

研修プレゼンファイルに対する研修担当者のコメント

分類	機関	当事者のコメント	研修担当者のコメント
A群	a	・測定機器の不具合、PCの劣化	<ul style="list-style-type: none"> ・PC希釈系列の調製においてはピペティングによる混和は避けること ・陽性コントロールの攪拌はしっかり行うこと、場合によっては複数回実施 ・Ct値の間隔、波形、サンプルの場所などはよく見ておく必要がある ・「-20℃冷凍庫から新しいPCを…」とあるが、PCの保存温度は-80℃が望ましい
	b	<ul style="list-style-type: none"> ・標準物質の希釈→チップ、チューブを低吸着製品へ変更 ・解析→値の外れたものは標準曲線から外す 	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い(GII)→管理に問題あり ・再配布のPCにおいても同一希釈間でCt値に多少のばらつきがみられる→測定チューブ(プレート)への添加に問題あり? ・PCでばらつきがあるということは攪拌に問題がある可能性がある ・新しいPCで判定基準に近づいたが、全体的に低い値になっている。再度、原液から調整すべきと思う
	c	・試料全ての測定値が高い→チューブ、チップが低吸着製品でなかったため(低吸着製品へ変更)。	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い→管理に問題あり ・EQA標準曲線の同一希釈(高い濃度でも)でややばらつき→測定チューブ(プレート)への添加に問題あり? ・再配布のPCにおいて、GI、GIIいずれもCt値が3.32以上離れている希釈ポイントがある→希釈に問題 ・PCのCt値をいくつかの濃度で覚えておくと変化に気がつきやすい ・PCでCt値が高くなってしまうのは、管理、使用方法に問題
	d	・EQAでは小分け分注したPC濃度が2.5倍高かったため、全て低めの測定値となった。	<ul style="list-style-type: none"> ・再配布のPCにおいても同一希釈間でCt値にばらつきがみられる→測定チューブ(プレート)への添加に問題あり? ・リアルタイムPCRではチューブをオートクレーブする必要は無い ・NCの増幅を原因不明としてはいけない ・陽性コントロールを作成する量が多く、作成後の攪拌に注意が必要 ・H11-12だけでなく、H23もNCが陽性になるのなら、コンタミネーションの可能性が高い ・PCを扱う器具や場所を別にする、などの対策を早急にすべきである
B群	e	・EQA実施時に分与されたPCに問題があった	<ul style="list-style-type: none"> ・EQA標準曲線(GII)の10²でCt値にややばらつきあり→希釈あるいは添加に問題 ・陽性コントロールの保存では保存法・使用方法を注意すべきである ・コンタミネーションによる偽陽性を避けるために、PCR反応液の調整をした後に、PCを調整する
	f	<ul style="list-style-type: none"> ・PC: 希釈倍率が高いポイントではCt値にばらつき→ピペティング操作(希釈)に問題 ・PCの劣化 	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い→管理に問題あり ・PCの希釈では陽性コントロールをしっかり攪拌する ・検査の確認を誰かにしてもらっても良かった。他の人がやったデータと比較したことがあるか
	g	・EQAではPC(GII)のCt値が非常に高かった→プライマーの劣化によることが判明(再配布後PCで確認?)→保存方法を変更した	<ul style="list-style-type: none"> ・低い濃度が検出できていないので、試薬、プローブ、プライマーについて確認の必要がある ・作業時の温度が室温であるがどの程度の時間室温になっているのか ・コンタミネーションによる偽陽性を避けるために、陽性コントロールは極力最後に添加すべき
	h	・EQAではGII試料の測定値がいずれも低かった→PCの希釈が不正確	<ul style="list-style-type: none"> ・PCのCt値が高い(GII)→管理に問題あり ・EQAのPC(GII): 10⁷ではCt=18にもかかわらず10³では検出限界→希釈の問題 ・検出限界が低いのは問題があるプローブやプライマーについても見直しが必要 ・10⁶のCt値が十分であるにも関わらず、10²~10³が検出されない。希釈の際に、問題があるのではと思う

「外部精度管理」調査研究班参加者へのアンケート調査 2015.12.2-14

はじめて感染症検査の部署に配属された新人(新規配属職員)のOJTないし教育研修について調査研究班に参加いただいている方の個人的なご意見としてご回答ください

1 最近3年で新人が配属されましたか	1. はい	21
	2. いいえ	4
最近3年間に新人配属が80%にあった		
2 教育研修の担当者(指導者)は何名いますか	0名	1
	1名	4
	2名	12
	3名	2
	4名	3
	5名	1
	11名	1
	6-8名	1
教育研修指導者は2名程度が約半数 2名以上が30%程度		
3 同じ部署にいますか	1. いる	24
	2. 所内の他の部署	0
	空白	1
同じ部署の方が指導者となる		
4 教育研修担当者の検査経験年数を教えてください	5年	1
	6年	1
	10年	1
	20年	5
	22年	1
	24年	1
	25年	2
	30年	1
	32年	1
	2-5年	1
	2-15年	1
	3-10年	1
	3-25年	1
	4-15	1
	8-20年	1
	10-25年	1
	10-30年	2
	15-20年	1
	空白	1
5 教育研修の方法は		
1. 1対1		13
2. 1対複数の指導者		7
3. その他		6
<ul style="list-style-type: none"> ・2種類あります。1つは企画調整課が実施する所内全体の教育研修(2週間程度)。 もうひとつは配属された課の専門業務の研修(1年間)。 ・業務ごとに、業務担当者が指導する。 ・3年以内の職員が4名もおり、教育研修するには無理がある。 ・個別に検査をしながら教えていく。 ・主に1対1でOJTを実施するが、例えば流行予測の手技やバイオセキュリティの講義は別の職員が教える体制。 ・時と場合により1.or2. ・後ろで見学 ・細菌は前任者からの引継ぎは2~3日で、その後は業務を実践しながら技術を習得する。 必要に応じて、各種の研修会に参加する。 ウイルスは試験法、対象病原体によってそれぞれ異なりますが、すでに技術を習得している者が 		

