

④PCR、シーケンスに関する品質管理

特の実施していない。

実施している(具体的な事項についてお答えください。機器、コントロール等)。

( )

⑤SOP (標準作業手順書) の有無

独自に作成している。  特に作成していない。

⑥検査手順を記載したものの有無 (検査ごとの実験ノート等、方法・結果等記載したもの)

作成している。  特に作成していない。

10. 必要とされる研修について

エンテロウイルス検査業務の中で必要とされる研修内容についてご意見をお願いします。

( )

11. エンテロファレンスセンターへの要望、病いは日常の検査で困っていることを自由に

記入願います。

( )

平成 26 年 9 月 25 日

都道府県および政令市特別区衛生研究所長 殿

「エンテロウイルス検査に関わるワークショップ」についてのお知らせ

初秋の候、ますます御健勝のこととお慶び申し上げます。また、日頃からレファレンス活動に関して大変お世話になっております。

このたびは、H25 年度実施した、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ラボネットワーク強化に関する研究」による、エンテロウイルス検査のアンケート調査にご協力いただき、誠にありがとうございました。

本アンケート結果を踏まえ、「エンテロウイルス検査精度管理に関わるワークショップ」を別紙のとおり企画いたしました。参加希望がありましたら別紙②の研修参加登録様式に記入後 10 月 10 日までに各ブロックのエンテロウイルスレファレンスセンターまでメールにてご登録いただくようお願い申し上げます。

今後ともよろしくお願ひ申し上げます。

研究実施者(本件照会先)  
 国立感染症研究所ウイルス第 2 部 吉田 弘  
 hvchida@nih.go.jp  
 tel)042-848-7033  
 研究代表者  
 国立感染症研究所レファレンス委員長 宮崎義雄

エンテロウイルスレファレンスセンター(地域ブロック)  
 福島県衛生研究所(北海道・東北・新潟)  
 神奈川県衛生研究所(関東・甲信・静岡)  
 愛知県衛生研究所(東海・北陸)  
 神戸市環境保健研究所(近畿)  
 愛媛県立衛生環境研究所(中国・四国)  
 福岡県保健環境研究所(九州)

スケジュール (案)

	1 日目(12 月 3 日)	2 日目(12 月 4 日)	3 日目(12 月 5 日)
9:00		中和試験	マイコプラズマ否定試験続き
10:00			中和試験続き
11:00		昼食	昼食
12:00			昼食
13:00	開会式(自己紹介等)	マイコプラズマ否定試験	各種エンテロウイルス CPE の観察及びウイルス感受性試験の細胞観察 開校式
14:00	培地作成		
15:00	細胞の鑑別、細胞のカウント		
16:00	ウイルス感受性試験		
17:00			
18:00			

別紙

企画タイトル: エンテロウイルス検査に関する精度管理研究の検討 (案)

目的: エンテロウイルス検査の精度管理体制確立に向けた研修の企画運営について参加者間で検討する。特に、内部精度管理のための①マイコプラズマ否定試験、②細胞感受性試験、の裏習を通じ、標準作業手順書(案)を参加者間で共同作成する。

期待される成果:

参加者とレファレンスセンターで、標準作業手順書、マニュアルを共同作成することで、今後の精度管理導入、研修会企画に資する。

時期: 2014 年 12 月 3 日-12 月 5 日の 2 泊 3 日

募集人数: 6 名(各ブロック 1 名を想定)

参加資格:

2014 年度ウイルス検査に配属された新人、かつ標準作業手順書等を共同して作成していただける方

参加費:

厚生労働科学研究費より規定に基づき、旅費を支給いたします。

応募方法:

2014 年 10 月 10 日までに別紙②の応募フォーム(A4 一枚以内)に記入し各ブロックのレファレンスセンターへメールで登録ください。

注意: 応募人数多数の場合は、千原に限りがあるため、研究実施者への一任をお願いいたします。なお、決定した参加者については 10 月 30 日までに参加者本人および各レファレンスセンターへ連絡いたします。

資料 3

1. 人員について

①貴研究所でウイルス検査に従事する職員数

	3名以上	2名	1名	不在	その他
計	57	17	1		回答辞退(3)

