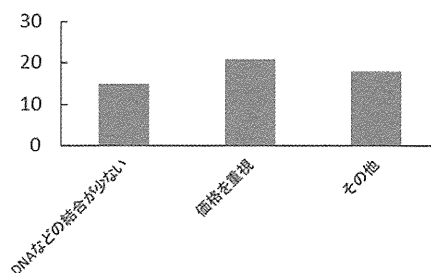


リアルタイム PCR で使用しているチップ、希釈容器

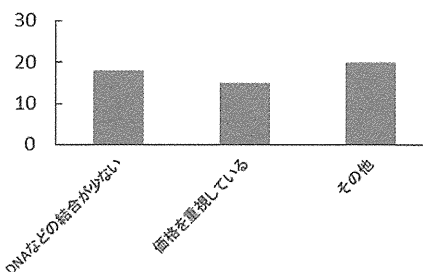
Q11 チップ

- ① DNA などの結合が少ない商品を使用している (15)
- ② DNA の結合よりも価格を重視している (21)
- ③ その他 (17)



Q12 希釈用チューブ

- ① DNA などの結合が少ない商品を使用している (18)
- ② DNA の結合よりも価格を重視している (15)
- ③ その他 (19)

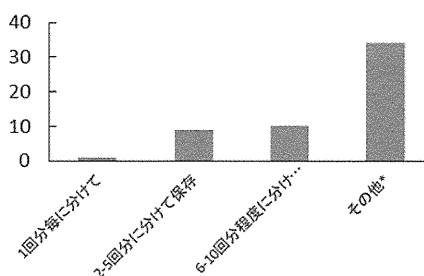


反応試薬

Q13 プライマー管理方法

- ① 1 回分毎に分けて (1)
- ② 2-5 回分に分けて保存 (9)
- ③ 6-10 回分程度に分けて保存 (10)
- ④ その他\* (34)

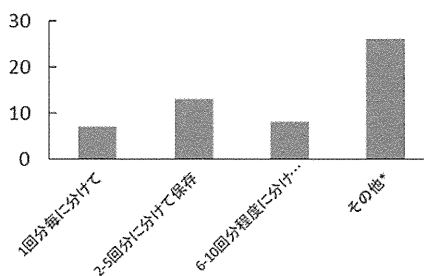
\* 小分け保存無しは 3 機関、  
20-200 $\mu$ l で保存 19 機関



Q14 プローブ管理方法

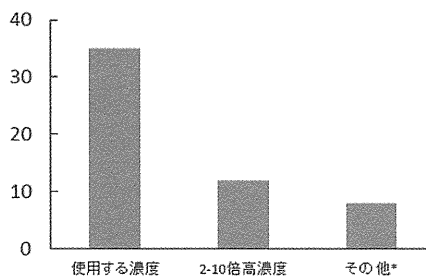
- ① 1 回分毎に分けて (7)
- ② 2-5 回分に分けて保存 (13)
- ③ 6-10 回分程度に分けて保存 (8)
- ④ その他 \* (26)

\* 小分け保存無しは 5 機関  
20-200 $\mu$ l で保存は 12 機関



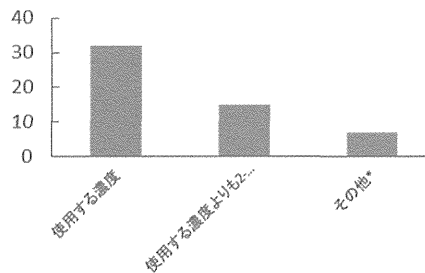
Q15 プライマー保存濃度

- ① 使用する濃度 (34)
- ② 使用する濃度よりも 2-10 倍高濃度 (12)
- ③ その他 (8)



Q16 プローブ保存濃度

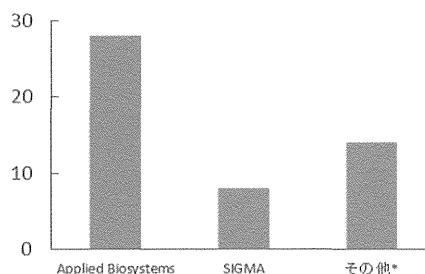
- ① 使用する濃度 (31)
- ② 使用する濃度よりも 2-10 倍高濃度 (14)
- ③ その他 (8)



Q17 プライマー製造メーカー

- ① Applied Biosystems (28)
- ② SIGMA (8)
- ③ その他 (14)

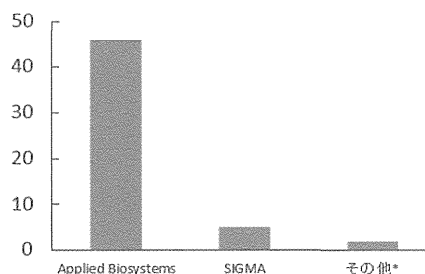
※①+②が 3 機関、①+③が 1 機関



Q18 プローブ製造メーカー

- ① Applied Biosystems (46)
- ② SIGMA (5)
- ③ その他 (2)

※②+③が 1 機関



その他意見（自由記載）

1. 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。
2. 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。
3. 理論値にほぼ同等の結果でしたので安心しました。プラスミド DNA は環状構造で、チューブへの吸着もあるため検体の 1 本鎖との相関を低コピー数でみるのは望ましくないのではないかと考えています。患者検体に対しては安定して検出できる濃度の Ct 値が毎回ぶれないことで検査の信頼性を確保しています。食品は低コピーなので、プラスミドでも安定して 10 コピーとかで欲しいですが、構造が違うので完全一致は無理と思って評価しています。
4. 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。
5. 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 450ul 測った平均が 440mg、P200 で 50ul 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。実施手順において、 $10^7 \sim 10^1$  コピー/well となるようにコントロールを調整し、検査を行うよう指示されていたが、当所では  $10^7 \sim 10^1$  コピー/ul のコントロールを 2.5ul/well 入れて検査を行った。PC の濃度を  $10^7 \sim 10^1$  コピー/well とした研究所と、 $10^7 \sim 10^1$  コピー/ul とした研究所で結果に差があったか知りたい。

