

平成27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  
 平成28年1月8日 第2回班会議

## 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

富山県衛生研究所 ウイルス部  
小淵正次

1

### 昨年度のリアルタイムPCR外部精度管理調査の結果

参加機関: 59機関  
 配布試料: 試料A (NoV GIとGIIの混合試料)  
 試料B (NoV GIIのみ)  
 基準値: べき乗変換後の定量値→平均値±1SD

3データとも基準値外→10機関  
 2データが基準値外→3機関  
 1データのみが基準値外→8機関

試料A GI定量値の分布(べき乗変換, Log<sub>10</sub>)  
 目標値: 3.40  
 Mean ± SD: 2.85 ± 0.71  
 中央値: 3.29

試料B GI定量値の分布(べき乗変換, Log<sub>10</sub>)  
 目標値: 4.88  
 Mean ± SD: 4.23 ± 0.95  
 中央値: 4.67

試料A GII定量値の分布(べき乗変換, Log<sub>10</sub>)  
 目標値: 4.40  
 Mean ± SD: 3.90 ± 0.77  
 中央値: 4.36

### 昨年度の外部精度管理調査後の追加アンケート (自由記載の抜粋)

<問題なし>  
 ・普段実施している方法で、精密性・正確性ともに良好な結果が得られた。

<基準値内でも低値>  
 ・試料AのG1定量値は基準値内ではあったものの、集計データより低い値であった。試薬の管理等見直しをしていきたい。”

<基準値内、コメント>  
 ・今回はA判定でしたが、検査方法(PCRのプログラムやウェルの配置、検体数)、試薬の種類、保管方法など課題があると感じました。今後、検査レベルの維持・向上のためにも改善していく必要があると思います。感染症の先生方が推奨される方法等をご教授いただければ幸いです。

<基準値外、低値、希釈、検討中>  
 ・当研究所の定量結果は、試料A、Bのいずれの定量値も基準値を1SD以上下回っていた。原因の一つとして、ピペットの精度異常でコントロールの段階希釈時に正しく希釈できず、想定よりも濃い濃度のコントロールを用いたことで相対的に試料の定量値が下がったことが考えられた。そのため、段階希釈に使用したピペットを蒸留水と天秤を用いて簡易的に精度測定をしたところ、P1000で450μl測った平均が440mg、P200で50μl測った平均が50mgであった。従って、これらのピペットを用いて段階希釈をしたことでコントロールの濃度が高くなったとは考えにくい。

3

<基準値外、原因不明>  
 ・3測定値とも基準値外で、低い値になりましたが、このような結果になった原因についての明確なトラブルシューティングには至りませんでした。  
 ・判定結果は判断できたが、べき乗変換を行ったのち定量値の分布が中央値でなかった場合に、どこが不備で結果に反映したかの判断ができない。当所は中央値よりやや低かったが、改善すべき点が不明である。インフルエンザウイルスの外部精度管理のときのようにトラブルシューティングのような解説がほしい。

ウイルス精度管理研究小班追加コメント

1. 定量PCR用標準物質の使用条件、保存・管理状態がまちまちであることがわかったので、使用・保存・管理法の改善をはかる必要があると思われる。
2. 精度管理を行う担当者に負担がかかった可能性もある。標準物質の保管や使用方法の違いが結果に与える影響もデータとして収集しておくことが今後の発展につながると考えられる。
3. 次年度研究にて、NoV定量PCR法全般におけるトラブルシューティングを作成する必要があると思われる。
4. 定量PCR法では微量のサンプルを扱うことからピペットの使用法・管理方法・点検方法について、メーカーを交えて検討を行う必要があると思われる。
5. リアルタイムPCR法における定量値の取り扱いなどについて、定量値の持つ意味を周知したほうが良いと思われる。
6. 定量PCR用標準物質の取り扱い法や希釈法についてのマニュアルをつけて配布するとういことかと思える。
7. 各機関の現有定量PCR用標準物質も同時にリアルタイムPCRにかけて、各自の保管状況の良否を判断することも必要。

4

### 平成27年度 外部精度管理調査実施後研修会(ウイルス検査)

目的  
 昨年度の外部精度管理調査(ノロウイルスリアルタイムPCR法)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行う。

実施内容  
 ・OJTを模したグループミーティング形式でリアルタイムPCR法のトラブルシューティングを行う(第1日目)→参加者のパワポ発表、ブレインストーミング、ワークシートの活用  
 ・実習・講義や全体討論を通して問題解決方法に対する理解を深める(第2日目)  
 ・研修後、トラブルシューティング集と研修担当者のコメントを追加したワークシートを送付→参加者は職場で研修が問題解決に役立ったが後日回答  
 ・研修後のアンケート調査により今後の研修について検討する

実施日時および実施場所  
 平成27年9月10、11日(1.5日間) 国立感染症研究所村山庁舎講義室および実習室

参加機関  
 昨年度の外部精度管理参加機関から、判定結果に基づく下記分類基準の各群より選出した代表10機関

分類基準  
 A: 3つ全ての測定値がべき乗変換後1SD範囲外の機関(10機関)→4機関  
 B: 1つの測定値のみがべき乗変換後1SD範囲外の機関(8機関)→4機関  
 C: 3つ全ての測定値がべき乗変換後1SD範囲内の機関(38機関)→2機関

研修担当者  
 研究班 ウイルス小班WG(進行役: 小淵、貞升、チューター: 塚越、水越、木村、長澤、総括: 佐多)

### 研修のポイント

1. 参加者のプレゼン内容(パワポのテンプレート6頁分を事前に配布し、記載依頼)
  - 1) 所属の状況
  - 2) 外部精度管理調査の提出結果データ
  - 3) 外部精度管理調査の標準曲線の図
  - 4) 外部精度管理調査の評価(受け取ったもの)
  - 5) 原因とおもわれるところ
  - 6) 自由意見(あらたな標準物質によるデータがあれば添付)
2. グループミーティング・ワークシート A4紙1枚(各自記入して完成)
  - 1) トラブル、2) 考えられる原因、3) 解決のための処置
 →第1日目でわかったこと  
 →第2日目でさらに気づいたこと
3. 実習・講義
  - 1) 模範例および手技的失敗例のデモ、OJTの体験
  - 2) リアルタイムPCRの基礎講座
4. 全員で討論してリアルタイムPCRトラブルシューティング集の作成  
 →各参加者に配付し確認依頼
5. 研修後のアンケート調査  
 →第1日目が終わった後  
 →ひと月が経過した後(職場での研修内容の伝達など)  
 →さらにひと月後の対応まで調査(職場での改善は?)

