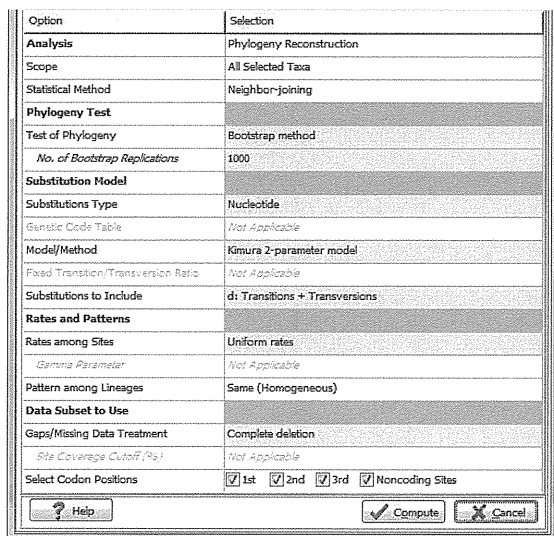
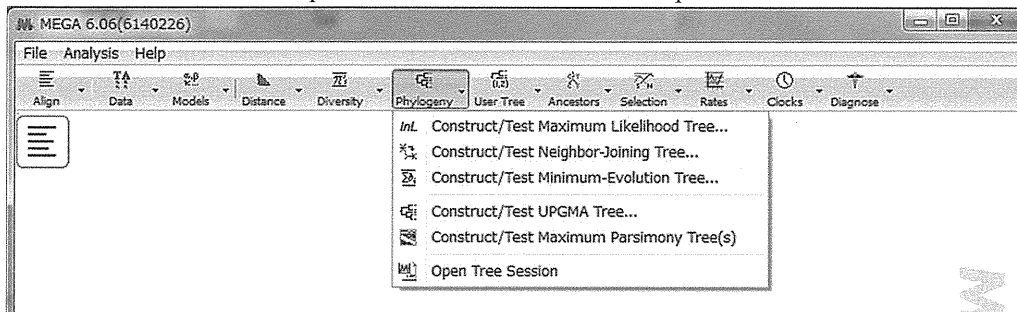


5. 分子系統樹解析 —MEGA6 による NJ 法での系統樹作成—

分子系統樹解析は、MEGA (<http://www.megasoftware.net/>)あるいは市販のソフトウェア (例: GENETYX など)やインターネット上に公開されている Clustal W (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/top-j.html>)などを使用し、得られた試料の塩基配列とともに配布した参照株の塩基配列のアライメントを行ったのち、近隣結合法 (Neighbor-joining 法, NJ 法)によって分子系統樹を作成する。ここでは MEGA による NJ 法による系統樹作成方法を紹介する。なお、前バージョンの MEGA5 で解析を行うことも可能である。

- 1) シークエンス解析で得られた塩基配列が相補的であることを、MEGA6 を用いて確認する。
- 2) 検出された塩基配列と Genbank に登録してある既知の塩基配列データ (リファレンス株)をまとめたファイル (FASTA 形式ファイル)を作成する。
- 3) MEGA あるいは DDBJ のホームページ (<http://www.ddbj.nig.ac.jp/>)から、Clustal W を用い、アライメントを行う。
- 4) 「Data」 → 「Phylogenetic analysis」を行う。
- 5) メイン画面「phylogeny」 → 「Construct/Test Neighbor Joining Tree」を選ぶ。
- 6) Test of Phylogeny – Bootstrap Method
No. of Bootstrap Replications – 1000
Model/Method – Kimura 2 – parameter model を選択し、Compute をクリックする



- 7) Tree Explorer で分子系統樹が表示される。リファレンス株とのクラスターの位置を基に供試株の genotype を推定する。

6. 解析結果の送付

解析結果は、解析データファイルに、以下のデータを入力する。

1. FASTA 形式による塩基配列
2. BLAST 検索による塩基およびアミノ酸配列の相同解析結果(最も相同性が高い参照株名も入力する)。

なお、解析株および配布参照株の塩基配列を基とした NJ 法による分子系統樹は、PDF ファイルに変換後、メ

別添資料 3

ールにて別途送付する (送付期限：平成27年11月27日必着)。

解析結果送付先

国立感染症研究所 感染症疫学センター第6室 木村 博一
データ一式を下記の2つのメールアドレスに送付すること。

送付先: kimhiro@nih.go.jp および adpa2753@nih.go.jp

なお、不明な点は、メールあるいは下記電話番号にて問い合わせしてください。

TEL: 042-748-7133(直通)

