

201525007A

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)

平成27年度 総括・分担研究報告書

平成28年3月

研究代表者

佐多 徹太郎

(富山県衛生研究所)

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实施のための事業体制の  
構築に関する研究(H26-健危-一般-001)

平成27年度 総括・分担研究報告書

平成28年3月

研究代表者

佐多 徹太郎

(富山県衛生研究所)

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」班  
班員名簿

氏 名	所 属	職 名
佐多 徹太郎	富山県衛生研究所	所 長
調 恒明	山口県環境保健センター	所 長
猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所	所 長
岸本 壽男	岡山県環境保健センター	所 長
山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所	所 長
岡野 素彦	北海道立衛生研究所	所 長
倉根 一郎	国立感染症研究所	所 長
宮崎 義継	国立感染症研究所・真菌部	部 長
大石 和徳	国立感染症研究所・感染症疫学センター	センター長
木村 博一	国立感染症研究所・感染症疫学センター	室 長

## 研究協力者

香月 進	福岡県保健環境研究所
佐野 一雄	名古屋市衛生研究所
四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
田原 なるみ	東京都健康安全研究センター
水野 哲宏	横浜市衛生研究所
荒川 英二	国立感染症研究所
泉谷 秀昌	国立感染症研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所
梅山 隆	国立感染症研究所
太田 嘉	横浜市衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
緒方 喜久代	国立感染症研究所
小澤 広規	横浜市衛生研究所
小渕 正次	富山県衛生研究所
影山 努	国立感染症研究所
勝見 正道	仙台市衛生研究所
岸本 剛	埼玉県衛生研究所
北川 和寛	福島県衛生研究所
倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
児玉 洋江	石川県保健環境センター
小林 美保	群馬県衛生環境研究所
駒瀬 勝啓	国立感染症研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
柴田 伸一郎	名古屋市衛生研究所
清水 俊一	北海道立衛生研究所
清水 英明	川崎市健康安全研究所
末吉 利幸	山口県環境保健センター
鈴木 里和	国立感染症研究所
勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
塚越 博之	群馬県衛生環境研究所
長澤 耕男	国立感染症研究所
野田 雅博	国立感染症研究所
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
藤井 理津志	岡山県環境保健センター
松島 勇紀	川崎市健康安全研究所
水越 文徳	栃木県保健環境センター
皆川 洋子	愛知県衛生研究所
村上 光一	国立感染症研究所
望月 利洋	兵庫県立健康生活科学研究所健康科学研究センター
森本 洋	北海道立衛生研究所
山下 照夫	愛知県衛生研究所
吉田 弘	国立感染症研究所
綿引 正則	富山県衛生研究所

ほか、調査等にご協力いただいた地衛研の担当者の方々

各小班の担当者リストを示す

\* 下線は小班長  
重複があります

### 体制小班

大石 和徳	国立感染症研究所
岡野 素彦	北海道立衛生研究所
香月 進	福岡県保健環境研究所
岸本 壽男	岡山県環境保健センター
倉根 一郎	国立感染症研究所
佐野 一雄	名古屋市衛生研究所
猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所
末吉 利幸	山口県環境保健センター
田原なるみ	東京都健康安全研究センター
水野 哲宏	横浜市衛生研究所
宮崎 義継	国立感染症研究所
村上 光一	国立感染症研究所
山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所
<u>佐多徹太郎</u>	富山県衛生研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所
小淵 正次	富山県衛生研究所
綿引 正則	富山県衛生研究所

### ウイルス小班

小澤 広規	横浜市衛生研究所
影山 務	国立感染症研究所
勝見 正道	仙台市衛生研究所
岸本 剛	埼玉県衛生研究所
岸本 壽男	岡山県環境保健センター
北川 和寛	福島県衛生研究所
木村 博一	国立感染症研究所
児玉 洋江	石川県保健環境センター
小林 美保	群馬県衛生環境研究所
駒瀬 勝啓	国立感染症研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
柴田伸一郎	名古屋市衛生研究所
清水 英明	川崎市健康安全研究所
<u>調 恒明</u>	山口県環境保健センター
高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
塚越 博之	群馬県衛生環境研究所
長澤 耕男	国立感染症研究所
野田 雅博	国立感染症研究所
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
藤井理津志	岡山県環境保健センター
松島 勇氣	川崎市健康安全研究所
水越 文徳	栃木県保健環境センター
皆川 洋子	愛知県衛生研究所
宮崎 義継	国立感染症研究所
山下 照夫	愛知県衛生研究所
吉田 弘	国立感染症研究所
佐多徹太郎	富山県衛生研究所
小淵 正次	富山県衛生研究所

### 細菌小班

荒川 英二	国立感染症研究所
泉谷 秀昌	国立感染症研究所
大石 和徳	国立感染症研究所
太田 嘉	横浜市衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
緒方喜久代	国立感染症研究所
倉園 貴至	埼玉県衛生研究所
黒木 俊郎	神奈川県衛生研究所
四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
清水 俊一	北海道立衛生研究所感染症部
鈴木 里和	国立感染症研究所
勢戸 和子	大阪府立公衆衛生研究所
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
村上 光一	国立感染症研究所
望月 利洋	兵庫県立健康生活科学研究所 健康科学研究センター
森本 洋	北海道立衛生研究所感染症部
<u>山本 容正</u>	大阪府立公衆衛生研究所
佐多徹太郎	富山県衛生研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所
綿引 正則	富山県衛生研究所