6

### グループミーティングシナリオ (第1日目)

A~C群を2分して、最初にグループ討論で昨年度の精度管理調査でうまくいかなかった原因や問題点を抽出し、進行役(貞升、小淵)が意見を集約してトラブルシューティングをホワイトボードにまとめる。グループ内でまとめたホワイトボードを発表し、全体討論を行ったトラブルシューティングを完成させる。

- | 項目                                | ポイント   |
|-----------------------------------|--|
| 1. 問題点の抽出<br>(参加者パワポ発表 1人10分)     | <ul style="list-style-type: none"> <li>標準曲線は正しく描かれているか一定量の取り扱い、定量値の持つ意味</li> <li>作業手順書の流れ図→自分の原因がどのあたりだったか明示</li> <li>試薬や試料(標準物質)等の保管方法、調製方法、使用方法に問題はないか。</li> <li>ピペットの使用法、管理方法、点検方法のチェック。</li> </ul> |
| 2. トラブルシューティングの作成<br>(グループ討論 60分) | <ul style="list-style-type: none"> <li>グループ内で抽出した問題点について、トラブルシューティングを作成する</li> <li>参加者は自身のトラブルシューティングをまとめる(ワークシート)。</li> </ul>   |
| 3. 各グループの発表(代表)<br>(全体討論 60分)     | <ul style="list-style-type: none"> <li>復用に持ち帰りができるトラブルシューティングを目指す。</li> <li>トラブルシューティングは正解ではなく、バラバラか。</li> <li>職場でのトラブルシューティングやOJTを構築するもの。</li> <li>検査の質の向上への動機付けと問題解決能力を高める。</li> </ul>               |
| 4. 総括                             |  |
| 5. 研修後アンケート(1日目の実施)               |  |

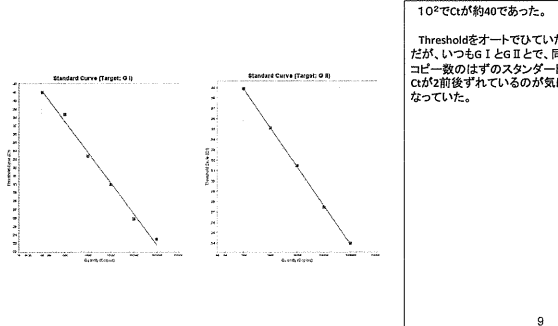
### 参加者パワポの事前確認(研修担当者間で問題点・解決法など共有)

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"> <li>PC希釈系列の調製についてはピペットによる誤差は避けること</li> <li>希釈コントロールの機材はしっかり行うこと、場合によっては複数回実施</li> <li>PC値の閉鎖、波形、サンプルの場所などはよく見ておく必要がある</li> <li>「-20℃冷凍庫から新ししPC...」とあるが、PCの保存温度は-80℃が望ましい</li> </ul>
	b	標準物質の希釈→チューブ、チューブを低吸着製品へ変更 解析一値の外れたものは標準曲線から外す	<ul style="list-style-type: none"> <li>PCのCT値が高い(GI)→管理に問題あり</li> <li>高吸着のPCにおいても同一希釈で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)への追加で問題あり?</li> <li>PCでばらつきがあるということは検体に問題がある可能性がある</li> <li>新しいPCで測定結果にばらつきが、全体的に強い気になっている。再度、原液から調製すべきと思う</li> </ul>
	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"> <li>PCのCT値が高い→管理に問題あり</li> <li>EOA標準曲線の同一希釈(高い濃度でも)でやばらつき→測定チューブ(プレート)の追加で問題あり?</li> <li>高吸着のPCにおいて、GI、GI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→希釈の問題</li> <li>PCのCT値をいくつかの濃度で見えておくと変化が気付きやすい</li> <li>PCでCT値が高くなってしまえば、管理、使用の注意に問題</li> <li>高吸着のPCにおいても同一希釈でCT値にばらつきがみられる→測定チューブ(プレート)への追加に問題あり?</li> <li>リアルタイムPCRではチューブをオートグループする必要がある</li> <li>PCの増幅を都度確認していない</li> <li>増幅コントロールを作成する量が多く、作成後の検体に注意が必要</li> <li>H11だけだけでなく、H23もNGが懸念になるのなら、コンタミネーションの可能性が高い</li> <li>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</li> </ul>
	d	EOAでは小分け分注したPC濃度が2倍高かったため、全て倍の測定値となった。	

### 昨年度の調査結果に対する参加者の自己評価例(参加者パワポより)

平成26年度厚生労働省研究費補助金(健康安全・危機管理対策)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-健康一般-001)  
平成27年度 外部精度管理調査の研修モデルの評価

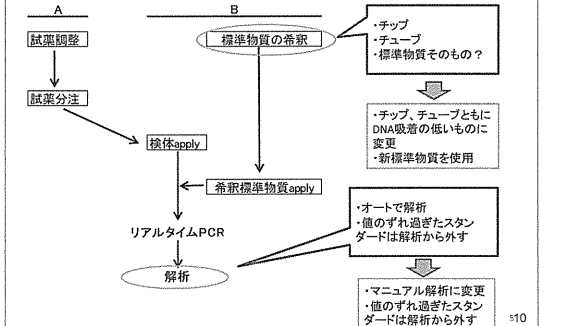
#### 2. 外部精度管理調査の提出結果-2 (標準曲線の図)



### 参加者の自己分析例(参加者パワポより)

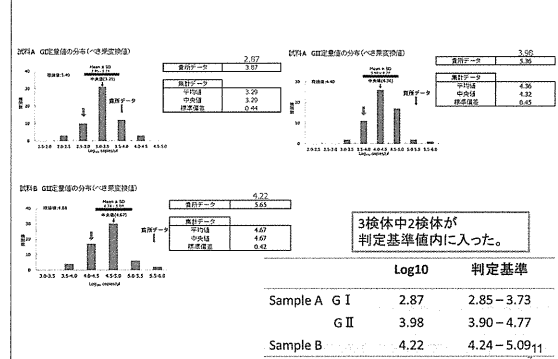
平成26年度厚生労働省研究費補助金(健康安全・危機管理対策)研究事業  
「地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の導入と継続的実施のための事業体制の構築に関する研究」(H26-健康一般-001)  
平成27年度 外部精度管理調査の研修モデルの評価