測定結果記入用(例)

別添

施設名 A 研究所

判定結果

推定genotype	GII.1
推定理由	系統樹、BLASTを総合的に判断

塩基配列

>A研究所

ATTCTCTGACCTCAGCACATGGGAGGGCGATCGCAATCTTGCTCCCGAAGGTGTGAATGAAG
 ATGGCGTCAATGACGCTACCCCATCTGATGATGGTGCAGCCGGCCTCGTACCAGAGATCAA
 CAGTGAGGTTATGGCTCTTGAACCCGTGCTGGGGCCTCCATTGCAGCCCCCGTAGTCGGC
 CAACAGAATATAATTGATCCCTGGATTAGAAATAATTTTGTACAAGCCCCTGCTGGTGAATTCA
 CAGTTTCCCCTAGAACTCTCCTGGAGAACTTCTACTTGATTTGGAATTGGGTCCTGAACTTAA

精度高く解読できた塩基数 (QV20以上など精度高く解読できた塩基数)	COG2F	201-300
	G2-SKR	201-300

BLAST解析結果

	最も相同性が高い参照株名	相同性
塩基	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US.(M87661)	99%
アミノ酸	Hu/NoV/GI.1/Norwalk/1968/US.(M87661)	99%

測定条件

PCR産物精製試薬※	QIAquick PCR Purification Kit (切り出し精製を実施)		
シーケンスPCR試薬	BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit		
反応容量※※	10 μL		
その他追記事項			
反応プログラム	°C	秒	25 サイクル
	96°C	60秒	
	96°C	10秒	
	50°C	5秒	
	60°C	240秒	
シーケンスPCR産物精製試薬	AutoSeq G-50		

※電気泳動後に切り出し精製を行っている場合には括弧にその頻度を記入

※※試薬を希釈するなど試薬を組み合わせで行っている場合には、その他へ記入してください。

測定機器

測定機種	Applied Biosystems 3130 Genetic Analyzer
シーケンスの陽性コントロールの有無	無

その他

検査に要した時間	10 時間
----------	-------

備考<ご意見等ご記入ください>

--

別添資料5

ウイルス検査精度管理実施後アンケート

機関名・担当者名(記入者名)・職名

精度管理への対応

Q1 検査に要した時間

	回答	
	およそ	時間

Q2 検査の分担

① 分担して行った ② 分担しなかった(Q3は回答不要) ③ その他*	回答	
()		

Q3 検査を分担した理由

	回答	

Q4 検査結果の最終確認者について

Q4-1 最終確認者

① 部署長(係長など) ② 同じ部署の同僚職員 ③ 確認者なし ④ その他	回答	
()		

Q4-2 確認方法

① 捺印のみ ② 最終結果の報告のみ ③ 生データを見せて討議 ④ その他*	回答	
()		

精度管理全般

Q5 今回の精度管理は担当者一人の業務量として時間的に適切か。

① 適切 ② 多い ③ 少ない ④ その他*	回答	
()		

Q6 最も精度管理が必要な検査はどれか。

① シークエンス ② リアルタイムPCR ③ その他*	回答	
()		

Q7 特に精度管理が必要と思われる分野はどれか。

① 感染症 ② 食中毒 ③ その他*	回答	
()		

Q8 特に精度管理が必要と思われるウイルスは何か。

	回答	
()		

Q9 精度管理を行う時期はいつ頃が良いか。

① 4-6月 ② 7-9月 ③ 10-12月 ④ 1-3月	回答	
()		

Q10 精度管理を行う頻度はどれくらいが良いか。

① 1回/年 ② 2回/年 ③ その他*	回答	
()		

