

### ウイルスの精度管理 1

• インフルエンザウイルス核酸検出検査  
(リアルタイムRT-PCR法)

国立感染症研究所インフルエンザ研究センターが実施した第1回地方衛生研究所外部精度管理事業に参加

検査結果 問題なし

19

### ウイルスの精度管理 2

- 1 ノロウイルス(リアルタイムPCR法)  
(当該検査を実施する際、毎回精度確認検査実施)
  - Echoウイルス Hill株の増幅確認
  - ノロウイルス遺伝子陽性コントロールを用いた検量線の作成
- 2 ノロウイルス(RT-PCR法)  
(当該検査を実施する際、毎回精度確認検査実施)
  - Echoウイルス Hill株の増幅確認

20

### ウイルスの精度管理 3

• インフルエンザウイルス  
(当該検査を実施する際、毎回精度確認検査実施)

オフシーズンに練習時に精度管理も実施  
インフルエンザウイルス遺伝子陽性コントロール  
による検査感度チェック

21

### 感染症GLPの課題

- 1 検査実施標準作業書の整備
- 2 検査機器の点検時間及び費用の増加
- 3 品質管理部門の人員確保
- 4 精度管理
  - (1)Hill 株利用の限界  
エンテロウイルス関与を疑う検体  
糞便以外の検体
  - (2)細胞培養法

22

国内外の検査室における質の管理について  
～ポリオウイルスを中心に～

国立感染症研究所ウイルス第二部  
吉田 弘

世界のラボの現状について

### 感染症対策における検査機能強化の流れ

世界ワクチン接種行動計画  
(The Global Vaccine Action Plan; GVAP, 2012年WHO総会で採択)

2020年までに、全国で90%以上、すべての地区で80%以上の接種率を達成。  
ワクチンで防ぐことができる病気をすべての制御を進める一方、ポリオの根絶が最初の目標。  
次世代ワクチンの研究・開発の推進。

↓

根絶、排除確認のための病原体サーベイランスの強化(ポリオ、麻疹)  
ワクチンで予防可能な疾患

国際保健規則(2005)  
(International Health Regulation: IHR, 2007年発効)

国際的に脅威となる(感染症に限らない)公衆衛生緊急事態(public health emergencies of international concern: PHEIC)全てをWHOに通知するシステム  
PHEICを検知してから24時間以内の通告を義務化  
感染症は天然痘、新型インフル、ポリオ、SARS

↓

公衆衛生ラボの機能強化 あらゆる検査

### ラボネットワークの例

#### Global WHO Vaccine Preventable Disease Laboratory Network

ラボネットに属する機関は定期的な認定を受ける

WHO Labs/institutes testing for:

- ★ Polio (22)
- Measles/rubella (543)
- Polio and measles/rubella (109)
- ◇ Measles/rubella and yellow fever (14)
- ◇ Polio, Measles/rubella and yellow fever (13)
- Polio and/or Measles/rubella and/or JE (1)

Data as of Aug 2007

WHO Vaccine Preventable Disease Lab Network

### ラボネットワークの構成とその役割(ポリオ)

#### Structure of the network

Every country need not have the same capacity  
"networking" provides access to services

ポリオラボのレファレンス

**Global Specialized Labs**  
N = 7  
Isolates & types viruses  
Performs ITD & sequencing  
Prepares & distributes reagents  
Prepares & distributes PT test  
Research

**Regional Reference Labs**  
N = 16  
Serves > 1 country  
Isolates & serotypes viruses  
Differentiates (ITD) wild & Sabin-like polio viruses  
Distributes supplies as needed. Performs sequencing or  
Refers wild & ITD discordant isolates for sequencing

**National / Subnational Labs**  
N = 123  
Serves host country and others  
Isolates viruses in cell cultures & refers untyped or serotyped virus for ITD  
Since 2009 several labs have ITD capacity

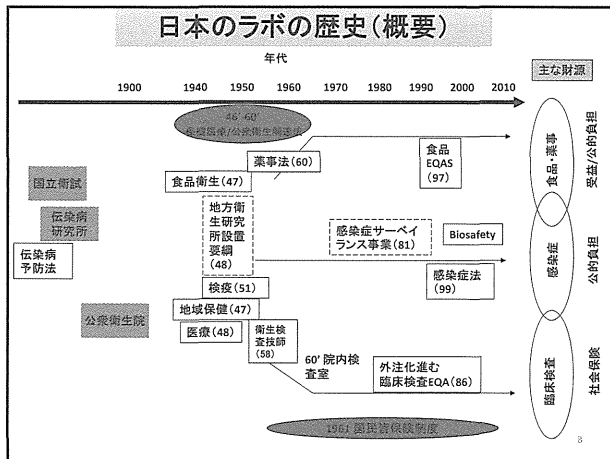
Global Polio Laboratory Network

### (例)WHOポリオウイルスラボの認定条件と査察項目

|                      |                                                                                                                   |             |
|----------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------|
| 認定条件                 | 1. Results are reported on at least 80% of all AFP specimens within 14 days:                                      | %           |
|                      | 1. Tests are performed on at least 150 stool specimens annually:                                                  | %           |
|                      | 1. At least 80% of suspected poliovirus isolates from AFP cases and contacts are forwarded for ITD within 7 days: | %           |
|                      | 1. Accuracy of identification of polioviruses among all isolates obtained in L20B cells is at least 90%:          | %           |
|                      | 1. Result on most recent virus isolation PT is at least 90%:                                                      | %           |
| 査察項目                 | 1. Score on annual on-site review is at least 80%:                                                                | %           |
|                      | PT(proficiency test)=EQASに該当                                                                                      |             |
|                      | 1.スタッフ(人数、経験、研修歴、等)                                                                                               | 6.便検体処理     |
|                      | 2.検査室(広さ、動線、清浄区と汚染区の区別等)                                                                                          | 処理法SOP、作業記録 |
|                      | 3.細胞継代、ウイルス分離のマネジメント                                                                                              | 保管記録        |
| 4.細胞                 | バイオハザード対応状況                                                                                                       |             |
| SOP(継代法など)、記録        | 7.ウイルス分離                                                                                                          |             |
| 使用細胞(RDとL20B)        | 分離のSOP、観察記録                                                                                                       |             |
| 継代時の細胞数のカウント         | 株保管記録、状況                                                                                                          |             |
| 培地調整、保管(温度、使用期限の記載等) | 8.ポリオの場合の保管状況                                                                                                     |             |
| 5.細胞の感受性試験(内部精度管理)   | 9.バイオセーフティ                                                                                                        |             |
| 標準品による感受性試験(SOP、記録)  | 10.試薬と消耗品の保管、調整記録など                                                                                               |             |
| マイコテスト、等             | 11.機器保守管理状況                                                                                                       |             |
|                      | 12.疫学部門との連携                                                                                                       |             |
|                      | 13.データマネジメント                                                                                                      |             |

各種SOPと記録は査察時に必要不可欠

# 日本のラボについて



### エンテロウイルス検査における質の管理状況について

H25年度厚生労働科学研究費「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」にて、エンテロウイルス検査における質の管理状況について、地方衛生研究所を対象にアンケート調査を行った(2013年12月)

**エンテロウイルス検査とは**  
主に2類感染症(ポリオ)、5類感染症(手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎等)を対象

**①ウイルス分離・同定検査の品質管理の状況**  
ウイルス分離は培養細胞を用いて行うもの。得られたウイルスは型別同定検査、抗原解析、抗体保有状況調査等に用いる。

**②PCR検査、遺伝子配列解析に関する品質管理の状況**  
PCR検査、遺伝子配列解析は①で得られたウイルス、或いは直接臨床材料を用い、各種機器により検査を実施するもの

**③検査に関わるSOP(標準手順書)整備状況**  
①②の検査手順を示した標準マニュアル。

### エンテロウイルス検査における質の管理状況について(結果)

エンテロウイルス検査を実施している67地方衛生研究所からの回答のまとめ

**①ウイルス分離・同定検査に関する品質管理**

|   |                      |                    |
|---|----------------------|--------------------|
| 計 | 特に実施していない<br>57(85%) | 実施している*<br>10(15%) |
|---|----------------------|--------------------|