6. コントロールプラスミドの Ct 値が非常に大きいのが普段から気になっていたが、今回の結果から、おそらく検量線が正しく立てられていないのではないかと想像できた。もう少し詳細な解析結果を待って、今後の検査に反映させたい。
7. 検量線のバラツキがなく測定精度に問題を感じていなかったが、今回基準値とのズレを指摘され、見直すきっかけになったのは良かった。ただ、何に問題が考えられるか解析結果のパラメータだけでは分かりにくく、全体総評などで説明が欲しかった。
8. 当所では、試料 A の GI の定量値が低値となり、B 判定となったことから、その原因究明を行った。その結果、検査担当者が感染症疫学センターから送付された標準曲線用コントロールプラスミドの GI の  $10^8$  を  $10^7$  に希釈する際、添付文書に記載のあった  $50 \mu\text{l}/\text{tube}$  をそのまま信じて、DEPC water  $450 \mu\text{l}$  を直接 tube に分注し、混和後、小分け分注保存していることが判明した。実際の tube の中には、少なくとも  $65 \mu\text{l}$  以上のプラスミドが入っていたことから、実際の標準コントロールの値としては、 $1.3 \times 10^7$  の 10 倍希釈列であるところを、 $1.0 \times 10^7$  の 10 倍希釈列として計算したことが、GI の定量値の低値の原因であった。標準曲線用コントロールプラスミドの希釈ミスが判明し、今後は、正確な定量値が算出できることが期待されることから、今回の精度管理への参加は非常に意義のあるものであったと考える。
9. 手技や検体等保存条件の検証のために、検量線作製のコントロールプラスミドは統一して配布して欲しい。
10. 他機関に比べ 1 オーダー高く出ているとの結果を受け、理由を検討した結果考えられる原因と対策について

① チップや希釈用チューブについて

DNA 吸着の少ない商品を使用していないことで、低濃度のコントロールの Ct 値が高く出て、そのために Std 曲線の傾きが大きくなり、検体の結果が本来よりも高いコピー数として出ている。

上記の対応策として、low retention のチップと DNA LoBind チューブを使用することとします。

② コントロールプラスミドの希釈について

当所では DDW または DEPC 水を使用していますが、Takara の EASY Dilution により結果が向上するか検討する予定としています。他機関であまり有効でなかったとの情報もあり、今回のアンケートにもその旨を尋ねる項目がなかったことから、先生も希釈に用いる溶液に関してはあまり関係がないとお考えなのでしょうか。以上の検討事項を、精度管理に用いた検体の残量で再測定し、対策の判定を行いたいと思います。

その他懸案事項

● 陽性コントロールプラスミドの保存方法について

希釈済みのコントロールプラスミドを凍結融解しながら使用すると、特に 3 乗以下で結果にバラつきが出るように思われるので、当所では 7 乗を 1 回分ずつ凍結保存しているものを毎回希釈して用いています。このことについては当所の方法で良いように思いますが、毎回希釈に時間を要するので、保存方法

によっては希釈済みのものを凍結融解して使用できるならそのようにしたいと考えています。

● 同一 Quantity sample の Ct 値のずれについて

低濃度の希釈コントロールプラスミドで同一のものを apply しているのに、Ct 値が大きくずれることが有ります。何が原因で同一のものが大きくずれるのか、ご助言頂ければ幸いです。

また、GI 及び GII 陽性コントロールの Ct 値が、同一 Quantity で GI の Ct 値の方が 3 ずつ大きくでる（1 オーダー分の差が出る）ことがあり、このことにも疑問を抱いています。こちらの方も何かご助言頂ければ幸いです。

11. 結果に関しては、値が大きく外れる事がなくて安心しましたが、本所の反応系について考えるうえで、他の衛研の反応系について、例えばサンプルアプライ量や反応液の量等の情報についてもフィードバックがあると参考になります。
12. すべてにおいて高値となり結果で D 判定でしたが、感染研から、アドバイスをいただき、新しい陽性コントロールを入手したので調整して陽性コントロールの Ct 値が正しい値で得られるよう行いたい。また、保管温度も-80℃にしました。検査精度を担保する貴重な機会であり、来年度以降も実施する場合には、参加を希望します。
13. 検査精度を向上させるため、結果を元に想定される問題点やトラブルシューティングについても頂けますようご検討お願いいたします。
14. 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。感染研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。
15. "このような外部精度管理の機会を与えていただきありがとうございます。検査方法を確認する良い機会だと思いますので、今後とも外部精度管理の実施を希望いたします。スタンダードコントロールを用いて、日常的に行っている検査であります。実際に外部評価を受けるのは初めてでした。今回の結果報告に安堵しつつも、今後も適切な検査結果を報告できるように努力したいと思えます。
16. スタンダードを含め、正確かつ精密に検査ができたのでよかったです。
17. 定量値が外れてしまった原因を究明し、改善していく。
18. 判定結果は判断できたが、べき乗変換を行ったのち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。
19. G1、G2 共に高い値にずれている事から、原因の 1 つとして、コントロール値の低下が考えられる。保存方法（-30℃保存）に問題が考えられるため-80℃保存に変更する。
20. 2・3 回目の測定の際にプラスミド濃度を間違えてコントロールを作成し、検量線を検証しないまま測定しました。後日、データ整理の際にズレに気がりましたが、再検するには検体量が不足、ズレたコントロールのまま 3 回測定した結果を報告しました。申し訳ありません。今後気をつけます。
21. 精度管理実施時に偶然、ヒートリッドドアカバーが故障し、温度上昇しなくなったため、修理を行った。毎年のメーカーメンテナンスは実施していないが、修理後メンテナンスを実施し、精度管理検体を検査した。

## 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ト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、定量値の持つ意味が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よいかと思えます。
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。

平成26年11月4日

### 地衛研精度管理研究班による 平成26年度外部精度管理（ウイルス検査）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26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实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)遺伝子定量(リアルタイム RT-PCR 法)