#### 5. 外部精度管理調査の結果について原因と思われること



### 参加者の検計例(参加者パワポより)

平成26年度厚生労働省研究費補助金(健康安全・危機管理対策)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-健康一般-001)  
平成27年度 外部精度管理調査の研修モデルの評価



### グループミーティングによるトラブルシューティング

参加者のパワポ発表とプレインストーニング  
ホワイトボードへまとめ  
各グループの発表と全体討論  
参加者各自のトラブルシューティング作成

実習・講義シナリオ(第2日目)

A, B群を2分して、ノロウイルスリアルタイムPCRのデモを行い、ピベットの操作方法や標準物質(陽性コントロール)の希釈方法等を習得する(1グループは模範例、他方は失敗例)。また、模範例と失敗例の解析結果を比較し、機材や手技上の問題点が結果にどのように反映されるかを検証する。さらに、リアルタイムPCRの原理や解析法などの基本、機器のメンテナンス等の講義を通してリアルタイムPCRによる遺伝子検出について理解を深める。

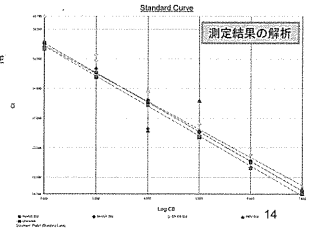
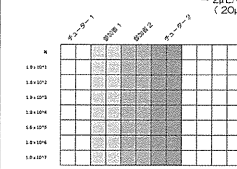
項目	ポイント
1. リアルタイムPCRのデモ (グループ見学、実技体験)	<ul style="list-style-type: none"> <li>試薬、試料(陽性コントロール)の取り扱い</li> <li>ピベットの正しい操作、段階希釈法</li> <li>→OJTの体験</li> </ul>
2. リアルタイムPCRについての講義 (講義、全体討論 120分)	リアルタイムPCRの原理、解析、メンテナンス、トラブルシューティングなどの基本を理解させる。
3. データ解析 (全体討論 60分)	段階希釈時の失敗が解析結果にどのように反映されるかを検証する。
4. 総括 (全体 30分)	2日間の研修のまとめ(チューターと参加者双方からの自由意見、感想など)

ラボ実習



標準物質の10倍希釈の調製  
 チューター1: DW45μL+標準物質5μL  
 参加者1: DW15μL+標準物質2μL  
 参加者2: DW45μL+標準物質5μL  
 チューター2: DW45μL+標準物質5μL (10<sup>2</sup>と10<sup>3</sup>の順が逆  
 →2μL Swell (20μL戻り系)

失敗例



リアルタイムPCR基礎講座

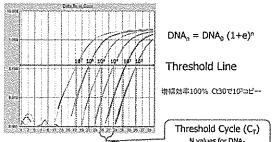
リアルタイムPCR法の基礎と応用

国立感染症研究所  
 感染症疫学センター  
 木村 博一

TaqMan ProbeによるリアルタイムPCR法の原理



Ct値と標準曲線の目安



試薬などに関する注意点

プライマー、プローブの保存管理  
 適切な温度と湿度管理(40°C)  
 繰り返し凍結融解を避ける  
 蛍光プローブの遮光保存  
 陽性コントロールの保存管理の徹底(-80°C)  
 適切な温度と湿度管理  
 繰り返し凍結融解をしない

15

チューターによる検討事例の解説

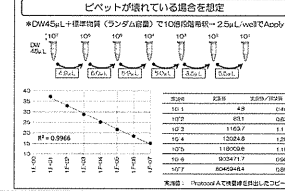
様々なエラーによる  
標準曲線への影響

目的と方法

様々な要因で、標準曲線に不具合が生じる。そこで、ピベットの不具合、不適切な操作などを想定し、標準曲線のデータに与える影響を検討した。

- Test-1 ピベットの故障などを想定とする場合 (3/1ターン)
- Test-2 検査する者のテクニカルエラーの場合 (3/1ターン)

Protocol D TEST-1-D



結果と考察

特にProtocol E, Gで、標準曲線に不具合が生じる  
 Protocol 試験結果 備考  
 F Good No Good 検査結果OKだが、標準曲線が直線でない、検出限界付近で不明  
 G Good OK 検査結果OKだが、標準曲線が直線でない  
 ※ 標準物質を意図的にデタラメな希釈をしても、まますますの検出限界(PP0.99)になる  
 ※ 「標準曲線が直線でない」問題に対しては、ピベットや手技的な理由よりも、機器や試薬の方に原因を追究する可能性が高い (各定検時の不具合や標準物質の劣化による)  
 ※ 10<sup>0</sup>の順であっても、正しい測定値(Copies)が得られない場合もある。

今回のリアルタイムPCR法のトラブルシューティング集 (10月15日参加者へ送付)

トラブル	考えられる原因	解決のための措置
●陽性コントロールのフェルムが陽性になる	<ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質のコンタミネーションによるピベーター、チューブの汚染</li> <li>標準物質のコンタミネーションによる試薬瓶の汚染</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ピベーター、チューブ類、試薬瓶の交換(汚染物質の除去)</li> <li>実験室エアアウトや乾燥機の見直し(試薬試料と標準物質の添加を別室で行う(乾燥機を全室共通))</li> <li>作業工程の見直し(廃液-洗浄機-標準物質の調製-調製作業工程ごと-専用のピベーター、チューブ類を使用)</li> <li>陽性安全キャビネットでの操作を併用(廃液は半分のみ用)</li> <li>オートクレーブの使い分け(試薬試料用と汚染用)</li> <li>標準物質や検体試料の採取・分注時は安全キャビネットのファンを止め(エアロソール発生防止)</li> </ul>
●経濃度(10コピーや10 <sup>2</sup> コピー-DNA)の標準物質が出ない	<ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の劣化</li> <li>不適切なピベット操作による希釈の誤差</li> <li>溶液の温度上昇による標準物質の分解</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回数のための小分け分注管理)</li> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質希釈の注意</li> </ul>
●標準曲線の傾きが低くなる(各濃度のCt値の間隔が3.0以上)	<ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の劣化</li> <li>不適切なピベット操作による希釈の誤差</li> <li>溶液の温度上昇による標準物質の分解</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回数のための小分け分注管理)</li> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質希釈の注意</li> </ul>
●標準物質のCt値が低め、あるいは高めで標準曲線に不具合がある	<ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の劣化</li> <li>試薬瓶の管理が不適切(反応試薬、プライムプローブ)</li> <li>不適切なピベット操作による希釈の誤差</li> <li>濃度計算ミス</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質、試薬瓶の管理の見直し(保管温度、使用期間、凍結融解回数などの小分け分注管理)</li> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質希釈の注意(エラーチェック)</li> <li>作業記録をつける(ダブルチェック)</li> </ul>
●標準物質の間隔(GE10)でCt値に差	<ul style="list-style-type: none"> <li>プライマー-プローブの劣化</li> <li>プライマー-プローブプレミックスの劣化</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>新たに合したプライマー-プローブの使用</li> <li>標準薬の使用期限を遵守</li> </ul>
●標準物質の測定値がばらつく(相対誤差率が90%以下)	<ul style="list-style-type: none"> <li>不適切なピベット操作による試料添加量の誤差</li> <li>標準物質不適切な希釈操作</li> <li>測定機器の温度ブロックの汚染</li> <li>測定機器の不具合</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質の調製(試料の検体とスピンダウンを確実に実施しピベティングしない)</li> <li>測定機器の温度ブロックの清掃</li> <li>測定機器の定期点検の実施</li> </ul>