\*実施項目は様々な状況

**②PCR検査、遺伝子配列解析に関する品質管理**

|   |                      |                    |
|---|----------------------|--------------------|
| 計 | 特に実施していない<br>42(63%) | 実施している*<br>25(37%) |
|---|----------------------|--------------------|

\*実施項目は様々な状況

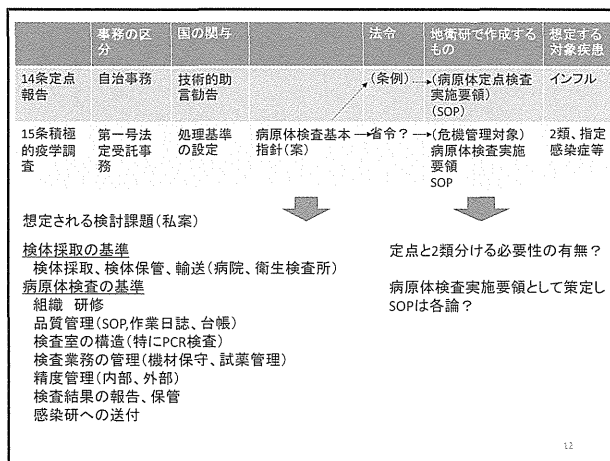
**③検査に関わるSOP(標準手順書)の有無**

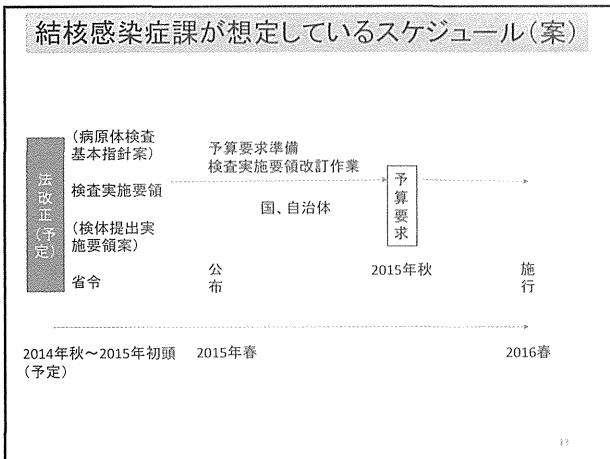
|   |                      |                      |
|---|----------------------|----------------------|
| 計 | 独自に作成している<br>16(24%) | 特に作成していない<br>51(76%) |
|---|----------------------|----------------------|

H25年度厚生労働科学研究費「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」による。

### 各種検査の関連法

| 区分    | 検査                            | 法的根拠                                |
|-------|-------------------------------|-------------------------------------|
| 水質    | 河川などの水質検査                     | 水質汚濁防止法15条(法定受託)                    |
|       | 水道の水質検査(地衛研は事業者に対する外部精度管理を担当) | 水道法20条(自治事務)                        |
|       | 温泉の水質検査                       | 温泉法(自治事務)                           |
| 大気/環境 | 大気汚染の検査                       | 大気汚染防止法22条(法定受託)<br>悪臭防止法11条12条(自治) |
|       | 土壌汚染検査                        | 農用地の土壌の汚染防止等に関する法律11条(法定受託)         |
|       | ダイオキシン検査                      | ダイオキシン類対策特別措置法27条(法定受託)             |
| 食品    | 食品収去検査                        | 食品衛生法(法定受託)                         |
|       | 食中毒検査                         | 食品衛生法(法定受託)<br>地域保健法                |
| 感染症   | 定点サーベイランス                     | 感染症法14条(届け出)(自治)                    |
|       | 積極的疫学調査(病原体管理)                | 感染症法15条(調査、届け出)(法定受託)<br>感染症法       |
| 薬事    | 医薬品分析                         | 薬事法                                 |
|       | 栄養調査                          | 健康増進法                               |





### まとめ

- ・GVAP: ワクチンで予防可能な疾患(ポリオ、麻疹、風疹など)の病原体サーベイランスの信頼性確保(標準化、認定制度あり)  
IHR(2005): 危機管理対応のための検査体制強化→信頼性確保
- ・感染症分野を除き精度管理に関する国内法令は整備
- ・信頼性確保のための項目は何か。そして限られたリソースで何が、どこまでできるか?
- ・外部精度管理の仕組み(民間機関、公的機関、財源)
- ・検査の基準(定点検査、精度管理)を維持するためには?  
産業界(KAIZEN→コスト削減)、医療界(事故防止)、食品(輸出)、環境(公害)
- 感染症: 国内法令、IHR、ポリオ根絶、麻疹排除→危機管理/公衆衛生

H26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

国立感染症研究所  
感染症疫学センター第6室  
木村 博一

研究班分担表

|                                           |        |                                                                           |
|-------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------|
| 体制小班<br>精度管理実施要領(綱)案作成                    | 佐多(富山) | 平田宏(名古屋) 平田輝(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) 倉根・宮崎・大石(感染症) |
| ウイルス小班<br>精度管理法(精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成) | 小澤(群馬) | 木村(感染症) 柴田(名古屋) 貞升(東京) 藤井・岸本(岡山) 岡野(北海道) 佐多(富山) 塚越・小林(群馬) 富崎・駒瀬(感染症)      |
| 細菌小班<br>精度管理法(精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成)   | 調(山口)  | 石岡(感染症) 世良(福岡) 勢戸(大阪) 清水(北海道) 太田(横浜) 佐多・磯部(富山) 大石・清池(感染症)                 |
| 突態調査(アンケート調査)                             | 佐多(富山) | 各小班担当者全員                                                                  |

H26年度 ウイルス検査外部精度管理(案)について

- 衛生研究所におけるウイルス検査の主な対象疾患
1. インフルエンザ
  2. ノロウイルス感染症(感染性胃腸炎・食中毒)
  3. 麻疹・風疹
  4. その他の呼吸器感染症(RSVなど)
  5. AIDS
  6. 急性脳炎(脳症)
  7. ウイルス性肝炎
  8. 手足口病・ヘルパンギーナ
  9. 無菌性髄膜炎
  10. その他原因不明疾患(ウイルス感染症疑い)

H26年度ウイルス検査診断精度管理体制の構築

・精度管理対象ウイルス:NoV

- 1) 精度管理実施要領(案)
- 2) 精度管理実施手順(案)
- 3) 標準検査法(案)
- 4) 精度管理データ記入ファイル(案)

・各地研におけるウイルス検査の精度管理の実態把握

- 1) 精度管理アンケート(案)

精度管理対象機関・実施時期

- ・対象:地方衛生研究所協議会加盟機関
- ・参加形態:任意とする
- ・測定法:プレート法のみ?
- ・実施時期:H26年度後半(10月以降?)
- ・実施方法:精度管理実施要領・精度管理実施手順に従う

ウイルス検査精度管理実施方法

- ・模擬検体: ノロウイルス(NoV)
- ・材料: NoV cDNAあるいはNoV組み換えプラスミドDNA
- ・方法: 精度管理実施要領・精度管理実施手順に従い、NoV遺伝子定量標準曲線作成と模擬検体測定

- ・日常業務に数検体程度の追加試験で済む
- ・精度管理解析のための必要なデータが得られる
- ・一定の内部精度管理体制が確立されていると思われる

ウイルス検査法の種類

- ・細胞培養法
- ・遺伝子検査法
- ・抗原検査法
- ・抗体検査法
- ・電子顕微鏡法

➔

遺伝子検査の汎用化  
(迅速・高感度・特異的)