Q11 その他

※コメントを自由を記入してください。

* 選択した場合には、記入例を参考にして、内容を記入してください。

内部精度管理に関するアンケート'

機関名・担当者名(記入者名)・職名

測定機器(シークエンサー)

Q1	測定機器名		回答 機種名 メーカー
Q2	購入日	① 1年以内 ② 3年以内 ③ その他*	回答 ()
Q3	定期点検	① 行っている* ② 行っていない	回答 ()
Q4	使用キャピラリー	① 36cm ② 50cm ③ その他*	回答 ()
Q5	キャピラリー交換頻度	① 100 run ② 200 run ③ その他*	回答 ()
Q6	使用時点検について		
	Q6-1 緩衝液の交換頻度	① 検査毎に毎回交換 ② 数回の検査毎に交換* ③ その他*	回答 ()
	Q6-2 緩衝液の使用期限 (②の場合、許容する期間 についても記載してくださ い)	① 使用期限内のみ ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* ③ その他*	回答 ()
	Q6-3 ポリマーの交換頻度	① 1週間毎 ② 残液が少なくなってきたら ③ その他*	回答 ()
	Q6-4 ポリマーの使用期限 (②の場合、許容する期間 についても記載してくださ い)	① 使用期限内のみ ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* ③ その他*	回答 ()
Q7	点検記録	① 記録簿があり、いつ・何をしたかを把握している ② 把握していない ③ その他*	回答 ()
Q8	取り扱い説明書	① 読んだことがあり、ほぼ理解している ② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 ③ 読んだことがない。 ④ その他*	回答 ()

Q9 機器使用時のルール・マニュアル ① 施設内で統一され、文書化されている。
 ② ある程度施設内で統一されているが、文書化はされていない
 ③ 統一されていない。 回答 ()
 ④ その他* _____

試薬

Q10 シークエンス反応試薬について

Q10-1 反応試薬 ① BigDye® Terminator v3.1(Applied Biosystems) 回答 ()
 ② BigDye® Terminator v1.1(Applied Biosystems) 試薬名
 ③ その他* メーカー _____

Q10-2 反応容量 ① 20µl
 ② 10µl 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-3 保存温度 ① -20 ~ -30℃
 ② -80℃ 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-4 保存方法 ① 1回分毎に分注して保存
 ② 数回分毎に分注して保存 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-5 凍結融解 ① 1回のみ
 ② 3回程度までは使用 回答 ()
 ③ その他* _____

Q10-6 使用期限 ① 使用期限内のみ
 ((2)の場合、許容する期間 ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* 回答 ()
 についても記載してください) ③ その他* _____

Q10-7 試薬の説明書 ① 読んだことがあり、ほぼ理解している
 ② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 回答 ()
 ③ 読んだことがない。 _____
 ④ その他* _____

Q11 PCR産物精製法について

Q11-1 使用キット ① QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) 回答 ()
 ② Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) 試薬名
 ③ その他* メーカー _____

Q11-2 使用期限 ① 使用期限内のみ
 ((2)の場合、許容する期間 ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* 回答 ()
 についても記載してください) ③ その他* _____

Q11-3 キットの説明書 ① 読んだことがあり、ほぼ理解している
 ② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 回答 ()
 ③ 読んだことがない。 _____
 ④ その他* _____

Q12 シークエンスPCR産物精製について

Q12-1 使用キット ① BigDye® XTerminator™ Purification Kit (Applied Biosystems) 回答 ()
② AutoSeq G-50 (GEヘルスケアバイオサイエンス) 試薬名
③ その他* メーカー

Q12-2 使用期限 ① 使用期限内のみ
(②の場合、許容する期間 ② 使用期限が切れたものも使用する事がある* 回答
についても記載してください) ③ その他* ()

Q12-3 キットの説明書 ① 読んだことがあり、ほぼ理解している
② 読んだことはあるが、あまり理解していない。 回答
③ 読んだことがない。 ()
④ その他*

Q13 検査毎のシークエンス用 ① 毎回行っている*
陽性コントロールの確認 ② とどきき行う(2-5回の測定に1回) 回答
③ 行っていない ()

