を想定し、どのように備え、そのためにはどのような課題が残っているかについて検討する。

研究協力者		世良暢之	福岡県保健環境研究所
岡部信彦	国立感染症研究所	田中義人	福岡県保健環境研究所
郡山一明	救急救命九州研修所	小野塚大介	福岡県保健環境研究所

A. 研究目的

本邦において、阪神・淡路大震災や有珠山、三宅山噴火のような自然災害、和歌山市毒物混入カレー事件のような犯罪、JOCによる東海村臨界事故のような放射線事故、サリン事件のような化学兵器や毒劇物を使用した大量殺傷型テロ事件等が発生した。このような健康危機に対し、地域保健の専門的、技術的かつ広域的拠点である保健所また地域における科学的かつ技術的中核である地方衛生研究所においても、警察、消防等他の関連機関と共に危機管理対応が求められるようになってきた。

アメリカ、ヨーロッパ等の諸外国においてはとりわけニューヨーク9.11事件、郵便物への炭疽菌混入事件以降、感染性微生物や有害化学物質等による事件等に迅速、適切に対応するため、初動体制から各機関の連携、協力、責任さらに役割分担を明確にした対策を進めている。

そこで、本年度はまず種々の手法を駆使して健康危機対応体制の情報収集を行い、視察対象国の選定を行うことを目的とした。次に諸外国の視察、調査を実施し、最終的に地方衛生研究所の健康危機に対する機能向上の具体的方策を提言したい。

B. 研究方法

本研究は平成17～19年度の3ヶ年計画として実施するものであり、初年度は国立感染症研究所、(財)救急振興財団・救急救命九州研修所との連携・協力の下に、海外情報の収集、整理ならびに考察を行った。具体的方策としては、インターネットを活用した文献収集、関連学会・研修会への参加、国公立大学・研究所、大使館・領事館、留学経験者などへ

の問い合わせなどを中心に情報収集を行った。海外における健康危機管理情報の収集対象としては、危機管理先進国であると思われるアメリカ、イギリスならびにカナダに焦点を絞り、検討を行った。

C. 研究結果

次年度に海外の視察・調査対象場所の選定を行うにあたり、諸外国における「国と地方の連携状況」、「精度管理状況」ならびに「積極的疫学調査状況」を焦点として文献情報を収集、整理した。

1. 国と地方の連携状況

1.1 アメリカの状況

アメリカにおいては、バイオテロや感染症等の健康危機に対応するため、疾病管理・予防センター(Centers for Disease Control and Prevention, CDC)を中心とした組織間連携(The Laboratory Response Network(LRN))が構築されている。この連携ではCDCを中心として縦(民間—州政府—連邦)と横(連邦組織—連邦組織)の連携が構築されている。またこの連携に先行してGNYHA(Greater New York Hospital Association)はニューヨーク地域における連携の中心的な役割を果たしている。

(1) Greater New York Hospital Association (GNYHA)

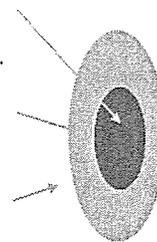
ニューヨーク市は、1996年、市長室に行政から独立した機関としてNew York Office of Emergency Management(NYC OEM)を設置し、集中統制室であるEmergencies Operation Center(NYC OEM EOC)を置き、政策決定権(decision making)を持たせた。

EOCは市、州、連邦、民間ならびにNPE (non-profit entries)からの100名以上のメンバーで構成され、24時間体制での監視、各メンバーの理解を徹底するための少なくとも毎週1回の会議を開催している。

GNYHAは3,000名以上の死者を出した2001年の世界貿易センター事件、炭疽菌事件を受けて、2001年11月にnonprofit hospital systemとして設立され、EOC内にGNYHA Emergency Preparedness Resource Center (GNYHA EPRC)を置き、活動を開始している。その設立目的はニューヨーク地域における風水害を含めた天災(地震、台風、洪水、火山噴火等)、ライフラインの寸断(電気、水道ならびにガス等の供給ストップ)、テロリズム(生物、化学、爆破等)、公衆衛生上の危機(SARS、新型インフルエンザ、ウエストナイルウイルス等の流行)、交通障害(航空、鉄道、高速道路等における不測事態)に対応するためである。GNYHAの使命は災害準備・対応時におけるネットワーク構成メンバー間の協力体制構築、構成メンバーと市・州・連邦の関係部局との連絡ならびに構成メンバー、関係部局、報道機関のためのデータ・情報の収集である。GNYHAは、主として医療提供者(病院、医師等)、保健・公衆衛生部局ならびに災害対策本部の三者から構成され、緊密な連携、双方向のパートナーシップに基づいた医療提供システムを確立している。GNYHAの生物・化学テロに対するネットワークは図に示すように3段階に分かれ対応している。

Hospitals: relative risk scale

- Key treatment centers
Hospitals in large urban areas
Note: This risk scale was used only to help identify a diverse group of hospitals for interviews. Other scales might have been used.
- Potential risk hospitals
Hospitals with populations less than 500,000 within a 50-mile radius and without a high-visibility target in that distance.
- Minimum risk hospitals
Hospitals within 50miles of a large urban area and high-visibility potential targets.
Major airport or sports stadium, large chemical mfg facility, nuclear power plant, major shopping mall, nationally recognized monument etc.