17

参加者ワークシート例(最終版)

10/7年度外務省検疫所職員研修会 グループワークシート	課題名: 1	
<p>1日目</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の10<sup>0</sup>コピーが検出されない</li> <li>10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>と10<sup>3</sup>の順が逆</li> <li>10<sup>2</sup>が検出されない</li> <li>標準物質(10<sup>2</sup>コピー-DNA)がばらつき</li> </ul>	<p>考えられる原因</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>温度(室温)の測定が実施されていない</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の劣化</li> <li>濃度の計算ミス</li> </ul>	<p>解決のための措置</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の管理</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の劣化</li> <li>濃度の計算ミス</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回数などの小分け分注管理)</li> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質希釈の注意</li> </ul>
<p>2日目</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の10<sup>0</sup>コピーが検出されない</li> <li>10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>と10<sup>3</sup>の順が逆</li> <li>標準物質(10<sup>2</sup>コピー-DNA)がばらつき</li> </ul>	<p>考えられる原因</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>温度(室温)の測定が実施されていない</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の劣化</li> <li>濃度の計算ミス</li> </ul>	<p>解決のための措置</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の管理</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の劣化</li> <li>濃度の計算ミス</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回数などの小分け分注管理)</li> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質希釈の注意</li> </ul>
<p>3日目</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の10<sup>0</sup>コピーが検出されない</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の劣化</li> <li>濃度の計算ミス</li> </ul>	<p>考えられる原因</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回数などの小分け分注管理)</li> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質希釈の注意</li> </ul>	<p>解決のための措置</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>標準物質の管理</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の劣化</li> <li>濃度の計算ミス</li> <li>標準物質の希釈法</li> <li>ピベーターの操作</li> <li>標準物質の管理の見直し(保管温度、凍結融解回数などの小分け分注管理)</li> <li>ピベット操作の熟練(取扱説明書を読んで操作法を理解し、練習する)</li> <li>標準物質希釈の注意</li> </ul>

赤字部分: 参加者に研修後約2か月に職場で行ったことを記載してもらい、11月末までに返送

### 研修後アンケートのまとめ

#### 第1日目 グループミーティングについて

- ・グループ(参加者5名、進行役1名)→適切な人数で良かった。
- ・自分と同じ問題が出され、その対処法が聞けて良かった→参加者同士の話し合いは有意義
- ・他施設の問題点や対応など、とても参考になった。
- ・今回のトラブルシューティングは役に立つと思う。

- 理由:①評価されるだけでなく、改善すべき点が明確になる。  
②どのトラブルも心当たりがあり、今後も起こるかもしれないので吸収できた。  
③トラブル時のチェックポイントが参考になり、職場に持ち帰りたい。  
④機材の管理、試薬、ピペットのことまで議論できてよかった。  
⑤基本的なことを再確認でき、新たに得られた知見もあった。

#### 第2日目 実習・講義について

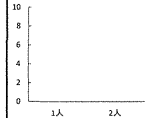
- ・試薬調製等の基本的手技がわかった→(少人数のため)デモ中にディスカッションできて良かった。
- ・リアルタイムPCR法の基本が理解できた。

#### 研修全体について

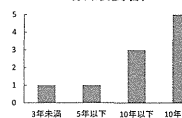
- ・リアルタイムPCR法に対する理解が深まった。
- ・試薬調製や機材の操作の技術が向上した。
- ・適切なトラブルシューティングが期待できる。
- ・手技などにおいて改善点がたくさん見つかった。
- ・研修内容は復命書の他、担当者間での打合せにより職場へ伝達(伝達講習会も2名あり)→職場での技術向上につながった。

### 参加者の所属状況

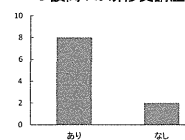
1 ノロウイルスPCR実施可能な職員数



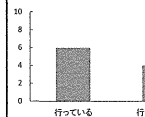
2 設問1の衛研経験年数(最長者)



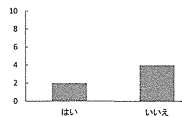
3 設問1の研修受講歴



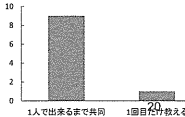
4 検査・結果確認・最終判断



5 最終判断者もノロ検査できる



6 未経験者の内部研修方法



### 今後の課題

#### ・地研における新人の教育研修

新人向け研修

研修内容

研修マニュアル

トレーナーの研修

研究指導

### 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ができていますと回答
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)

H27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  
木村 博一  
大石 和徳

H27年度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:調恒明(山口県)  
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)  
小淵正次(富山県)  
皆川洋子(愛知県)  
松島勇紀 清水英明(川崎市)  
勝見正道(仙台市)  
柴田伸一郎(名古屋市)  
藤井理津志 岸本寿男(岡山県)  
濱崎光宏(福岡県)  
大石和徳 宮崎義継 駒瀬勝啓 影山努 野田雅博 長澤耕男 木村博一(感染研)

