

②-6 今回のEQAの実施時期について

| | | |
|---------|----|-----|
| このままでよい | 44 | 81% |
| 他の時期がよい | 9 | 17% |

- もう少し早めがよい。(理由：解析結果の受領時には、既にインフルエンザの流行期に入っており、早めに結果を知ること対策を講じたい)
- せっかく詳細な解析をしていただいているので、結果もシーズン前に受信できるような日程の方がその後の検査に行かせるのでありがたいと思います。
- 基本的には、8～10月までの非流行期に実施することが望ましいが、実施までの準備期間が十分であるかが不明
- ウイルス検査のシーズンは避けてほしい。
- 流行予測調査の時期と重なってしまったので、もう少し早い時期を希望します。
- 可能であれば、8月頃の夏期に、回答期限を長めに設定していただけるとありがたいです。
- EQAの結果までがシーズン前に終了することを希望します。問題点がみつかった場合、改善してからシーズンに備えることができる。
- 10月は流行予測調査があるので、8～9月に実施してほしい。
- 流行予測事業の検査と時期が重なるので、できればもう少し早いほうがよい。

②-7 実施要項と共に送付した「アンケート(エクセルファイル)」の回答方法について

| | | |
|----------|----|-----|
| このままでよい | 46 | 87% |
| 改善した方がよい | 7 | 13% |

- 今回のEQAにおいてアンケートの回答作成が最も煩わしく感じられました。今後も実施するのであれば様式は変更せず、今回の回答が流用できるようにする等、ご配慮をお願いします。
- 設問が細かすぎる(希釈時に使用するチップのメーカーやカタログ番号等は省略してもよいと思う)。
- 送付されたエクセルファイルに入力ができなかった。
- 報告時のアンケートがもう少し簡略化されたいと思います。
- 回答内容が細かすぎる(②-2各隠性コントロール希釈液作製の方法ならびに使用機材についてでの使用ピペッターや使用チップの項目)
- 試薬調製手順の入力方法がわかりにくかった。
- わかりにくいので要点のみに絞って欲しい。

②-8 実施要項と共に送付した「結果記入ファイル(エクセルファイル)」の回答方法について

| | | |
|----------|----|-----|
| このままでよい | 47 | 89% |
| 改善した方がよい | 4 | 8% |

- 件名の冒頭にインフルエンザ研究室に関する内容であることを明記して頂けるとありがたいです。
- 地衛研の担当者に直接送付ではなく、所長あてに送付して欲しい。
- そのまま返信してしまう地衛研があるので、返信不可の形式にした方がよいのでは。
- インフルエンザウイルス研究センターと、感染症疫学センターのどちらの事業なのかわかりにくいので、それぞれの分担内容がわかるようにしてほしい。
- いろいろなアンケートなどがあり地衛研の承認を得ているのかわからないことが多いため、地衛研の全国協議会を経由した方がよいと思います。

②-9 実施要項の送付方法について

| | | |
|----------|----|-----|
| このままでよい | 49 | 92% |
| 改善した方がよい | 3 | 6% |

- サンプルシートの記入が煩雑だった。
- 試薬調整手順の記入がやや煩雑なので、もう少し簡単な記入法にしていきたい。
- 試薬調整手順の記入シートが入力しにくかった。
- 試薬調整手順記入欄で、作業の所要時間を逐次記入しながら作業を進めるのが煩雑なので、作業開始時間と測定開始時間の記入程度に簡略化した方がよいと思う。
- 再度送っていただいたファイルで入力できましたが、入力するとエラーが出たため次回は、スムーズに入力が行えるようになれば良いと思います。(こちらのPCやエクセルのバージョンなどの問題なのかもしれません。)
- わかりにくいので要点のみに絞って欲しい。