#### 4. 配付試料の概要

試料到着時期：平成26年11月上旬

試料名：NoV 遺伝子挿入プラスミド

量：50  $\mu$ L

個数：2バイアル（試料Aおよび試料B）

備考：試料AおよびBとも T<sub>10</sub>E<sub>1</sub> 緩衝液（Tris10mM/EDTA1mM）に溶解凍結

#### 5. 試料の検査

##### 1) 試料の保存及び検査方法

試料はマイナス 80℃で保存し、検査方法は別添資料2の精度管理実施手順に準じて行う。

##### 2) 試料名

NoV 遺伝子挿入プラスミド

##### 留意点

- ① 検査は、日常の当該項目の検査担当者とする。
- ② 検査は、送付試料から3検体をそれぞれ検査する（計3回測定）。
- ③ 標準曲線を別添1および2を参照し作成する。

#### 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

各機関は、検査・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書の電子データの提出（印刷物及び電子データ両方提出）。

電子メールにて、別途送付したエクセルファイルに、各機関における測定値、測定条件、測定試薬、標準曲線作成に用いた Ct 値、相関係数および測定装置等の必要事項を入力する（入力項目については別添資料3参照）。

##### 2) 検量線印刷物の PDF ファイルの提出

標準曲線の図を A4 サイズに形式を揃え、PDF ファイルにして提出する。

(検量線の原本は各機関で保存すること)

なお、精度管理報告書及び測定ファイルの様式の変更をしないこと。

7. 地衛研精度管理研究班による精度管理報告書の提出期限および送付先  
平成26月12月10日(水)必着

#### 8. 研究班員

研究代表者 富山県衛生研究所	佐多徹太郎
群馬県衛生環境研究所	小澤邦壽 塚越博之 小林美保
岡山県環境保健センター	岸本壽男 藤井理津志
東京都健康安全研究センター	貞升健志
名古屋市衛生研究所	柴田伸一郎
国立感染症研究所真菌部	宮崎義継
国立感染症研究所ウイルス第三部	駒瀬勝啓
国立感染症研究所感染症疫学センター	野田雅博 木村博一

#### 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)

地衛研精度管理研究班による  
平成 26 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 26 年度外部精度管理（ウイルス検査）実施要領に基づき、NoV 遺伝子挿入プラスミドを使用し、リアルタイム RT-PCR 法により、NoV キャプシド遺伝子検出・定量を実施する。

## 【操作法】

リアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス（NoV）の標準検査法（別添 2）と以下の手順により配布物質の定量を行う。

## 1 必要な器具と試薬

## 1) 測定機器

リアルタイム PCR 装置（例：ABI7500 Fast Real-Time PCR System）

## 2) 試薬

TaqMan<sup>®</sup> Universal PCR Master Mix（ABI, Cat.No. 4304437）、TaqMan プローブ、プライマー、DDW および関連試薬

## 2 反応プレートの準備

1) 表 1 のとおり、NoVGI および GII 検出反応液を各々調製する。

表 1. 反応液の調製

試薬	GI	GII
DDW	5.2 $\mu$ l	5.8 $\mu$ l
TaqMan <sup>®</sup> Universal PCR Master Mix	10.0 $\mu$ l	10.0 $\mu$ l
Primer (20pmol/ $\mu$ l)	COG1F	COG2F
	COG1R	COG2R
TaqMan probe (4pmol/ $\mu$ l)	RING1-TP(a) <sup>注3)</sup>	RING2AL-TP <sup>注5)</sup>
	RING1-TP(b) <sup>注4)</sup>	
計	18.0 $\mu$ l	18.0 $\mu$ l

注3) : RING1-TP(a) : 5'- FAM-AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA-TMRA-3'

注4) : RING1-TP(b) : 5'- FAM-AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA-TMRA-3'

注5) : RING2AL-TP : 5'-FAM -TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT-TMRA-3'

2) プレート（Micro Amp Optical 96-Well Reaction Plate）のウェルに 18 $\mu$ l ずつ反応液を入れる。コントロール DNA は 3 ウェル、試料（試料 A および試料 B）、陰性コントロール（NTC:No template control）も同様に 3 ウェルずつ使用する。



- 3) 配布した DNA 2 $\mu$ l を各々3 ウェルに加える。
- 4) コントロール DNA のノロウイルス GI および GII を別々に 2 $\mu$ l あたりで 10<sup>7</sup> から 10<sup>1</sup> コピーまで 10 倍階段希釈し、2 $\mu$ l を 3 ウェルに加える。コントロール DNA は、10<sup>7</sup> から 10<sup>1</sup> コピーを使用する。
- 5) NTC として DDW 2 $\mu$ l を 3 ウェルに加える。
- 6) MicroAmp Optical Adhesive Film によりプレートを密閉する。
- 7) ウェルの壁についている反応液を遠心して落とす。なお、遠心機がない場合はプレートを軽く叩いたり、振り下ろしたりする。
- 8) 反応条件(50°C 2分、95°C 10分を1回、次いで95°C 15秒、56°C 1分を45回、25°C で保存)を設定する。
- 9) ランを開始する。
- 10) ラン終了後、データ解析を行う。
- 11) Amplification Plot 画面を表示させ、baseline および threshold Line を設定する。
- 12) Standard Curve を表示させる。相関係数(R<sup>2</sup>)が 0.990~1 であることを確認する。
- 13) Report 画面を表示させ、下の画面のウェルをハイライト選択し、解析データを表示させる。
- 14) Real-time PCR の結果から、配布したサンプルに含まれている DNA のコピー数を算出する。
- 15) 得られたデータを期日までに実施要領に基づきファイルを電子メールで送付する。

### 3. 研究班員・解析データ送付先\*・問い合わせ先\*

小班担当者は、下記のウイルス小班員です。実施については、感染研・木村までお問い合わせください。

研究代表者 富山県衛生研究所	佐多徹太郎
群馬県衛生環境研究所	小澤邦寿 塚越博之 小林美保
岡山県環境保健センター	岸本壽男 藤井理津志
東京都健康安全研究センター	貞升健志
名古屋市衛生研究所	柴田伸一郎
国立感染症研究所真菌部	宮崎義継
国立感染症研究所ウイルス第三部	駒瀬勝啓
国立感染症研究所感染症疫学センター	野田雅博
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)