・今年度の新規精度管理調査

内容:地研で頻繁に行われているシーケンス・系統樹解析の  
精度管理を行う。

材料・方法:  
・NoVPCR産物(300bps程度)  
1)材料の塩基配列解析(シーケンス解析)  
2)近隣結合法(NJ法)による系統樹解析

精度管理調査内容:  
1)塩基配列解析の精密度  
2)塩基配列解析長  
3)解析試料の系統樹上の位置  
4)標準株との塩基配列相同性

精度管理(シーケンス・系統樹解析)実施手順

・ウイルス検査精度管理対象ウイルス:NoV  
下記要領などを作成し、昨年度と同様に実施する。

- 1) 精度管理実施要領
- 2) 精度管理実施手順
- 3) 精度管理データファイル
- 4) 精度管理アンケート

1)~4)は9月までに作成済

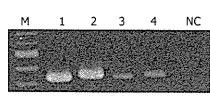
・9月参加募集  
・10月中旬試料送付  
・11月下旬デー回収  
・12~1月データ解析  
・1月中旬結果報告

H27ウイルス検査精度管理実施体制

- ・精度管理実施要領作成
- ・精度管理実施手順作成
- ・精度管理データファイル作成  
担当:◎塚越・○長澤・貞升・野田・木村
- ・解析試料作製  
担当:◎長澤・○小林・木村
- ・データ解析  
担当:◎塚越・○清水(松島)・小林・長澤・野田・木村
- ・総括  
担当:調・皆川・岸本・佐多・大石

配布試料について

- ・常法により、RNA抽出・RT-PCR(COG2F/G2-SKR)
- ・PCR産物を切り出し精製後、100倍希釈
- ・電気泳動上、非特異産物なし



H27年度 精度管理結果  
-NoVシーケンス系統樹解析-

7

H27ウイルス検査精度管理応募実施機関

- 参加希望機関: 62機関
- 精度管理実施機関数: 62機関
- 精度管理参加およびデータ解析機関数62機関  
(都道府県41機関, 政令指定都市15機関, 中核市6機関)

8

**NS7(RdRp)のほぼ最後の部分で1塩基フレームシフト**

NS7(RdRp)の一部分を共用かつ一塩基フレームシフトにより、ORF2が翻訳

9

本精度管理での解析領域の特徴

NS7(RdRp)の一部分を共用かつ一塩基フレームシフトにより、ORF2が翻訳

10

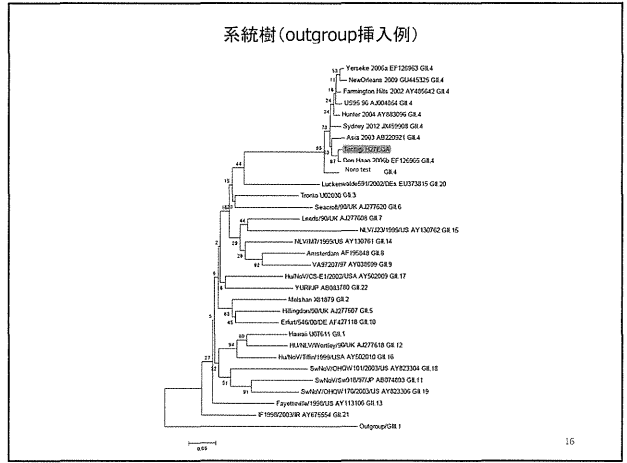
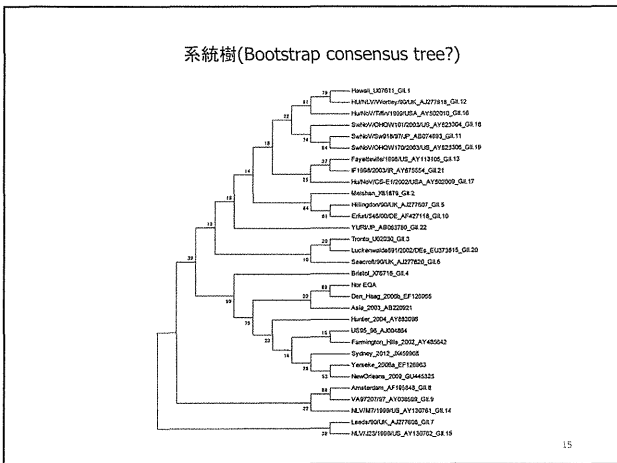
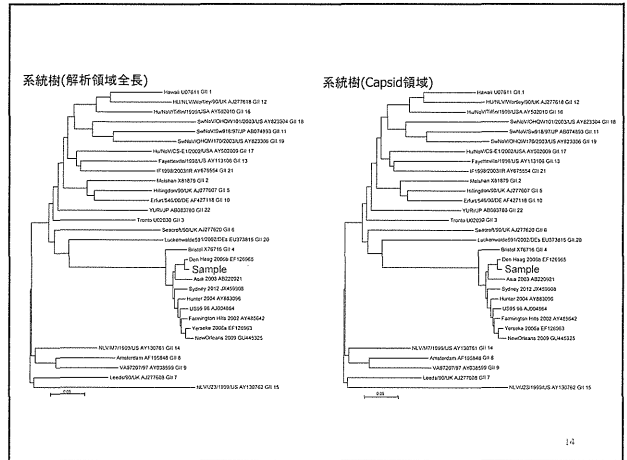
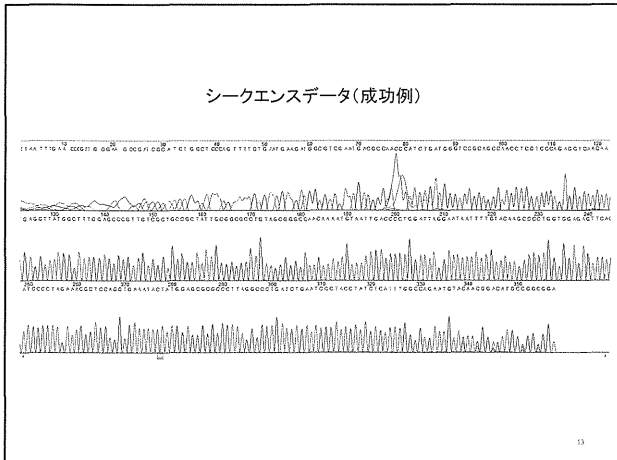
評価項目

1. シーケンス解析の精度  
(解読塩基数、ミスリードやプライマー配列の有無)
2. 相同性検索の精度(塩基配列・アミノ酸)
3. 系統樹作成の精度(解析株の位置など)
4. Genotypingの精度

11

シーケンスデータ(失敗例)