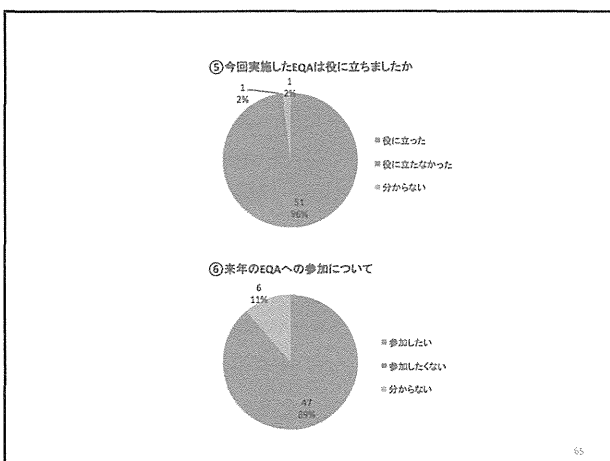
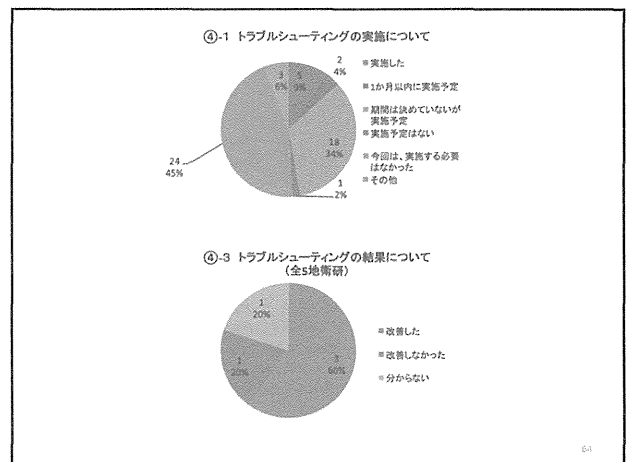
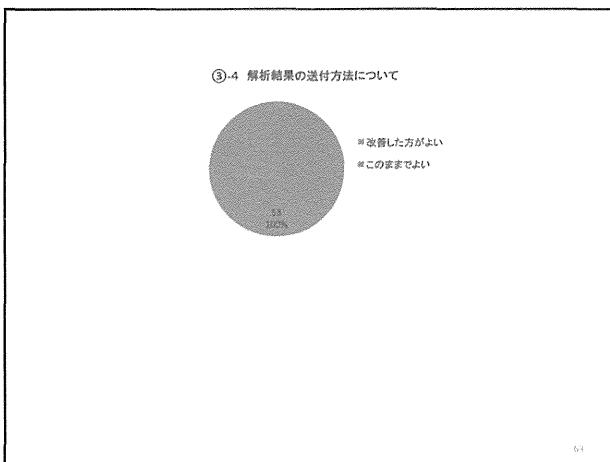
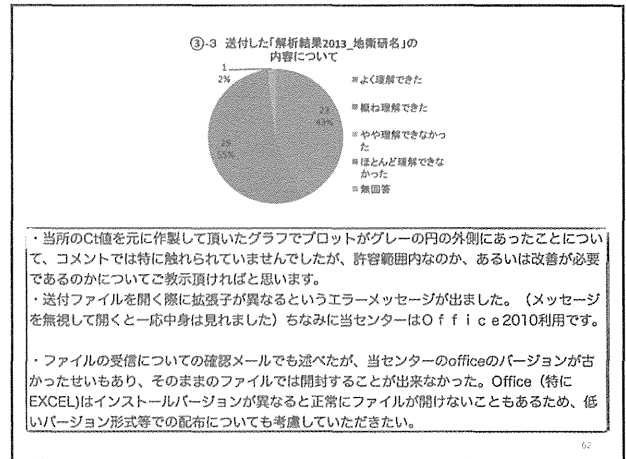
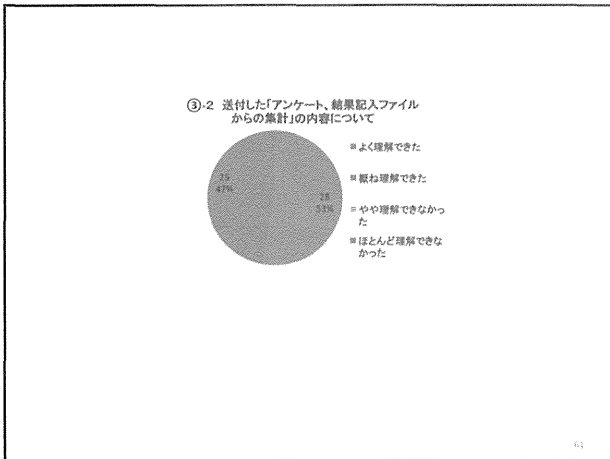
②-10 各所からのEQA結果の送付方法について

| | | |
|---------|----|------|
| このままでよい | 53 | 100% |
|---------|----|------|

③-1 送付した「結果の解釈について」の内容について

| | | |
|------------|----|-----|
| よく理解できた | 4 | 7% |
| 概ね理解できた | 19 | 36% |
| やや理解できなかった | 33 | 57% |

- データの解析方法の記載があるため内容が難しいです。問題点が図1から図9まで例示されていますので、検討結果から問題点がどの図に該当しているのかを結果欄に記載して頂ければ、内容をより簡単に把握できたのではないかと思います。
- 解析結果の説明が難解でわかりづらい。もう少し初心者にも理解しやすいように説明をつけて欲しい。
- 細かく説明があったので、分かりやすかった。今回のEQAにとどまらず普段の検査においての評価の仕方が分かったのでよかった。活用していきたい。
- 波形などを見ずに、Ct値だけで解釈するのは少々危険だと思います。



EQA2014について

- 事前アンケート(参加確認)の送付(平成26年7月1日)
- 今年度は未知の検体として6検体を送付(平成26年7月28日～30日)
- 亜型同定およびCt値の報告(平成26年9月12日)
- 検査に関するアンケート(平成26年9月12日)

今後の課題

- RNA抽出
- ウイルス分離

67

平成26年度厚生労働科学研究費補助金
「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
事業体制の構築に関する研究」班班会議 (H26-健危-一般-001)
平成26年7月14日

感染症検査における外部および内部精度管理
の先行事例等について

- 麻疹ウイルス検査診断における
精度管理について -

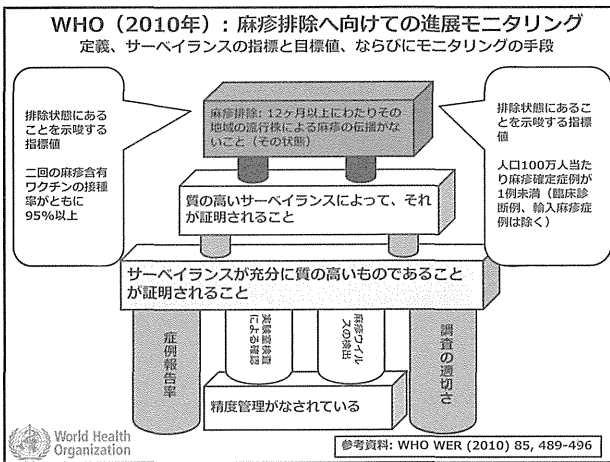
ウイルス第3部第一室
駒瀬 勝啓

麻疹

- 5類感染症/全数把握感染症
- 学校保健安全法(解熱後3日間の出席停止)
- WHOが中心となり地球上から排除を目指している感染症

- 2015年まで
麻疹による死亡者数を2000年と比較して95%減少させる。
各地域での麻疹並びに風疹/CRSの排除目標を達成する。
- 2020年まで
少なくとも5つの地域で麻疹排除を達成する。
(Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012-2020)