②貴研究所でエンテロウイルス検査に従事する職員数について、お答えください。

	3名以上	2名	1名	不在	その他
計(78)	33	22	9	11	1.5人が3機関

2. 検体数について

貴研究所で年間搬入される大まかな検体数(エンテロウイルスに関連する)について、お答えください。

	検体数					検査を行っていない
	2000以上	2000-1000	1000-500	500-100	100以下	
計(78)	1	3	7	32	24	11

3. 検体搬入について

①検体搬入状況について伺います。

計	毎週 隔週 毎月 随時 毎日 その他				
	30	5	5	18	3

②検体搬入までの検体保管方法について伺います(複数回答あり)

計	冷蔵	冷凍	その他
	40	31	

4. 検査材料について

①無菌性髄膜炎の場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	その他
計	68	43	54	<ul style="list-style-type: none"> <li>鼻腔ぬぐい液</li> <li>鼻汁</li> <li>鼻汁、尿</li> <li>記載なし(1)</li> <li>この数年のあいだ経験がない</li> <li>上記3つを材料としているが、最近無菌性髄膜炎の検体は搬入されていない</li> </ul>

②ヘルパンギーナ、手足口病の場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	水疱	その他
計	8	24	66	12	<ul style="list-style-type: none"> <li>鼻腔ぬぐい液</li> <li>鼻汁</li> <li>皮膚病巣</li> <li>具体的に依頼なし</li> <li>検体が搬入されたことがありません</li> <li>うがい液、鼻汁</li> </ul>

③ポリオの場合

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	当所では数年無し
計	8	26	17	40

④その他エンテロウイルス感染が疑われる場合(発疹、上気道炎、下気道炎、脳炎/脳症など)

	髄液	糞便	咽頭ぬぐい液	その他
計	44	41	65	<ul style="list-style-type: none"> <li>死亡例において剖検があった場合、関連臓器組織片</li> <li>鼻腔ぬぐい液</li> <li>うがい液、鼻汁、血清</li> <li>血液(2か所)</li> <li>具体的に依頼なし</li> <li>検体が搬入されたことがありません</li> <li>鼻汁</li> <li>血清(2か所)</li> <li>気管吸引液、血清、直腸ぬぐい液、尿、鼻汁</li> </ul>

5. ウイルス分離について

①分離に用いている細胞について伺います(複数回答可)

FL	Vero	RD-18s	RD-A	RD-2	HEp-2	LLC-MK2	Caco2	VeroE6	HeLa	A549	RD-5	MRC-5	その他
計	12	44	48	20	45	9	18	19	10	6	4	2	HEF L20B, HeLa229 Vero9013(2か所) L20B PCRを実施し、ポリオウイルスや 副症からエンテロウイルスが検 出された場合に実施 RD-Aについては検討中 HEA1 KB HEF, GMK, LLC-MK2, HMV-II

\*検査に分離を行っていないところは無回答

④分離に用いる培地について伺います

イーグルMEM	ダルベッコMEM	種類で使い分け	
計	44	11	11
<ul style="list-style-type: none"> <li>DMEM: RD-AとVeroE6, イーグルMEM: HEp-2とMRC-5</li> <li>イーグルMEM: Vero, RD-18S, DMEM: VeroE6</li> <li>イーグルMEM: FLとVero, DMEM: RD-18S</li> <li>イーグルMEM: FLとRD-18S, DMEM: VeroE6</li> <li>イーグルMEM: Vero, DMEM: RD18s</li> <li>DMEM: VeroとRD-18s, イーグルMEM: HEp-2</li> <li>イーグルMEM: HEp-2とHeLa, DMEM: RD-18S</li> <li>DMEM: RD-18S, イーグルMEM: その他の細胞(2か所)</li> <li>DMEM: RD-18s, VeroE6, A549, イーグルMEM: HEp-2</li> <li>RD-A, HEp-2, RD, HeLa: イーグルMEM, VeroE6: DMEM</li> </ul>			

②分離に用いる細胞の継代数(凍結保存している細胞との入れ替え頻度)について伺います。

15代	15-30代	適宜切り替え	年に1度	その他
計	1	14	41	5
<ul style="list-style-type: none"> <li>100代程度</li> <li>MRC-5→10代で切り替えている, その他の細胞→適宜切り替えている</li> <li>40代前後</li> </ul>				

③分離の際の培養温度について伺います

33度	34度	35度	36度	37度	その他
計	8	20	13	11	13
<ul style="list-style-type: none"> <li>33度(HRVs)及び37度(その他)</li> <li>35.5度</li> <li>FL→34度, その他の細胞→37度</li> </ul>					