## 目 次

I. 総括研究報告書「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体制の構築に関する研究」	
佐多徹太郎（研究代表者、富山県衛生研究所）	..... 1
II. 分担研究報告書	
1. 精度管理に関する技術的支援 —シーケンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理調査—	
木村 博一（国立感染症研究所） ほか	..... 17
2. 昨年度のリアルタイム PCR 外部精度管理調査後のトラブルシューティング研修	
小淵 正次（富山県衛生研究所） ほか	..... 41
3. 手足口病ウイルスに関する外部「精度管理」調査（案）に関する研究	
山下 照夫（愛知県衛生研究所） ほか	..... 83
4. 平成 26 年度に実施したサルモネラ外部精度管理調査について —トラブルシューティングを中心に—	
森本 洋（北海道立衛生研究所） ほか	..... 107
5. 試料発送から検査実施までの温度変化における検査結果への影響について	
森本 洋（北海道立衛生研究所） ほか	..... 113
6. 全国の地方衛生研究所を対象にしたコレラ菌検査の外部精度管理調査	
勢戸 和子（大阪府立公衆衛生研究所） ほか	..... 123
7. 平成 28 年度精度管理調査「細菌性赤痢」に関する事前調査	
磯部 順子（富山県衛生研究所） ほか	..... 181
8. 病原体検査の信頼性保証の取り組みについて	
吉田 弘（国立感染症研究所） ほか	..... 191
9. 外部精度管理調査の実施体制について	
佐多 徹太郎（富山県衛生研究所） ほか	..... 209
III. 研究成果に関する刊行一覧表	..... 239

#### IV. 資料

- 1) 第一回ウイルス小班会議資料（2015.5.20 感染研）  
（プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料） ..... 241
- 2) 第一回細菌小班会議資料（2015.5.29 感染研）  
（プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料） ..... 263
- 3) 地全協臨時総会（2015.6.5 都健安研）  
（パワーポイント配布資料） ..... 269
- 4) 第一回研究班会議資料（2015.6.12 感染研）  
（プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料） ..... 293
- 5) 地全協精度管理部会会議資料（2015.11.3 長崎）  
（プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料） ..... 319
- 6) 第二回研究班会議資料（2016.1.8 感染研）  
（プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料） ..... 327

# I . 総括研究報告書



## 総括研究報告書

研究代表者：佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

**研究要旨** 地方衛生研究所（地衛研）の微生物検査の技術水準を維持するために、外部精度管理の手法を導入し、地方衛生研究所全国協議会（地全協）として継続的に実施することの妥当性評価を目的として研究を行った。本年度は1) ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査、2) ウイルス外部精度管理調査後のトラブルシューティング研修、3) 手足口病と細菌性赤痢についての外部精度管理調査のたたき台案の作成、4) 病原体検査の信頼性確保の取組み、および5) 外部精度管理調査の実施体制について検討した。1) ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査では、ノロウイルスのPCR産物を試料としてシーケンスと樹状解析、およびコレラ菌の生菌を配付し同定検査を行った。シーケンスには62機関が参加し、75.8%で適切に解読され、相同性解析では遺伝子型は100%一致したが、いくつかの問題も明らかとなった。コレラ菌の調査では74機関が参加しおよそ正しい同定結果を回答した。良い調査モデルとなった。2) 昨年実施したリアルタイムPCRの外部精度管理調査後、うまく結果を出せた機関とそうでなかった機関に依頼し10機関の参加を得て、小グループで発表と討論の後、トラブルシューティング研修を行ったところ、良好な評価を得た。3) 手足口病の外部精度管理調査案として、CODEHOP PCRによる遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。細菌性赤痢の原因菌である赤痢菌の検査についても検査法の精度と実施体制を確認する手順書等を作成した。可能ならば、次年度以降に作業班を設けて実施したい。4) WHOによる実験室評価指標と比較すると、外部精度管理調査は検査施設内の質の改善には有効な指標であるが、検体採取から検査、報告までの一連のフローの中で、信頼性を保証する必要がある。そのための評価の指標を今後、開発していくことが必要である。5) これまでの検討結果から外部精度管理調査の実施に当たっては、内部精度管理調査支援とトラブルシューティング研修を一体化させて実施すること、外部精度管理調査を継続的に実施可能な予算や人員のある組織が必要で、運営組織には地全協と感染研や厚労省が、実施組織には感染研を中心とすることが望ましいとの結論を得た。すなわち感染研に事務局といったものを設置するのが適当である。また検査の経験ある地衛研職員の積極的参加が必須である。以上から、定期的継続的な外部精度管理調査の実施が地衛研の微生物検査の技術水準の維持や感染症検査の質確保および地衛研担当者の人材育成に役立つと考えられ、ひいては国や自治体の感染症発生動向調査や健康危機管理対応に役立てられるので事業化を強く要望したい。

### 研究組織

研究代表者 佐多徹太郎（富山県衛生研究所）

研究分担者 岡野素彦（北海道立衛生研究所）、岸本壽男（岡山県環境保健センター）、猿木信裕（群馬県衛生環境研究所）、調 恒明（山口県環境保健センター）、山本容正（大阪府公衆衛生研究所）、倉根一郎、宮崎義継、大石和徳、木村博一（国立感染症研究所）

研究協力者 香月 進（福岡県保健環境研究所）、水野哲宏（横浜市衛生研究所）、田原なるみ（東京都健康安全研究センター）、佐野一雄（名古屋市衛生研究所）ほか別紙記載。

## A. 研究目的

地方衛生研究所（以下地衛研）の微生物検査の技術水準を維持するために、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（以下地全協）として継続的に実施することの妥当性評価を目的とする。

地衛研の予算・定員は年々削減されており、検査精度の維持が困難となっている。地方分権の推進に伴い、自治体の認識の差により、各地衛研間の技術力にも格差が生じている。平均水準の低下と格差の拡大により、一部地衛研では必要最低限レベルの確保も難しい。一方、健康危機管理体制として、病原体検出技術の維持は不可欠であるが、食品以外、地衛研全体における感染症検査に関する精度管理の仕組みは存在しない。また、微生物検査の分野では、分子生物学的手法の導入により、検査技術は高度化し、検査機器も日進月歩で、レベルを維持することは容易ではない。これらの課題の解決を各地衛研任せにせず、全国規模で実行しなければ、地域によっては修復不能な技術の低下等を招く危険性がある。緊急事態への危機管理対応として、知事等による自治体間の協定があるが、制度化された検査の広域連携はない。地衛研の検査水準を確保するためには外部精度管理が必要であるものの、各自治体が独自に実施することは困難で、また、国が直接に指示し実施することにも問題がある。そこで、地全協が主体となって、地衛研の臨床検体に係る微生物検査の外部精度管理を統一的に全国で実施する体制を整え、専門的評価として行うことは有効であると考えられる。