- 麻疹に関する特定感染症予防指針
「目標: 平成27年までに麻疹の排除を達成し、世界保健機関による麻疹排除の認定を受け、その後も排除状態を維持する」



麻疹

- 5類感染症/全数把握感染症
- 学校保健安全法(解熱後3日間の出席停止)
- WHOが中心となり地球上から排除を目指している感染症

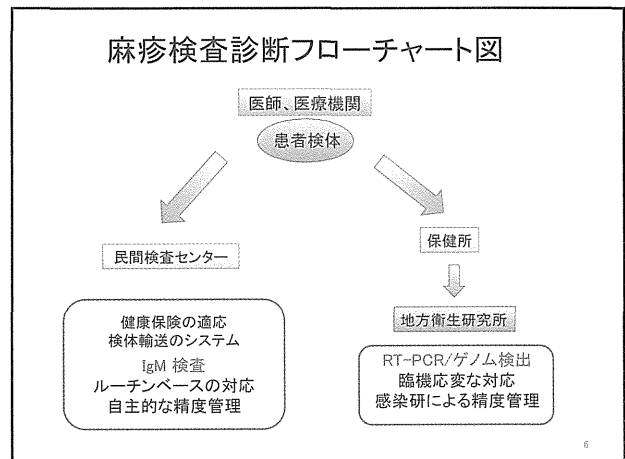
- 2015年まで
麻疹による死亡者数を2000年と比較して95%減少させる。
各地域での麻疹並びに風疹/CRSの排除目標を達成する。
- 2020年まで
少なくとも5つの地域で麻疹排除を達成する。
(Global Measles and Rubella Strategic Plan 2012-2020)

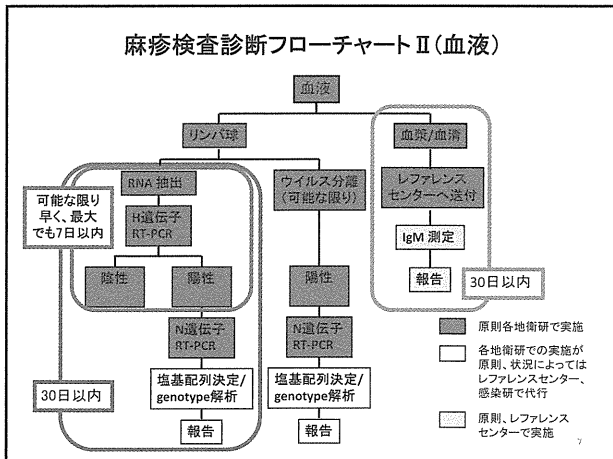
- 麻疹に関する特定感染症予防指針
「目標: 平成27年までに麻疹の排除を達成し、世界保健機関による麻疹排除の認定を受け、その後も排除状態を維持する」

麻疹に関する特定感染症予防指針

(平成24年12月14日 一部改正、平成25年4月1日 適用)

- 第2 原因の究明
- 三 麻疹の届出基準
…風しん等の類似の症状を呈する疾病と正確に見分けるためには、病原体を確認することが不可欠であることから、原則として全例に検査の実施を求めるものとする。しかしながら、迅速な行政対応を行うため、臨床診断をした時点でまず臨床診断例として届出を行うとともに、血清IgM抗体検査等の血清抗体価測定の実施と、都道府県等が設置する地方衛生研究所でのウイルス遺伝子検査等の実施のための検体の提出を求めるものとする。…
- 六 ウイルス遺伝子検査等の実施
都道府県等は、医師から検体提出された場合は、都道府県等が設置する地方衛生研究所において、原則として全例にウイルス遺伝子検査等を実施するとともに、その結果の記録を保存することとする。検査の結果、麻疹ウイルスが検出された場合は、可能な限り、地方衛生研究所において麻疹ウイルス遺伝子配列の解析を実施する。又は国立感染症研究所に検体を送付し、同研究所が遺伝子配列の解析を実施することとする。国立感染症研究所は、解析されたウイルスの遺伝子情報を適切に管理し、流行状況の把握や感染伝播の制御等に役立てることとする。





Measles/Rubella IgM Proficiency Testing

Objectives

- Assess proficiency of laboratories in the WHO global network
- Identify any problems with assays in routine use
- Check the accuracy of data reporting
- Check assay validation criteria
- Laboratories to report results within 14 days of receiving panel

Jennie Lyndon (VIDAL); 11th Global Measles & Rubella laboratory meeting (June 2013)

麻疹 IgM ELISA (Proficiency test)

- 対象 レファレンスセンター(10カ所)
- 検査検体 血清20検体に送付
- 検査キット 感染研から配布
- 回答までに期間 検体を受け取ってから2週間
- 方法 麻疹IgM 抗体価を配布したキットで測定し、判定結果を感染研の結果と比較する
- 試験成立条件をみたしているかを確認する。
- 成立条件を満たし、90%以上の正答で「合格」とした。
- WHOが「M & R LabNet」実施しているIgM PTと概ね同じ考え方