Q14 シークエンス反応・精製の ① 施設内で統一され、文書化されている。
手順 ② 施設内で統一されたものはあるが、文書化はされていない。
③ 統一されたものはない 回答
④ その他* ()

シークエンス解析

Q15 アライメント用ソフト ① MEGA
② Genetyx 回答
③ その他* ()

Q16 系統樹作成ソフト ① MEGA
② Genetyx 回答
③ その他* ()

シークエンス検査体制

Q17 シークエンス検査ができる ① 1名のみ
人数 ② 2名以上 回答
③ その他* ()

Q18 系統樹作成ができる人数 ① 1名のみ
② 2名以上 回答
③ その他* ()

Q19 シークエンサーの1年間の ① 100検体以下
検体数※ ② 101~200検体 回答
③ 200検体以上 ()
※ForwardとReverseの一組で1検体とし、
VNTRなど塩基配列を決定しないは含まない

精度管理全般について

Q20 その他 ※精度管理に対してのコメントを自由を記入してください。

* 選択した場合には、記入例を参考にして、内容を記入してください。

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

研究協力者	小渕 正次、佐多徹太郎	富山県衛生研究所
	貞升 健志	東京都健康安全研究センター
	塚越 博之	群馬県衛生環境研究所
	水越 文徳	栃木県保健環境センター
	長澤 耕男	国立感染症研究所
研究分担者	木村 博一	国立感染症研究所

研究要旨 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。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。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。

A. 研究目的

昨年度、本研究班でノロウイルス (NoV) の模擬検体を用いた定量リアルタイム PCR 法に関する外部精度管理調査を実施した。その結果、測定値3つのいずれも判定基準値外となった機関が参加59機関中10機関、測定値2つが判定基準値外だった機関が3機関、測定値1つが判定基準値外だったところは7機関であった。

調査後の追加アンケートの結果から、各機関における試薬や標準曲線作成用標準物質の保存条件や使用方法は多種多様であり、それが判定基準から外れた原因の一つと考えられた。実際に、参加機関の中には試薬や標準物質の管理の見直しを図ったところもみられた。一方で、明確なトラブルシューティングに至らなかった機関や改善すべき点が不明で、トラブルシューティングの解

説がほしいとの意見も寄せられた。そこで、昨年度の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。

B. 研究方法

昨年度の外部精度管理調査参加機関から、判定基準に基づいてA～Cの3群に分類し、各群より無作為に選んだ10機関を研修の対象とした。すなわち、A群(3つ全ての測定値が判定基準外の機関)10機関から4機関、B群(1つの測定値のみが判定基準外の機関)8機関から4機関、C群(3つ全ての測定値が判定基準内の機関)38機関から2機関とした。参加の可否について個別に訊いたところ快諾を得た(資料1)。

On the Job Training (OJT)を模したトラブルシューティング研修として、第1日目はA～C群が均等になるように、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、先ずグループミーティング形式でトラブルシューティングを行った。事前にパワーポイントのプレゼンファイル(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、新規配付標準物質の測定結果等の自由記載)を参加者に配付し(資料2-a,b)、必要事項を記入後に返送してもらった。当日、それを配布資料とするとともに、参加者は各自のパワーポイントを発表した。これにより、グループ内で問題点を抽出し、原因や対処法を議論しながら、ファシリテーターがホワイトボードにトラブルシューティングをまとめた(資料3-a,b)。同時に、参加者はワークシート(資料4)を用いて、グループミーティングのなかで各自のトラブルシューティングを作成した。次いで、参加者および担当者全員が集まり、各グループの代表がホワイトボードのまとめを発表し、全員で議論してトラブルシューティング集(資料5)を作成した。

第2日目はラボ実習と講義を行った。研修担当者2名がリアルタイムPCRの標準曲線作成の模範例と手技的失敗例について質疑応答を交えながらデモを行い、一部参加者も標準物質の希釈調製法を体験した。測定結果の解説時に、ピペッターの不具合や不適切な操作の標準曲線に及ぼす影響についての検討事例も紹介した(資料6)。講義では、リアルタイムPCR法の原理、解析のポイントや試薬の保存管理に関する注意点などの基礎講座を実施した(資料7)。参加者は実習・講義を通して気づいた点をワークシートにさらに追記して自身のトラブルシューティングを完成させた。