本研究は病原体検査水準の維持と向上を図るために、地全協が主体となって国立感染症研究所（以下感染研）と連携して、外部精度管理のシステムを構築し、継続的に実施しうる事業化

が可能となるような研究を行い、健康危機管理体制や感染症発生動向調査の整備や地衛研の人材育成に役立てられるよう立案し提言に結び付けたい。

## B. 研究方法

本年度は、体制小班、ウイルス小班、細菌小班、および必要に応じてさらに作業班を設けて検討した。作業班の検討事項はそれぞれの小班に照会し意見を求めて完成させ、班会議で議論した。本年度は下記の5点について検討した。1) ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査では、ノロウイルスのPCR産物を試料としたシーケンスと樹状解析をテーマとし、近年実施されることの多い検査技術とした。また、三類感染症のコレラについては、コレラ菌の生菌を参加地衛研に配付し同定検査を行った。2) 外部精度管理調査後の関連研修として、職場でのOJT (On the Job Training) を模した小グループミーティング形式を試みた。昨年実施したりアルタイムPCRの外部精度管理調査後、うまく結果を出せた機関とうまく結果を出せなかった機関のいくつかに参加を要請し10機関の参加を得て、二つの小グループに分かれて発表と討論を行い、さらに検査のデモや講義も加えて実施した。各担当者のトラブルシューティングとともに、全体でトラブルシューティングのまとめを作成した。また研修期間中、およびその後もフォローアップ調査をおこなった。3) 手足口病の外部精度管理調査案は、CODEHOP PCRによる遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。細菌性赤痢の原因菌である赤痢菌の検査について地衛研を対象にアンケート調査を行い、検査法の精度と実施体制を確認する手順書等を作成した。4) 感染症発生動向調査における病原体検査の信頼性確保の取り組みについて、世界保健機構(WHO)による実験室評価指標と比較し、応用可

能性について考察した。5) これまでに得られたデータと資料から外部精度管理調査の実施に当たっては、体制小班のみならず、研究班に参加している方々にアンケート調査を実施し、案を煮詰めた。その後、研究班会議等で提示しさらに意見を求めて案を作成した。

(倫理面の配慮)

個人情報を取り扱わない。

## C. 研究結果

### 1. ウイルスおよび細菌の外部精度管理モデル調査

#### 1) ウイルスのシークエンスと樹状解析外部精度管理調査 (木村分担報告書 1 参照)

地衛研におけるウイルス検査の精度管理を試行的に行うため、ノロウイルス(NoV)の模擬検体を用いたシークエンスおよび分子系統樹解析に関する外部精度管理調査を行った。特にシークエンス解析および分子系統樹解析は、種々のウイルスの詳細な遺伝学的特性を把握するうえで極めて重要で、分子疫学解析として日常的に実施されている。模擬検体には、GII.4 の PCR 産物を用いた。また、各機関における測定機器、測定条件および試薬管理状況などに関する詳細なアンケート調査も行った。本研究においては、塩基配列リードミスの有無、解析長、プライマー配列の有無、塩基配列相同性解析結果、アミノ酸配列相同性解析結果、系統樹上の解析株の位置、系統樹解析法の精度、遺伝子型の精度、計 8 項目を各 1 点とし、合計 8 点で判定を行った。本研究参加機関 62 機関の平均は 7.0 点 (最高 8 点、最低 3 点) であった。全項目とも適切 (8 点) であった機関は 30 機関 (48.3%) であった。事後アンケートは 50 機関 (80.6%) から回収できた。シークエンス解析機器は、45 機関 (90.0%) が Applied Biosystems 社製で、シークエンス反応試薬は全機関がメーカー純正品を使用していた。約半数の機関は試薬使用期限内で使用していると思われたが、残りの機関は、使用期限外の試薬も使用していた。さらに、シークエンスのマニュアルを 29 機関が「理解している」と答えたのに対し、19 機関が「読んだ事はない」、「理解していない」と解答した。今後、

改正感染症法が施行されたのちに、内部精度管理調査の実施状況については是非比較してみたい。さらに本研究を発展させ、地研におけるウイルス検査精度の確保・改善に資する詳細な検討と技術支援を行う必要がある。

#### 2) 細菌のコレラ菌外部精度管理調査 (a) 森本分担報告書 5 および b) 勢戸分担報告書 6 参照)

##### a) 試料発送から検査実施までの温度変化における検査結果への影響について (森本分担報告書 5)

平成 27 年度の外部精度管理調査に当たり、ゆうパックによるコレラ菌試料発送から検査実施までの輸送中の温度変化を把握し、過度な変化があった場合の供試試料に与える影響を検討した。7 月 24 日 (金) 発送、27 日 (月) 着で 4 カ所の地衛研で行った事前調査では、いずれにおいても試料引受郵便局到着時での温度を基準に  $\pm 5^{\circ}\text{C}$  以内の温度幅で輸送されていた。また、この時の試料では血清学的検査及び毒素検査について適切な結果が得られていた。10 月 1 日 (木)、2 日 (金) 発送、5 日 (月) 着 (1 地衛研のみ 1 日発送、2 日着) で行った本調査 (全国 74 地衛研) では、輸送中、試料引受郵便局での温度と比較し、大きな温度変化が認められた試料が複数あった。また、輸送中及び試料到着後の一時保存温度を含め、 $20^{\circ}\text{C}$  以上の高低差のある環境下に置かれた試料が 5 試料あり、本来 O1 抗原 (+) となる菌株 1 で 2 機関、菌株 2 で 1 機関、計 3 機関が O1 抗原 (-) と報告した。このうち 1 機関の試料は、最も高低差のある温度環境下 (高低差  $26.8^{\circ}\text{C}$ ) にあった。なお、このことが菌株に影響していたかについては、判断することができなかった。外部精度管理調査においては、配付試料の安定性を担保することが不可欠である。従って、シミュレーションを入念に行うのはもちろんのこと、実施時期にかかわらず、外気温の影響を受けにくく、試料到着後輸送中の温度と変わらない温度帯で一時保存しやすい、冷蔵輸送での対応が適切と思われた。加えて、配付試料においては、輸送中の温度、一時保存温度を念頭に置いた菌株選定が必要と思われた。