2011年度麻疹IgM ELISA PT 結果

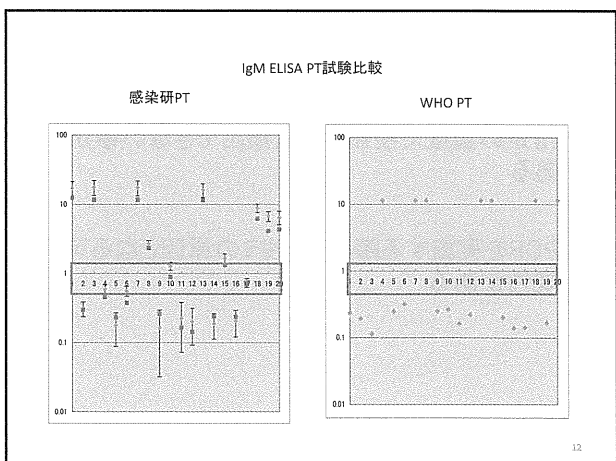
| Method | Kit Brand Name | Batch/Serial No. | Expiry Date |
|--------|----------------|------------------|-------------|
| EIA | エンザイブテスト | 40738 | 2012/6/23 |

| Antigen O.D. | Control Antigen O.D. | Δ O.D. | 有効性の確認 |
|---------------|----------------------|--------|---------------------|
| reference P/N | 0.050 | 0.048 | 0.002 < 0.1 |
| reference P/P | 0.603 | 0.653 | 0.050 > 0.099662918 |
| reference P/P | 0.529 | 0.05 | 0.479 > 0.099662918 |

| sample | Antigen O.D. | Control Antigen O.D. | Δ O.D. | Assay Value | Pos./Neg./Equi |
|---------|--------------|----------------------|--------|-------------|----------------|
| 2011-1 | 0.078 | 0.078 | 0.003 | 0.003090276 | - |
| 2011-2 | 0.072 | 0.068 | 0.004 | 0.004120595 | - |
| 2011-3 | 0.154 | 0.132 | 0.022 | 0.022982729 | - |
| 2011-4 | 0.441 | 0.624 | 0.211 | 0.381579524 | - |
| 2011-5 | 0.168 | 0.066 | 0.152 | 0.135976876 | + |
| 2011-6 | 0.107 | 0.053 | 0.014 | 0.014421799 | - |
| 2011-7 | 0.097 | 0.054 | 0.009 | 0.002003023 | - |
| 2011-8 | 0.078 | 0.073 | 0.005 | 0.005160632 | - |
| 2011-9 | 0.635 | 0.07 | 0.565 | 0.58202228 | + |
| 2011-10 | 0.078 | 0.07 | 0.008 | 0.00241011 | - |
| 2011-11 | 0.085 | 0.08 | 0.005 | 0.005160632 | - |
| 2011-12 | 0.071 | 0.068 | 0.003 | 0.003090276 | - |
| 2011-13 | 0.376 | 0.05 | 0.211 | 0.238466524 | + |
| 2011-14 | 0.088 | 0.08 | 0.018 | 0.018542274 | - |
| 2011-15 | 0.079 | 0.072 | 0.007 | 0.007210884 | - |
| 2011-16 | 0.163 | 0.068 | 0.055 | 0.05155622 | + |
| 2011-17 | 0.375 | 0.081 | 0.294 | 0.302857143 | + |
| 2011-18 | 0.09 | 0.085 | 0.005 | 0.005160632 | - |
| 2011-19 | 0.068 | 0.079 | 0.007 | 0.007210884 | - |
| 2011-20 | 0.508 | 0.084 | 0.414 | 0.416472303 | + |

IgM ELISA Proficiency Test (2008)

| Sample | NIID | | | REFERENCE CENTER | | | | | | | | | | 正答率 |
|--------|------|------|----------|------------------|------|-----|------|----|------|-----|------|------|-----|------|
| | 判定 | 判定 | 判定 | A | B | C | D | E | F | G | H | I | | |
| 008-01 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-02 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-03 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-04 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-05 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-06 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-07 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-08 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-09 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-10 | Equi | Equi | Equi | + | Equi | + | + | + | Equi | + | + | Equi | + | 33.3 |
| 008-11 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-12 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-13 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-14 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-15 | + | Equi | + / Equi | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 |
| 008-17 | - | Equi | - / Equi | - | - | - | Equi | - | - | - | Equi | Equi | - | 100 |
| 008-18 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-19 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| 008-20 | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | + | 100 |
| | | | | 正答率 | 95 | 100 | 95 | 95 | 95 | 100 | 95 | 95 | 100 | |



麻疹IgM ELISA精度管理の問題点

- 検体の確保
感染研には検体が集まらない
倫理問題
- 検査キットのコスト
Siemens IgM kit
130,000円/kit + 補助試薬 40,000円/kit
- 配送の手続き、コスト

13

RT-PCR法

14

Reference RNA について

- RT-PCRの陽性コントロール
- RT-PCRの精度管理用
- ワクチン株ゲノム由来の合成RNA (genotype A)

15

Results of RT-PCR using reference RNA by National Laboratory (NIID)

1.5% agarose gel

16

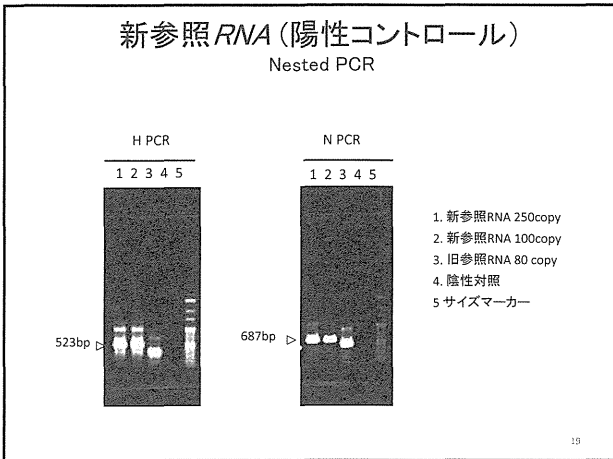
参照RNAの問題点

- 指定の濃度で使用すると検出できない事がある
- PCRを実施する際のコンタミの原因となる可能性がある

17

新参照RNA(陽性コントロール)