12



- ### 解析結果
- シーケンス解析(理論値最大:338bp, 252~338bp)
    - 適切なシーケンス解析: 47/62施設(76%)
    - ミスリード: 5施設 (1~8塩基)
    - 含プライマー配列: 14施設
    - 320bp以下: 4施設
    - Reverse配列送付: 1施設→再提出:30bp短, 含プライマー配列
  - 相同性検索
    - 適切な塩基配列株を選択: 47/62施設(76%)
    - 適切なアミノ酸配列株を選択: 43/62施設(69%)
  - 適切な系統樹解析: 59/62施設(95%)
  - 適切なgenotyping(GII.4): 62/62施設(100%)

### シーケンスミスリード(解析困難)例

参照配列  
提出配列

リードミスの内容

- 5'側の塩基情報欠落
- 塩基の誤り

リードミス部位波形

5'側 Forward

Reverse

塩基の誤り

波形が乱れているため解読困難

波形にノイズが多く正確な解読が出来ていない

### シーケンス解析ミスと対処法

#### ✓機器

シーケンサーの不良(レーザーの出力低下、光軸のズレなど)  
→ 機器のメンテナンス

#### ✓試薬

反応試薬・精製試薬の劣化  
→ 陽性コントロールによる確認、使用期限確認、保存状態確認

#### ✓手技

精製など手技的不良による反応性の低下  
→ 手技の統一・習熟、結果の見直し、再検査

19

### 判定基準(案)

1. シーケンス精度
  - a. ミスリードの有無 (1点)
  - b. 解析長 (320bp以上 or 280bp以上) (1点)
  - c. プライマー配列の有無 (1点)
2. 相同性解析
  - a. 塩基配列 (1点)
  - b. アミノ酸配列 (1点)
3. 系統樹解析精度
  - a. 解析株の位置 (1点)
  - b. 解析法の精度 (1点)
4. 解析株の遺伝子型の確度 (1点)

合計8点満点とする

20

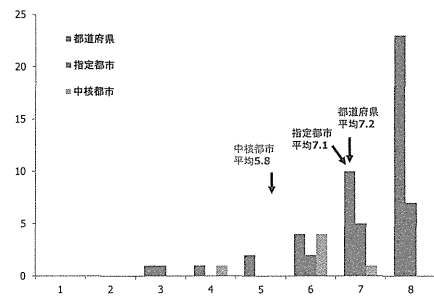
### 判定結果

- 8点: 30機関 (都道府県: 23, 政令指定都市: 7, 中核市: 0)  
 7点: 17機関 (都道府県: 10, 政令指定都市: 5, 中核市: 2)  
 6点: 9機関 (都道府県: 4, 政令指定都市: 2, 中核市: 3)  
 5点: 2機関 (都道府県: 2, 政令指定都市: 0, 中核市: 0)  
 4点: 2機関 (都道府県: 1, 政令指定都市: 0, 中核市: 1)  
 3点: 2機関 (都道府県: 1, 政令指定都市: 1, 中核市: 0)