##### b) 全国の地方衛生研究所を対象にしたコレ

## ラ菌検査の外部精度管理調査（勢戸分担報告書 6 参照）

地衛研で実施する細菌検査の信頼性確保のため、外部精度管理調査を実施し、検査能力の実態を把握するとともに、継続的な実施に必要な手順や問題点を検証した。74 機関の参加を得た。多くの地衛研が三類感染症の検査を実施していた。また、「防疫対象となるコレラ菌の決定は地衛研における検査によって行う」（昭和 63 年 9 月 28 日健医発第 1133 号）と明記されていることから、実施項目を「三類感染症検査に係る『コレラ菌』の同定」とした。検査試料は感染研の保存株から、事前に 4 箇所の地衛研で性状を確認した上で 3 株（試料 1: *Vibrio cholerae* O1 稲葉型 コレラ毒素 (CT) 陽性、試料 2: *V. cholerae* O1 小川型 CT 陰性、試料 3: *V. cholerae* O139 CT 陽性）を選び、感染研から発送した。検査報告書の集計の結果、正答は試料 1: 72 施設、試料 2: 66 施設、試料 3: 74 施設で、試料 2 では正しい同定結果（O1 抗原陽性、CT または CT 遺伝子陰性）であったが「コレラ菌陽性」と判定した施設が 7 施設あった。検査経過記録書や事後アンケートから、全体として地衛研では概ね適切にコレラ菌検査が実施されていた。特に、届出基準のひとつである CT 産生あるいは CT 遺伝子の確認については、74 施設で一致した結果が得られていた。試料 1 および 2 では O1 抗原陰性と判定した機関が 3 箇所あり、原因については、使用した免疫血清やラテックスの劣化、凝集反応に供した菌株が不適切（ラフ型）等の要因が考えられた。血清凝集反応で判定不能の場合、特に CT 産生あるいは CT 遺伝子陽性の場合、PCR 法による O1 抗原あるいは O139 抗原の確認を実施すべきであると考えられた。大規模な外部精度管理調査を実施するにあたって、配付株の選定には検体の保存条件を考慮する必要がある。また、検査経過記録書やアンケート等については、多様な回答を想定し記入しやすい様式を作成することが課題である。参加施設から提出される各種文書のとりまとめには、集計に至るまでの事務作業に相当の時間が必要であり、未記入や記載ミスと考えられる回答を提出元に確認するなど、実施結果の集計や解析には専従の担当者を

おくことが望ましい。

## 2. 研修

### 1) ウイルス外部精度管理調査後のトラブルシューティング研修（小淵分担報告書 2 参照）

昨年度のノロウイルスリアルタイム PCR に関する外部精度管理調査をフォローし、検査の質確保および人材育成につなげるための研修を実施した。昨年度の調査より判定基準値をもとに参加機関を 3 群に分け、各群から代表を選んで 10 機関を研修の対象とした。平成 27 年 9 月 10、11 日のおよそ 1 日半の日程で、On the Job Training (OJT) を模したトラブルシューティング研修を行った。参加者 5 名とファシリテーター 1 名からなる計 2 グループに分け、グループミーティング形式で各トラブルシューティングを行い、次いで全体討論により全体のトラブルシューティング集をまとめた。具体的な方法や準備等は分担報告書を参照してほしい。さらに、ラボ実習と講義により、各自トラブルシューティングを完成させ、さらに全体をまとめてトラブルシューティング集を作成した。研修後、参加者にアンケートならびにトラブルシューティング集を送付し、職場での復命や研修の効果についてのフォローアップ調査も行った。その結果、職場での技術向上につながったことが確認できた。今回の研修を通して、職場で OJT による検査技術の伝達が行われているものの、十分な知識と経験がある中堅職員が少ないことが部署内でトラブルシューティングできないことの一因であることが明らかになった。一方で、今回の研修やアンケート等を通して検査の質を確保するためには、新規職員の教育研修が重要であることがわかった。

### 2) 平成 26 年度に実施したサルモネラ外部精度管理調査について（森本分担報告書 4 参照）

平成 26 年度の外部精度管理調査（試料：2 種類のサルモネラ属菌を添加した模擬便）結果について、総括・分担研究報告書（平成 26 年度）及び北海道立衛生研究所における結果より推察された事象を基に問題点等を検証した。外部精度管理実施機関側の検証を行った結果では、配付試料の妥当性評価が困難だった。また、参加機関側の検

証では、試料の妥当性評価ができなかったため、最終的に問題点の絞り込みができなかった。このことから、今回の調査に関しては、事後研修を実施せず、国立保健医療科学院などの座学と実習を伴った通常行われる研修会において、検査意識とともに精度管理の向上につながるような、機会を持つことが望ましいと思われた。外部精度管理調査実施機関側は、参加機関に求める結果を想定し、そのことを達成するための安定した配付試料を作製することが不可欠である。また、参加機関側は自ら、内部精度管理ができるシステムを導入し、日常検査における精度の担保や外部精度管理の結果が思わしくなかった場合に迅速かつ適切な検証ができるよう体制を整える必要がある。全国的な公的外部精度管理調査を継続的に行うためには、施設、人員、予算などを確保し、安定した実施母体を構築する必要があると思われた。