18



1.5-2µg RNA (17 well) を用意し、各PCR検体 10µL を下記の表の順序で電気泳動
(Size marker-N または Size marker-H も 10µL/lane で泳動)
この順序を 2 検体(検体用、N 用)し、下記の表の通り泳動の結果を、写真を取って PDF 等でご送付下さい。

| Lane | サンプル | 検体 | 備考 | 通/不通 |
|------|---|------------------|--------|------|
| 1 | 1 st PCR | 5000 copy / 10µL | 新参照RNA | 通 |
| 2 | 1000 copy / 10µL | | | |
| 3 | 500 copy / 10µL | | | |
| 4 | 100 copy / 10µL | | | |
| 5 | 50 copy / 10µL | | | |
| 6 | 旧参照RNA | 旧参照RNA | 旧参照RNA | 通 |
| 7 | 高純水 | 陰性対照 | 陰性対照 | 不通 |
| 8 | 100bp ladder (Nは100bpの適当なサイズマーカー) | | | |
| 9 | 2 nd PCR | 5000 copy / 10µL | 新参照RNA | 通 |
| 10 | 1000 copy / 10µL | | | |
| 11 | 500 copy / 10µL | | | |
| 12 | 100 copy / 10µL | | | |
| 13 | 50 copy / 10µL | | | |
| 14 | 旧参照RNA | 旧参照RNA | 旧参照RNA | 通 |
| 15 | 高純水 | 陰性対照 | 陰性対照 | 不通 |
| 16 | Size marker - H (523bp) 又は Size marker - N (683 bp) | どちらかを使用 | | |

写真

Real-time PCR法

CDC法

Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens
(Hummel et al., Journal of Virological Methods 132 (2006) 166–173)

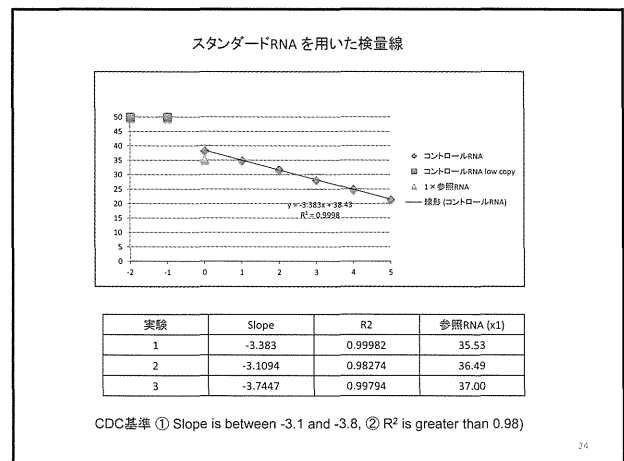
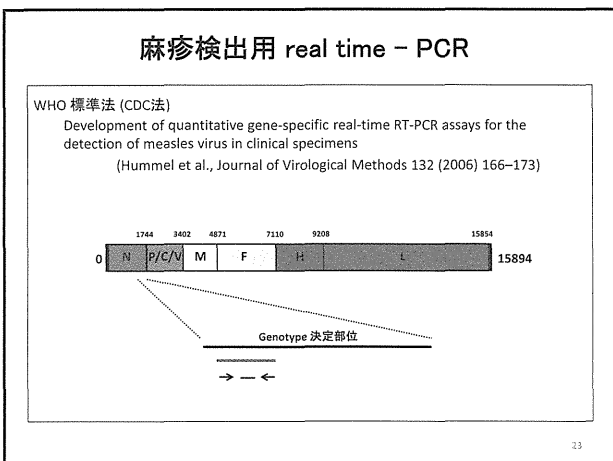
必要なオリゴDNA

Forward Primer (MVN1139F) : 5' TGGCATCTGAACTCGGTATCAC 3'
Reverse Primer (MVN1213R) : 5' TGCTCTCAGTAGTATGCATTGCAA 3'

Probe (MVNP1163P) : 5' FAM-CCGAGGATGCAAGGCTTGTTCAGA-TAMRA 3'

修正したCDC法 (TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix)

| | | |
|--------------------|---------------|-----------------------------------|
| water | 7.6µl | 1 cycle [50°C 5min 95°C 20sec |
| 4 × Master mix | 5µl (1 ×) | |
| MVN1139F (10µM) | 0.8µl (400nM) | 50cycle 95°C 15sec 60°C 1min |
| MVN1213R (10µM) | 0.8µl (400nM) | |
| MVNP1163P (6.25µM) | 0.8µl (250nM) | |
| サンプル | 5µl | |
| | 20µl | detector : FAM-TAMRA |



レファレンスセンターにお願いした事

- ① 本方法の確認 → 様々な機器、試薬で一般化が可能か?
「Real-time RT-PCR法による麻疹ウイルスN遺伝子の検出」を参考に最適化を実施してください。
- ② 過去にNested-PCRで検査を実施した検体の本方法での検査 → 判定基準をどのようにすればいいか?
- ・Nested-PCRで結果がでている「陽性検体」「陰性検体」を使用してください
 - ・遺伝子型、感度等の影響も検討したいのでできるだけ多くの検体で実施してください。
 - ・過去のNested-PCRでの検査との整合性を確認してください。

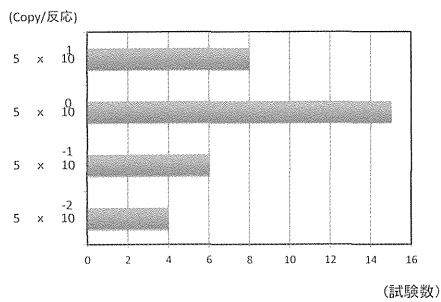
25

Real time PCRの検量線の解析

| 項目 | 求められる範囲 | 規格に対する適合率 |
|--------------------------------------|-------------|--------------|
| スロープ | -3.1 ~ -3.8 | 100% (33/33) |
| 検量線のR ² 値 | 0.98 以上 | 97% (32/33) |
| Standard RNA 5 × 10 ² の検出 | Ct ≤ 40 | 100% (33/33) |