第1日目および2日目終了時に、今回の研修と職場での復命などに関するアンケート調査を行った(資料8-a,b)。さらに、研修1か月後に参加者へトラブルシューティング集と参加者のワークシートまとめを個別に送付して、研修後約2か月半の間に研修内容の理解度や職場での対応状況を中心にフォローアップ調査を行った(資料9参照)。

さらに、新規配属職員(新人)のOJTと教育研修に関して、本研究班参加者を対象としてアンケート調査を行い、研究班内の意見を集約した(資料10)。

今回作成し配付した様式等の書類は、トラブルシューティング研修案内申込書(資料1)、プレゼンファイル(6ページ、資料2)、各自の回答シート様式(資料3)、研修プログラム(資料10)、ワークシート(資料4)、トラブルシューティング集(資料5)、ワークシートまとめ(資料9参照)、研修参加者へのアンケート用紙(第1日目および第2日目)(資料8-a,b参照)、本研究班参加者へのアンケート(資料13参照)である。

(倫理面への配慮)

本研究ではヒト検体ならびに個人情報を取り扱わない。

C. 研究結果

平成27年9月10日午後から11日15時までの日程で、国立感染症研究所村山庁舎講義室ならびに実習室にて研修を実施した。研修担当者打合せ会議(平成27年7月28日、国立感染症研究所村山庁舎)やメール等により、1)シナリオの作成(資料11-a,b,c)、2)参加者の昨年度調査結果における問題点や解決方法の指摘(資料12)を事前に行って担当者間で意見統一を図ったため、研修はほぼ予定通り実施できた。2)の担当者指摘事項は参加者各自のワークシートまとめにも参照として載せた。

研修後のアンケート調査(資料8-a,b)より、参加者からはグループミーティングでは他機関の様子がわかり、参加者同士の話し合いができたことがよかったという声が寄せられた。また、多くの質問と討論を通して、昨年度の調査結果に対する疑問の解消につながり、戻ってすぐにも試してみたいという意見が多かった。一方で、グループミーティングの時間がやや足りなかったと感じた参加者もいた。また、研修後のフォローアップ調査では(資料9)、復命等により職場や関連部署でも研修内容が紹介され、今回の研修が職場でのOJTに役立つと期待できる効果も得られた。今後の研修については、

今回のように7~9月の時期に2~3日の期間で実施して欲しいとの要望が多かった。また、研修内容は講義と実習の両方がよいという意見が多数を占めた。

参加者の所属状況を分析した結果、いずれの機関もNoVリアルタイムPCRができる職員が3名以上いるものの、その中の地衛研での職歴最長者が10年以上の機関は半数にとどまっておらず、5年以下も2機関あった。最長者のなかには国立保健医療科学院主催の「短期研修ウイルスコース」や「新興再興感染症技術研修」の受講歴がない職員もいた。検査、結果確認、最終判断を別々の職員が行っているところは6機関で、残り4機関は行っていなかった。最終判断者がNoVリアルタイムPCR検査可能なところは2機関にとどまった。さらに、新人等未経験者に対する職場での検査手技のOJTについては、1人で出来るまで先輩等が共同して行う機関がほとんどであったが、最初だけ教えるというところも1機関あった。これに関連して、本研究班参加者にアンケート調査(資料13)を行った結果、上述のように1対1のOJTにより検査指導するものの、教育研修に関する取り決めはないとの回答が多かった。さらに、そういった研修の機会が必要と感じているが、研修内容がトレーナーによって決まってしまうのはよくないので、研修マニュアル等があるとよいとの回答が寄せられた。