説明しながら検査方法を一通り見せた後に、新人本人に行わせます。その後、1人で練習をしてもらい、データに問題がない場合、検査を任せます。

半数は1対1で指導、1/4は1対複数で指導
全体に関する研修は皆さんで、専門検査の
研修は1対1が多い。ただし若手職員が多
いと実施は困難

6 新人の教育研修期間はどれくらいですか

- | | |
|----------|----|
| 1. 1週間 | 0 |
| 2. 1ヶ月程度 | 1 |
| 3. 3ヶ月程度 | 0 |
| 4. 6ヶ月程度 | 7 |
| 5. 1年程度 | 10 |
| 6. それ以上 | 0 |

空白 3
5

7. その他

- ・各測定法ごとに適宜行う。
- ・検査頻度により異なるが、1～3か月程度。
- ・業務により異なるため、特に設定していない。
- ・期間は定めていない、各検査の実施に伴い研修している。
- ・概ね1年を目途としている。後はOJTにより指導。
- ・事務処理から調査研究まで全ての項目をこなせるようになるまでには2～3年程度は必要。
- ・適宜
- ・細菌は1週間、ウイルスはその他

6ヶ月から1年がほとんど、
ただし3ヶ月以下もある。

7 検査を1人で行うのは何時からですか

- | | |
|----------|---|
| 1. 1週間 | 0 |
| 2. 1ヶ月程度 | 2 |
| 3. 3ヶ月程度 | 3 |
| 4. 6ヶ月程度 | 8 |
| 5. 1年程度 | 6 |
| 6. それ以上 | 0 |

空白 1
9

7. その他

- ・概ね1年と考えているが、細かい項目では3か月程度で任せている。
- ・習得の状況により判断する。
- ・検査によって異なる。
- ・実施する検査、新人の理解度によって変わる。
- ・実施する検査技術を取得してすぐ1人で検査を行う。
- ・検査項目によって必要な期間は異なるが、検査頻度の多い項目で、少なくとも6ヶ月程度。
- ・期間は定めていない、同じ検査を1ヶ月間程度を実施してから。
- ・細菌は1週間、ウイルスは試験法、対象病原体によってそれぞれ異なりますが、
すでに技術を習得している者が説明しながら検査方法を一通り見せた後に、新人本人に行わせます。
その後、1人で練習をもらい、データに問題がない場合、検査を任せます。

6ヶ月から1年が半数を占める
検査によって異なる、1ヶ月程度のこともある

8 検査担当者となるいわゆる独り立ちは何によって決めますか

- | | |
|-----------|---|
| 1. 期間 | 8 |
| 2. 検査結果 | 8 |
| 3. 何らかの試験 | 1 |

4. その他 9
- ・期間と検査結果
 - ・被研修者の習熟度や理解度
 - ・総合的に判断する。
 - ・検査手技の確認、結果の安定性・再現性。
 - ・常時、副担当者を付けている。
 - ・検査を共同して行い、ある程度単独で実施可能と判断された段階で独り立ちしてもらう。
 - ・検査を実施してもらい、その様子を観察し、大丈夫かを判断する。
 - ・現状では一定期間を経過した後、本人の学位や職位等も勘案して複数の上司が相談の上何となく決めている、試験例があれば参考にしたい。
 - ・検査が正確に実施できればその検査については独り立ちとします。
 - ・細菌は1週間、ウイルスは検査結果

期間や検査結果が良ければいい
両者ないし総合的に判断する

- 9 配属された新人を教育研修する取り決め(教育研修計画など) 1. ある 7
がありますか 2. ない 19

70%で取り決めがない

- 10 教育研修にはどんな項目がありますか 23
番号を記入してください(複数回答可)
- | | |
|-------------|----|
| 1. バイオセーフティ | 23 |
| 2. 消毒・滅菌法 | 22 |
| 3. 試薬調製 | 23 |
| 4. 器具機器の取扱い | 23 |
| 5. 検査作業 | 23 |
| 6. その他 | 8 |
- ・課内の一連の検査業務と必要な知識を1年間かけて学ぶ。
 - ・行政検査の意義、GLP検査の意味づけ、結果の取り扱い、成績書の書き方など。
 - ・細菌係では、1年目は食品GLP検査関係中心の研修を行い、2年目以降、感染症関係の研修に移行する。
 - ・OJTで行う。
 - ・検査結果文書(行政文書)の出し方等、業務全般に関すること。
 - ・事務手続き(検査成績書作成、機器・設備の修繕、備品購入、感染性廃棄物処理の業者委託、保守管理等委託の公告・入札等)、調査研究のための技術継承。
 - ・検査結果通知書作成等の文書事務、電話対応。
 - ・データの処理・解析