↕

- ・RT-PCR法
- ・リアルタイムPCR法
- ・シーケンス/系統解析法
- ・NGS解析

データ解析および送付について

1. 曲線の関数式および相関係数(R value)
2. 各標準物質濃度別Ct値(NoV組み換えプラスミドDNA)
3. 使用試薬名と反応系
4. 測定装置(機種名や購入年など)
5. 標準曲線図(平均値プロット図)

・模擬検体に関するデータ

1. 測定生データ(3重測定の各々のデータ)

↓

1-4をデータファイルに入力  
5をPDFファイル化

↓

電子メールにて送付

データ解析・還元について

- ・ウイルス小班によるデータ収集解析
- ・解析データと報告書については研究代表者に一括還元

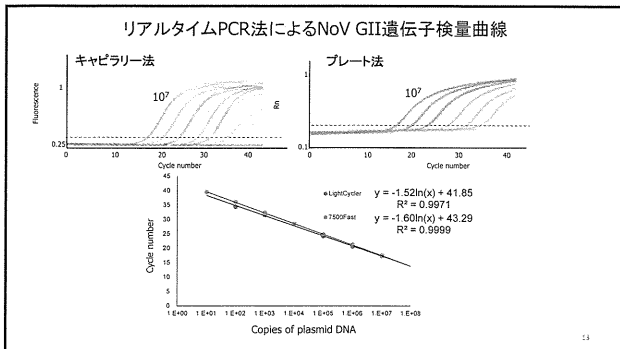
その他

詳細について、当班会議後、各小班のメンバーで検討し、とりまとめを行う。

リアルタイムPCR法の特徴

- ・長 所
  1. 迅速・高感度・特異的
  2. ウイルス遺伝子の定量が可能
  3. 実験室内コンタミネーションが起こりにくい
- ・短 所
  1. ある程度の熟練が必要
  2. 高コスト(試薬・機器)

地研のウイルス検査に汎用されている(特にNoVとインフルエンザ)



H26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  
(細菌検査部門について)  
  
国立感染症研究所  
感染症疫学センター第五室  
石岡 大成  
  
2014.07.14

分 担 表

| 担当小班                                              | とりまとめ      | 担 当                                                                                 |
|---------------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 体制小班<br>精度管理実施要領(綱)案<br>作成                        | 佐多<br>(富山) | 平田宏(名古屋) 平田輝(福岡)<br>山本(大阪) 岡野(北海道) 水野(横浜)<br>末吉(山口) 岸本(岡山) 田原(東京)<br>意根、宮崎、大石(感染症研) |
| ウイルス小班<br>精度管理法:<br>精度管理実施手順(案)<br>標準検査法(案)<br>作成 | 小澤<br>(群馬) | 木村(感染症研) 柴田(名古屋)<br>貞升(東京) 藤井、岸本(岡山)<br>岡野(北海道) 佐多(富山)<br>塚越、小林(群馬) 宮崎、駒瀬(感染症研)     |
| 細菌小班<br>精度管理法:<br>精度管理実施手順(案)<br>標準検査法(案)<br>作成   | 調<br>(山口)  | 石岡(感染症研) 世良(福岡) 勢戸(大阪)<br>清水(北海道) 太田(横浜)<br>佐多、磯部(富山) 大石、蒲池(感染症研)                   |
| 実態調査<br>アンケート調査                                   | 佐多<br>(富山) | 各小班担当者全員                                                                            |

平成26年度  
地衛研外部精度管理(案)

地衛研で実施される細菌検査の主な病原体

1. 病原大腸菌(腸管出血性大腸菌)
2. 赤痢菌属
3. コレラ菌(ビブリオ属菌含む)
4. 結核菌
5. カンピロバクター属菌
6. サルモネラ属菌(腸チフス・パラチフスA菌含む)
7. 黄色ブドウ球菌
8. セレウス菌
9. ウェルシュ菌
10. エルシニア属菌
11. レジオネラ菌
12. A群溶血性レンサ球菌
13. 細菌性髄膜炎起因菌
14. 百日咳起因菌
15. その他原因不明疾患

感染症法における精度管理としての候補は

平成26年度  
地衛研精度管理体制(細菌検査診断)の構築  
(案)

外部精度管理対象病原体: サルモネラ属菌(案)

- ・精度管理実施要領(案)
- ・精度管理実施手順(案)
- ・検査結果報告書(案)
- ・検査経過記録書(案)
- ・検体管理記録簿(案)
- ・生化学性状試験記録表(案)

→ 検討事項のまとめ

各地衛研における細菌検査精度管理に関する状況

- ・精度管理アンケート(案)

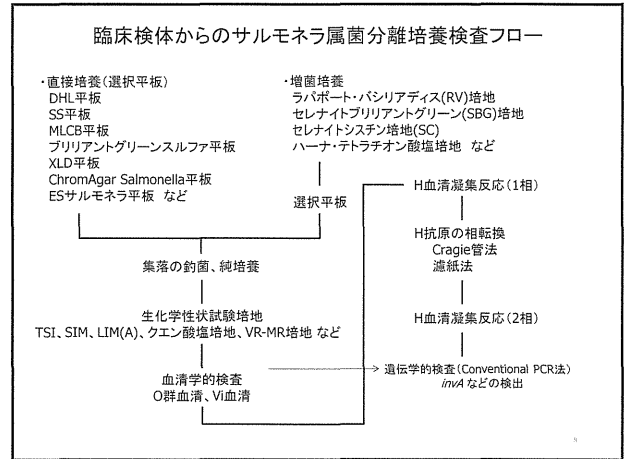
外部精度管理実施方法

- ・対象: 地方衛生研究所全国協議会加盟機関
- ・実施形態: 希望調査の上検討
- ・実施時期: 平成26年度後半(年明け)
- ・実施方法: 精度管理実施要領、精度管理実施手順に準じて行う



### 細菌検査精度管理（案）


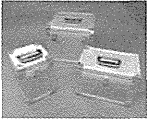
- ・材料：病原体添加臨床検体
- ・対象病原体：サルモネラ属菌  
候補血清型：*Salmonella* *Infantis*  
他に*S. Cerro* など
- ・方法：培養法によるサルモネラの同定および血清型別を精度管理実施要領、精度管理実施手順（地衛研におけるSOP）に従って実施



### 精度管理検体の送付方法

第一選択候補：ゆうパック

1. 一次容器  
スクリュウキャップチューブを使用(パラフィルムでシール)
2. 二次容器、三次容器、四次容器  
国連容器を用いて吸収剤を入れ、緩衝材で固定  
各地衛研から発送場所に事前に送付
3. 発送場所および送料  
国立感染症研究所 村山庁舎

(参考)  
ゆうパック送料 80サイズ(片道)  
東京 → 北海道 (1230円)  
東京 → 新潟 (930円)  
東京 → 大阪 (1030円)  
東京 → 鹿児島 (1340円)  
東京 → 沖縄 (1440円)

### 結果の報告方法およびデータ解析について

- ・ 検査結果報告書(様式1)、検査経過報告書(様式2)を使用して郵送またはE-mailで報告
- ・ 各増菌培地、選択平板の使用状況および組み合わせ
- ・ 使用試薬名およびメーカー
- ・ 培地による検出感度
- ・ 機器使用の場合は当該機種、メーカー
- ・ SOPの比較(独自の場合)
- ・ その他(輸送方法)

### データとりまとめおよび還元

- ・ 細菌小班にてデータ収集および解析を行う
- ・ 解析データと報告書については研究代表者に一括還元

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精度管理の導入と継続的实施のための全国的制度の構築に関する研究（H26-健危-一般-001）」班

研究代表者：佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

## 第二回研究班会議

日時：平成27年1月9日（金）13時30分から16時30分

場所：国立感染症研究所共用第二会議室

議題等（案）

- 1) 挨拶等 原田志織（厚生労働省健康局がん対策・健康増進課地域保健室）
- 2) 研究班の進捗状況説明 佐多徹太郎（研究代表者）
- 3) 感染症検査の精度管理に関する実態調査 佐多徹太郎
- 4) 外部精度管理のしくみ構築のためのウイルス検査 木村博一（研究分担者）
- 5) 外部精度管理のしくみ構築のための細菌検査 石岡大成（研究分担者）
- 6) 地方衛生研究所における感染症検査に係わる精度管理実施要綱(案) 佐多徹太郎
- 7) 討論および今後の予定等