平均: 7.0点

21

### 平成27年度ウイルス検査外部精度管理 シーケンスおよび系統樹解析結果



プライマー配列、解析長、ミスリードの有無、アミノ酸、塩基、系統樹、サンプルの位置についてそれぞれ1あるいは0点で評価。全部正解であれば8点となる。

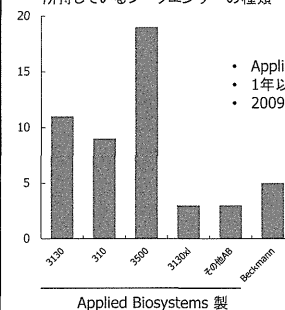
22

アンケート解析結果(50機関, 回答率81%, 50/62)  
H27.12.17現在

23

### 所持しているシーケンサー

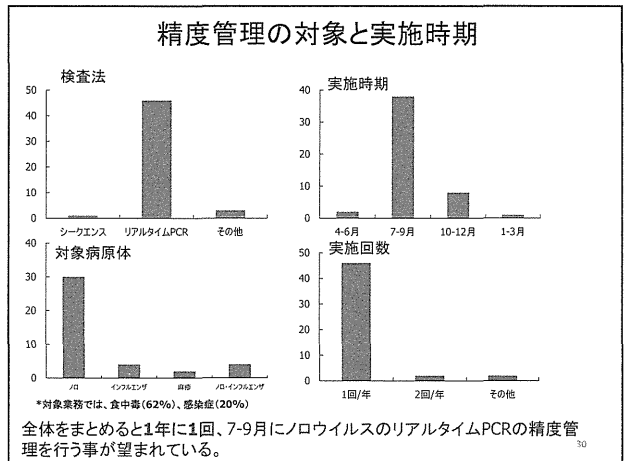
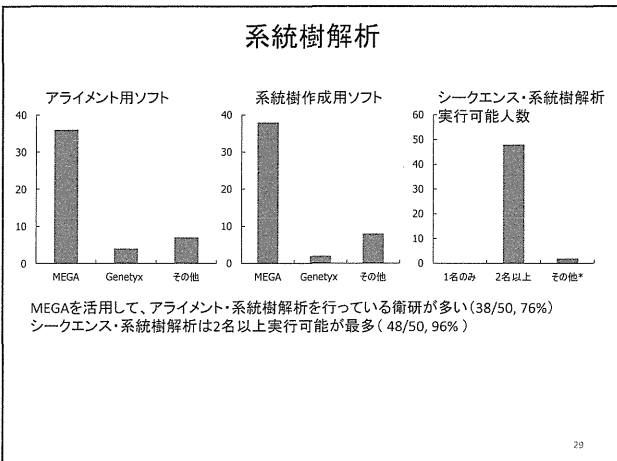
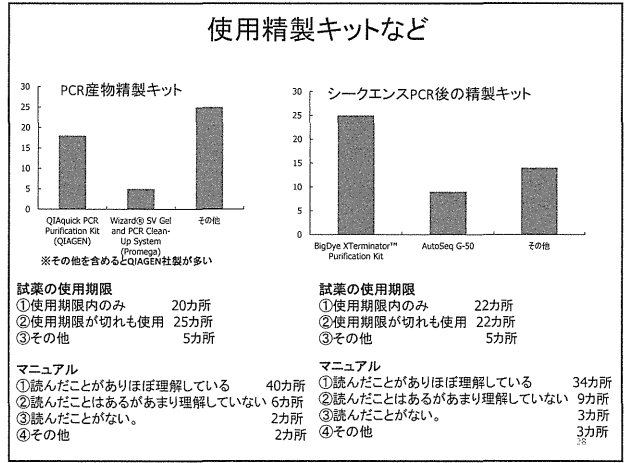
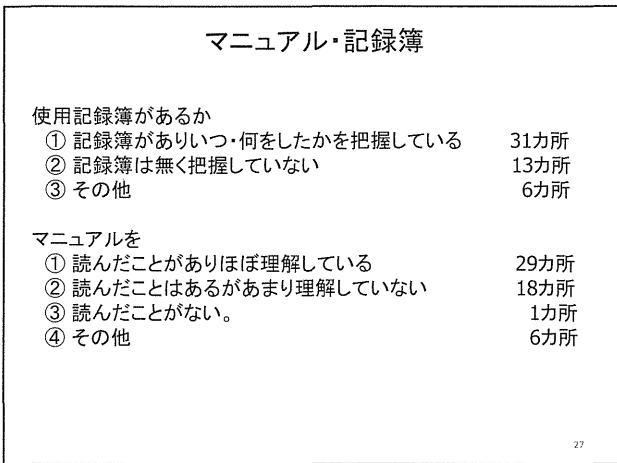
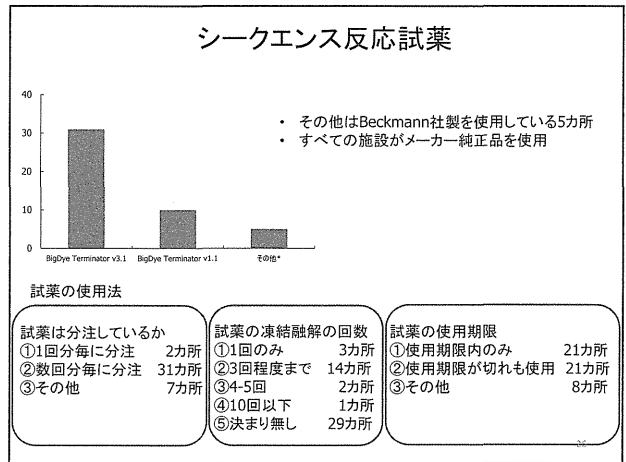
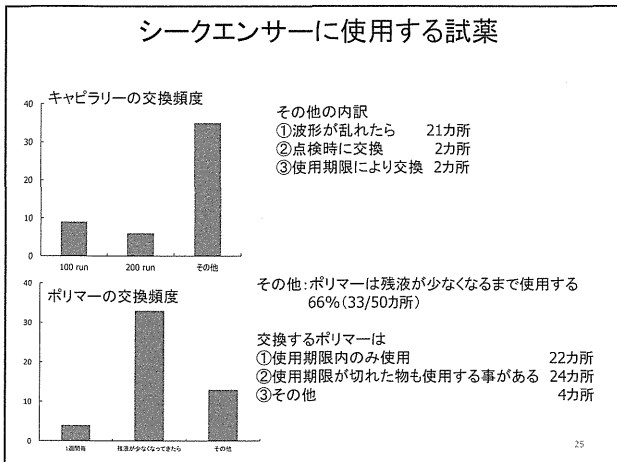
所持しているシーケンサーの種類



- Applied Biosystems 社製が全体の90% (45/50)
- 1年以内の購入が6カ所、3年以内の購入が7カ所
- 2009年あたりで購入が多い

24

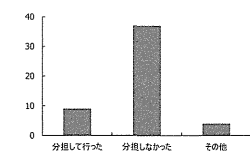




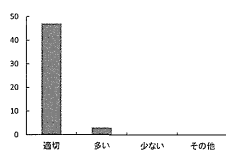
### 精度管理の実施

検査に要した時間: 15.2±13.5時間(平均値±標準偏差)  
最短5.5時間, 最大72時間

精度管理に関する業務を分担して行ったか



精度管理に関する業務量はどうか



精度管理に関する業務量は適切で他の職員と分担せずに実施している。

31

### コメント抜粋(1)

- 年度により、検体数に極端な多寡があり、計画的な試薬調達・使用ができていないことがよくわかった。すべての試薬、キャピラリー等の消耗品を規定の使用期限内の中で使い切ることができないのであるからDye Terminatorなど、特に希釈することなく使用してもよいのではないかと見直しているところである。せめて、BigDye添付のpGEM controlを毎回1つ入れてきちんとサイクルシーケンス以降の流れが実施できていることを確認するようにしたいと考えている。(A県)
- 使用頻度とコストの面からシーケンスにかかるすべての試薬を使用期限内のもので実施するのは困難。(B県)
- 全国の状況を見ることで試薬の保管温度や機器メンテナンス等、自所の方法の見直しにつながり、新たな気づきも多く、大変参考になります。行政依頼検査(食中毒・感染症)の検査についてはできる限り、期限内の試薬等を用いて検査を実施していますが、予算の関係上期切れでも使用せざるをえないのが現状です。(C県)
- シーケンスの基本的な操作、原理などの研修機会があるといいと感じました。(A市)
- 精度管理後の結果について、問題点が認められた場合、トラブルシューティングについて、指導、助言してもらえるようなサポート体制が必要だと思います。結果がよくなかった場合、当然、自分たちでトラブルシューティングは実施しますが、色々検討してもダメだった原因が突き止められないこともあります。(例えば、前回の精度管理で行われたノロウイルスのリアルタイム定量検査では原因の追究ができませんでした。)(B市)

32

### コメント集(2)

- 精度管理の評価後にコメントしたい。(C市)
- 他にもシーケンスにかける検体が有ったので、それらと一緒にまとめて、シーケンスPCR産物の精製からシーケンスにかけるところまでをもらった。(D県)
- 通常の業務では型別まで行うことはなかなかないので、今回の精度管理はよい機会だった。(E県)
- シーケンス関係の試薬、特にポリマーは使用期限が短く、高価であるため、期限切れでもデータが読めれば使用しているのが現状である。当所ではSOPを整備中だが、試薬等の管理、使用に関しての規定は試薬等の性能に問題ないことを確認してから使用する等の規定を盛り込むことは可能なかご教示願いたい。(F県)
- マニュアルに従ってシーケンスを使った場合、コストが非常にかさむので、データに問題がなければカラムや試薬類は使用期限を越えて使用することが多い。(G県)