業務全般で、ほか例示したものが含まれる

- 11 使用する検査機器の操作のほかに、原理等も説明しますか 1. する 14
2. しない 1
3. 場合による 11

半数は検査原理なども説明する

- 12 ピペットの使い方の説明は行いますか 1. する 15
2. しない 2

半数はピペットの使い方を説明する

3. 場合による 9

- 13 使用する機器や器具の取扱説明書を読むように指導しますか 1. する 14
2. しない 2

半数は取説を読むように指導する

3. 場合による 10

14 ほか、具体的にどのように教育研修を行っていますか。概要を記載してください

- ・ 例えば、細菌の釣菌の仕方や無菌操作から教える。実技をしながら教える。
- ・ 英語のマニュアルなどに関する語学研修。
- ・ 細菌検査でもっとも基本となる生菌数測定という作業を担当してもらい、その業務の中で、培地の作製法・ピペットの使い方、オートクレーブの操作手順、滅菌の方法、希釈の方法、培養の手順等を教える。その先は、検査毎に担当者が個別にそれぞれの菌の特性とあわせて、次のステップの教育をする。
- ・ 1回みてもらい、次は自分でやってもらう。
- ・ 紙・電子媒体を利用した卓上研修、短期間の実技(基礎的、専門的)研修及び実際の試験検査業務を利用した実技研修。
- ・ 精度管理用菌株を使用した、菌株の同定操作等。
- ・ 日常検査でのOJTを基本としているが、経験する機会が少ない検査材料は特別に研修を設定している。
- ・ 一緒に作業をしながら、都度、教えていくようにしている。また、検査はある程度の慣れが必要なため、同じような検査を何度も繰り返しいし、覚えてもらっている。検査の意義への理解を深め、モチベーションを高めるようにしている。
- ・ 抄読会(週一回)、研究発表会(月一回)。
- ・ 自施設でできないことに関しては、近隣衛研、感染研等に研修をお願いしている。また保健医療科学院が実施する「ウイルス研修」「細菌研修」に職員を派遣する。
- ・ 論文検索と英文翻訳。
- ・ 書面資料を試用した研修、1週間程度の実技(基礎的、専門的)研修及び実際の試験検査業務を利用した実技研修。
- ・ 検査を行いながら保健所の考え方や対応の仕方などについても知っている範囲で教えている。
- ・ 日常業務を一緒に行い仕事に慣れてもらうことを第一に研修を行います。
- ・ ①トラブル発生時にトラブルシューティングを行ってもらう、②検査依頼に対する電話対応により、概要の伝達を行ってもらう。
- ・ 1回みてもらい、次は自分でやってもらう。
- ・ 論文抄読会を開催し、若手にJournal Clubの当番を割り当てて紹介させている。
- ・ 作業手順書、判定基準、非定型例の説明等。抄読会。

15 いわゆるOn the Job Trainingはできていると思いますか

- | | |
|-----------|----|
| 1. できている | 21 |
| 2. できていない | 2 |
| 3. わからない | 3 |

大半はOJTができている

16 国立保健医療科学院・感染研で行われている現在の研修のほかに、新人を対象とした研修は必要と感じたことがありますか

- | | |
|----------|----|
| 1. 必要 | 20 |
| 2. 不要 | 4 |
| 3. わからない | 2 |

3/4は新人研修が必要と感じている

17 その教育研修に指導者の1人(講師)として参加できますか

- | | |
|----------|----|
| 1. できる | 13 |
| 2. できない | 3 |
| 3. わからない | 10 |

半数は講師として参加できる

18 新人の教育研修に必要なものや足りないものはありますか
番号を記入してください(複数回答可)

- | | |
|--------------|----|
| 1. 指導者 | 13 |
| 2. 新人研修マニュアル | 16 |
| 3. 新人研修会 | 13 |
| 4. 参考書リスト | 4 |
| 5. その他 | 7 |

- ・ 最終的な目標や動機づけをもてるような機会。
- ・ 検査だけでなく研究にも目を向けることができるような研修がしていただけるとよいと思います。
- ・ 配属される新人の経歴がそれぞれ異なるため何が必要かをその都度検討している。
- ・ 当所で実施している保健所検査課職員の研修用マニュアルは当所で作成しているのが、当所職員用のマニュアルは無い。
- ・ 新人研修の場合は、業務の習得が第一のため特に足りないものは無いと思います。
- ・ 最終的な目標や動機づけをもてるような機会。

- ・ 新人を長期にわたり一から指導する職員の負担が大きいので、見返り(人事考課上プラス評価される体制)が必要。
- ・ 予算
- ・ 時間と費用

マニュアルや研修会があるといい
研究も指導できるように。

19 新人の教育研修についてご意見を記載してください

- ・ 基本的なことであっても指導する人によって微妙に異なり新人が戸惑う場合があるので、マニュアルがあれば便利だと思う。
- ・ 原理の異なる測定法ごとの技術指導、解析データの判断能力を高める指導が必要であると思う。
- ・ 基本、新人教育は、機関の責任においてすべきことだと思います。使用培地や検査機器を含め、各機関において使用されている機材は異なります。受講しても、自施設で実施できる保証はありません。新人研修の目的が明確でないと、単なる親睦の会の役割しか果たせないのではないのでしょうか。
- ・ 管理職員が新人教育研修の必要性を認識しているか大いに疑問である。
- ・ 衛生・化学、獣医師、薬剤師、臨床検査技師が新人として配属されるが、感染症法および本法に基づく検査についての知識、経験がほとんどない。また、指導する人も教育を受けたわけではなく、座学と経験に基づく研修となっている。
- ・ 所内での研修においては業務を抱えながらであるため、系統的に実施することが難しい。人材育成の観点からは国立機関での研修受講が望ましいが、旅費確保が難しい。
- ・ 衛生研究所等の公的試験検査研究機関では、マンパワーの問題で、研修専門のスタッフを抱えることや研修時間を十分に割くことは不可能です。自ずから、OJTによる研修が必須となります。しかし、人事異動の関係で、指導に当たるべき立場の職員の経験年数が短く、指導能力が十分担保されない可能性が今後高くなるのが危惧されます。
- ・ 直属の上司のスキル、人間性によって、仕事に対する意識・成長度が異なることが懸念材料である。
- ・ 新人の研修期間や教育訓練の必要性は感じているが、指導者の人材確保などの課題がある。
- ・ ①機器の原理・使用法、マイクロピペット等一般検査機器の基本的な取扱いに関する研修 ②検査に関する(精度管理含む)研修を分けて行う必要を感じた。懇切丁寧な研修を実施する必要性を感じる。
- ・ 当所に採用され配属される職員については、経験や経歴によりさまざまな技能、知識を持っており、それぞれの職員に対し、適切な研修計画を個別に組んで実施する必要があると思う。
- ・ 検査についての研修はもちろんであるが、研究者としてモチベーションを上げる研修を新人にも必要と考える。
- ・ 関東から遠隔地での地方自治体の中には研修参加旅費の確保が難しい場合がある。ブロック単位での短期間研修等が開催されると参加が容易になる。地衛研全体として最低限確保されるべきレベルの研修マニュアルが整備されると助かる。
- ・ 書面だけでは伝えられないことが多く、時間や事例数などが必要なことが多いのが現状です。何かマニュアルのようなもので解決するとも思えないので職場で研修をする人向けの研修があっても良いかと思います。
- ・ 現在は、複数のベテランによる研修が可能だが、将来的には3年位の経験者のみが新人に教える事態も予測され、技術の伝承が困難になる可能性がある。このような場合、検査技術は継承できたとしても、高度な技術を要するような調査研究を実施することは困難になっていくと思われる。
- ・ 属人的にならないようにすると良いです。
- ・ 当所では検査のOJTはあと数年は可能と考えるが、独立して調査研究を立案実行できる職員を自前で育成するだけの余裕は既になく、県内の大学院進学する意欲のある者以外は研究者として必要な見識を身につけないままになってしまうおそれが大きい。早急に学位取得者の採用や社会人大学院進学者を増やす必要性を感じている。
- ・ 研究者として独り立ちできるまでには長時間を要するため、指導者の負担は大きい。新規採用者が長期間衛研に留まることを望む。
- ・ 現場の状況を把握しないと、一方的な研修となります。検査の流れの中の、ミスの原因、改善のポイントなど、ディスカッション/事例紹介を通じ、参加者が考える機会を持ち、講師と参加者が互いに研修内容を評価し、次に立ち上がることを期待しています。
- ・ 細菌は人数が少ない細菌検査部門では研修を行う人の余裕がなく、内部のみで十分な研修をすることが難しい。特に、VNTR、PFGEなどは新人向けに研修を実施してほしい。ウイルス部門は「新人の教育研修」と言うよりも、人事異動に伴う「手技等の引き継ぎ」になります。配属された職員は、引き継ぎを受けた後、自己で研鑽を積み、グループで情報共有し、習熟していくこととなります。国立保健医療科学院感染研で行われる各種研修については、ある程度の手技を習得した者を対象としている。地方衛生研究所のレベルが実施しているウイルス研修や向上のために、経験がなく、知識が浅い新人を育成するような研修を国を挙げて計画して頂きたいと切望いたします。また、ウイルス研修は二年に一回である。しかしながら、人事異動は年に一回あり、ウイルス研修もそれに併せて、毎年開催して頂ければ幸いです。