# 「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」 第2回研究会議 概要

平成27年1月9日 感染研 共用第三会議室 13時～17時00分

1. 佐多研究代表者より挨拶

2. 原田地域保健専門官（厚労省）

感染症法の改正について、地研の強化と精度管理についての記載があることから、本研究の成果について期待している。

3. 佐多（研究班の進捗状況の説明）（配布資料1）

次年度の継続申請書についてはこれまでのスキームを来年度も使用したい。感染研の宮崎班との連携も視野に入れる。必要に応じて、都道府県の感染症担当部局への研究の結果を情報として提供し、予算獲得の根拠に使ってもらうことを想定している。

今年度を実施したことは、①アンケート調査を行い、結果を解析した。②精度管理実施要領素案を作成した。③ウイルス・細菌小班別に外部精度管理調査を実施した。

4. 佐多（精度管理に関する実態調査アンケート報告）

感染症検査における「標準検査法」「標準作業書」「プロトコール」など、言葉のもつ意味が混同されている状況となっている。感染症検査においては、食品検査と同じような「SOP」な導入は、検査に制約が生まれるという意見があった。20年ほど前にもこの研究班と同じようなテーマで実施し報告書がまとめられていることが判明した。その報告書についてCD化しているので後日皆さんに配布したい。総括に述べられていることは、外部精度管理の意義はあるが、実施母体、予算、人的な問題があるということであった。すなわち、今回の研究班とよく類似している。ただし、今回は時代背景が異なるとともに、感染症法に盛り込まれる可能性があるという点が異なる。また、20年間ほとんどできなかつたとならないように考えていきたい。

5. 木村（ノロウイルスの精度管理要綱等の説明）（配布資料2）

今回の外部精度管理調査は、標準検査法としては食中毒検査の公定法とし、ウイルス研修のコースでも実際に使用した方法である。検査は各機関が日頃実施している方法で実施することとした。59機関が参加した。試料Bでは、結果は95%信頼区間外であった機関が36～40機関と半数以上であった。原因としては、試料の混和が十分でなかった可能性、配布試料の劣化、器具や機器の問題などが考えられたが、明らかではなかった。40サイクル以上でCt値が上がったものを陽性とした機関も見られた。

→ノロウイルスの検査に半定量値が必要かどうか、調査項目として適当か？

→実際の検査では、検体からの遺伝子の抽出に精度の問題があると思われる。

→定量値で2桁の違いが認められたら、陽性検体を陰性と判断する可能性があるということなので、定量値による調査も意味がある。

→食中毒検査の場合、実際のプロトコールで実施すると、試薬代が高い。

→キャリアオーバー、クロスコンタミ、フォールスネガ、フォールスポジティブのような検体も調査項目の中に入れるべきである。

→40サイクルでCtが立ち上がる例は食品業務従事者やふき取り検体である。これを単純に「陰性」として処理できず、意味のある40サイクルといえるので、判断は難しい。

→はずれ値の原因について、プライマーの凍結融解による劣化が問題であったと自施設で考察している  
→結果が思わしくなかった機関については、その原因について考察してもらい、その情報はみんなで共有すべきである。

#### 5. 石岡（細菌小班の精度管理結果）（配布資料3）

サルモネラを対象として、2検体で調査した。検体の送付時に大きな問題が浮上し、調査開始が遅れた。原因のひとつは、菌株の入った検体の発送時に大きな制約（病原体輸送の規定）があったことである。感染研との協議が必要である。10機関への調査で、1検体はサルモネラ陰性、1検体には *S. Infantis* と *S. Cerro* を接種し、送付した。3機関では *S. cerro* のみ検出したと回答。7機関では2血清型を検出していた。

→予備実験で48時間培養から検出されていたが、そのような培養は基本的な方法ではないので、菌株の選定に問題がないか？

→地衛研に対する調査であることを考慮すべき（今回の項目は医療機関向けであった）  
施設基準の申請もわずらわしかった

→調査項目に対し選定された菌の特性により、結果としてクイズみたいになった？

→食中毒菌ではなく、感染症法にある菌で実施してほしい

佐多の（アンケート部分は報告書に改訂した最終版を提示した）

#### 6. 佐多（結果報告の最終版はアンケート調査結果の報告書に添付）（配布資料4）

地方衛生研究所における感染症検査に係わる精度管理実施要綱（案）の作成について（体制小班）として、これまでの地衛研研究活動の調査結果について、体制小班の担当として代表者から紹介された。アンケートの自由記載意見にあった「おなじような精度管理事業を行った記憶」との指摘から、平成9年度の「行政検査における精度管理システム構築に関する研究」班の報告書を入手した。その概要について紹介があり、今後役に立てることになった。報告書はpdfファイル化して班員に配布する予定とのことであった。そして今回、精度管理実施要綱（案）が提示された。こういった点を踏まえて今後さらに検討すること、そしてその計画等について提示された。

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精度管理の導入と継続的実施のための全国的制度の構築に関する研究 (H26-健危-一般-001)」班  
研究代表者: 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)

第二回研究班会議  
日時: 平成27年1月9日(金)13時30分から16時30分  
場所: 国立感染症研究所共用第二会議室

議題等(案)

- 1) 挨拶等 厚生労働省健康局が対策・健康増進課地域保健室 原田志織
- 2) 研究班の進捗状況説明 佐多徹太郎(研究代表者)
- 3) 感染症検査の精度管理に関する実態調査 佐多徹太郎
- 4) 外部精度管理のしくみ構築のためのウイルス検査 木村博一(研究分担者)
- 5) 外部精度管理のしくみ構築のための細菌検査 石岡大成(研究分担者)
- 6) 地方衛生研究所における感染症検査に係わる精度管理実施要綱(案) 佐多徹太郎
- 7) 討論および今後の予定等

申請書  
平成26年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)

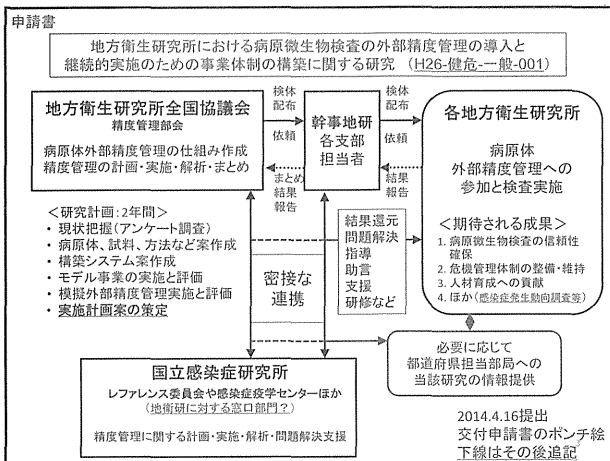
地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施のための事業体制の構築に関する研究 (H26-健危-一般-001)

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)  
平田宏之(名古屋市衛生研究所) 宮崎義継(国立感染症研究所)  
平田輝明(福岡県保健環境研究所) 大石和徳(国立感染症研究所)  
岸本壽男(岡山県環境保健センター) 木村博一(国立感染症研究所)  
山本容正(大阪府公衆衛生研究所) 石岡大成(国立感染症研究所)  
岡野素彦(北海道立衛生研究所) (敬称略)  
協) 小澤邦寿(群馬県衛生環境研究所)  
協) 水野哲宏(横浜市衛生研究所)  
協) 田原なるみ(東京都健康安全研究センター)