26

検出されたStandard RNA (≤40)



27

試験法の違いによる試験の感度、特異度の比較

| 結果 | 試験方法 | 手順書と同じ (4施設) | その他 (7施設) |
|-------------------------------|------|--------------|--------------|
| 5 (copy/反応) で検出不可 (Ct > 40) | | 0/12 = 0% | 9/21 = 42.9% |
| 陰性対照(水)でも検出 (Ct < 40) | | 0/12 = 0% | 4/21 = 19% |
| 0.5(copy/反応)以下が検出可能 (Ct < 40) | | 1/12 = 8.3% | 9/21 = 42.9% |

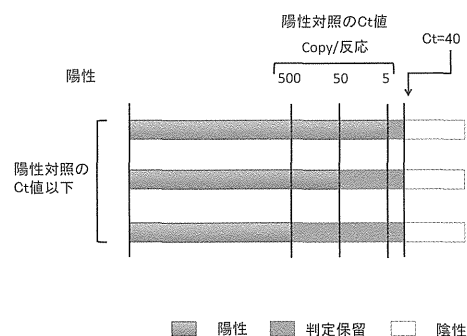
28

結果と機器・試薬の関係

| | 機器 | 試薬 |
|-----------------------|---------------------------------|---|
| 良好な結果が得られた機器、試薬の組み合わせ | ABI 7500 (またはABI 7500 Fast) | TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix |
| | ABI 7500 (またはABI 7500 Fast) | QuantiTect Probe RT-PCR kit |
| | ABI 7500 Fast | One step PrimeScript RT-PCR kit (Perfect Real Time) |
| | Roche LightCycler 480 system II | TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix |
| | ABI stepOne Plus | QuantiTect Probe RT-PCR kit |
| 問題が考えられた機器、試薬の組み合わせ | Roche LightCycler 480 | QuantiTect Probe RT-PCR kit |
| | ABI stepOne Plus | TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix |

29

判定方法



30

Real-time PCRとcPCRの比較解析

| | | Real-time PCR | | | |
|------|----|---------------|------|---------|------|
| | | 陽性 | 判定保留 | 陰性 | |
| | | | | Ct > 40 | 反応せず |
| cPCR | 陽性 | 54 | 7 | 1 | 3 |
| | 陰性 | 0 | 3 | 0 | 71 |

(N=139検体、陰性対照が陽性になった施設を除く)

31

Real-time PCRとcPCRの比較解析

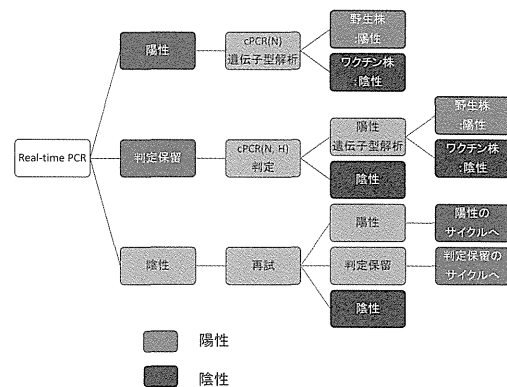
| | | 判定保留 | |
|-----|--|-------|-------|
| | | 陰性を含む | 陽性を含む |
| 感度 | | 83.1% | 93.8% |
| 特異性 | | 100% | 95.9% |

32

試験成立の基準、試験法の変更

| | 項目 | 求められる範囲 |
|--------|--|--------------|
| 試験成立条件 | スロープ | -3.1 ~ -3.8 |
| | 検量線のR ² 値 | 0.98 以上 |
| | Standard RNA 5 x 10 ¹ の検出 | Ct ≤ 40 |
| | 陰性対照 | 陰性 (Ct > 40) |
| 試験法の変更 | 陽性対照の調整: 5 x 10 ⁶ 及び 5 x 10 ¹ copy/反応 の2希釈を陽性対照として使用。Ct ≤ 40 となるより薄いスタンダードRNAを陽性対照とする。 | |

33



34

Molecular PTの問題点

- RNAの配布(方法、手間、コスト)
- 機器、試薬等の違いによる方法の調整
- 機器のメンテナンスの問題
- 精度管理の程度

35

Molecular PT(案)

- Real-time PCR
- 検量線用RNAの配布 (10⁷ copy/μL)
RNA希釈液 (10⁵-10¹ copy/μL)を作製し、real-time PCRを実施し、検量線を作成する。
→規格を満たす検量線が再現できるかを確認する
 - 陽性検体2、陰性検体1(FTA card)で配布
FTA cardからRNA抽出 → real-time PCRを実施 → 適切に検出できるかを確認する

36

Molecular PT(案)

RT-PCR

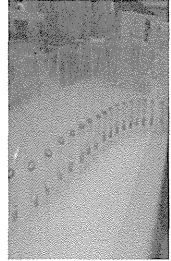
- Real-time PCRの検量線作成に用いた希釈RNA(10^3 - 10^7 copy/ μ L)にRT-PCRを実施する。
→ 10^2 copy/ μ L が検出できる事を確認する(検出感度の確認)

- 陽性検体2、陰性検体1 (FTA card)を配布
FTA cardからRNA 抽出→RT-PCRを実施(ゲル写真、RT-PCRの確認、陽性コントロール、陰性コントロール、サイズマーカー等を適切に使用しているか)
RT-PCR陽性検体→塩基配列を決定する(塩基配列の確認)
系統樹を作成し遺伝子型を解析する(遺伝子型解析法の確認)

17

Panel 01202 composition (n=20)

| | |
|--------------------------------------|----|
| Measles IgM positive samples | -5 |
| Rubella IgM positive samples | -7 |
| Parvovirus IgM positive samples | -1 |
| Dengue IgM positive samples | -1 |
| Measles/rubella IgM negative samples | -6 |