### 3. 手足口病と細菌性赤痢についての外部精度管理調査のたたき台案の作成

#### 1) 手足口病（山下分担報告書3参照）

5類定点把握対象疾患である手足口病は、毎年流行するウイルスの血清型が異なり、それらを把握することは重要である。手足口病病原体の対象ウイルスはエンテロウイルス(A、B、CおよびD)で、検査方法はRD、Vero、HeLa細胞等を用いて分離培養し中和法で同定するが、抗血清の入手が困難な場合は、遺伝子を検出しPCR産物の塩基配列により型別する場合がある。今回、手足口病病原体の外部精度管理案としてCODEHOP PCRによる遺伝子増幅と塩基配列の解析による型別のための作業手順書案を作成した。分離株から抽出したRNAを送付して行うことを目的として輸送方法の違いによる温度の影響を調べ、問題なく実施されることを確認した。BLAST検索以外の解析法としてNJ法による系統樹作成のためのデータベースを作成した。エンテロウイルスの同定はウイルス分離と中和反応によることが基本である。生きたウイルスの輸送方法の問題を解決する必要があるが、中和反応による血清型別は精度管理が必要な項目と考える。また、分離ウイルスを用いた各施設の細胞感受性評価も今後必要で

ある。

#### 2) 細菌性赤痢（磯部分担報告書7参照）

細菌性赤痢を外部精度管理調査の対象とした理由は、細菌性赤痢は三類感染症であり、感染者が食品関連業務に従事している場合は就業制限がかかるなど、検査結果の影響は大きい。しかしながら、原因菌である赤痢菌を同定するための感染症検査の基準はなく、また、類似菌だけでなく、血清型・菌種の同定が困難である事例もしばしば経験され、最終的な同定が地衛研に求められる状況にある。この問題は10年以上前から、地衛研の中でも指摘されているが、これまで解決していない。本年度（平成27年度）に赤痢菌検査に関する実態調査を、コレラ菌のアンケートとともに実施した。細菌性赤痢を対象として精度管理調査を行うための検討項目について意見を求め、まとめて検査実施手順書案を作成した。赤痢菌検査に関する現状調査結果から、およそ6割の地衛研で糞便検体を用いて検査が実施されていたが、その大部分の検査数は10検体以下であった。検査経験があったのは地衛研のおよそ半数であった。配付試料を模擬臨床検体ないし高層寒天培地で作成する、あるいは臨床検体からの分離同定では、他の菌や複数の血清型の菌を混在させること、型別が正しくできること、類似菌の選択が重要であること、鑑別上の問題、その他検証すべき課題が明らかとなった。試料としての菌株選定、調査項目等の検討を踏まえて、複数回にわけて実施することが望ましい。

### 4. 病原体検査の信頼性確保の取組み（吉田分担報告書8参照）

平成28年4月1日からの感染症法改正の施行に伴い、感染症発生動向調査における病原体検査の信頼性確保の取組みについて、世界保健機構(WHO)による実験室評価指標と比較し、応用可能性について考察した。指標としては、1) 報告までの日数、2) 年間検査数、3) 正確性、4) レファレンス体制、5) 精度管理（外部、内部）、6) 認定と査察、7) ウイルス分離率（認定条件外）、8) エンテロウイルス検査の施設間の比較の試み、があり、これらの項目について検討した。改正感

感染症法では感染症情報収集強化のため、サーベイランス体制と検査体制について、感染症発生動向調査実施要綱と病原体等検査の業務管理要領にて一定の基準が示されている。地方公共団体が行う病原体検査は独自の取り組みにより信頼性を保証してゆくことになり、外部精度管理調査は、検査施設内の質の改善には有効な指標である。他方、今般の法改正では病原体収集体制の見直しも含まれている。よって病原体サーベイランスとして捉えた場合、検査施設の改善のみでは不十分であり、検体採取から検査、報告までの一連のフローの中で、信頼性を保証する必要がある。そのため評価の指標を今後、開発していくことが必要である。

#### 5. 外部精度管理調査の実施体制(佐多分担報告書9参照)

平成9年にまとめられた衛籐班の報告書がいまでも基本的に適切と考えられたので重要参考資料とした。ほか、昨年度に実施した「感染症検査の実態に関するアンケート調査」や外部精度管理調査実施後のデータを参考に検討案を作成し研究班で議論のうえ、調査を実施し検討した。前回の報告書はおそらく2期6年に亘って地全協と感染研や国衛研とともに、理化学や微生物検査の外部精度管理調査を検討し、平成9年3月にまとめられた。内容的には現在でも通用する部分が多い。ただし、その後、遺伝子検査が迅速検査として広く行われるようになったこと、病原体の運搬が規制されたこと、そして、この間に地衛研を取り巻く状況や地衛研自体の問題、たとえば予算や人員の削減、団塊世代の経験者の大量退職、2-3年間隔という短期間での人事異動等から、なかにはOJTの実施が困難となってきたことなどの変化がある。外部精度管理調査を行う場合は、内部精度管理調査支援と、検査担当者を対象とした調査後の研修、中でもトラブルシューティング研修までを一連の事業として、一体化させて実施することが望ましい。そして、外部精度管理調査を継続的にまた定期的にも実施可能な、予算や人員のある中心的な組織の存在が必要である。運営組織には地全協と感染研および厚労省が、実施組織には

感染研を中心とすることが望ましいという結論に至った。すなわち感染研に事務局といったものを設置することが適切である。地衛研における外部精度管理調査の実施は、発生動向調査等における感染症検査の質確保、そして地衛研の人材育成にも役立つこと、そして国の感染症対策に重要な事業と位置づけられるので、今後、さらに調査内容の詳細を経験豊富な地衛研職員の参加によって検討しつつ、最低年一回、継続的にかつ定期的に実施していくことが必要である。

なお、本年度の研究班評価会(H28.2.22)の抄録とパワーポイント配布資料を報告書に添付した。

#### D. 考察

地衛研全体を対象とする外部精度管理調査は、地衛研の検査技術維持向上に重要で、しかも人材育成にも関わるものであり、継続的に実施していくことが必要という根拠となるデータが得られた。運営組織には地衛研と感染研そして厚労省担当課、実施組織には感染研という結論は、期せずして平成9年の衛籐班の結果とほぼ同じ提言になる。とくに実施組織は、継続的に実施可能な組織、予算、人員があることが大前提で、これがないと機能しないのは現状をみても明かである。すなわち事務局機能が必要である。そして地衛研職員が豊富な検査経験をもとに自らの問題として積極的に企画、運営、調査に参加すること、そして感染研が組織としてどう対応するかにかかっている。種々の知恵を生かして実施し、継続していかなければいけない時期にきた。幸い厚労省には新年度から関連予算がつくようであるが、感染研と地衛研のネットワークを維持しさらに向上させ、感染症発生動向調査および健康危機管理に役立てられる対応を望みたい。なお、外部精度管理調査は全体に対して行うべきものであるが、企画や運営等の一部として地全協の支部の役割については今後の検討に委ねたい。