<参考>

表 2. ノロウイルスのプライマーとプローブの塩基配列

Primer	塩基配列 [5'→3']	Sense
COG1F	CGY TGG ATG CGN TTY CAT GA	+
COG1R	CTT AGA CGC CAT CAT CAT TYA C	-
COG2F	CAR GAR BCN ATG TTY AGR TGG ATG AG	+
ALPF	TTT GAG TCC ATG TAC AAG TGG ATG CG	+
COG2R	TCG ACG CCA TCT TCA TTC ACA	-

Probe	塩基配列 [5'→3']	Sense
RING1-TP(a)	AGA TYG CGA TCY CCT GTC CA	+
RING1-TP(b)	AGA TCG CGG TCT CCT GTC CA	+
RING2-TP	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CT	+
RING2AL-TP	TGG GAG GGS GAT CGC RAT CT	+
RING2-Plate	TGG GAG GGC GAT CGC AAT CTB GCT CCC	+

#### IUB CODES

R = A or G      B = C,G or T

Y = C or T      D = A,G or T

K = G or T      H = A,C or T

M = A or C      V = A,C or G

S = G or C

W = A or T

N = A or G or C or T

### 3. 地方衛生研究所への細菌検査に関する外部精度管理導入に関する技術的支援

研究分担者	石岡大成	国立感染症研究所
研究協力者	森本 洋、清水俊一	北海道立衛生研究所
	井上伸子	群馬県衛生環境研究所
	尾畑浩魅、甲斐明美	東京都健康安全研究センター
	太田 嘉、森田昌弘	横浜市衛生研究所
	清水美和子、磯部順子	富山県衛生研究所
	柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
	勢戸和子	大阪府立公衆衛生研究所
	中嶋 洋	岡山県環境保健センター
	野村恭晴、調 恒明	山口県環境保健センター
	仙波敬子、四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
	岡元冬樹、世良暢之	福岡県保健環境研究所
	蒲池一成、大石和徳	国立感染症研究所

**研究要旨** 地方自治体における感染症の公的検査機関である地方衛生研究所の、細菌検査に関する検査精度の把握および維持・向上を目的として、外部精度管理の導入について検討を行った。平成26年度は、まず、本年度の細菌検査に関する地衛研外部精度管理の方針を検討するための細菌小班を設置した。細菌小班での検討の結果、対象とする細菌は、地方衛生研究所において検査頻度の高いサルモネラ属菌（2種類の血清型）を対象病原細菌とすることに決定した。また、検査試料については、ヒト糞便にサルモネラ属菌を一定量添加し、キャリーブレイア培地入り臨床検体輸送用スワブに浸漬させて封入した。これらの検査試料は、ゆうパックを利用して国立感染症研究所村山庁舎から検査協力11機関に国際連合規格容器を用いて発送した。精度管理の結果は、サルモネラ属菌陽性試料から2血清型とも検出され、かつ、サルモネラ属菌陰性試料からサルモネラ属菌がされなかった機関は8機関であった。また、サルモネラ属菌が1血清型のみ検出され、かつ、サルモネラ属菌陰性試料からサルモネラ属菌がされなかった機関は3機関であった。サルモネラ属菌陽性試料からサルモネラ属菌が1血清型も検出されなかった機関またはサルモネラ属菌陰性試料からサルモネラ属菌が検出された機関はなかった。サルモネラの検査における使用培地などについては、機関ごとに特徴があり、今回の結果の差違は増菌培養の有無によることが示唆された。したがって、感染症の細菌検査を実施する場合においても、食品の細菌検査同様に検体別の標準検査作業書を作成して検査に対応するべきであることが考えられた。

## A. 研究目的

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下、感染症法）の一部改正および公衆衛生の向上の観点からも、地方衛生研究所（以下、地衛研）における病原体検出の技術水準の維持は不可欠である。しかしながら、近年の日本経済の成長鈍化と税収の低下から、地方自治体における予算および定員は年々削減されており、このことは地衛研においても同様である。したがって、地衛研における微生物検査の分野においては、年々高度化する検査技術や検査機器の進歩および新技術へ対応するために、多大なる努力を払っているが、一部の地衛研においては必要最低限の検査レベルの維持確保も困難な状態に陥っている。さらには、食品に関する細菌検査においては、規格基準等詳細に規定された検査法が存在するものの、感染症の分野では、明確な精度管理のシステムは存在しない。

そこで、これらの問題に対応するためには全国規模での検査水準の維持・向上を図る必要がある、そのためには地衛研および国立感染症研究所（以下、感染研）が連携してこれらのことに対応する必要がある。本分担研究では、細菌性の病原体検査に関する技術水準の維持および向上を図るために、精度管理の実施方法等について検討し、模擬精度管理を実施することにより問題点および解決法について考察した。

## B. 研究方法

1. 関係機関：細菌検査に係わる地衛研外部精度管理を実施する上で、検討するための細菌小班を結成した。構成機関は、山口県保健環境研究所を班長とし、班員は北海道立衛生研究所、横浜市衛生研究所、富山県衛生研究所、大阪府立公衆衛生研究所、福岡県保健環境研究所および感染研の7機関（10名）であった。

2. 外部精度管理対象機関：平成26年度の地衛研外部精度管理への参加機関は、本研究班に属する機関および他に希望する機関とした。すなわち、細菌小班を構成する6機関、群馬県衛生環境研究所、東京都健康安全研究センター、名古屋市衛生研究所、岡山県環境保健センターおよび愛媛県立衛生環境研究所の計11機関であった。

3. 精度管理実施要領の作成：細菌小班でのディスカッションにより、平成26年度に実施する外部精度管理対象病原細菌をサルモネラ属菌と決定した。そこでサルモネラ属菌を検出するための外部精度管理に関する要領を作成した。

4. 精度管理実施手順書の作成：細菌小班で決定したサルモネラ属菌検出に関する検査実施手順書を細菌小班で作成した。この手順書は、標準的な実験室（P2レベル）に適応するようにまとめられた。