外部精度管理調査研究班参加者へのアンケート 2015.12.2-14
～新規配属職員のOJTないし教育研修について～まとめ

1. 最近3年間に新人配属が80%あり
2. 指導者は2名程度が半数、3名以上が30%程度おられる
3. 同じ部署の方が指導者となる
4. 指導者は10年以上の経験者が50%、5年以下の方もおられる
5. 半数は1対1で、1/4は1対複数で指導、専門検査は1対1、若手が多いと実施困難
6. 新人教育研修期間は、6ヶ月から1年がほとんど、3ヶ月以下もある
7. 検査を1人で行うのは、6ヶ月から1年が半数、1ヶ月程度もある
8. その判断は、研修期間および検査結果が適切であれば可
9. 教育研修に関する取り決めは70%で存在しない
10. 検査の原理等も説明するのは半数
11. ピペットの使い方の説明は半数
12. 取扱説明書を読ませるのは半数
13. 大半ではOJTができていると回答
14. ただし3/4は新人研修の機会が必要と感じている
15. 講師として参加できると回答したのは半数
16. 新人研修に関するマニュアルや研修会があるといい、研究もできるように指導。

職場の同じ部署に経験者がおられるときは1対1でOJTで検査指導、職場での教育研修に関する取り決めはない。新人研修の機会が必要と感じていて、指導者で決まるのは良くないので、マニュアル等があるといい。

(アンケートの内容と回答数、コメントは別紙、報告書に掲載します)

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

研究協力者 山下 照夫、安達 啓一、伊藤 雅、小林 慎一、皆川 洋子 愛知県衛生研究所

研究要旨 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。

A. 研究目的

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。流行の規模は年ごとに異なるが、時として大規模な流行が認められる。特に、2011 年と 2013 年のコクサッキーウイルス A6 型 (CV-A6) による流行は、患者定点当たりの報告数が 10 を超え、例年の 3~5 倍の規模であった。水疱の状態や回復期に爪が剥がれるなど、従来と異なった症状が認められ、過去に分離された株との比較が進められているところである。また、まれに無菌性髄膜炎の合併症を伴うことがある。さらに、エンテロウイルス 71 型 (EV-A71) による手足口病の流行時には、中枢神経合併症の発生頻度が高いとされており、重篤化するおそれのあるウイルスである。このウイルスは 3~5 年ごとに地域流行するので、病原体検索により流行の可能性を事前に予測することは有意義である。

5 類定点把握対象疾患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 及び 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、必要により遺伝子検出し PCR 産物の塩基配列により型別する場合がある。同定に関する外部精度管理が速やかに実施できるよう作業手順書を作成することを目的とした。また、2 類感染症

の急性灰白髄炎はエンテロウイルス C に属するポリオウイルスによるもので、その外部精度管理にも関連するものである。

B. 研究方法

エンテロウイルスの検査の基本は細胞培養による分離と中和反応による血清型別である。しかしながら、手足口病の原因となるエンテロウイルスはしばしば中和困難な株が分離される。また、抗血清による型別可能なウイルスは、EV-A71 までで EV-B73 以降の抗血清は入手困難である。そこで、RT-PCR 法による分離株からの遺伝子増幅と塩基配列決定による遺伝子型別を精度管理に用いることとした。手足口病病原体の種類と検出方法の検討のため、EV-A71 と CV-A6 の臨床分離株各 1 株を RD 細胞で培養し、遠心上清からウイルス RNA を抽出した。RNA 抽出には High Pure Viral RNA Kit (Roche) を用いた。抽出 RNA を TE 液で 101~107 倍階段希釈し、4℃、-80℃、ドライアイス容器に各々保存し、3 日後に CODEHOP PCR 法にてウイルス遺伝子を検出した。EV-A71 分離株については塩基配列を決定し系統樹解析による型別を実施した。