Jennie Lyndon (VIDAL); 11th Global Measles & Rubella laboratory meeting (June 2013)

レジオネラ属菌検査法の
安定化に向けた取り組み

北海道立衛生研究所
感染症部 細菌G
森本 洋 H26.7.14

1

厚生労働科学研究

【 H22～24 】

公衆浴場におけるレジオネラ属菌対策を含めた
総合的衛生管理手法に関する研究

【 H25～27 】

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

2

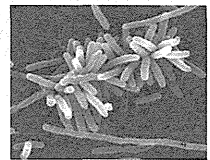
精度管理の対象となる病原菌は？

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

3

①感染症法からの必要性
—法的対象—

- レジオネラ症は、平成11年4月、「感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律(感染症法)」が施行され、全臨床医に届け出義務のある全数把握対象の四類感染症となった。



①感染症法からの必要性
—四類感染症の届け出数—

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

5

①感染症(法)からの必要性
—致命率が高い—

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

6

②検査対応の困難さからの必要性

— 要望1 —

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

7

厚労省回答

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

8

国立保健医療科学院 研究事業 推進官からのコメント

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

9

なぜ検査結果に
大きな差が生じているのか！

現状の確認
— 検査方法(培養法)について —

10

②検査対応の困難さからの必要性

— 防止指針 —

レジオネラ属菌培養方法の基本は、JIS K 0250:94-10:2006に準拠するが、種々の種別・状況、検査施設の規模・設備・人員その他の要因により実施方法の細部が異なる可能性がある。レジオネラ属菌検査は熟練した専門家が行わなければならない。検査実施に際し、操作によってエラーが生じ得る可能性があるときは、ローカル2の安全キャビネット内で作業する必要がある。省のレジオネラ属菌検査に従事しようとする者は、レジオネラ研究施設において受検者として検体採取、培養、知識、観察力、判定能力、バイオハザードの概念等を身に付けなければならない。

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

5.1 培養法

5.1.1 レジオネラ用培地

省に寄託施設として法に定めるように、レジオネラ属菌は通常の細菌培地に使用される成分を含有しない。本指針の採菌検査を行うのに、L-J培养基(L-J medium)を用いる。

北海道衛研のこれまで

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

12

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

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

13

②検査対応の困難さからの必要性
—SOPの基となっている検査マニュアル—

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

14

疑問点？問題点？妥協点？

- これらに示されている検査法には随所に違いがある
- それぞれにおいて項目ごとに複数の選択肢が認められる場合がある
- 改訂・レジオネラ属菌防除指針
 - 温泉利用入浴施設用—(1999年3月)
 - 検査方法, 検出限界, 検査範囲, 検査価格は実施機関によって異なる

⇒依頼時には、価格だけでなく、検査内容の説明をよく聞き判断する必要がある

15

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

→ 100倍濃縮した検体を培養した時に生菌が検出されないことを意味する。

→ 具体的には、どの方法から導かれた基準？

16

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

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

17

レジ検査に不安を感じたことはありますか？

| | 回答数 |
|------|----------|
| ある | 47(約63%) |
| 特にない | 28(約37%) |

18

不安ありとしたコメント

レジが強く疑われるが、確定させるのが困難な場合

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

19

さらに

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

20

レジオネラ属菌と確定
(成績書へ反映)させる根拠

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

21

このような状況下、検査結果は

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

非常に重要な役割を担っている
このためにも

自施設で行っている検査法の根拠・妥当性も重要

研修システムは
必要だと思いますか？

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

23

検査法の統一は必要だと思いますか？

| | 回答数 |
|-----|----------|
| 必要 | 68(約91%) |
| 不必要 | 3(4%) |
| その他 | 4(約5%) |

24

精度管理は必要だと思いますか？

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

25

今回の実態調査結果から

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

- 研修システムの構築
- 精度管理(培養法)

官・民間問わず検査精度の安定に向けた取り組みを進めることが必要

26

精度管理を行うためには

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

27

信頼性確保のための精度管理の位置づけ

外部精度管理

- 検査技術レベル
- 検査精度の確認(平均値、結果のばらつき)
- 検査手法の確認

(共通試料を用いた比較)

内部精度管理

- 検査精度の確認(回収率等の確認)
- 担当者間でのばらつき
- 機器の点検、整備

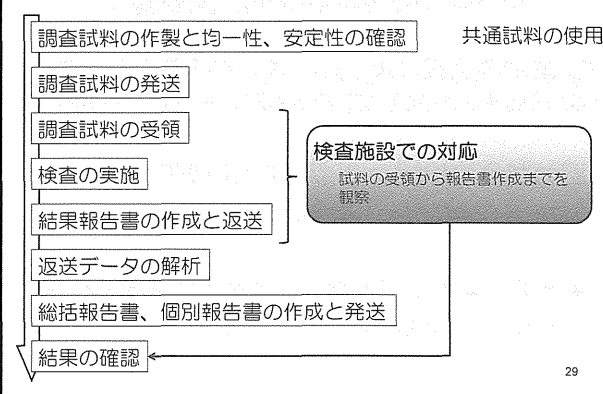
↑ 実施状況の確認
内部点検

(検査施設内で完結)

他検査施設との比較が可能

28

外部精度管理の実施の方法



29

微生物学調査試料の作製

- 微生物学検査用調査試料の最大の問題点は、添加菌の増殖、死滅、変異をいかに抑えるのか
- 定性検査で結果に影響を及ぼさないことを前提とした場合には、いかに死滅させないか
⇒調査試料中の添加菌の均一性、安定性の担保

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

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

30

特注品BioBallの使用により

①外部精度管理用菌株の検討
②配付試料の安定化に向けた検討 **解決!**
③外部精度管理参加条件の設定
④配付方法の検討
⑤検査方法の検討(定義:どの部分に重きを置くのか)
⑥プレ外部精度管理実施
⑦評価と解析方法の検討
⑧公益法人との協力(将来的な外部精度管理委託機関)
⑨内部精度管理の必要性
⑩その他(検査法の標準化、研修会等)

31

⑤検査方法の検討 どの部分に重点を置くか?