研究協力者: ほかに地衛研および感染研の関係者



分担表(案) 2014.7.14-23

| 担当グループ                                   | とりまとめ      | 担当                                                                            |
|------------------------------------------|------------|-------------------------------------------------------------------------------|
| 体制小班<br>精度管理実施要綱(案)作成                    | 佐多(富山) 12名 | 平田宏(名古屋) 平田輝明(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) 倉根・宮崎・大石(感染研)    |
| ウイルス小班<br>精度管理法・精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成 | 小澤(群馬) 12名 | 木村・野田(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(富山) 勝見(仙台市) 宮崎・駒瀬・影山・吉田(感染研) |
| 細菌小班<br>精度管理法・精度管理実施手順(案)および標準検査法(案)作成   | 調(山口) 11名  | 石岡(感染研) 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) 大石・蒲地(感染研)           |
| 実態調査(アンケート調査)                            | 佐多(富山)     | 各小班担当(分担、協力)全員                                                                |

厚生省: 原田、林、中嶋、福島、梅木

計画実施中 本研究班の成果物として期待 (せねばならぬ) 20150109 update

1. 地衛研の精度管理の実態(アンケート調査の解析)  
(地衛研は感染症法に関連する精度管理が必要)  
→ 6月20日までアンケート項目の提出依頼(班員等全員へ)  
→ 案2回、回答付き案2回の意見聴取し、10月8日調査開始、10月21日締切64件。  
→ 76地衛研から回答あり(10/31まで)集計作業開始 精度管理部会(11/4)調班(11/6)  
→ 全79地衛研から回答(11月中旬)再集計 班員配布(12/5)調班(12/16)
2. 外部精度管理実施要綱(案)ないし精度管理実施要綱(案)(体制小班)  
→ 要綱案の案の項目の提出依頼: 6月27日まで  
→ 11月4日の精度管理部会で項目議論→その後了承 その後立案予定(メール等)  
→ これまで地衛研で行ってきた精度管理に関する研究報告の収集・まとめ  
→ 平成9年の報告書を手直し、本日供覧、ここまでのまとめを行う
3. 外部精度管理の適切な方法(実験結果も含む)ないし精度管理実施手順(案)  
→ ウイルス・細菌小班的キックオフ班会議を7月14日に開催  
ウイルス小班(59地衛研参加)、細菌小班(11地衛研参加)→本日報告。
4. (病原検査マニュアルの改訂)→ 宮崎班へ依頼

○本外部精度管理事業は、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・構築し、その妥当性を評価する  
○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今回の研究目的とする 5

H26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第6室  
木村 博一

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:小澤邦壽(群馬県)

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)

柴田伸一郎(名古屋市)

藤井理津志 岸本寿男(岡山県)

宮崎義継 駒瀬勝啓 野田雅博 木村博一(感染研)

H26年度ウイルス検査診断精度管理体制の構築・実施

- ・検査精度管理対象ウイルス:NoV
- ・リアルタイムPCR法によるNoV遺伝子定量

- 1) 精度管理実施要領
- 2) 精度管理実施手順
- 3) 標準検査法
- 4) 精度管理データ記入ファイル

- ・各地研におけるウイルス検査の精度管理の実態把握

- 1) 精度管理アンケート

ウイルス検査診断精度管理実施経過

- ・対象:地方衛生研究所協議会加盟機関
- ・参加形態:任意

7~10月

- 1) 精度管理実施要領
- 2) 精度管理実施手順(プレート法)
- 3) 標準検査法
- 4) 精度管理データ記入ファイル

10月下旬:配布資料作成

11月上旬:試料配布

11~12月上旬:試料測定・データ還元

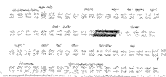
12月中旬からデータ解析開始

標準曲線作成試料および配布試料の配列

挿入配列

NoVG1

CGTTTGATCGGGTTCCATGATCTGAGCATGTGGACAGGGGATCGCGATCTCTGCCCCATTATG  
TAAATGATGATGGGCTTAAGGACCCGCCCAACAGATGATGGACACAGTGGTCCGCGCCGCGC  
TGGTACAGAGGCAACACACAGCTGACGCTATTGCTATGGATCCAGTATGGTGTCTGCTACGGC  
AGTTGCCACTGCTGGTCAAGTAAATGATGATGACCCCTGGATTATGAGTAATTTTGTTCAAGCAC  
CCAGAGGAGTTTTACATTCACCCATACACACCCCTGGTATTTGTTTGGATTCAATTA  
GGACCTCAATTAACCCCTTTTGTCTCATTTAGACAAATGACAAATGGCTGGGTTG



NoVGII

CAGGAAGCTGTTTTCAGGTGATGAGGTTCTCAGATCTAAGCACATGGGAGGGCGATCGCAATC  
TGGCTCCAGTTTTGTGAATGAAGATGGGCTCGAATGACGCTGCTCCATCTAATGATGTCGG  
CCGGCCTCGCCAGAGATCAACAATGAGGCAATGGCCCTAGACCCAGTGGCGGGTGGAGCGAT  
AGGAGACCCCTGCTGCTGGCAGAAATGATATTGATCCCTGATATGATATATTGTTGGAAAG  
CACCTGGTGGATTTACAGTGTCCCTAGGAATCCCTGGTGAAGTCTCTTAATTTGGAA  
TTGGCCAGAAATAACCCCTATTGTCCTACTGCTGAGATGACAAATGGCTGACGAGTGG



プラスミド

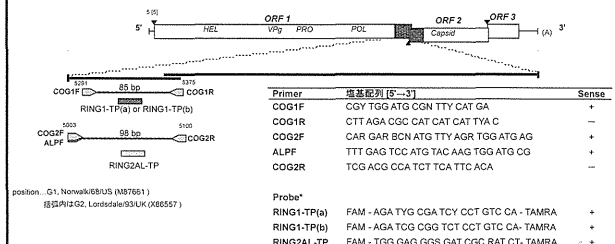
NoV検査の標準物質として全国地方衛生研究所に配布  
NoV遺伝子挿入プラスミドを配布試料として使用  
増幅効率:ほぼ100%

NoVリアルタイムPCR検査法

検査方法:実施要領標準検査法

配布された検体をリアルタイムPCR法により3重測定し、  
定量結果(コピー数)、Ct値などを報告する。

J Clin Microbiol. 2003 Apr;41(4):1548-57.



H26年度 NoV検査 精度管理解析結果

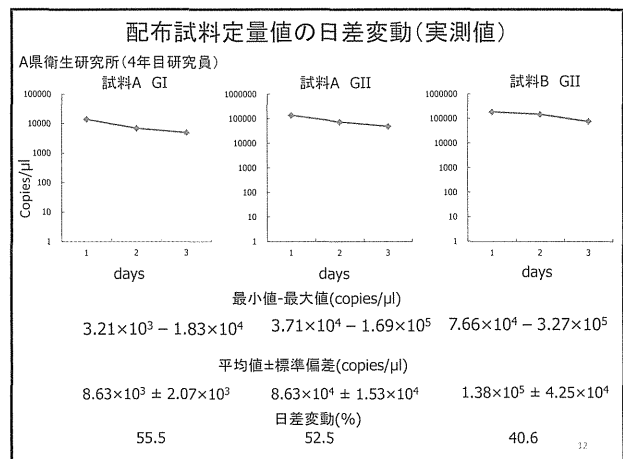
- 精度管理応募・実施機関
- 参加希望機関 66機関
  - 参加機関 60機関 (参加希望後辞退: 1機関)
  - 参加辞退機関 2機関 (A県、A市)
  - 精度管理参加およびデータ解析機関数: 59機関 (都道府県37 政令指定都市 8 中核市11 特別区3)