倫理面への配慮として、個人情報には取り扱わない。

C. 研究結果

検出方法として全てのエンテロウイルス検出

が可能であり、型別可能な VP1 領域を標的とする CODEHOP PCR 法の作業手順書概要案（別紙 1）を作成した。配布検体としてエンテロウイルス分離株の核酸 RNA を用いることとした場合を想定した保存実験では 4℃でも安定した保存状態を維持できることを確認した（図 1）。PCR 産物を遺伝子解析し BLAST 検索により遺伝子型別を行う場合、公的データベースを用いた検索は型によっては同定困難な場合も想定されるため、系統樹解析と相同性にて型別を実施する案を加えた。遺伝子型別のための標準株の塩基配列データベースを作成した（表 1 DB ファイル）。種別用ファイルには CV-A2(EV-A)、CV-B1(EV-B)、PV-1(EV-C) 及び EV-D68(EV-D)の KODEHOP PCR 増幅部位の配列を FASTA 形式で保存した。型別用ファイルには EV-A、EV-B、EV-C、EV-D 用の 4 ファイルを作成した。各ファイルに FASTA 形式で保存したウイルス標準株リストを表に示した。EV-A71 分離株について塩基配列を決定し、系統樹解析による型別と標準株との相同性を調べ報告書結果記入例として別紙 2 のとおり作成した。

D. 考察

遺伝子型別のための標準株の塩基配列データベースを配布することにより BLAST 検索による型別不能の危険性が回避できると考える。CODEHOP PCR 法及びその領域を用いた遺伝子型別の技術伝承につながることを期待される。今後の課題としてアンケートを実施した結果を別紙 3 にまとめた。分離培養と中和反応、VP4 領域を標的とした RT-PCR 法による増幅と解析方法等が課題としてあげられた。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となる。生きたウイルスの輸送方法の問題を解消する必要があるが、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可能となる。

VP4 領域を標的とした RT-PCR 法はウイルス検出方法としては優れているが、VP1 領域と比較して異なる血清型間の相同性が高く、BLAST 検索により遺伝子型を決定することは危険である。今回

標準株の VP1 領域についてデータベースを作成したが、VP4 領域で型別する場合同じ各血清型に分離株の遺伝子情報も加える必要があると考える。

E. 結論

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。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。将来的にはウイルス分離と中和法による血清型別の精度管理も望まれる。

G. 研究発表

- 1) 論文発表
関連論文はなし
- 2) 学会発表
関連発表はなし

H. 知的所有権の出願・登録状況

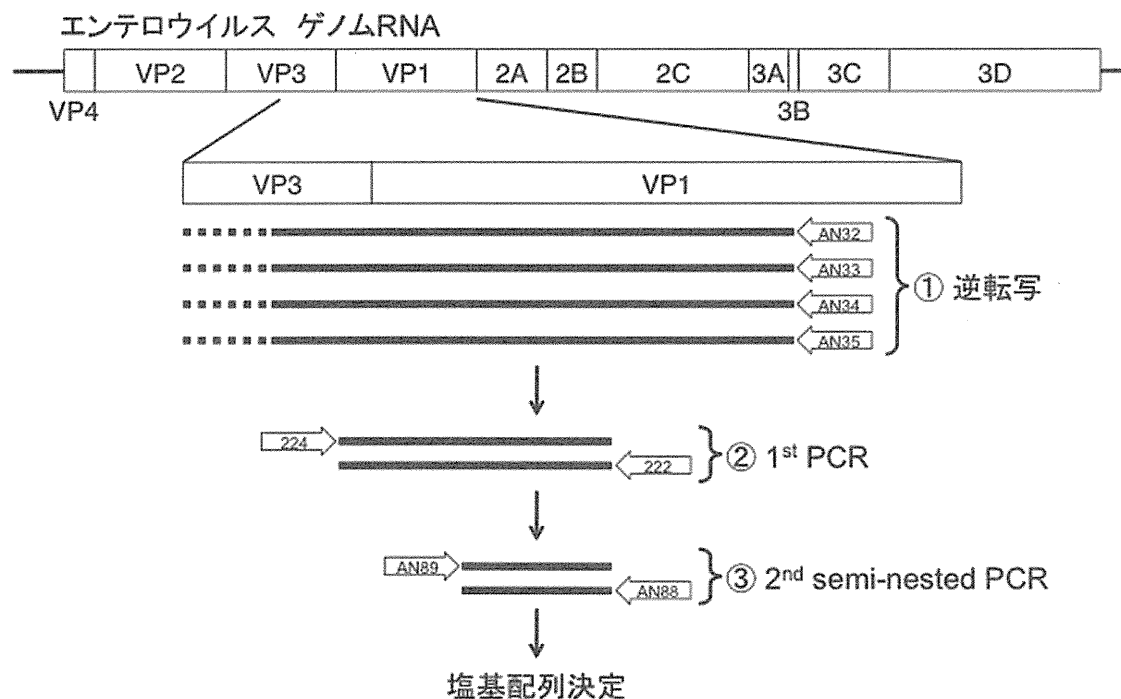
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

(別紙1)

手足口病ウイルスの同定作業手順書概要案

【精度管理内容】検体として、手足口病患者より分離したウイルス株由来RNAを送付。各機関において遺伝子を増幅し、塩基配列を決定し、遺伝子型別（及び分子系統樹解析）を実施する。

【概要】CODEHOP PCR 法によりエンテロウイルス VP1 領域の遺伝子を増幅（下図）、ダイレクトシーケンシング法および近隣結合法（NJ 法）により配布RNAの型別を実施する。



CODEHOP VP1 RT-snPCR は、①多様性が高く血清型との関連性の高いVP1領域を増幅するため、塩基配列からの遺伝子型同定が容易である、②semi-nested RT-PCR であるため検出感度が高い、といった長所を兼ね備えている。留意すべき点として、①高感度であるがゆえコンタミネーションによる疑陽性の恐れが高くなる、②二種類以上のエンテロウイルスが混在するサンプルからは、遺伝子型同定不能である、③逆転写に加えPCRを2回行うので高価である、等が挙げられるが、高感度かつ高速な遺伝子検出法として利用価値の高い方法である。