⑤培地調製について伺います

液体培地を 購入	粉末培地を 購入し、調 整している	その他	
計	19	49	
<ul style="list-style-type: none"> <li>基本的に粉末培地だが、MRC-5のみ液体培地を購入</li> <li>HEFのみ粉末</li> <li>液体培地を使用していたが、現在は粉末培地を使用している</li> <li>Caco2細胞のみ市販の液体培地を使用</li> </ul>			

⑥ウイルス分離に用いる資材(プレート、ガラスチューブなど)について伺います

チューブ法により分離	24穴プレートを使用	48穴プレートを使用	96穴プレートを使用	その他
計	0	42	14	10

・6穴プレートを使用する場合もあり  
・スクリーニングは96穴、分離ウイルスを増やす際は24穴使用

⑦ポリオウイルス分離に用いるL20B細胞について伺います

ポリオウイルスの有無を調べるため使用している	ストックしているが使用していない	保有していない	
計	13	24	28

⑧乳のみマウスの使用について伺います

ルーチン検査で使用	時折実施	乳のみマウスは用いていない	
計	5	7	51

6. ウイルス同定について(複数回答可)

分離株、臨床材料を用いた場合の同定法について伺います

抗血清による中和法のみ実施	塩基配列による同定の組み合わせ	乳のみマウス中和法と強で分離した株の塩基配列による同定の組み合わせ	エンテロウイルス特異的リアルタイムPCRにてスクリーニングし、塩基配列により同定	その他	
計	1	10	51	6	5

・エンテロウイルスのコンベンショナルRT-PCR法にてスクリーニングのみ実施している(型別不明(NT)で報告)  
・CF+中和+シーケン

7. 塩基配列による同定について

①塩基配列による同定法について伺います(複数回答可)

ODDEHOP法 anPCR法	VP4-VP2部分領域をVP1領域を増幅するRT-PCR	VP1領域を増幅するRT-PCR	その他	②ODDEHOP法以外にVP1領域を増幅するプライマーをお使いの場合、プライマーの名称(例040,012,011など)について以下列挙ください。
計	38	48	20	1*

\*シーケンサーを保有していないためPCRのみ

・187, 188, 189, 011(8か所)  
・011,012, 187, 188, 040, 222(1か所)  
・187, 188, 189, 222(1か所)  
・012,040/011, 187, 188, 189/222(3か所)  
・040, 012, 011(2か所)  
・480/482(1か所)  
・距離なし(4か所)  
・187, 188, 189, 222, 011(2か所)  
・187, 188, 189, 012, 040, 011, 480, 482, 222(1か所)  
・040, 012, 011(1か所)  
・040, 012, 187, 188, 189, 011(2か所)  
・488, 487, 486, 489, 480, 482, 71/2757F, 71/2780R1, 71/2348, 71/3998, UG1, UG11, P18-VP18, P18-VP1A, P28-VP18, P28-VP1A, P35-VP18, P35-VP1A(1か所)  
・011, 012, 040, 187, 188, 189, 222, 480, 481, 482, 483, 484(1か所)  
・188, 011(1か所)  
・012, 040, 011, 187, 188, 189, 222, 282, 488~487 (1か所)

8. 塩基配列解析法について

①得られた塩基配列を用いてどのように血清型を同定するか伺います(複数回答可)

BLAST検索でオランダRIVM標準株との相同性上位に現れたMのエンテロものを血清型として報告して	ウイリスライビ配列で75%以上一	致)に基づいて同定	している	している
計	58	18	14	

・VP4-VP2部分領域について標準株との相同性に基づき同定  
・FASTA検索で上位に現れたものを血清型として報告している。  
The European Bioinformatics Instituteのサービスを利用  
・標準株を使用した系統樹解析による分類

②塩基配列解析に用いるソフトウェアについて伺います(複数回答可)

	DNASIS	MEGA	BioEdit	Genetyx	その他
計	4	35	3	14	
					Clustal X, SeqConv 外注しているため不明 Finch Sequencher(2か所) DNA Dynamo CEQ8000(BECKMAN COULTER) BioNumerics チュートリアルVer6.5 イン フォコム株式会社 ChromasPro

④PCR、シーケンズに  
関する品質管理

	特に実施していない	実施している(具体的な事項についてお答えください(機器、コントロール等))
計	42	26

・機器については、シーケンサーは、業者との保守点検契約により、年1回の定期点検を実施。PCRについては、点検等は行っていない。また、コントロールや試薬に関する品質管理は特に行っていない。