5. 精度管理実施時期：平成26年12月から平成27年1月まで

6. 試料の調整：胃腸炎患者<sup>1, 2)</sup>を想定して、サルモネラ属菌をヒト由来の糞便に添加した。サルモネラ属菌は、A食肉衛生検査所から分与された *Salmonella Cerro*（以下、SC）および *S. Infantis*（以下、SI）を供試した。一般的にサルモネラ属菌は硫化水素産生性であるが、今回は硫化水素産生性のサルモネラと硫化水素非産生性のサルモネラの重複感染性胃腸炎を想定して、SIについては硫化水素非産生性の株を使用した<sup>3)</sup>。便への添加量は、それぞれ便1gあたり10万CFUとした。また、ヒトの糞便については、地衛研において一般的な食中毒検査において種々の病原体が培養法により検出されなかったものを選択し、さらには、添加回収率が良好な便を選択した。

7. 送付用容器：固形培地（キャリーブレイ）であることから輸送上安全であること、細身のス

ティックタイプであることから取り扱いが容易で保存場所をとらないこと、普段多くの地衛研で取り扱っていることなどの理由から輸送用一次容器としてシードスワブ  $\gamma 1$  号を選択した。付属の綿棒に SC および SI を添加した便サンプルを浸漬し、その綿棒一次容器の管壁に触れないようにキャリーブリア培地に突き刺し密封した。これらの試料は、発送まで  $4^{\circ}\text{C}$  の条件下に保存した。これらの操作は、すべて感染研村山庁舎感染症疫学センター細菌検査室で実施された。

8. 発送手段：感染研から地衛研または地衛研から感染研へ病原体を含む検体を送付する場合は、コスト面などから一般的にゆうパック（チルド）を利用している。したがって、今回もゆうパック（チルド）を利用して感染研村山庁舎から検査協力 11 機関に国際連合格格容器を用いて発送した。なお、発送日は平成 16 年 12 月 5 日が 7 機関、12 月 8 日が 4 機関であった。

9. 検証：検査協力 11 機関に送付した試料（陽性試料 1 本、陰性試料 1 本）について、精度管理実施要領（別添 1）および精度管理実施手順書（別添 2）に従って検証を行った。

### C. 研究結果

#### 精度管理実施要領および精度管理実施手順書の策定

細菌小班におけるディスカッションにより、精度管理実施要領（別添 1）を策定し、また、標準的な実験室レベルで検査対応可能な精度管理実施手順書（別添 2）を策定した。別添 2 の補助的様式として、検査結果報告書（別添 3）、検査経過記録書（別添 4）、検体管理簿（別添 5）を作成した。他の分担研究で実施されているアンケートの結果から、感染症に関する細菌検査に関しては、試験検査およびその結果の信頼性を確保するためのシステムである GLP (Good Laboratory Practice) が導入されている地衛研は少ない。このことを考慮して上記手順書および

様式を作成したが、精度管理を実施する上で自施設のシステムが構築されている場合は、今回作成した様式の使用について、実施対象地衛研の判断にゆだねることとした。

#### 送付試料の検証

送付試料（試料 1 および試料 2）を平成 26 年 12 月 5 日および 8 日に参加対象地衛研にゆうパック（チルド）で送付した。そのため、感染研村山庁舎感染症疫学センター細菌検査室において平成 26 年 12 月 9 日から実施した。検査法については、精度管理実施手順書にしたがって実施した。なお、本精度管理の検査フローチャートを別添 7 に示した。この中から、増菌培地はセレナイトシスチン培地（ニッスイ）を使用し、選択分離培地は DHL 寒天培地（ニッスイ）、SS 寒天培地（ニッスイ）、CHROMagar サルモネラ（CHROMagar）、ES サルモネラ寒天培地 II（関東化学）の計 4 種の平板を使用した。また、生化学性状試験は TSI 寒天培地（ニッスイ）、LIM 寒天培地（ニッスイ）、シモンズクエン酸塩寒天培地（栄研化学）、マロン酸塩寒天培地（栄研化学）、VP 半流動培地（栄研化学）を選択し、市販の同定キットは使用しなかった。試料 1 および試料 2 とともに直接平板に塗布し、スワブの残余便をセレナイトシスチン培地に懸濁した。増菌培地は  $42\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ 、選択平板は  $36\pm 1^{\circ}\text{C}$  で 24

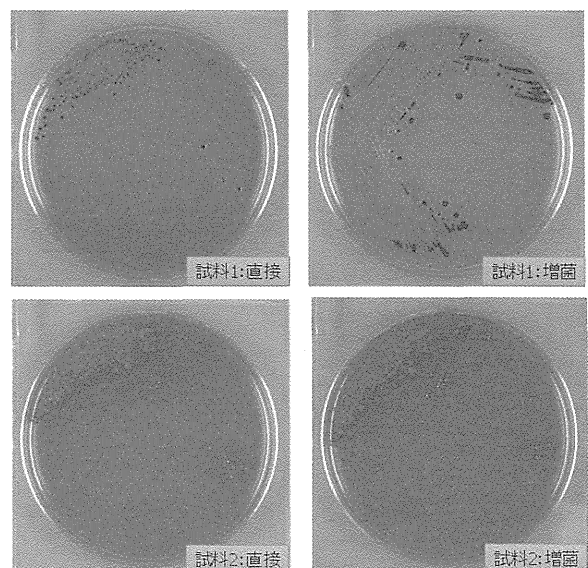


図1 検証試験における各培地の発育状況 (DHL)

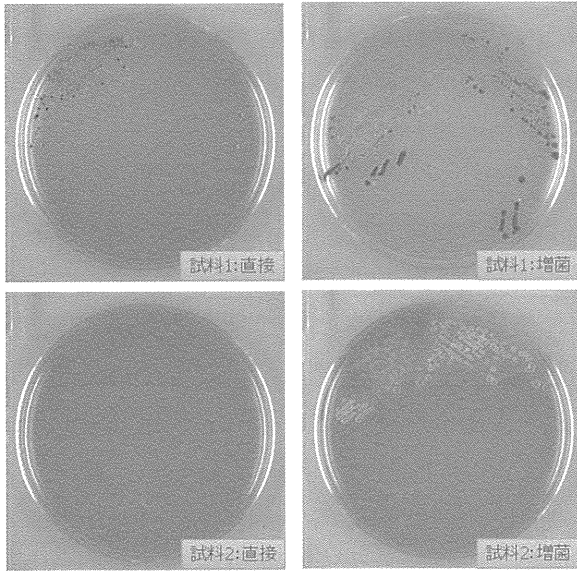


図2 検証試験における各培地の発育状況 (SS)