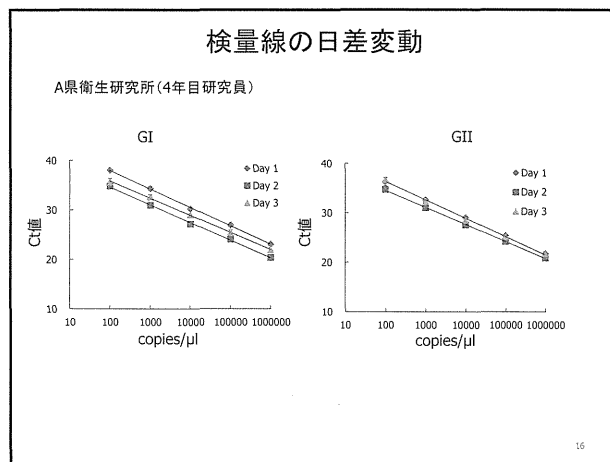
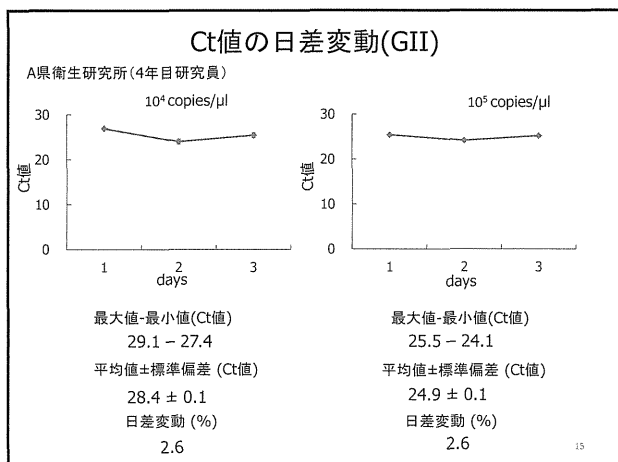
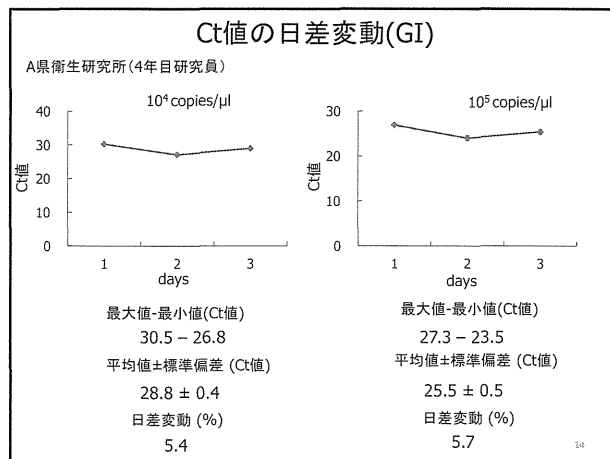
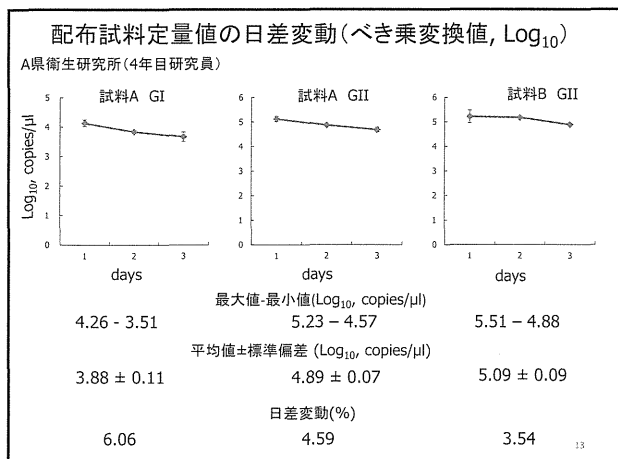
ブロック別参加機関

|           |         |
|-----------|---------|
| 北海道・東北・新潟 | 10/12機関 |
| 関東甲信静     | 19/23機関 |
| 東海・北陸     | 7/8機関   |
| 近畿        | 10/14機関 |
| 中国・四国     | 8/10機関  |
| 九州        | 5/12機関  |

- 配布試料
- 試料A (NoV GI NoV GII混合試料)  
NoV GI (理論値:  $2.5 \times 10^3$  copies/ $\mu$ l)  
NoV GII (理論値:  $2.5 \times 10^4$  copies/ $\mu$ l)
  - 試料B (NoV GIIのみ)  
NoV GII (理論値:  $7.5 \times 10^4$  copies/ $\mu$ l)

- 予備試験
- 配布試料の日差変動
  - 検量線の日差変動





## H26年度 ウイルス検査精度管理結果

- ### ウイルス検査精度管理実施方法
- ・配布試料: NoV cDNAあるいはNoV組み換えプラスミドDNA
  - ・方法: 精度管理実施要領・精度管理実施手順に準じる。  
遺伝子定量標準曲線作成と配布試料測定(3重測定)
  - ・取得データ  
1)配布試料定量値 2)各反応系のCt値 3)標準曲線図  
4)標準曲線の相関係数 4)使用試薬 5)測定機器 6)その他



各機関の試験系のバリエーション

| 総量(μl) | 試料添加量 | 機関数 |
|--------|-------|-----|
| 20     | 1     | 1   |
|        | 1.5   | 1   |
|        | 2     | 30  |
|        | 5     | 2   |
| 25     | 2     | 1   |
|        | 2.5   | 11  |
|        | 5     | 5   |
| 27,778 | 2,778 | 1   |
| 35     | 4     | 1   |
| 50     | 2     | 1   |
|        | 5     | 5   |

↓

各定量値をcopies/μlに補正

使用測定機器

|                                                        | 機関数 |
|--------------------------------------------------------|-----|
| 7500Fast (Applied Biosystems®)                         | 16  |
| 7500 (Applied Biosystems®)                             | 20  |
| 7900HT Fast (Applied Biosystems®)                      | 9   |
| StepOne Plus (Applied Biosystems®)                     | 4   |
| 7300 (Applied Biosystems®)                             | 4   |
| 7000 (Applied Biosystems®)                             | 2   |
| LightCycler® 96 システム (Roche®)                          | 1   |
| LightCycler® 480システム (Roche®)                          | 1   |
| ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems®)     | 1   |
| CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad®) | 1   |

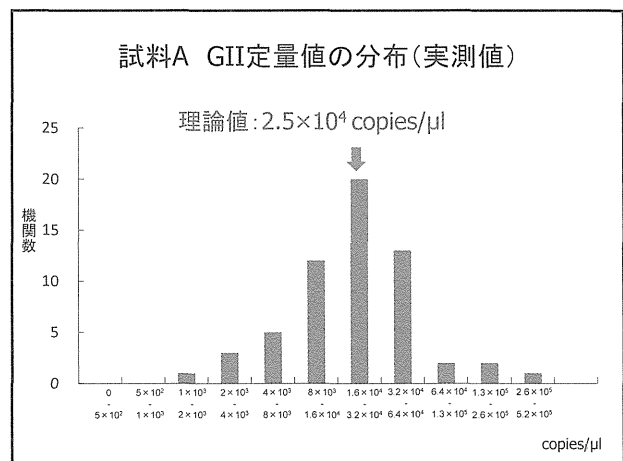
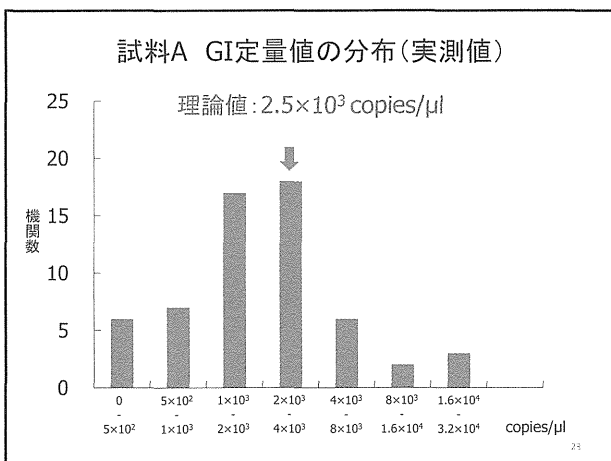
使用試薬