本法ではまず、バッファー（逆転写酵素、PCR 酵素にそれぞれ付属）・プライマー・dNTP・DW を混合し、“KIT”とよぶ混合液を3種類作製する（一度に10 ml 程度作り、適宜分注して-30℃に長期保存可能）。検体解析時は、KIT とウイルス RNA、酵素等を混合し、反応を開始する。なお、下記文中のカタログナンバー等は2010年前後のカタログに基づいており、以降の変更もありうる。また、フォントの文字化け等による誤解を避けるため、マイクロμをuで表現してある（例：1マイクロリットル→1 ul）。

1. 試薬と実験器具

共通の実験器具・機器

0.2 ml PCR 用チューブ
1.5 ml チューブ
フィルター付きピペットチップ (20, 200, 1000 ul)
マイクロピペット
精製水(distilled water; DW, Milli-Q 水など)
微量高速遠心機
サーマルサイクラー
シークエンサー

RNA 抽出用試薬

市販のキット各種を利用可能である。代表的なものを列挙する。

High Pure Viral RNA Kit (Roche, 1 858 882, 100 回精製)

QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN, 52904, 50 回精製, 他のサイズもあり)

電気泳動用試薬・機器

アガロース
TBE あるいは TAE バッファー
エチジウムブロマイド溶液
DNA サイズマーカー
Loading バッファー
アガロースゲル作製器
アガロースゲル電気泳動装置

塩基配列解析用試薬

市販のキット各種を利用可能である。代表的なものを列挙する。

① PCR 産物精製

Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega, A9281, 50 回分, 他のサイズもあり)

② シークエンス反応

BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied biosystems, 4337455, 100 反応, 他のサイズもあり)

BigDye Terminator v1.1/v3.1 5X Sequencing Buffer (Applied biosystems, 4336697, 1 ml, 他のサイズもあり)

③ シークエンス反応産物精製

Centri-Sep スピんカラム (Applied biosystems, 401762, 100 カラム, 他のサイズもあり)

逆転写プライマー

AN32 GTYTGCCA

AN33 GAYTGCCA

AN34 CCRTCRTA

AN35 RCTYTGCCA

それぞれ 100 uM に希釈し、AN32, 33, 34, 35 cocktail (10 uM each) を作製する。

100 uM AN32	10 ul
100 uM AN33	10 ul
100 uM AN34	10 ul
100 uM AN35	10 ul
DW	60 ul
Total	100 ul

PCR/シーケンスプライマー

224	GCIATGYTIGGIACICAYRT
222	CICCIIGGIGGIAYRWACAT
AN89	CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG
AN88	TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT

KIT 作製時は 10 uM、シーケンス反応時は 3.2 uM に希釈して使用する。

逆転写・PCR 試薬 (KIT の準備)

① dNTP Set, 100 mM Solutions (GE ヘルスケア, 28-4065-51, 4 x 25 umol, 他のサイズもあり)
20 mM dNTP (5 mM each) 溶液を作製する(各 KIT に混合する)。

100 mM dGTP	5 ul
100 mM dATP	5 ul
100 mM dTTP	5 ul
100 mM dCTP	5 ul
DW	80 ul
Total	100 ul

② SuperScript II RNaseH⁻ Reverse Transcriptase (Invitrogen, 18064-014, 10000 U (50 ul), 他
のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 cDNA (RT) KIT を作製する。

5X RT Buffer	110.0 ul
20 mM dNTP (5 mM each)	27.5 ul
AN32, 33, 34, 35 cocktail (10 uM each)	27.5 ul

③ Taq DNA Polymerase (Roche, 1 146 165, 100 U, 他のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 PCR 1 KIT を作製する。

10x PCR +Mg buffer (11 271 318 001)	137.5 ul
10 uM Primer S0224	137.5 ul
10 uM Primer S0222	137.5 ul
20 mM dNTP (5 mM each)	13.75 ul
DW	646.25 ul

④ FastStart Taq Polymerase (Roche, 2 158 264, 50 U, 他のサイズもあり)

添付のバッファーを用いて、Enterovirus VP1 snPCR 2 KIT を作製する。

PCR buf. 10x +MgCl ₂ (12 161 567 001)	137.5 ul
10 uM Primer AN89	110.0 ul
10 uM Primer AN88	110.0 ul
20 mM dNTP (5 mM each)	13.75 ul
DW	701.25ul

⑤ RNasin RNase Inhibitor (Promega, N2111, 2500 U, 他のサイズもあり)

2. 操作

1) cDNA 合成

陰性対照として DW、陽性対照として必ず増幅される RNA (ポリオウイルス RNA 等) を用い、配布 RNA と並行して反応を行う。

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 cDNA (RT) kit	3 ul
0.1 M DTT	1 ul
RNasin RNase Inhibitor	0.5 ul
SuperScript II	0.5 ul

② 配布 RNA 5 ul とマスタープール 5 ul を、0.2 ml PCR 用チューブに加え混合。

③ 下記の条件にて反応 (約 1.5 時間)。

22°C 10 min

42°C 60 min

95°C 5 min

2) 1st PCR

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 PCR 1 KIT	30 ul
DW	9.5 ul
Taq	0.5 ul

② cDNA 合成反応を終了したチューブに、上記マスタープールを 40 ul 加え混合。

以下の温度で、40 サイクル反応 (約 2 時間)。

95°C 30 sec

42°C 30 sec

Ramp 0.4°C/sec (42°C から 60°C への温度変更を、0.4°C/sec で行う。Ramp を行った方が、検出感度が向上する。)