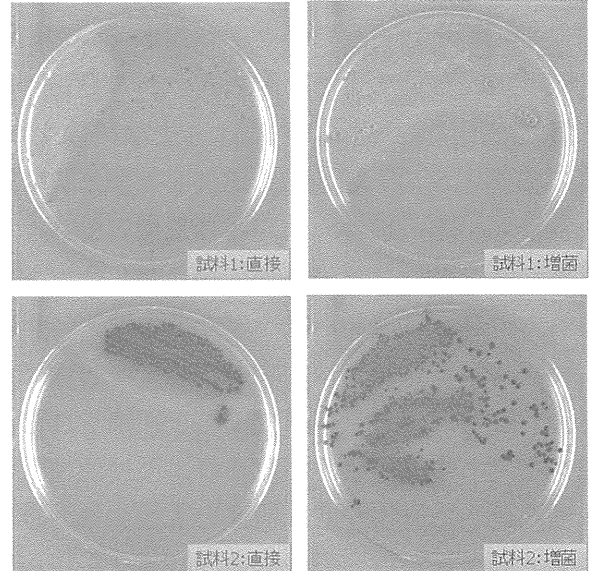


図3 検証試験における各培地の発育状況 (ESサルモネラII)

時間培養した。増菌培養については、その後同様に選択平板で培養した。

それぞれの平板における発育状況を図 1～4 に示した。選択平板が DHL の場合、試料 1 では直接塗抹ではほぼ黒色コロニーのみの発育であったが、増菌した方は黒色コロニーのみならず、乳白色コロニーも多数観察され、明らかに複数の細菌の発育が観察された。一方、試料 2 については、直接塗抹および増菌培養ともほぼ同様レベルで赤色コロニーのみが観察された (図 1)。選択平板が SS の場合、試料 1 では直接塗抹および増菌培養とも黒色コロニーのみならず乳白色コロニーも観察された。一方、試料 2 については、直接塗抹ではほとんど細菌の発育は観察されず、増菌培養では赤色コロニーのみの発育が観察された (図 2)。選択平板が ES サルモネラ寒天培地 II の場合、試料 1 では直接塗抹および増菌培養ともに大小様々なピンク色のコロニーのみが観察された。一方、試料 2 については、黒～黒紫色のコロニーのみが観察され、試料 1 および 2 とも、増菌培養した方が平板での発育が優位であった (図 3)。選択平板が CHROMaga サルモネラの場合、試料 1 では直接塗抹および増菌培養ともに単一で藤色のコロニ

一のみが観察された。一方、試料 2 については、青～緑青色のコロニーのみが観察された (図 4)。これらの結果から、すべての種類の選択平板において試料 1 がサルモネラ属菌陽性であり、試料 2 は陰性であることが推測された。また、DHL、SS、ES サルモネラ II の平板においては、単一でない複数のサルモネラ属菌の存在も示唆された。

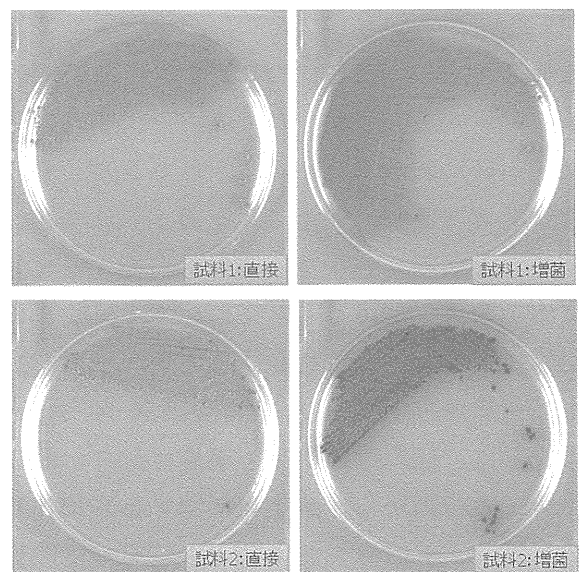


図4 検証試験における各培地の発育状況 (CHROMagar Salmnella)

そこで、1 枚のシャーレから 3～5 コロニーを TSI、LIM、シモンズクエン酸塩培地、マロン酸

塩培地、VP 半流動培地に移植し生化学性状試験を実施したところ、試料 1 から得られたコロニーは、硫化水素産生性以外すべてサルモネラ属菌の性状を示した。そこで、市販免疫血清（デンカ生研）を利用して O 群型別を実施したところ、硫化水素産生株は O18 群、硫化水素非産生株は O7 群であった。続いて H 血清型別（1 相および 2 相）を実施したところ、O18 群については Z<sub>4</sub>, Z<sub>23</sub> : 1, 5、O7 群については r : 1, 5 を示した（相誘導は濾紙法で実施）。また、O18 については、免疫血清 O6 にも凝集を示した。以上のことから、試料 1 から検出されたサルモネラは、SC および SI（硫化水素非産生株）と同定が可能であった。

#### 外部精度管理の結果

検査対象 11 機関すべてが精度管理に参加し、結果の回答を送付した。送付された結果を表 1 および表 2 に示した。各機関とも試料 1 からサ

表1 各試料からのサルモネラ属菌検出結果

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

表2 試料1から検出されたサルモネラの血清型

分離血清型	分離機関数
<i>Salmonella</i> Cerro*のみ	3
<i>Salmonella</i> Infantis のみ	0
<i>Salmonella</i> Cerro* および Infantis	8
計	11

ルモネラを検出し、試料 2 はサルモネラ属菌陰性と回答した（表 1）。しかしながら、試料 1 に添加されていた SC および SI を両方とも記載していた機関は 8 機関、SC のみの記載していた機関が 3 機関、SI のみと回答した機関は無かった。また、この 2 つ以外の血清型を記載した機関はなかった（表 2）。