NYC OEM EOCとGNYHA EPRCは、24時間体制で疫学者がリアルタイムでの異常兆候(集団内の異常監視、救急部門患者数、救急車出動回数、薬剤購買状況ならびに主要企業の病欠率等)を監視している。GNYHAは構成メンバーが互いの仕組み、役割ならびに担当範囲の理解を徹底し、危機状況に即した計画と対応を実行するため、

- a. 手順、手続き、ガイドライン
- b. 反復訓練と応用演習
- c. 状況報告と訓練教材

を提供している。

活動例として、①同じ透析クリニックでの2例の心停止観察が救急車派遣センターから通報され、生物テロの可能性がある異常事態として察知されたことから、機器と手順の検査が終了するまでそのクリニックでの透析を禁止した事例、②2003年の豪雪による大停電時にはメンバー間でのコミュニケーションを確保するために800MHzラジオ、トランシーバーのように双方向で無料会話ができる機能を持ったNextel緊急対応ネットワーク携帯電話、緊急時連絡用電話番号の活用、市民へのボイラー・発電用燃料・食料の提供などを行った事例、③2005年のクリスマス直前の交通ストライキ発生時には宿泊施設の手配、共同使用

車両の手配、バスのリース、駐車場確保、メール・電話・FAXでの情報提供などを実行した事例等がある。

(2) The Laboratory Response Network (LRN)

LRNは、大統領令39に基づき保健福祉省(HHS)と疾病管理・予防センター(CDC)によって設立され、1999年の8月から活動している。その設立目的はバイオテロには対応に限界があった既存の公衆衛生体制を改善し、効果的に対応できるようにすることであった。現在、LRNは生物・化学テロ、その他の健康危機にも対応可能な分析ネットワークを構築している。このネットワークは州－地方－軍－連邦の連携のほか国際間の連携からなっている。特に国内では州と地方の公衆衛生研究所、獣医、農業、軍、水質、食品検査に関する研究所に及ぶ前例のないネットワークとなっている。LRNの使命は、生物・化学テロ、緊急的な感染症事例及びその他の公衆衛生への脅威や緊急事態に速やかに対応するため、国内外におけるネットワークを構築することとされている。

LRNの生物テロに対するネットワークは、National Laboratory、Reference Laboratory、Sentinel Laboratoryの3段階に分かれ、感染性微生物等に対応している。National Laboratoryは菌の同定や抗菌剤の選択、高感染性菌への対応を受け持つ研究所である。Reference Laboratoryは標準菌株を持っている研究所で参照標本及びその調査への対応を受け持つ。州や地方の公衆衛生研究所や軍、獣医、農業、食品、水質など100以上の研究所からなる。また、米国以外にReference Laboratoryとして英国、カナダ、オーストラリ

アにもある。Sentinel Laboratoryは主に病院や民間の検査機関など25,000の分析機関からなる。このレベルのLaboratoryは菌体早期発見の重要な役割を担っている。これらの分析機関は、日常業務で菌の同定等を行っている。多くの州や管轄地区は微生物安全性レベル3の設備を整えている。LRNの目的の一つはすべてのReferenceと国立研究所がレベル3を持つことである。現在、微生物関連で140機関(50の州とオーストラリア、カナダならびにイギリス)、化学物質関連で62機関が参加している。

LRNの化学テロに対するネットワークには62の州やメトロポリタンの研究所が参加し、検査レベルをレベル1～レベル3に分けて定義し、有害化学物質等に対応している。レベル1は5つの研究機関からなる。この研究機関では、レベル2の対象物質に加えてマスタードガス、神経ガスならびにその他の有毒化学物質を検出する。レベル2は全参加機関の1/4が属する。このレベルの研究員は血中及び尿中におけるシアン及び有害金属等の有害化学物質の検出を行う。レベル3は全ての研究機関が参加し、以下の活動と対応する。

- ・管轄下の病院と共に活動する
- ・標本の適切な収集と運搬方法の認識
- ・標本を犯罪調査の証拠として確保
- ・化学物質とその健康影響についての熟知
- ・病理標本の運送方法の熟知、訓練
- ・それぞれの州や管轄の対応計画の遂行

LRNのメンバーは合衆国内外に戦略的に配置されている(下図参照)。それぞれの機関はその州や管轄において危機対応を担っている。