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

32

| ⑤&⑥&⑦ | 参加機関 | SOP | 参加機関 | SOP |
|--|------|------|--------|------------|
| 【H25プレ外部精度管理で確認した検査法、結果、解析】 * 本来の外部精度管理は、各検査機関のSOPが適切であるかを確認するもの。 * 検査方法を指定せず、各地研のSOPに従って実施。 * WGにおいては、WG推奨法による検査も実施。 * 目標値: BioBall メーカー保証範囲の30 ~ 300%と定義し、300~15000 cfu/100ml と設定。メーカー中央値: 3383. 2 cfu/100ml | 1 | 2000 | 24 | 20 |
| | 2 | 5000 | 25 | 920 |
| | 3 | 3000 | 26 | 530 |
| | 4 | 110 | 27 | 120 |
| | 5 | 2000 | | 190 |
| | 6 | 60 | | 30 |
| | 7 | 20 | 28 | 40 |
| | 8 | 20 | 29 | 25 |
| | 9 | 56 | 30 | 30 |
| | 10 | 160 | 31 | 10 |
| | 11 | 220 | 32 | 20 |
| | 12 | 400 | 33 | 70 |
| | 13 | 10 | 34 | 850 |
| | 14 | 30 | 35 | 110 |
| | 15 | 40 | 36 | 3000 |
| | 16 | 350 | 37 | 810 |
| | 17 | 310 | 38 | 370 |
| | 18 | 300 | 39 | 560 |
| | 19 | 80 | 機関数別 | 14/39(36%) |
| | 20 | 80 | のべ試料数別 | 15/42(36%) |
| | 21 | 50 | 平均値 | 532.761905 |
| | 22 | 15 | 最大値 | 5000 |
| | 23 | 200 | 最小値 | 30 |
| 24 | 160 | 中央値 | 115 | |

⑨ & ⑩ 標準的検査法の提示とその研修会 及び 内部精度管理 の必要性

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

34

⑧将来的な外部精度管理の対応 (公益法人との協力?)

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

外部精度管理受託機関選定

- BioBallの利用により、レジオネラ属菌及び検査法の知識を十分有している必要はあるが、検体調製ノウハウを有する必要はない。
- 配付製品の確認 → レジオネラ検査研修受け入れ機関と提携するなど

* 上記により、レジオネラ属菌を直接扱える機関ではなくても受託機関として選定可能。

36

3) 検査研修会(WG意見)

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

37

どのような研修システムでも

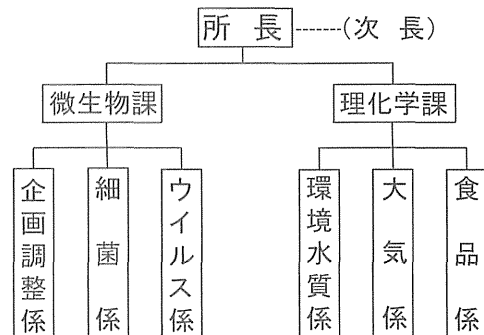
- ・ 研修受け入れ機関の設置 と 講師の養成 が 必要
 - ・ 地方衛生研究所を研修対応機関として機能させる場合
 - ・ 業務としての位置付け
 - ・ 予算化
- ⇒ 厚労省、各自治体、全国地方衛生研究所協議会との連携が必要
- ・ 民間研修事業の活用も検討

38

仙台市衛生研究所における感染症検査に係る精度管理について

仙台市衛生研究所 勝見正道

仙台市衛生研究所の機構



業務概要(平成24年度)

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

検査の流れ

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

GLP導入の経緯

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

仙台市衛生研究所における検査業務管理に関する基本要綱

- | | |
|-------------|-------------|
| ・ 目的 | ・ 検査業務管理委員会 |
| ・ 適用 | ・ 内部点検 |
| ・ 組織 | ・ 内部精度管理 |
| ・ 検査部門責任者 | ・ 外部精度管理 |
| ・ 検査区分責任者 | ・ 研修 |
| ・ 品質管理部門責任者 | ・ 文書等の保存期間 |

平成19年4月1日 実施

仙台市衛生研究所における 検査業務管理に関する基本要綱

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

7

衛生研究所微生物検査業務実施要領

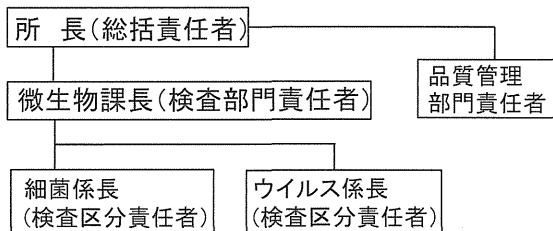
平成19年6月 制定

微生物検査部門における検査の業務管理の実施

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

8

感染症検査GLPの機構



9

内部点検

- 検査部門責任者による点検(年4回)
- 品質管理部門責任者による点検(年2回)

点検項目

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

10

精度管理の導入 1

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

11

精度管理の導入 2

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

参考(平成25年度)

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

12

精度管理の導入 3

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

13

細菌の精度管理 1

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

14

EHEC精度管理結果

平成25年度結果 平成24年度との比較

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

| | H24 | H25 |
|-----|-----|-----|
| O型別 | 95% | 99% |
| H型別 | 77% | 57% |

15

細菌の精度管理 2

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

16

レジオネラ属菌(定量)精度管理結果

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

17

細菌の精度管理 3

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

18