#### 使用培地状況

精度管理を実施する上で、使用する培地の種類、ロット、培養温度および培養時間は、サルモネラの発育に大きく影響する<sup>5)</sup>。そこで各機関が、今回の精度管理で実際に使用した培地について報告書に記載してもらった。それらを取りまとめた表が表 3～5 である。増菌培地については、セレナイトシスチン培地を単独で使用するか、TT ハーナ培地と RV 系培地を併用する組

表3 増菌培地の使用状況

増菌培地	メーカー	使用機関
TTハーナ	栄研化学	2
RV培地	栄研化学	1
RV Enrichment	OXOID	2
セレナイトシスチン	ニッスイ	2
セレナイトシスチン	Difco	1

表4 選択分離培地の使用状況

選択平板	メーカー	機関数	選択平板	メーカー	機関数
SS	栄研化学	3	クロモアガー*1	CHROMagar	7
SS	ニッスイ	2	XLD	栄研化学	1
SSS	ニッスイ	1	ESサルモネラII	栄研化学	1
DHL	栄研化学	2	SMID*2	シスメックス	1
DHL	ニッスイ	3	BGA	OXOID	1
MLOB	ニッスイ	3			
MLOB	OXOID	1			
XLT4	Difco	1			

\*1, 一部生培地 \*2, 生培地

み合わせパターンが多かった。また、11 機関のうち 5 機関が増菌培地を使用せず、直接塗抹のみでの検査対応であった。

選択分離培地に関しては、表 4 左欄に示したように、サルモネラ属菌を硫化水素の産生性をもって鑑別する培地では、SS 培地に白桃を添加した SSS や XLT4 などの培地を使用している機関もあったが、多くは従来用いられている DHL、SS、MLCB などが使用していることが確認された。一方、硫化水素産生性によらない酵素基質培地では、従来から推奨されている CHROMaga サルモネラを使用している機関が多かった。しかしながら、粉末からの CHROMaga サルモネラ培地作成方法は少し技術が必要なことや、最近 CHROMaga サルモネラと同等以上の酵素基質培地が発売されていることから、CHROMaga サルモネラ以外の培地を選択している機関も認められた。

表 5 には、サルモネラ属菌の生化学性状試験を実施するために、各機関で選択・使用した培

表5 性状試験培地の使用状況

培地名	メーカー	使用機関
TSI 培地	栄研化学	5
	ニッスイ	4
	極東製薬	1
	スギヤマゲン*	1
LIM 培地	栄研化学	4
	ニッスイ	5
	極東製薬	1
	スギヤマゲン*	1
シモンズクエン酸塩培地	栄研化学	3
	ニッスイ	1
	Difco	1
マロン酸塩培地	栄研化学	4
VP半流動培地	栄研化学	5
SIM 培地	栄研化学	2
リジン脱炭酸試験用培地	栄研化学	1
酢酸ナトリウム培地	栄研化学	1
Urea 培地	BD	1
Motility Sulfide Medium	Difco	1
ジョルダンD酒石酸塩培地	栄研化学	1

\*, 生培地

地を示した。生化学性状試験のみならず、増菌培地および選択平板においても、二大国産メーカーの培地が多く使われていた。また、TSI 培地および LIM 培地のような培地についても、生培地で検査対応している機関も認められた。

## 考察

感染症法の一部改正が行われることにより、平成 27 年度からは、地方自治体における病原体の検査機関である地衛研は、あらゆる病原体の検査に対応しなくなればならなくなった。そのため、各地衛研では様々な病原体の検査を実施するための予算措置、人員確保が必須であるが、現状はかなり厳しいものと考えられる。今回の外部精度管理を実施した結果、すべての機関から試料 1 はサルモネラ属菌陽性、試料 2 は陰性である回答が得られたことは、地衛研の細菌検査に関する精度は確保されていると言えることはできると思われる。しかしながら、3 機関において、試料 1 が硫化水素産生株 (SC) と非産生株 (SI) との混合であったことを見落としか、検査手技上のトラブルで検出できなかった。検証試験においては、SC と SI は明瞭に発育培地上で区別できたことから、この原因は、増菌培養の有無によるものと考えられた。一部の機関においては、報告書の記載に齟齬が認められたため、実際には増菌培養を実施していない機関は 6 機関であったことが推察される。つまり半分以上の機関が感染症のサルモネラの検査では増菌培養の工程を省略している可能性が示唆された。

また、地衛研によっては、試料到着の翌週から検査を実施しているので、一週間のタイムラグが結果を左右することが考えられる。ここでは省略したが、第二週目の検証実験では、直接塗抹した平板の発育状態は、送付直後のものと比較してあまり良くない。この場合、明確に発育するまでにさらに 1 日を要した。したがって、



冷蔵保存といえども、試料送付から検査までのタイムラグが大きければ大きいほど、通常の検査工程に関しても何かしらの工夫や変更が必要となることが示唆された。

今回の精度管理を実施するにあたり、試料作製上の問題や候補菌種、輸送容器および送付方法など様々な問題が散見されたが、これらに関することは他の分担研究で論じているのでここでは省略する。今後継続して外部精度管理を実施するためには、地衛研と感染研とのさらなる協力関係が必要であると考えられた。

#### D. 結論

地方衛生研究所全国協議会と感染研が密に連絡を取り合いながら、細菌性感染症に関する外部精度管理を導入していくことは重要である。しかしながら、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。このことに関する考察は他の分担研究に譲るとしても、まずは、精度のしっかりした試料を作成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。

#### 参考文献

1. Murakami K, Ishihara T, Horikawa K et al. Features of Salmonella serovars among food handlers in Kyushu, Japan. *New Microbiol.* 2007. 30,155-159.
2. 小花光夫、相楽裕子、青木知信 他、『感染性腸炎の細菌の動向』－1996～2000年における感染性腸炎研究会の調査成績より－. *感染症誌.* 2002. 76,355-368.
3. Yamasaki S, Hara K, Izumiya H, et al. Lysine decarboxylase-negative Salmonella enterica serovar enteritidis: antibiotic susceptibility, phage and PFGE typing. 2007. *J Vet Med Sci.* 69,813-818.
4. Dusch H, Altwegg M. Evaluation of five new plating media for isolation of Salmonella species. *J Clin Microbiol.* 1995. 33,802-804.