・コンタミネーションのチェック

- ・機器、コントロール
- ・検査ごとに1点ずつ陽性・陰性コントロールを置いている。
- ・定期的な保守点検(シーケンサー)
- ・PCR時 陽性・陰性コントロールを置いている。
- ・検査結果による保守点検を実施
- ・PCR実施時は陰性・陽性コントロールを置いている
- ・PCR検査等において使用する試薬等の使用期限の確認。リアルタイムPCRについて試薬キットによるキャリブレーションを年2回実施

・PCRに關して内在コントロールを置くようになったところである。

・PCRでは、互形別に陽性対照、陰性対照を設置している。

- ・陽性および陰性コントロールを併せて実施する
- ・サーマルサイクラーの定期点検、実施時の陽性、陰性コントロールの検出
- ・サーマルサイクラー、DNAシーケンサーについては年1回の保守点検を行っている
- ・PCRについては、ポジティブコントロールを使用
- ・検体の保守点検、検体毎にコントロールを同時測定
- ・検査毎にコントロールを置いている。機器については定期的に洗浄等をしている
- ・定期的な点検及びメンテナンス
- ・機器の保守点検
- ・機器毎の定期点検、陽性及び陰性コントロールの同時検査
- ・シーケンサーのみ実施(年1回の業者による保守点検)
- ・GLPに基づき管理している。(例:機器毎の日常及び定期点検等)
- ・シーケンサーについては、年1回の定期点検を実施
- ・保守点検
- ・検体
- ・シーケンサーのみ行っている(年1回、メーカー標準品を用いたキャリブレーション)

9. 品質管理について

③ウイルス分離・同定検査に関する品質管理

	特に実施していない	実施している (具体的な事項についてお答えください。細胞、試薬等)
計	57	10

具休例

- ・コンタミネーションのチェック
- ・細胞、培地添加用牛胎児血清、対照ウイルス標準株
- ・細胞台櫃の作成
- ・培養細胞は15代継代後、廃棄している
- ・ロット毎に非感染細胞(陰性対照)を置いている。
- ・ウイルス分離の際に、同一プレート上に陰性コントロールをおき併せて観察する
- ・保存細胞を使用する際には必ずマイコプラズマのチェックを行っている。
- ・温度・湿度・期間の管理
- ・細胞の維持継代は定期的に行っている。
- ・GLPに基づき管理している。(例:試薬及び試液管理簿による使用期限等の管理、ウイルス分離台櫃による保管状況の確認)

⑤SOP(標準作業手順書)の有無

	独自に作成している	特に作成していない
計	18	52

⑥検査手順を記載したものの有無(検査ごとの実験ノート等、方法・結果等記載したもの)

	独自に作成している	特に作成していない
計	60	3

10. 研修に関する要望(原文のまま)

- POR, シークエンス, ウイルス分離+中和法
- 細胞培養における基本的操作法と、当センターはシーケンサーを保有しておりますが、その使用法や解析方法の研修があれば幸いです。また、エンテロウイルス検査法として、きちんと研修を受けた経験もないので、せめて検査法全般(基本的操作も含め)に対するスタンダードマニュアルがあれば、と常々感じております。現在はかなり以前の担当者が独自に作成したマニュアルをもとに検査を実施しているのが現状です。
- 抗血清による中和法による分離株特定やヒト血清中抗体検出法など、エンテロウイルスの血清学的検査法
- 塩基配列からのウイルス同定の際の注意点、解析方法等
- 細胞の鑑別方法、それぞれのウイルスに特徴的なOPEの形態と判定について
- ウイルス分離及び中和法による同定
- いろいろな細胞を使用した、ウイルス分離・同定をしてほしい。
- 細胞培養法、中和血清による同定法
- OD/EOP法
- ウイルス分離株の中和による同定法
- ポリオウイルスの野生株とワクチン株を鑑別するための手法の習得
- 検査法(細胞培養、POR等)に関する技術的研修
- ウイルス分離の技術研修を実施していただきたい。
- 古典的な中和試験による同定法
- 中和法と塩基配列による同定結果の解釈について
- 細胞培養、OPEの確認、同定方法(中和試験、POR、シーケンス、解析など)
- 中和法の経験者がいないので、中和法の実習をして欲しい