D. 考察

地衛研技術職員を対象としたウイルス検査の技術研修として、「短期研修ウイルスコース」や「新興再興感染症技術研修」が隔年で実施されている。これら研修では30名ほどの参加者数であるが、今回の研修ではグループミーティング形式を取り入れたことにより参加者は10名と少数で、しかも2グループに分かれて実施した。また、参加者同士の討論によってトラブルシューティングできるように、昨年度測定値の分類群A~C全てが入るグループ構成とした。これにより、参加者が受身にならずに積極的に意見交換する研修となり、職場に戻ってからのトラブルシューティングが期待できた。しかしながら、このような形式の研修を希望者全員に

対して行うとなると、予算、人員、準備などや効果の面も含めて、難しい点が多々あるかと思われた。今後、どのようにこの研修方法を活用するか検討が必要である。

現在、リアルタイムPCR法はウイルス検査には不可欠な遺伝子検出技術となっている。今回のトラブルシューティング研修において、参加者の発表・意見、感想などから、試薬や標準物質の管理・使用法、反応液の混合・希釈・分注といった調製法、微量ピペッターやチップの使い方などの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様々なトラブルに関係していたことが判明した。基本的知識・経験不足の一因として、職場では若手担当者が多くなり、OJTを担う経験豊富な中堅以上の職員が減少していることがあげられる。本研究班参加者へのアンケート調査結果からも、地衛研における新人職員の教育研修が検査の質確保において重要な課題であることが明らかになった。教育研修の実施機関、研修内容、研修マニュアルの作成や研修トレーナーの研修など検討すべきことは多い。

E. 結論

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。したがって、今後は新人の教育研修が検討課題になると思われる。

F. 研究発表

- 1) 論文発表
なし
- 2) 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・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

平成 27 年 8 月 13 日

〇〇衛生研究所 所長 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会
厚生労働科学研究「精度管理研究」班
研究代表者 佐多徹太郎
(富山県衛生研究所長)

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会について (ご案内)

平素より全国地研協議会の活動にご協力いただきありがとうございます。

昨年度に実施しました「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 (研究代表者 佐多徹太郎)」に係るリアルタイム RT-PCR 法によるノロウイルス遺伝子定量について、本年度は下記および別紙プログラムのとおり検査の質確保および人材育成のための研修会を開催いたします。

つきましては、貴所施設で外部精度管理 (ウイルス検査) を担当された方の本研修会への参加をご配慮くださいますようお願いいたします。

なお、参加者には本研究班より旅費が全額支給されます。

記

1. 実施項目：外部精度管理実施後研修会 (ウイルス検査)
2. 開催日時：平成 27 年 9 月 10、11 日
3. 参加申込：平成 27 年 8 月 20 日締め切り
4. 参加申込先：厚生労働科学研究「精度管理研究」班 ウイルス小班 研修 WG

富山県衛生研究所 ウイルス部 小渕正次

〒939-0363 富山県射水市南太閤山 17-1

電話 0766-56-8143 (直通) FAX 0766-56-7326

メールアドレス:masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp

平成 27 年 8 月 13 日

〇〇衛生研究所
ウイルス検査担当者 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会
厚生労働科学研究「精度管理研究」班
研究代表者 佐多徹太郎
(富山県衛生研究所長)

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会について (ご案内)

平素より全国地研協議会の活動にご協力いただきありがとうございます。

昨年度に実施しました「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(研究代表者 佐多徹太郎)」に係るリアルタイムRT-PCR法によるノロウイルス遺伝子定量について、本年度は下記および別紙プログラムのとおり検査の質確保および人材育成のための研修会を開催いたします。

つきましては、貴部署で外部精度管理(ウイルス検査)を担当された方の本研修会への参加をご配慮くださいますようお願いいたします。

なお、参加者には本研究班より旅費が全額支給されます。

記

1. 実施項目：外部精度管理実施後研修会(ウイルス検査)
2. 開催日時：平成 27 年 9 月 10、11 日
3. 参加申込：平成 27 年 8 月 20 日締め切り
4. 参加申込先：厚生労働科学研究「精度管理研究」班 ウイルス小班 研修 WG