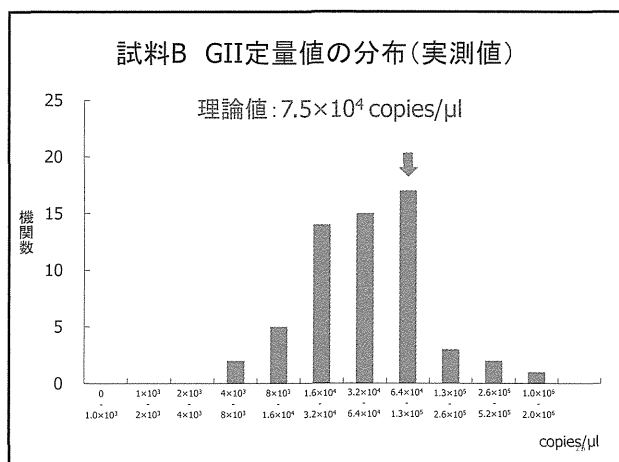
| 試薬名                                                          | 使用機関数 |
|--------------------------------------------------------------|-------|
| TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems®)        | 45    |
| TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems®)        | 2     |
| TaqMan Universal Master Mix II (Applied Biosystems®)         | 1     |
| Premix Ex Taq (Perfect Real Time or Probe qPCR) (TakaraBio®) | 3     |
| QuantiTect Probe PCR Kit (QIAGEN®)                           | 2     |
| EagleTaq Master Mix with ROX (Roche®)                        | 1     |
| FastStart Universal Probe Master (Rox) (Roche®)              | 1     |
| FastStart Essential DNA Probes Master (Roche®)               | 1     |
| Realtime PCR Master Mix (TOYOBO®)                            | 1     |
| THUNDERBIRD Probe qPCR Mix (TOYOBO®)                         | 1     |

実測値統計解析結果

一般的には、

- データ分布が正規分布か否か？
- 精密度の測定誤差許容限界(±CV%)  
= 生理的変動SD / 生理的平均変動幅 × (1/2) × 100



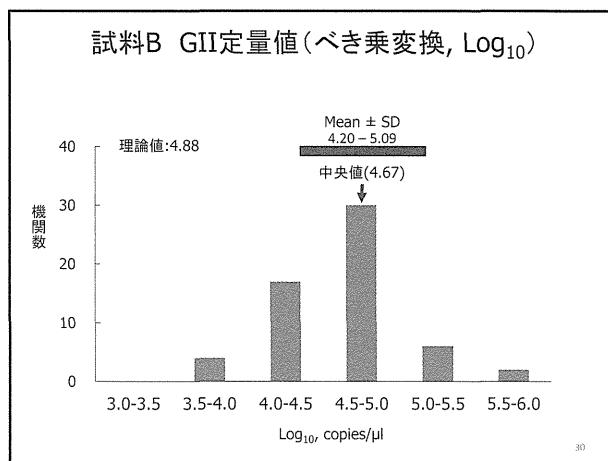
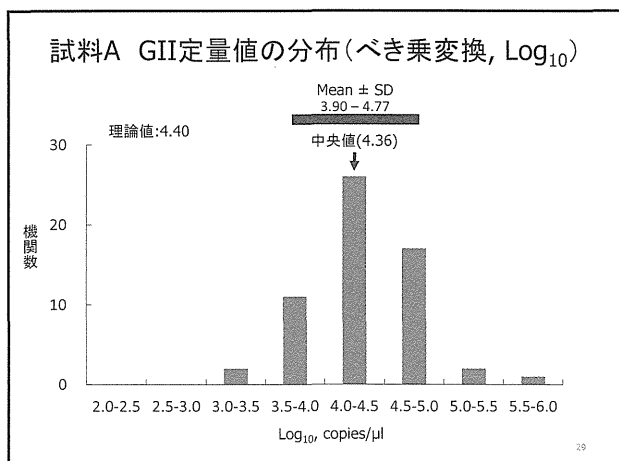
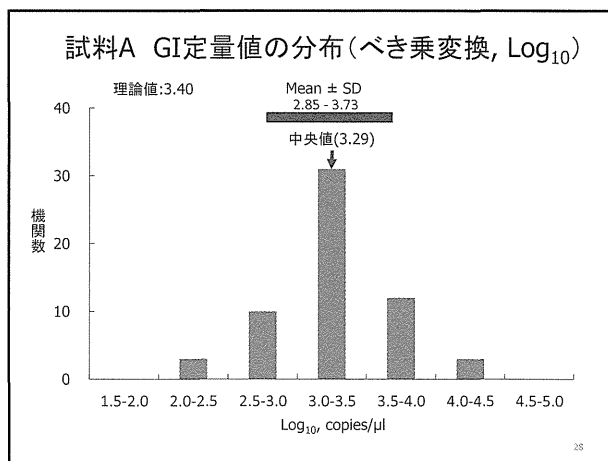


### データ解析結果のまとめ(実測値)

|          | 試料A<br>GI                             | 試料A<br>GII                            | 試料B<br>GII                            |
|----------|---------------------------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 理論値      | $2.5 \times 10^3$ copies/ $\mu$ l     | $2.5 \times 10^4$ copies/ $\mu$ l     | $7.5 \times 10^4$ copies/ $\mu$ l     |
| 平均値      | $3.35 \times 10^3$                    | $3.74 \times 10^4$                    | $7.82 \times 10^4$                    |
| 中央値      | $1.86 \times 10^3$                    | $2.27 \times 10^4$                    | $4.68 \times 10^4$                    |
| 最小値-最大値  | $2.53 \times 10^2 - 3.06 \times 10^4$ | $1.38 \times 10^3 - 4.32 \times 10^5$ | $5.61 \times 10^3 - 8.43 \times 10^5$ |
| 最小/最大    | 121.1                                 | 312.8                                 | 150.2                                 |
| 標準偏差     | $5.00 \times 10^3$                    | $6.36 \times 10^4$                    | $1.24 \times 10^5$                    |
| 標準誤差     | $6.51 \times 10^2$                    | $8.28 \times 10^3$                    | $1.61 \times 10^4$                    |
| 95%信頼区間  | $2.28 \times 10^3 - 4.63 \times 10^3$ | $2.12 \times 10^4 - 5.37 \times 10^4$ | $4.66 \times 10^4 - 1.10 \times 10^5$ |
| 95%信頼区間外 | 40機関                                  | 36機関                                  | 37機関                                  |
| 99%信頼区間  | $1.67 \times 10^3 - 5.03 \times 10^3$ | $1.61 \times 10^4 - 5.88 \times 10^4$ | $3.66 \times 10^4 - 1.20 \times 10^5$ |
| 99%信頼区間外 | 33機関                                  | 28機関                                  | 31機関                                  |

### べき乗変換統計解析結果

27



| べき乗変換後の統計解析値(Log <sub>10</sub> ) |                     |                     |                     |
|----------------------------------|---------------------|---------------------|---------------------|
|                                  | 試料A<br>GI           | 試料A<br>GII          | 試料B<br>GII          |
| 理論値                              | 3.40                | 4.40                | 4.88                |
| 平均値                              | 3.29                | 4.32                | 4.67                |
| 中央値                              | 3.29                | 4.36                | 4.67                |
| 標準偏差                             | 0.44                | 0.46                | 0.42                |
| 最小/最大<br>(最小-最大)                 | 1.87<br>(2.40-4.49) | 1.79<br>(3.16-5.64) | 1.58<br>(3.75-5.93) |
| 平均値±標準偏差                         | 2.85 - 3.73         | 3.90 - 4.77         | 4.20 - 5.09         |
| 平均値+1SD以上の機関数                    | 8                   | 7                   | 6                   |
| 平均値-1SD以下の機関数                    | 6                   | 8                   | 5                   |