11. エンテロレファレンスセンターへの要望、問い合わせは日常の検査で困っていることを自由に記入願います(以下原文のまま)。

- 当所に異動してくる職員の間は、ウイルス検査等の知識や経験、技術を持たないこと、9~6年で異動をしようから、落女等(例えば、エンテロウイルスの場合のボリオリ)については、全く経験者がいない状況に陥る可能性があります。また、通常ルーチンで行っている検査と比較して高度な内容が要求される場合、異動で解決困難なこともあると聞かれます。そのような状況があったとき、検査技術等で異動にご相談させていただいたり、場合によっては職員の新卒を受け入れていただく等が可能であれば、大変心強く思います。
- 当センターはシーケンサーを保有しておりませんが、ウイルス型別同定を中和試験に頼っており、細胞の維持と抗血清の入手がネックになっております。ですので、エンテロウイルス培養においてよく用いられる細胞の分々の提供、あるいはその案内があること、大変ありがたいです。また、中和試験用抗血清につきましても同様に思います。こちらも当センターの事情というところで大変申し訳ないのですが、入家異動が頻発ということもあり、レファレンスセンターや提携研にどういった抗血清を分与していただけるのか分からないのが現状です。例えば、ヒトレコウイルスへの抗血清なども分与いただけるのでしょうかや基本的な異動になり、申し訳ありません。
- VP4領域とVP1領域の塩基配列による同定を行い、それぞれ異なるエンテロウイルスと同定された場合の評価、異動感染と考えるべきかVP1領域の結果のみを採用すべきか。
- 各地常務では、どのようにエンテロウイルスの同定を行っているのか教えていただきたい。
- 中和抗血清の需要にわたり積極的に供給されるかが不安である。
- 分離培養と遺伝子検査の組み合わせについて
- エンテロウイルスの同定は、ほとんど遺伝子検査で実施しており、一部を中和で実施している状況です。ウイルス分離同定はウイルスによっては難しいものもあり、苦労しています。ウイルス分離に関する情報を迅速にいただけたらと思います。

- 若い人が急増しているので分離、同定特に中和などの研修を実施していただけたらと大変ありがたいです。
- 中和反応、遺伝子解析の手順
- ウイルス分離、同定方法などの研修を数回毎にでも行っていただけたらと、職員が代わりした際など非常に助かる。
- Rhinovirusの検査意義および重要性について
- 新しい知見に関する研修の実施を希望します
- エンテロウイルスは型ごとに細胞感受性が異なるため、細胞操作、ウイルス分離同定作業を行うためには慣れが必要であると考えます。また、無菌性細胞培養や超微、病原については、エンテロウイルス以外の病原体が原因となることもあるため、差別診断する必要のある病原体(マンデラウイルスやヘルペスウイルス、日本腸炎ウイルスなど)の検査についても、研修が必要であると思えます。
- 現在、メンバーを理由に検査を実施していませんが、どのような過程があるのか一週り研修できる機会があればありがたいです
- ODEHOP法がよくわからないので研修していただきたいです。
- マニュアルに基づいたスタンダードな分離培養及び遺伝子検出法と検出率を上げるための工夫等について
- ODEHOP→POR法、系統樹解析の実習
- 塩基配列による同定法について、どの部位を解析するのがよいか、血清型同定についてなど研修の機会があればと思います
- 細胞培養法、ウイルス分離法、及び中和・塩基配列による同定法に関する基礎的研修
- 分離試験、中和検査、PCR法、遺伝子解析
- エンテロウイルスに限らず、分離培養に関する基礎的研修、如神
- シークエンス及び系統樹作成に関すること

- コクサッキーA群に感受性の高い細胞を分与して欲しい
- 当所は現在エンテロウイルス検査を実施していませんが、保菌所が行政検査が必要と判断した場合にウイルスのPOR検査・シーケンス検査の依頼がありますので、もしエンテロウイルスを検査してなくても研修参加が可能であれば参加したいです。
- エンテロウイルスと関係することではないですが、この病原体は、OO先生、といった感染研の担当者が一貫されたいたものがあるというのではと常々伺っています。
- 抗ポリオウイルス抗体価の低い職員へのPV検査要否に関する情報がほしい。
- 抗iPeV-3血清について、感染研で分与できるシステムを作ってください。
- 近隣県でどの様なウイルス型が分離・検出されているか相互に共有できると、同定がよりスムーズに行えるのではと思います。
- 手足口病、ヘルペスウィー、無菌性髄膜炎等について、感染発生動向調査病原体検査の検体がなかなか集まらず、地域におけるウイルスの流行状況の把握が難しいため、困っています。
- ここ数年で、シーケンスで型別ができないエンテロウイルスが検体分が出てきているので、的確な型別法をご教授願いたいです。VPA-VP2領域の参照特配列を調べたものも少しあるようでしたらいただけないでしょうか。
- 細胞に人事異動があり、検査技術の引継ぎがOKできるか不安である
- ODEHOP→POR法での感度が低い、型別不明になってしまう事例が多い。
- 分離ができなかった検体について、PCRでもVP1領域の増幅が困難です
- 当所では、臨床検体から抽出した遺伝子についてODEHOP法を用いています。本来、370bpを読めるどころ、300bp程度しか読めていません。370bp読むには、テクニクが必要であると聞かされたので、是非、御指導ください。
- 臨床検体からVP1遺伝子全長を抽出できる高感度PCR法が提供されるとありがたいです
- エンテロの血清型により、プライマーによって反応性の良いもの、悪いものがあるという、分る範囲でその情報提供して欲しい