富山県衛生研究所 ウイルス部 小渕正次

〒939-0363 富山県射水市南太閤山 17-1

電話 0766-56-8143 (直通) FAX 0766-56-7326

メールアドレス:masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp

資料 1-b

平成 27 年度 外部精度管理実施後研修会（ウイルス検査）プログラム

日時：9月10日（木）13：30～17：00

9月11日（金）9：00～15：00

場所：国立感染症研究所村山庁舎 講義室および実習室（6号棟6階）

内容：On the job training を模したグループミーティング形式で、ノロウイルスリアルタイム PCR のトラブルシューティングを行う。さらに、実習を通して問題が解決できたかを確認する。

第1日目

13：30～17：00

講義室

- ・開会の挨拶（研究代表者、富山県衛生研究所：佐多）
- ・リアルタイム PCR のトラブルシューティング：グループミーティング、全体討論（富山県衛生研究所：小淵、東京都健康安全研究センター：貞升）
- ・研修後アンケート

第2日目

9：00～10：30

実習室

- ・リアルタイム PCR 実習：模範例および手技的失敗例のデモ（群馬県衛生環境研究所：塚越、栃木県保健環境センター：水越）

10：30～12：00

講義室

- ・リアルタイム PCR 基礎講座：講義（国立感染症研究所：木村）

13：00～15：00

講義室

- ・結果の解析：解説（群馬県衛生環境研究所：塚越、栃木県保健環境センター：水越）
- ・総括（富山県衛生研究所：小淵）
- ・閉会の挨拶（国立感染症研究所：木村）

資料 1-b

※研修参加予定者には、事前課題として研修プレゼンファイル（パワーポイント）をお送りします。ファイルは資料として研修第 1 日目に参加者全員に配布しますので、研修 1 週間前までに作成して小渕までご返送ください。

※尚、研修結果は研究班報告書として、参加者と施設名は匿名でまとめさせていただきます。

研修参加予定機関

平成 26 年度外部精度管理（ノロウイルスリアルタイム PCR）参加機関から、判定結果に基づいて選出された代表 10 機関

研修担当（ウイルス小班の研修 WG に属する研究分担者および協力者）

小渕 正次（富山県衛生研究所）
貞升 健志（東京都健康安全研究センター）
塚越 博之（群馬県衛生環境研究所）
水越 文徳（栃木県保健環境センター）
木村 博一（国立感染症研究所）
長澤 耕男（国立感染症研究所）
佐多 徹太郎（富山県衛生研究所）

問合せ先

富山県衛生研究所 ウイルス部 小渕 正次
〒939-0363 富山県射水市南太閤山 17-1
電話 0766-56-8143（直通）
メールアドレス:masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp

平成27年度 外部精度管理実施後研修会（ウイルス検査）参加申込書

参加する 参加しない (○印をお願いします)

貴所施設名： _____

参加者氏名	所属	住所	連絡先 (メール、TEL)
			メール:
			TEL:

FAX (0766-56-7326) またはメール (masatsugu.obuchi@pref.toyama.lg.jp) にて、富山県衛生研究所ウイルス部 小渕までご回答願います。

微生物検査を行う係の構成メンバーを職名で記入してください。回答者のセルは黄色で塗りつぶしてください。

受講したことのある研修に○を入れてください。

年齢をプルダウンメニューから選んでください。

ノロウイルスのリアルタイムPCRが単独で実施可能な者に○を入れてください。

構成 (職名)	年齢	衛研 経験 年数	研修受講歴				検査体制		
			ウイルス コース	新興再興 (ウイルス)	細菌 コース	新興再興 (細菌)	担当検査	ノロウイルス リアルタイム PCR実施可 能	前年度の精 度管理での 対応・役割
係長	50代	10年以上			○		細菌		結果の最終判断
主幹	40代	5年以下	検査の担当を選んでください。				細菌		
主任	30代	10年以上	○				ウイルス	○	検査結果確認
技師	20代	5年以下	○	○			ウイルス	○	検査
技師	20代	5年以下	○	○			両方	○	
技師	20代	5年以下			○		細菌		
			衛研での通算の経験年数を選んでください。						
感染症 検体数	細菌	101-200	担当者(所属)		塚越博之(群馬県衛生環境研究所)				
	ウイルス	201-400	連絡先(メール、電話)		tsuka-hiro@pref.gunma.lg.jp		027-232-4881		
検査未経験者に対する研修			研修方法:一通りの検査が出来るようになるまで先輩と共同して検査を行う						