ウイルスの外部精度管理調査は、昨年リアルタイムPCR検査と本年度のシーケンスと樹状解析を対象とした。期せずに遺伝子検査技術が対象となった。現在では、種々のウイルス検査で分子

生物学的技術を用いた迅速検査を行うにあたり、これらは重要な基本技術となっている。トラブルシューティング研修で明かになったのは、試薬の管理・使用法、反応液の混合・希釈といった調整、使用器具や機器に関する使い方等、基本的実験手技に関する知識と経験が不十分であることがさまざまなトラブルに関係していたことである。職場で若手担当者が多くなり、OJTを担う経験の豊富な中堅以降の職員が減少していることも一因と考えられた。今回のトラブルシューティング研修は6人と少数でしかも2グループで行われ、高い効果があったと評価したが、多人数の研修となると、予算、人員、準備等で、難しい点が多々あるろうかと思われた。従来の研修ではほとんどが座学で情報提供であるが、今回の細菌の調査ではあまりトラブルシューティング研修の必要性が低かったので、どのようにこの研修方法を利用するかを検討する必要がある。

細菌検査では分離・同定が正しくできることが重要である。ほぼ全地研対象に四種病原体の生菌を送付状に明記して配付し外部精度管理を実施することが可能となった。ただ数が多いと作業量も増え大変だったと聞いている。コレラ菌は地研が検査するものであること、および三類感染症としてのコレラ菌の定義を再認識できたことは意義がある。そして平成28年2月の希少感染症研修会で解説する機会を得て、今後の成果につながることを期待した。また今回のWGによる進め方および種々作成した書類等は今後の参考になる基礎資料ができたと考える。

手足口病や細菌性赤痢の外部精度管理調査のたたき台案は次年度以降の対応に役立つ。また、今回の外部精度管理調査に含めた内部精度管理支援調査からは、平成28年4月から実施される感染症検査の質保証の導入の事前調査結果となるとともに、現在も対応準備中といった状況が窺われた。それぞれの地衛研での検査手順書の書き方とも関連し検討が必要と思われる。また次年度も同じ内部精度管理支援調査が可能であれば、是非実施して新年度の対応状況を把握し対応支援につなげていきたい。

## E. 結論

地衛研の感染症検査に係わる外部精度管理調査は、実際に有意義で重要であり、かつ地研の人材育成にも役立つが、これまで感染症検査にはその仕組みがない。地研の検査機能と質を維持向上させるためには、継続的に実施することが大事で、そのためには継続実施を可能とする運営および実施組織、予算、人員が必要不可欠である。感染症研に事務局を設置するのが適切である。外部精度管理調査の内容については基礎ができたが、今後さらに検討項目を議論しつつ調査案を検討していくこと、さらに病原体の分離同定をテーマとした調査が必要である。外部精度管理調査と内部精度管理支援調査そしてトラブルシューティング研修を一体となって実施することで、地衛研の抱える問題と感染症検査の課題について解決に近づけると考える。なお、「精度管理」は感染症検査の場合、適切とはいえないが便宜上使用した。

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

吉田弘, 伊藤俊之, 梅木和宣, 中嶋健介.  
H26年5月に実施した病原体サーベイランス等に関する調査より-地方衛生研究所における検査実施体制について 病原体検出情報 36: 114-116, 2015

### 2) 学会発表

1. 佐多徹太郎 感染症法改正と病原体検査指針 ④検査の信頼性確保。衛生微生物技術協議会第36回研究会(2015.7.24 仙台)
2. 勢戸和子 コレラ菌の検査と精度管理。希少感染症診断技術研修会(2016.2.18 感染研)

## H. 知的所有権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

研究課題：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体制の構築に関する研究

課題番号：H26-健危-一般-001

研究代表者：佐多徹太郎（富山県衛生研究所・所長）

要旨：地方衛生研究所全国協議会が主体となって外部「精度管理」のシステムを試験的に構築し、継続的に実施可能な事業を立案・提言することを目的とした。体制、ウイルス、細菌小班および各作業班で検討した。外部「精度管理」と内部「精度管理」調査そして研修の一体化実施と、継続的实施が可能となる運営や実施組織が必要である。外部「精度管理」を導入することで感染症検査の質確保および地研の抱える技術的問題の解決に効果的と考えられた。

## 1. 研究目的

地方衛生研究所の病原微生物検査の技術水準を維持し向上させるためには、外部「精度管理」の手法を導入することが必要と思われる。しかし、細菌及びウイルス検査において、食品以外の外部「精度管理」の仕組みはない。本研究は、地方衛生研究所全国協議会(地全協)が主体となって外部「精度管理」のシステムを試験的に構築し、継続的に実施可能な事業を立案し提言することが目的である。

## 2. 研究方法

研究分担者と、地研精度管理部会員、地研職員、感染研職員計 53 名に研究協力を依頼し、体制、ウイルス、細菌の小班に分かれて検討した。本年度は、さらにワーキンググループ(作業班、WG)を作り、試料作製、実施計画の立案と書類等の作成、輸送、結果集計、事前事後アンケート調査の作成および集計解析等の実務を担当した。

1) 体制小班では、外部「精度管理」の文言、外部「精度管理」と内部「精度管理」調査そして研修の一体化、外部「精度管理」調査の運営組織と実施組織、経費、実施時期、回数、研修の 7 点について意見照会し議論し、調査結果を加えてまとめた。