資料 4-1 「エンテロウイルス検査精度管理に関わるワークショップ」

1. 場所

国立感染症研究所村山庁舎 6 号棟 6 階

2. 日程

2014 年 12 月 2 日 13 時より 12 月 5 日 15 時まで

3. 参加者

荒畑 沙織	静岡県環境衛生科学研究所
水村 綾乃	千葉県環境保健研究所
清水 耕平	横浜市衛生研究所
杉本 大地	奈良県保健研究センター
高橋 剣一	名古屋市衛生研究所
村田 遼海	北九州市環境科学研究所
辰己 智香	島根県保健環境科学研究所
古舘 大樹	札幌市衛生研究所

講師

濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
吉田 弘	国立感染症研究所

資料 4-2 「病原体検査標準作業書作成に関わる作業部会」(調会長との共同開催)

1. 場所:

東京都健康安全研究センター 6 階 6A 会議室

2. 日程:

2015 年 8 月 11 日午後-8 月 12 日終日

3. 参加者:

川上 千春	横浜市衛生研究所
長島 真美、千葉 隆司	東京都健康安全研究センター
加瀬 哲男 (11 日のみ)	大阪府立公衆衛生研究所
皆川 洋子、安井 善宏	愛知県衛生研究所
高橋 雅輝	岩手県環境保健センター
滝澤 剛則	富山県衛生研究所
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所

進行役: ウイルス二部 吉田主任研

オブザーバー:

インフルエンザ研究センター 渡邊室長、影山室長、  
感染研 脇田副所長  
厚生労働省 宮川室長



資料5

H26 年度分担研究にて作成した SOP 案

機械器具保守管理 SOP

DNA シーケンサー

リアルタイム PCR

冷凍庫

検体（病原体）取扱 SOP

試薬等管理 SOP

汎用

細胞用培地

培養細胞維持管理 SOP

細胞の継代

保存と再起培養

病原体検査 SOP

ポリオ分離

信頼性確保試験 SOP

マイコプラズマ試験













検体（病原体）取扱標準作業書

作成日：年月日

改定日：年月日

検査部門責任者

検査区分責任者

作成者

〇〇衛生研究所

標準作業書改定の履歴

区分名

記号

微生物検査区分 No. 〇〇〇〇〇

	作成日	事由	備考
1	年月日		新規

	改訂日	事由	備考
2	年月日		
3	年月日		
4	年月日		

1. 目的

この作業書は、微生物検査における検体の取扱いについて管理基準を定め、検査等の信頼性確保を図ることを目的とする。

2. 適用範囲

この作業書は、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第14条に基づく検査または試験（以下「感染症発生動向調査検査」）を行う検体に適用する。

3. 検体の定義

検査等に供する目的で採取された臨床検体、その他の検体及び病原体をいう。

臨床検体：糞便・嘔吐物・咽頭拭い液・鼻洗浄液・喀痰・水浴液・眼粘膜拭い液・髄液・血液・血清等をいう。

その他の検体：病原体媒介性生物等をいう。

病原体：細菌、ウイルス、原虫等をいう。

4. 検体の受領

4.1 検体受領時の確認

検体を受領する職員は、次の事項について確認する。

- (1) 一類感染症・二類感染症・三類感染症・四類感染症及び五類感染症検査票（病原体）、または保健所長による検査依頼書の記載事項と検体に同一性があること。
- (2) 検体は検査の目的に合っていること。
- (3) 検体の状態（外観、量）が適切であること。