60°C 45 sec

3) 2nd PCR

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

Enterovirus VP1 snPCR 2 KIT	39 ul
DW	9.5 ul
FastStart Taq	0.5 ul

② 1st PCR の反応物 1 ul と上記マスタープール 49 ul を、新しい 0.2 ml PCR 用チューブに加え混合。

③ 下記の条件で反応(約 1.5 時間)。

95°C 6 min

以下のサイクルを 40 回

95°C 30 sec

60°C 20 sec

72°C 15 sec

4) 電気泳動

反応終了後、1st および 2nd PCR 反応物を、3 ul/lane でアガロースゲル電気泳動し、増幅を確認する。

5) PCR 産物の精製

PCR 産物をアガロースゲル電気泳動にて目的とするサイズの単一のバンド (1st PCR; 約 760 bp、2nd PCR; 約 370 bp (Poliovirus Sabin 1 VP1 (Accession No. AY082688) の場合、124~498 の 375 bp に相当) が認められた場合、PCR 反応液から PCR 産物の精製を行う。市販の PCR 産物精製キットを用いると簡便である。手技については各種キット付属のマニュアルを参照のこと。精製した DNA 濃度を分光高度計により測定し、シーケンス反応に用いる。特に 2nd PCR 産物を AN88, AN89 プライマーにてシーケンスする場合、DNA 濃度が高すぎると反応を阻害する場合がある。経験的には、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製・50 ul DW で溶出した DNA 溶液を 10~20 倍に希釈し、4 ul をシーケンス反応に用いるとよいようである。

6) シーケンス反応

① 下記の反応組成に基づきマスタープールを作製。

BigDye Terminator	2 ul
5X Sequencing Buffer	1 ul
Primer	1 ul
DW	7 ul
溶出 DNA (3~10 ng)	4 ul

② 下記の条件で反応(約 2.5 時間)。

96 °C 1 min

以下のサイクルを 25 回

96 °C 10 sec

50 °C 5 sec

60 °C 4 min

7) シークエンス反応物の精製およびシークエンサーによる塩基配列解析

Centri-Sep スピニングカラムなど市販の精製キットや、エタノール沈殿法を用いて精製する。シークエンサーによる解析は、機器マニュアル等参照のこと。

8) 塩基配列の相同性検索

得た塩基配列を用い遺伝子型を同定する。公共データベースにおいてブラスト検索する場合、間違った情報もあるので注意が必要である。エンテロウイルス標準株のデータベースを添付したので、実施可能な機関は以下の方法により系統樹解析（NJ 法）による検索を実施する。

1. 種別用ファイルとの系統樹解析により種別（A～D）を行う。
2. 種が決まったら各種の型別用ファイルにて系統樹解析を行う。
3. 最も近縁の型が決まったら相同性が 75%以上であることを確認する。
4. 次に近縁の型との相同性が 70%以下であることを確認する。

参考文献

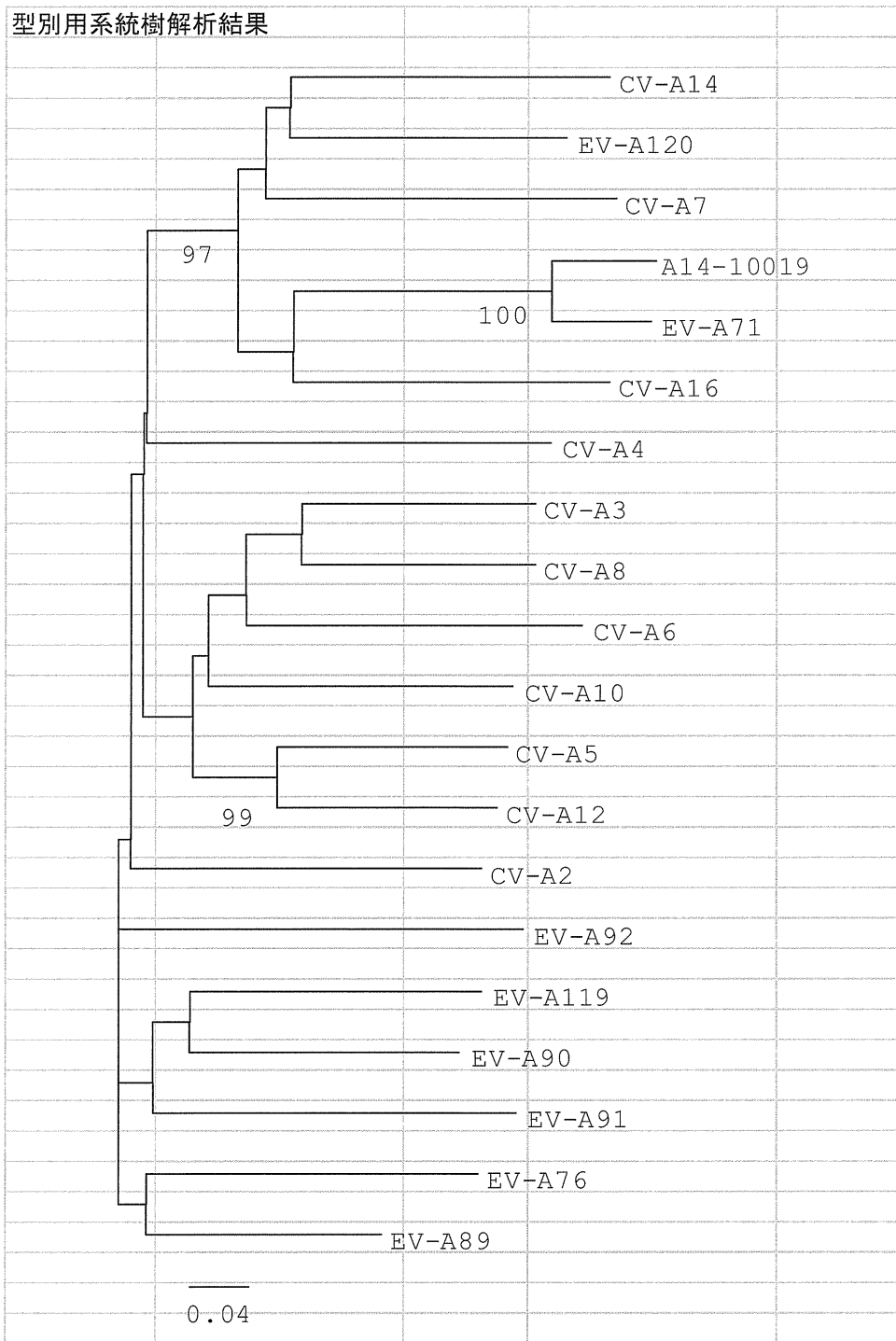
- (1) 手足口病病原体検査マニュアル（国立感染症研究所）
- (2) Nix W.A. et al. J. Clin. Microbiol. 2006, 44(8) 2698-704.
- (3) Rose T.M. et al. Nucleic Acids Res. 1998, 26(7) 1628-35.