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし
2. 学会発表  
なし

#### H. 知的財産の出願・登録状況

なし

## 別添 1

### 地衛研精度管理研究班による 平成 26 年度外部精度管理（細菌検査）実施要領

#### 1 目的

本外部精度管理事業は、各地方衛生研究所（以下、地衛研）における微生物検査の技術的水準の維持・向上のために、外部精度管理の手法による全国的な仕組みを構築し、地方衛生研究所全国協議会が主体となって、継続的に実施するための体制整備・構築およびその妥当性を評価することを目的とする「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ものである。したがって、本外部精度管理は、当該目的で適切に作製された試料を用いて、予め決められた検査法または各機関における標準作業手順書に従って実施し、検査経過および検査結果から検査実施上の問題点、検査法などの実態を把握することにより、検査技術の改善・向上を図るとともに、地衛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が可能であると考えられる。

#### 2 実施主体

今回の外部精度管理の実施は、平成 26 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の実施のための事業の体制の構築に関する研究」に基づいて、本研究班（いわゆる「地衛研精度管理研究班」）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が構成されている。

#### 3. 平成 26 年度の検査項目

サルモネラ属菌の検出（定性）

#### 4. 配付試料の概要

試料送付：発送予定日 平成 26 年 12 月 5 日（金）

到着予定日 平成 26 年 12 月 8 日（月）着日指定

ゆうパック チルド指定

送付試料：模擬臨床検体（糞便）

内容量：シードスワブ 1 本（1 試料あたり）

個数：シードスワブ 2 本

#### 5. 配布試料の検査

##### 1) 試料

サルモネラ属菌添加または非添加模擬臨床試料

##### 2) 検査方法

本検査については、日常業務において専ら細菌検査を担当している職員が実施するものとする。また、検査方法については、別添試料 2 の「地衛研精度管理研究班」による平成 26 年度外部精度管理手順書に準じて行うか、参加機関で日常行っている検査方法に従って実施するものとする。

る。

3) 配布試料の保管方法および廃棄方法

検査終了までの配布試料の保管は、冷蔵保存とする。また、検査終了後の保管期間および廃棄については、検査実施機関で日常実施している方法または蒸気滅菌等適切な方法で処理するものとする。

6. 結果報告書および検査経過記録書の提出

検査終了後は、以下の書類を作成または記入して提出するものとする。

1) 「地方衛生研究所精度管理研究班」による平成 26 年度外部精度管理結果報告書  
(様式 1)

実施機関名、責任者名、検査担当者名、検査結果などの必要事項を様式 1 に記入。

2) 検査経過記録書 (様式 2)

配布試料受領、検査開始日、検査終了日、検査手順の概略などの必要事項を様式 2 または、検査実施機関で使用している様式に記入するものとする。検査手順の概略については、実施した検査手順および検査結果判定の根拠についての概略を記入するものとする。

7. 地方衛生研究所精度管理研究班による平成 26 年度外部精度管理細菌検査結果報告書の提出

平成 26 年 12 月 27 日 (金) まで電子メールで送付

8. 問い合わせおよび送付先

〒208-0011

東京都武蔵村山市学園 4-7-1

国立感染症研究所村山感染症疫学センター第 5 室 石岡 大成 宛

E-mail: ishioka@nih.go.jp

TEL: 042-561-0771 (内 3702)、042-848-7132 (直通)

## 別添 2

### 地衛研精度管理研究班による平成 26 年度外部精度管理細菌検査手順書 ー臨床検体からのサルモネラ属菌定性検査の精度管理手順書ー

#### ・精度管理内容

地衛研精度管理研究班による平成 26 年度地方衛生研究所外部精度管理細菌検査実施要領に基づき、模擬臨床検体（糞便）からサルモネラ属菌の分離検出、同定を実施する。

#### ・操作法

##### 1. 試験の概要

送付試料を均一にし、寒天平板に直接塗抹、または必要に応じて選択増菌培地での培養を経てから寒天平板に画線塗抹する。寒天平板は、硫化水素産生株を検出する培地と硫化水素産生株または非産生株であっても検出できる培地を併用して培養する。サルモネラが疑われる集落を純培養し、生化学性状培地等を用いて生化学性状の確認を行い、その後 O 多価または O1 多価血清での凝集反応によりサルモネラ属菌と推定する。引き続き H 血清を用いて H 抗原（1 相および 2 相）を確認する。必要に応じて、検査キット、遺伝子検査法を組み合わせる。同定する。

##### 2. 使用器具、装置など

三角フラスコ、滅菌ピンセット、滅菌薬さじ、天びん、pH メーター、滅菌メスピペットまたはマイクロピペットおよび滅菌マイクロチップ、メスシリンダー、小試験管、中試験管、試験管ラック、エーゼ、高圧蒸気滅菌器、乾熱滅菌器、恒温槽または恒温水層、滅菌シャーレ、スライドグラス、シャーカステンなど

##### 3. 培地、試薬および抗血清

###### ① 選択増菌用培地

- ・ Rappaport-Vassiliadis (RV) 培地、Tetrathionate (TT) 培地、セレナイト-シスチン培地、セレナイト-ブリリアントグリーン培地、セレナイト-ブリリアントグリーン-サルファ培地などを使用する。各使用説明書に従って作製する。

###### ② 分離寒天平板培地

- ・ 硫化水素の産生性を確認できる培地：MLCB、DHL、SS、XLD などを、使用説明書に従って作製する。
- ・ 硫化水素非産生性サルモネラであっても判定可能な培地：ES II サルモネラ寒天培地、ブリリアントグリーンサルファピリジン寒天培地、クロモアガーサルモネラ、SMID II などを、使用説明書に従って作製する。

###### ③ 生化学性状確認用培地および試薬類

必要に応じて、以下の培地を、試薬を用意する。

- ・ TSI (Triple Sugar Iron) 寒天培地：使用説明書に従って作製する。
- ・ LIM (Lysine Indole Motility) 培地：使用説明書に従って作製する。