4.2 検体受領時の記録

検体受領の確認を行った後、受付番号等の必要事項を検体受付管理簿へ記入する。

- (1) 検体の取り違えや紛失等を防ぐため、検体受付管理簿の記入事項を複数確認すること。

4.3 検体の分割

複数検査を行う場合は、検査目的に応じて検体を適切に分割する。

- (1) 分割した場合は、必要に応じて新たな受付番号等を検体受付管理簿へ記入すること。

5. 検体受領後の検体の保管

検体受領後、必要に応じて、次により検体を適切に保管する。

- (1) 検体の保管にあたっては、検体を保管する容器ごとに番号等を表示すること。
- (2) 検査の目的に応じた適切な条件で検体を保管すること。
- (3) 検体受付管理簿に保管場所等を記載し、検体の取り違え、紛失等を防ぐこと。

6. 検査終了後の検体の保存

検査に用いた検体については、検査結果通知の発行後一定の期間、適切な条件の下に保存する。

- (1) 保存期間及び保存条件は病原体検査 SOP で定めること。

7. 検体の廃棄

検体の廃棄は、次により適切に行う。

- (1) 検体を廃棄した時は関係帳簿に記録し、検査区分責任者の確認を受けること。
- (2) 検体の廃棄にあたっては、廃棄物の処理及び清掃に関する法律を遵守すること。
- (3) 滅菌の要否及び感染性廃棄物容器への収納方法等については、病原体検査 SOP で定めること。



試薬等管理標準作業書

SOP No.        △-1

施行年月日    平成    年    月    日

改訂年月日    平成    年    月    日

作成者        ○○課    ○○××

承認者        △△□□  
(検査部門責任者)

失効日        平成    年    月    日

○県保健環境研究所  
○○部    ○○課

試薬等管理標準作業書

	年 月 日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成 27 年 月 日	○○××	△△□□	
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 10 回改訂				

○県保健環境研究所  
○○部    ○○課

1. 適用範囲

感染症法第14条及び第15条に基づくウイルス学的検査又は試験（以下「検査等」という）を行う際に使用する試薬等全般に適用する。

2. 定義

試薬等の定義は次の通りとする。

試薬等とは、試薬、試液、細胞、参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）、陽性コントロール（病原体遺伝子）をいう。

1) 試薬

検査等に使用する化学物質及び生物学的製剤をいう。（基礎培地、液体培地、培地添加物質、細胞、免疫血清、抗原、赤血球等を含む）

2) 試液

試薬を調整して得られた溶液等をいう。（調整した培地、抗血清、抗原等を含む）

3) 細胞

ウイルス分離に使用する株化細胞等をいう。由来及び継代歴が明確なものを使用する。

4) 参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）

ATCC等の生物資源データベースに登録されているウイルス、細菌株で文献等で公に基準株として使われているものをいう。

5) 陽性コントロール（病原体遺伝子）

病原体遺伝子（抽出RNA液、抽出DNA液、cDNA液、PCR増幅産物等）で、遺伝子検査時に陽性コントロールとして使われるものをいう。

3 調整方法

1) 試薬

検査実施標準作業書に記載された方法で調整する。

2) 細胞

維持管理方法（凍結保存、継代方法、品質管理方法）について別に定める。

3) 参照株

参照株を再度保存する場合は、元の特性が引き継がれていることを遺伝子増幅法等により確認すること。

4) 陽性コントロール（病原体遺伝子）

検査実施標準作業書に記載された方法で調整する。

4 表示方法と管理台帳への記載項目

1) 試薬

(1) 試薬の容器には、次の事項のうち①～⑩を表示するとともに、試薬管理台帳（様式1）に①～⑩の事項を記載する。購入時に留意すべき事項

式1)に①～⑩の事項を記載する。購入時に留意すべき事項

- ① 入手年月日
- ② 入手源（製造者又は販売者等）
- ③ 識別名称
- ④ ロット番号（又は製造番号）
- ⑤ 純度（グレード）又は濃度
- ⑥ 保存方法
- ⑦ 保存場所
- ⑧ 使用期限
- ⑨ 開封年月日
- ⑩ 開封確認者氏名
- ⑪ 使用終了年月日
- ⑫ 使用終了確認者氏名

2) 試液

(1) 試液の調整は、それぞれの検査実施標準作業書に定める試液調整方法に従って行い、次の事項を試液管理簿（様式2）に記載する。また、別の標準作業書で調整記録があるものについては試液管理簿への記載は不要。

- ① 調整年月日
- ② 調整者氏名
- ③ 名称（濃度が含まれる）
- ④ 調整に使用した試薬の名称および量
- ⑤ 調整量
- ⑥ 保存方法
- ⑦ 保管場所
- ⑧ 使用期限
- ⑨ 使用開始年月日
- ⑩ 使用開始確認者氏名
- ⑪ 使用終了年月日
- ⑫ 使用終了確認者氏名