2) ウイルス小班では、シーケンスおよび分子系統樹解析を課題とした。試料はノロウイルスゲノム PCR 増幅産物とし、実施要領、実施手順書、測定結果記入ファイル、系統樹作成参照株データとともに参加 62 機関に配付した。事後アンケートは内部「精度管理」支援調査と事後調査を作成し回答を求めた。トラブルシューティング研修は、昨年のノロウイルスリアルタイム PCR の外部「精度管理」調査の結果から計 10 機関を選び、了解を得て対象とした。参加者 5 名とファシリテータ 1 名からなる計 6 名、2 グループに分けた。参加者には事前にパワーポイントの様式(所属の状況、外部「精度管理」調査提出結果、標準曲線図、受け取った評価、考えられる原因、新規配付標準物質を使用した結果)を配付した。各参加者は記載した資料をもとにグループミーティングで発表し、皆で問題点を抽出した。最後に一枚のトラブルシューティング集を作成した。翌日は、ラボでリアルタイム PCR の講義とデモを行った。毎日の研修終了後、1 ヶ月後、2 ヶ月後にもフォローアップアンケート調査を行った。また新人研修に関する調査について、班会議参加者を対象として行い、意見を集約した。

3) 細菌小班で、昨年度のサルモネラ属菌の検出同定に関する外部「精度管理」調査の結果をもとに検証した。コレラ菌調査は、コレラ菌 17 株をチェックし 3 株を試料とした。74 地研が参加した。試料発送は、感染研バイオセーフティ管理室と打ち合わせて準備し、参加地研から感染研に送られた温度記録計入りの輸送容器に感染研で試料を入れて参加施設へ送付した。調査実施案内、申込書、輸送容器および送付方法説明書、



検査手順書、検査結果報告書、検査経過記録書、感染症検査全般および内部「精度管理」支援調査を含むアンケート、温度記録報告書を作成送付した。結果を集計した後、事後アンケート調査も行った。

6) 今後の外部「精度管理」調査として、昨年度実施したアンケート調査結果から小班で検討した結果、手足口病と細菌性赤痢について検討するたたき台を作成した。

(倫理面への配慮)

ヒト検体は取り扱わない。

### 3. 研究結果・考察

1) 体制小班：感染症検査の結果は定性的で、数字で表さない。また検査対象不明病原体の検査が頻繁に行われている等から、「精度」ではなく、外部「品質保証、信頼性評価、検査の質、ないし検査の質の優良性評価」といった表現がのぞましい。外部「精度管理」と内部「精度管理」調査そして研修の一体化については良い考えとされた。外部「精度管理」調査の運営組織と実施組織は、継続的に実施可能な組織で、予算と人員があることが前提で、運営組織は地全協と感染研（と厚労省）の合同委員会、実施組織には感染研という意見が多かった。

2) ウイルス小班シーケンス調査：シーケンス配列の読み違いやプライマー配列を外さずに系統解析が行われており、研修の必要性が考えられた。トラブルシューティング研修は、討論を通して問題点の気づきにつながり、参加者からは好評であった。参加者が多い場合の検討が必要である。またフォローアップ調査で、職場や関連部署でも内容が紹介され波及効果があった。一部では経験者が減り、基礎的な実験手技の継承や新規配属職員への研修も不十分と思われた。

3) 細菌小班：昨年度の外部「精度管理」調査は配付試料の妥当性評価が困難で、実施前の検討がより必要と考えられた。コレラ菌調査は、三種類のコレラ菌を配付して同定検査した結果、1問は72機関、2は66機関、3は74機関全部が正答で、おおむね良好な結果であった。生菌の発送や輸送配付手続きと実施、菌の定義の確認および作成した書類は今後の参考資料となる。

4) 今後の外部「精度管理」調査案：手足口病と細菌性赤痢のたたき台を作成し、意見照会した。今後、実施する機会が得られれば、さらに検討して、実施案をまとめ調査を行い評価したい。

### 6. 結論

地研の感染症検査に係わる外部「精度管理」調査は実際に有意義でかつ地研の人材育成にも役立った。地研の検査機能と質を維持向上させるためには、継続実施を可能とする運営および実施組織、予算、人員が必要不可欠である。外部「精度管理」調査の内容については今後さらに検討していくこと、さらに臨床検体からの病原体の分離同定をテーマとした調査が必要である。外部「精度管理」調査と内部「精度管理」支援調査そしてトラブルシューティング研修を一体となって実施することで、感染症検査の質確保と地研の抱える技術的問題解決に役立つと考える。

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)

1. 研究代表者: 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)
2. 研究分担者: (地全協精度管理部会、感染研レファレンス委員会等)

## 背景

- 地衛研の定員・予算の削減→技術低下による検査精度の維持困難
- 検査技術の高度化・機器の進歩→検査技術の維持困難
- 健康危機管理体制における病原微生物検査技術の維持向上は不可欠
- 感染症法に関連する感染症診断検査には精度管理の仕組みがない
- 地衛研の検査水準の確保、健康危機管理体制の維持、地衛研の人材育成に役立てる(さらに、感染症発生動向調査、地衛研-感染研のネットワークの維持にも役立てる)

## 研究目的

- 地方衛生研究所の微生物検査の技術水準を維持・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、地衛研全国協議会が主体となって、継続的に実施することの体制整備・構築およびその妥当性評価を目的。

## H26、27年度の研究成果の概要

1. 地衛研の感染症に関する精度管理の実態についてのアンケート調査  
→全79地衛研から回答。現状の把握。
2. ウイルス小班とWGで外部精度管理等を実施(ウイルス24名)  
→ノロウイルスのリアルタイムPCRで実施。59地衛研の参加。  
→シーケンス・系統樹解析の調査実施、62地衛研参加。  
→リアルタイムPCRのトラブルシューティング研修実施、10地衛研参加。  
→手足口病の調査案の作成
3. 細菌小班とWGで外部精度管理等を実施(細菌17名)  
→サルモネラ属菌分離同定について実施。11地衛研参加。  
→コレラ菌の調査実施、74地衛研参加。  
→赤痢菌の調査案の作成
4. 外部精度管理実施要綱(案)の作成から提言(体制13名)  
→これまで地衛研で行ってきた研究資料を収集し、素案の作成を行った。  
→研究班参加者に意見照会し概要をまとめた。
5. 参加者へのご意見照会(全53名)  
→1)体制・調査等、2)新人教育研修、3)手足口病や細菌性赤痢調査検討項目