(別紙2)

結果				
施設名:				
判定結果:				
塩基配列:				
使用機種:	PCR			
	シーケンス			
	(オプション)			
解析ソフト:	系統樹			
	相同性			
相同性:	最も高い標準株	%	2番目に高い標準株	%
種別用系統樹解析結果				
型別用系統樹解析結果				

結果(例)					
施設名:	愛知県衛生研究所				
判定結果:	エンテロウイルス71型				
塩基配列:	ATCATCGAATACTAGTGATGAGAGTATGATTGAGACACGGTGCGTTCTTAACTCACACAG CACAGCAGAGACCACCCTGGACAGTTTCTTCAGCAGAGCAGGTTTGGTGGGAGAGATAG ATCTTCCTCTAGAGGGTACCACCAACCCAAATGGTTATGCCAACTGGGATATAGACATAA CTGGTTATGCGCAAATGCGCAGGAAAGTGGAGCTGTTACCTATATGCGCTTTGATGCAG AGTTCACCTTTCGTTGCGTGCACTCCTACTGGTGAGGTTGTTCCGCAACTACTCCAGTAT				
使用機種:	PCR	ABI Veriti			
	シーケンス	ABI 3130 Genetic Analyzer			
(オプション)					
解析ソフト:	系統樹	Genetyx (ver.10.1)			
	相同性	Genetyx (ver.10.1)			
相同性:	最も高い標準株	%	2番目に高い標準株	%	
	EV-71	86.8	CV-A16	65.9	
種別用系統樹解析結果					

型別用系統樹解析結果



(別紙 3)

手足口病、「外部精度管理調査」の「検討項目（外部精度管理として検討したい、すべき調査内容、ポイント等）」について

1. 1 細胞培養法による分離・同定

- (1) 培養細胞の準備（細胞の種類・略歴、継代法や検体接種用プレートの調製）
- (2) 使用する培地（増殖用培地、維持培地の調整）
- (3) ウイルス分離方法（検体接種法、接種後の観察法、ウイルス回収法）
- (4) ウイルスの同定（ウイルス力価の測定法・中和試験法、または解析した遺伝子部位と相同性検査法）

2 RT-PCR・ダイレクトシーケンス法によるウイルス遺伝子検出

- (1) 検体からの遺伝子抽出法
- (2) RT-PCR 法（増幅部位、増幅方法）
- (3) 遺伝子解析法

2. 1) 配布する検体及び陽性対照の形態（例：感染性ウイルス・精製 RNA・左記の中間となるウイルス液を不活化したもの等）

2) 常温・非感染性物質の配布によりウイルス検査の外部精度管理検体を実施可能か（手間と費用を節約するため）

3) 精度管理を行う項目・範囲（陽性・陰性に限定？ 型別まで？ さらに分子系統樹解析まで？）

3. 1) VP1 領域の RT-PCR シークエンスによる型別（CODEHOP 法）

2) RD 細胞による病原体分離

4. 手足口病の検体は咽頭ぬぐいが多く、発症からの日数で検体中のウイルス量は異なる変化をする。一般的には量が少ない。つまり検査陰性は、①手技、②ウイルス量、③プライマー等の試薬、④PCR 装置の不具合、⑤RNA 抽出キット、⑥輸送法（特に輸送培地と温度）等様々な要因がある。

したがって病原体個票の情報（採取日、検体の種類）なども大切であり、総合して判定しているかどうかポイントとなる。

以上の流れに基づき、EQAS は個別技術を評価することとなる。例として

1. 核酸抽出：検体からの RNA 回収（内部コントロール RNA 添加物との比較試験）及び RT-PCR によるバンド確認（合成 RNA の代わりに標的部位を挿入したプラスミドで代用）
2. DNA シークエンス：ブラインドで単独のもの、混ざったものなど用意しシーケンス解析の結果の評価

5. 1) ウイルス分離と中和反応による同定、2) PCR 遺伝子検出と Blast サーチによる同定

6. 1) VP4 を標的とするプライマーを用いたウイルスの同定。2) 中和反応による血清型の判定。

7. ウイルス分離のポイントは用いる細胞の良し悪しと思われるが、適切な評価方法は？

8. 遺伝子検査における適切なプライマーの選択、塩基配列の解析

9. 現在、感染症発生動向調査における手足口病の原因ウイルスの同定は、咽頭ぬぐい液から直接 RNA 抽出を行い、塩基配列を決定し、その塩基配列に基づいて行っている地研が多いと考えられます。外部精度管理では、以下の2点が確認できる試験が望ましいと思います。

- ① それぞれの手技が問題なく実施されていること。
- ② 結果判定の考え方。

具体的な方法

① FTA カードにコピー数が既知の低濃度から高濃度の RNA をしみこませ検体として配布。また数種類のウイルス RNA が混ざった検体も1検体入れる。

- ② 各地研の SOP に従って検査を実施。

確認できること

- ① 各地研が行っている検査方法の検出限界
- ② 複数のウイルスが混ざった検体では、シーケンス波形が乱れると予想されますので、その時の

対処方法

- ② 陰性、陽性判定の考え方

10. 大腸菌、*Morganella morganii* との鑑別を行うため、性状試験、病原遺伝子の検出の実施状況について調査する。

11. * 遺伝子検出、塩基配列の決定によって診断する事、* どの領域 (VP1?) の遺伝子検査法 (PCR 法) を標準とするのか、* 検査材料が、咽頭拭い液、糞便等、多岐にわたる事

12. ・ VP4 領域の PCR、・ VP1 領域の PCR+シーケンス、・ BLAST 検索

13. ・ 年間に実施される外部精度管理が多い。(本年度は、コレラ、結核、ノロウイルス、インフルエンザ、麻疹ウイルス)

・ 外部精度管理の年間で細菌、ウイルスでそれぞれ1つの病原体として回数を減らし、その後のフォローアップ (事後研修) などの充実を希望いたします。