平成26年度の感染症検体の数を選んでください。

職場で新人に対応する場合の指導方法を記入してください。

平成26年度に行った精度管理への対応について、役割を記入してください。

ノロウイルスリアルタイムPCR トラブルシューティング(Aグループ)

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
●希釈通りの Ct値でない	◆標準物質(PC)の劣化	■新たに配付(サイクルコピー数を記載、モニタリング)
●検出限界以下(10^{-10^2} コピー)が出ない	◆標準物質(PC)の劣化	■10コピーDNAは1/2程度の検出率 ■Ct値:10サイクル3.3を目安 ■ 10^3 コピーで30サイクルが目安 ■ 10^7 コピーで17-18サイクル
●Ct値が高め(ないし低め)に外れている	◆技術的問題(人、試薬、測定機器) ◆ピペッター採取量、精度 ◆凍結融解の回数(プライマープローブも) ◆プライマーの劣化 ◆測定機器の故障(潜在的で気づかない)	■定期点検(保守) ■メンテだけで無く自分の目を大事に ■全ウエルで一定濃度を測定(一定濃度とはどれくらい?) ■計画的にメンテする

H27年度外部精度管理実施後研修会グループミーティング・ワークシート 機関名:

トラブル	考えられる原因	解決のための処置

ノロウイルスリアルタイムPCR トラブルシューティング集

トラブル	考えられる原因	解決のための処置
●陰性コントロールのウェルが陽性になる	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質のコンタミネーションによるピペッター、チューブ類の汚染 ◆標準物質のコンタミネーションによる試薬類の汚染 	<ul style="list-style-type: none"> ■ピペッター、チューブ類、試薬類の交換(汚染物質の除去) ■実験室レイアウトや動線の見直し(試薬調製と標準物質の添加を別室で行うなど汚染物質を持ち込まない) ■作業工程の見直し(反応液→検体サンプル→標準物質の順で調製) ■作業工程ごとに専用のピペッター、チューブ類を使用 ■同一安全キャビネット内で全操作を行う場合は十分なUV照射 ■オートクレーブの使い分け(試薬調製用と汚物用) ■標準物質や検体由来核酸の分取・分注時は安全キャビネットのファンを止める(エアロゾル発生防止)
●低濃度(10コピーや10 ² コピーDNA)の標準物質が検出不能	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の氷冷
●標準曲線の傾きが急(各希釈のCt値の間隔が3.3以上)	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆溶液の温度上昇による標準物質の分解 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■標準物質希釈液の氷冷
●標準物質のCt値が低め、あるいは高め(濃度が理論値とは異なる)	<ul style="list-style-type: none"> ◆標準物質の劣化 ◆試薬類の管理が不適切(反応試薬、プライマー&プローブ) ◆不適切なピペット操作による希釈の誤差 ◆濃度計算ミス 	<ul style="list-style-type: none"> ■標準物質、試薬類の管理の見直し(保管温度、使用期限、凍結融解回避のための小分け分注保存) ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈の各段階でチップを交換(キャリーオーバー防止) ■作業記録をつける(ダブルチェック)
●標準物質間(GIとGII)でCt値に差	<ul style="list-style-type: none"> ◆プライマー・プローブの劣化 ◆プライマー・プローブレミックスの劣化 	<ul style="list-style-type: none"> ■新たに合成したプライマー・プローブの使用 ■試薬の使用期限を順守
●標準物質の測定値がばらつく(相関係数R ² が0.990以下)	<ul style="list-style-type: none"> ◆不適切なピペット操作による試料添加量の誤差 ◆標準物質不適切な希釈操作 ◆測定機器の温度ブロックの汚染 ◆測定機器の不具合 	<ul style="list-style-type: none"> ■ピペット操作の習熟(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する) ■希釈系列の調製時に液の攪拌とスピンドウンを確実に実施(ピペティングはしない) ■測定機器の温度ブロックの清掃 ■測定機器の定期点検の実施