## 検 討 課 題 (20150401)

改変20160201

地衛研で行う検査技術およびその正確性を維持・向上させるためには、外部「精度管理」、内部「精度管理」支援、研修の3つを関連・一体化させた導入が役立ち、人材育成に役立てる。

- 1) 外部「精度管理」は、第三者機関により他の地衛研との(検査レベルの)比較を目的とし、地衛研の検査の質評価(EQA)。
- 2) 内部「精度管理」を支援し、個々の地衛研で検査結果の再現性を担保できるようにする。迅速検査が導入され必要性増加。
- 3) トラブルシューティング研修は、検査担当者の気づき、知識・技術の補完と問題解決能力を向上させ、検査能力を高め、人材育成に役立てる。
  
- いわゆるEQA(外部による質保証)には、a.特化した試験(第三者機関が作成した試験品を用いて、検査のプロセスごと(核酸抽出技術他)を評価する方法、あるいは特定の病原体の検査技術を評価で対応可)、b.ブラインドテスト(難しい)、c.検体提出による方法も可能。

3

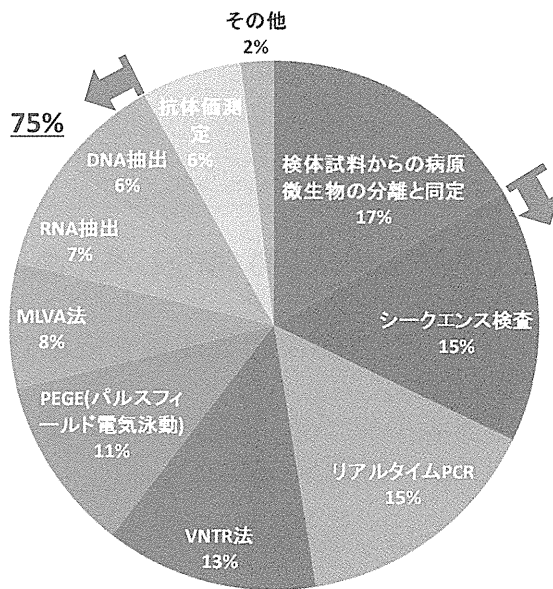
### 問6 地衛研が検査可能な(している)感染症対象疾患

地衛研のおよそ80%以上ができる感染症を「順に」下記にリスト、数字は2013年検査数  
 \* 一類、二類、指定感染症および鳥・季節性インフルエンザを除く

<p>&lt;ウイルス&gt;</p> <p>四 ウエストナイル熱 902</p> <p style="padding-left: 20px;">A型肝炎 157</p> <p style="padding-left: 20px;">重症熱性血小板減少症候群 54</p> <p style="padding-left: 20px;">デング熱 372</p> <p>五 後天性免疫不全症候群 18,532</p> <p style="padding-left: 20px;"><u>先天性風しん症候群</u> 169</p> <p style="padding-left: 20px;"><u>風しん</u> 3,766</p> <p style="padding-left: 20px;"><u>麻疹</u> 3,421</p> <p>五 RSウイルス感染症 2,107</p> <p>定 咽頭結膜熱 2,327</p> <p style="padding-left: 20px;">感染性胃腸炎 13,436</p> <p style="padding-left: 20px;">手足口病 3,401</p> <p style="padding-left: 20px;">ヘルパンギーナ 2,049</p> <p style="padding-left: 20px;">流行性耳下腺炎 264</p> <p style="padding-left: 20px;">急性出血性結膜炎 116</p> <p style="padding-left: 20px;">流行性角結膜炎 595</p> <p style="padding-left: 20px;">感染性胃腸炎(病原体がロタウイルスであるものに限る) 1,148</p> <p style="padding-left: 20px;">無菌性髄膜炎 1,976</p>	<p>&lt;細菌&gt;</p> <p>三 コレラ 351</p> <p style="padding-left: 20px;">細菌性赤痢 1,045</p> <p style="padding-left: 20px;">腸管出血性大腸菌感染症 9,983</p> <p style="padding-left: 20px;">腸チフス 800</p> <p style="padding-left: 20px;">パラチフス 692</p> <p>四 <u>レジオネラ症</u> 806</p> <p>五 A群溶血性レンサ球菌咽頭炎 990</p> <p>&lt;リケッチャ&gt;</p> <p style="padding-left: 20px;">つつが虫 211</p> <p style="padding-left: 20px;">日本紅斑熱 211</p>
--	--

4

## 問8 外部精度管理が必要と思われる検査の方法・技術



(その他)  
IS-printing System,  
コンベンショナルPCR,  
LAMP,  
電子顕微鏡検査,  
結核:QFT検査,  
薬剤感受性試験,  
遺伝子抽出からPCRまでをトータルで

### 迅速検査の導入

1)ゲノムないし分子生物学的検査手技(75%)、2)病原体の分離同定(17%)、  
そして3) 抗体価測定(6%)の3つがあげられた  
→分子生物学的技術は、技能試験(PT)としても重要

5

## ウイルス小班(20150520) アンケートの回答結果および小班会議結果まとめ

- 対象感染症について(ウイルス)  
→(3位以内の集計)デング熱7, 手足口病5, 無菌性髄膜炎4、感染性胃腸炎3
- 検査技術(ウイルス)  
→ シーケンスと樹状解析 4、リアルタイムPCR 4

## 細菌小班(20150529) アンケートの回答結果および小班会議結果まとめ

- 対象感染症について(細菌)  
→1)細菌性赤痢7、2)EHEC6、3)コレラ4、4)チフス3
- 検査技術(細菌)  
→1)疫学的解析法(IS-printing, MLVAなど)6  
2)リアルタイムPCR5 3)シーケンスと樹状解析5 4)分離3、ほか

6