(2) 試液の容器には、次の事項を表示する。

- ① 調整年月日
- ② 試液名称（濃度が含まれる）
- ③ 調整者氏名

3) 参照株（ウイルス参照株、細菌参照株等）



試薬名： \_\_\_\_\_

調製年月日	調整者	調整量	試薬名称/量	試薬名称/量	試薬名称/量	保存方法/ 保存場所	使用開始/ 確認者	使用終了日 /確認者	備考

試薬管理標準作業書

SCP No. XXXX

項目 試薬の調整

適用 細胞培養に使用する培地

施行年月日 平成 年 月 日

改訂年月日 平成 年 月 日

作成者 ○○課 氏名

承認者 氏名  
(検査部門責任者)

失効日 平成 年 月 日

○○研究所  
○○課  
検査実施標準作業書

1

【細胞培養用培地作成】

	年月日	作成・改訂者	承認者	改訂理由
作成	平成 年 月 日			
第 1 回改訂				
第 2 回改訂				
第 3 回改訂				
第 4 回改訂				
第 5 回改訂				
第 6 回改訂				
第 7 回改訂				
第 8 回改訂				
第 9 回改訂				
第 10 回改訂				

○○研究所  
○○課

2

試薬調整標準作業書

- 適用範囲  
ウイルス分離培養で使用する培地の調整方法
- 種類  
RD-A及びL20B細胞に使用する増殖培地と維持培地
- 出典
  - イーグルMEM培地「ニッスイ」① 製品説明書
  - 井出利憲「細胞培養入門ノート」1999 羊土社
  - ポリオ実験室マニュアル第4版World Health Organization. Polio laboratory manual 4th edition, WHO/IVB/04.10, 2004
- 調整に使用する機器・器具及び器材
  - 機器・器具  
ガラスビン  
電子天秤 (機械器具保守 SOPNo. )  
冷蔵庫 (機械器具保守 SOPNo. )  
ビベーター  
メスシリンダー  
オートクレーブ (機械器具保守 SOPNo. )
  - 器材  
10ml ビベット (滅菌済み)  
アルミ箔  
オートクレーブテープ
- 試薬の調整  
MEM 培地
  - 試薬  
イーグルMEM培地「ニッスイ」① (粉末) (同每品)  
牛胎児血清：メーカー名  
7.5%炭酸水素ナトリウム：  
L-グルタミン (200mM)：  
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液(下記参照)

3

2) 調整法

- イーグルMEM 4g を電子天秤で量りとりビンに入れる。
- 蒸留水 1000ml をメスシリンダーで量りとり、イーグルMEM を完全に溶解する。
- ビンの蓋を軽く開け、アルミ箔で覆う。
- オートクレーブシール(日付記載)を貼る。
- 121℃で15分間オートクレーブする。
- 室温まで冷やす。(翌日まで置く。)
- 密栓して、冷蔵庫 (2~10℃) に保存する

培地調整

安全キャビネット内で下表に従い混合する。

	増殖培地 (220ml)	維持培地 (210ml)
MEM	200 ml	200 ml
L-グルタミン(200mM)	2.2 ml	2.1 ml
ペニシリン/ストレプトマイシン溶液*	0.22 ml	0.21 ml
牛胎児血清	20 ml (final 10%)	4.4 ml (final 2%)
7.5%Bicarbonate	3.3 ml (final 0.11%)	5.5 ml (final 0.13%)

\*ペニシリンG (20,000,000 units/12.5g) とストレプトマイシン 20g を 100ml の水で溶解し、ろ過滅菌 (0.22μm フィルター)、分注し凍結保存。培地 100ml あたり 0.1ml 添加 (最終濃度はペニシリン：ストレプトマイシン=100units/ml：100μg/ml)

- 密栓して、冷蔵庫 (2~10℃) に保存する。
- 作成した培地には、種類、調整日、使用期限、作成者を記載すること

6. 培地調整時の注意事項

- 安全キャビネットでの作業中は必ず使い捨ての手袋、マスク及び白衣を着用する
- オートクレーブする際、ビンは密栓しない。
- オートクレーブ後の操作は、安全キャビネット内で行うこと。
- 細胞ごとに増殖培地、維持培地を区別し保管する (細胞同士の交差汚染防止のため)
- 作成した培地には、種類、調整日、使用期限、作成者(イニシアル等)を記載すること

4