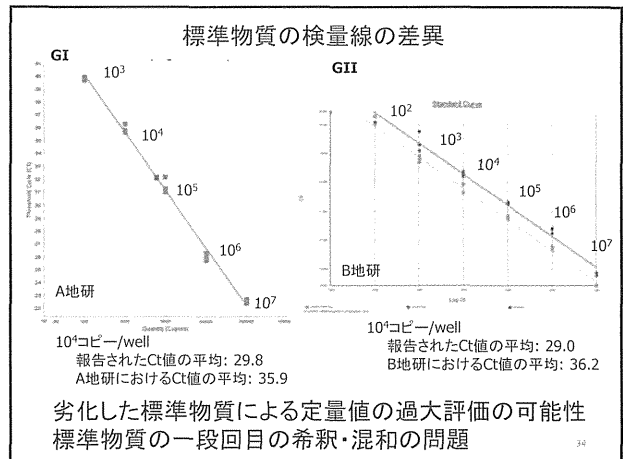
95%信頼区間外あるいは平均値±1SD外の機関(実測値)

3データ: 18都道府県、8政令指定都市・特別区、5中核市  
2データ: 3都道府県、1政令指定都市特別区、1中核市  
1データ: 8都道府県、2政令指定都市・特別区

平均値 ± 標準偏差外の機関(べき乗変換値)

3データ: 4都道府県、2政令指定都市・特別区、4中核市  
2データ: 2都道府県、1政令指定都市・特別区  
1データ: 3都道府県、4政令指定都市・特別区、1中核市

配布試料定量値の過大評価に関する考察



配布試料定量値の過小評価に関する考察

- ・配布試料の混和の問題?
- ・器具(ピペットの精度)の問題?
- ・測定機器のメンテナンスの問題?
- ・配布試料の劣化?

その他

陰性となるはずの試料BのGIにおいて、  
実測値(Ct値:44.8473と44.3129)を報告(A県)

陰性となるはずのサンプル2のGIIにおいて、実測値  
(Ct値: 42.11)を報告(B県)

試験前の内部事前調整が不十分?

各機関からの意見など(1/3)

- ① 実施要領では「試料Aおよび試料B」、実際の試料には「キャップに「1」、胴部分に「A」、『キャップに「2」、胴部分に「B」と記載されており、報告用エクセルファイルでは「サンプル1、サンプル2」となっていたので、混乱を避けるためにも表記は統一するべきだと思います。(A県)
- ② GIの3とGIIの2,3については、最小濃度のコントロールDNA(10コピー)が検出されませんでした。他の6点で検量線を描き、定量しました。(A県)
- ③ 今回のサンプルのコピー数の算出に用いた検量線はコピー数 $10^1 \sim 10^7$ までのすべてのPCのCt値を用いた。コピー数 $10^1$ 、 $10^2$ のPCはコピー数 $10^3$ 以上のPCと比べてばらつきが大きくなった。そのため、コピー数 $10^3$ 以上の濃度のPCを用いて検量線を描くことで、より正確に検体の定量ができると考えられる。(A県)
- ④ 当施設のSOPでは、検体を1ウエルあたり2.778 $\mu$ L加えることになっておりますので、配付試料の量が足りず、試料AのGIは2ウエルで行いました。(A市)
- ⑤ 質問:ノロウイルスの測定に「TaqMan Universal PCR Master Mix II」を使用することは可能でしょうか。(A市)
- ⑥ 各濃度の平均をもって検量線を作成しましたので、相関係数は1つになります。(A県)

37

各機関からの意見など(2/3)

- ⑦ 職員数名で数回実施しましたが、G2よりもG1の方が感度も精度も悪いのが気になりました。また、100コピー以下は検出できていない感度というのにも気になります。陽性コントロールの希釈はDDWを使用しております。アドバイス等ありましたら、ぜひご教授承りたいと存じます。よろしくお願いたします。(A市)
- ⑧ 当市では、便検体の場合25 $\mu$ 系で検査を行っておりますが、今回は別添資料2表1にならって実施しました。(理由:試料の凍結融解の繰り返しを避けるために、受取時3等分した後-80 $^{\circ}$ C保存をすると、1回当り15 $\mu$ L使用する25 $\mu$ 系では試料が不足する不安があったため)検査は、ノロウイルス検査を行う職員3名が、1回ずつ実施しました。(A市)
- ⑨ GIIについては相関係数を0.9以上にするため、いくつかのウエルをomitした。10 $^7$ のコントロールについては、ルーチンで使用していないため添加しなかった。(A区)
- ⑩ サンプル量について  
・今回、実施要領によると、サンプルが100 $\mu$ Lずつ送付されるとのことだったので、当所では当該検査法によるノロウイルスの検査を担当している2名がそれぞれ実施してみました。  
・当方の検査系では、1回・1サンプルあたり5 $\mu$ L $\times$ 3ウエル $\times$ 2(GIとGII)、すなわち30 $\mu$ Lを使用する。ところが、2人目が実施しようとしたところ、サンプルAは30 $\mu$ Lをなんとか採取することができたが、サンプルBについては、30 $\mu$ Lを採取することはできなかった。つまり、送付されたサンプルは、当方において封封した時点で100 $\mu$ Lは入っていないということになる。以上のことから、今回は、最初に実施した担当者の結果を入力した。(A市)

18

各機関からの意見など(3/3)

- ⑪ 検量線作成時、G1の10 $^7$ 及びG2の10 $^5$ を棄却した。(R $^2$  0.99以上確保のため)(A市)
- ⑫ 精度管理試験結果入力ファイルおよび検量線の写しを添付ファイルで送ります。なお当所では通常ノロウイルスの定量は生かき(反応容量5 $\mu$ L総量50 $\mu$ Lの系)のみで実施しております。糞便検査は定量せず、反応容量2.5 $\mu$ L総量25 $\mu$ Lの系として実施しております。(A区)
- ⑬ 5 $\mu$ L測定のため2回測定できませんでした。G1の相関係数が0.98ですが、報告いたします。通常は定量検査は実施していないため、相関係数等の処理までは行っていません。そのため、個々の相関係数の出し方がわからず、エクセルの統計にて算出した数値を記入しました。(A区)
- ⑭ 反応系の試料添加量は2 $\mu$ Lですが、陽性コントロールを1 $\mu$ Lあたりで希釈しているため、コピー数は1 $\mu$ Lあたりで計算しました。(A市)

39

各機関からの意見など(抜粋)

- ① 職員数名で数回実施しましたが、G2よりもG1の方が感度も精度も悪いのが気になりました。また、100コピー以下は検出できていない感度というのにも気になります。陽性コントロールの希釈はDDWを使用しております。アドバイス等ありましたら、ぜひご教授承りたいと存じます。よろしくお願いたします。(A市)。
- ② GIIについては相関係数を0.9以上にするため、いくつかのウエルをomitした。10 $^7$ のコントロールについては、ルーチンで使用していないため添加しなかった(A区)。
- ③ 検量線作成時、G1の10 $^7$ 及びG2の10 $^5$ を棄却した。(R $^2$ =0.99以上確保のため)(A市)。
- ④ 反応系の試料添加量は2 $\mu$ Lですが、陽性コントロールを1 $\mu$ Lあたりで希釈しているため、コピー数は1 $\mu$ Lあたりで計算しました(A市)。

40

検 討 課 題

1. 各機関への結果還元について
2. 配布試料定量値の過小評価の原因について(各機関へアンケート調査?)
3. 報告書の記載について

41

まとめ(ウイルス検査精度管理)

1. リアルタイムPCR法によるノロウイルス遺伝子定量に関する精度管理を行った。  
(取得データ数:3データ 試料A:2データ、試料B:1データ)
2. すべての参加機関(59機関)のデータ解析が可能であった。
3. 各定量データをべき乗変換後、平均値 $\pm$ 1SDを基準とした判定を行った。その結果、20機関(33.9%)の定量値の一部あるいはすべてが上記基準値範囲外であった。
4. 基準値外の結果が得られた理由として、検量線用の標準物質の劣化、ピペッ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。

42