33

### 事後アンケートコメント抜粋(1)

- 基本的な検査技術(RNA抽出、リアルタイムPCR、コンベンショナルPCR、シーケンス解析)の確認を、各年でウイルスを変えて実施すれば地研でのウイルス検査技術がさらに向上すると考えます(年によってインフルエンザ、ノロウイルス、麻疹、風疹など)。感染研HP記載の病原体検出マニュアルについて検査機会の多い類については、基本的な検査の指針として全ての疾患について記載していただきたい(感染性胃腸炎にはロタウイルスだけでなく他の下痢症ウイルスの記載もおねがいしたい)。(H県)
- ウイルス検査の主流になりつつあるPCR法+Seq法は高感度ゆえのコンタミの問題を除き大きなツールとなっています。しかし、系統樹解析解析による遺伝子型別、得られた塩基配列情報の疫学的解釈等についても、最新の情報に基づくガイドラインが必要と思います。(D市)
- ノロウイルスの定量リアルタイムPCRの結果で行政処分が決定されるので、精度管理はノロウイルスのリアルタイムPCRが良いと思います。一方、ノロウイルス以外でも遺伝子解析結果が重要視されるようになってきているため、シーケンス解析の精度管理も必要と考えますので、ノロウイルスのリアルタイムPCRの精度管理と他のウイルスでも良いのでシーケンスの精度管理が交互に実施されれば良いと思います。(I県)

34

### 事後アンケートコメント抜粋(2)

- あまり濃すぎる陽性検体は必要ないと思います。(O県)
- 今回の精度管理は、通常ノロウイルスの検査に携わる4名で各々実施しました。シーケンスの結果は全員一致しました。今後とも外部精度管理の機会があればぜひ参加させていただきたいです。(K県)
- シーケンスの結果解析については、不慣れなため時間がとてもかかりました。(E市)
- Q10の「精度管理の頻度」については、同一項目は2年に1回とし、ノロウイルスとインフルエンザウイルスやシーケンスとリアルタイムPCRなど、内容を変えて交互に実施する形が良いと思われます。(L県)
- 実施時期については、感染性胃腸炎やノロウイルスの流行時期を外した年度前半にしてほしい。今後何らかのウイルスの外部精度管理を毎年1回、全国規模で実施してもらいたい(特にリアルタイムPCRを使用した精度管理)。(M県)
- 今後食中毒検査などにおいて、遺伝子解析を依頼されることも十分に想定されるので、今回のような遺伝子解析に関連する精度管理も、2~3年に1回程度実施していただきたいと思います。(N県)
- 当所では、ウイルスも細菌も同じ職員で担当しているため、この他に細菌部門の精度管理もあるので頻度としては、現在行われているインフルエンザウイルスとノロウイルスそれぞれ年1回が適当だと思います。(F市)

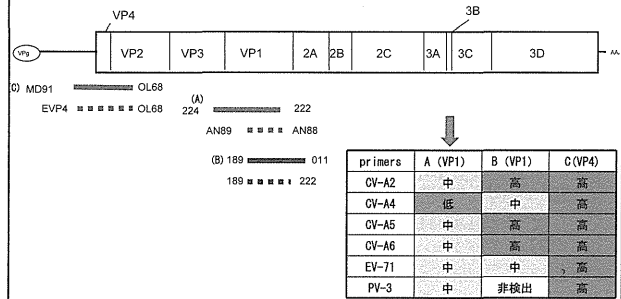
# 手足口病ウイルスに関する 「外部精度管理」調査(案) について

愛知県衛生研究所  
山下照夫、皆川洋子

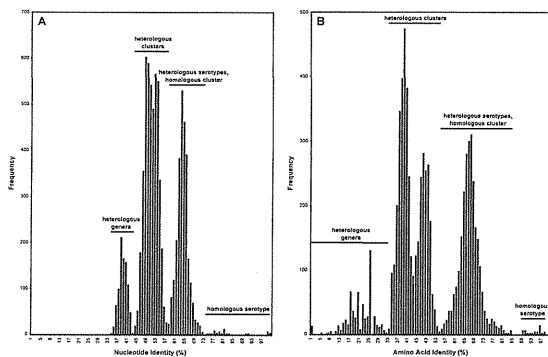
2016. 1. 8

1

## RT-PCRのエンテロウイルス標的的部位



Frequency distribution of pairwise identity scores for comparison of VP1 nucleotide (A) and deduced amino acid (B) sequences.



M. Steven Oberste et al. J. Virol. 1999;73:1941-1948

Journal of Virology

Journals.ASM.org | Copyright © American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

## 手足口病ウイルスの同定作業手順書概要案

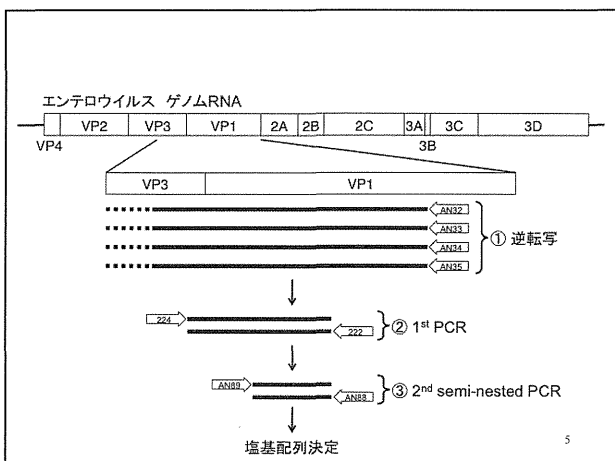
### 【精度管理内容】

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ス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。

4



5

## 1. 試薬と実験器具

### 共通の実験器具

RNA抽出用試薬

電気泳動用試薬・機器

塩基配列解析用試薬

逆転写プライマー

PCR/シーケンスプライマー

逆転写・PCR試薬

6

逆転写プライマー  
AN32 GTYTGCCA  
AN33 GAYTGCCA  
AN34 CCRTCRTA  
AN35 RCTYTGCCA

PCR プライマー  
224 GCIATGYTIGGIACICAYRT  
222 CICCIGGIGGIAYRWACAT  
AN89 CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG  
AN88 TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT

7

逆転写プライマー  
AN32 GTYTGCCA  
AN33 GAYTGCCA  
AN34 CCRTCRTA  
AN35 RCTYTGCCA

PCR プライマー  
224 GCIATGYTIGGIACICAYRT  
222 CICCIGGIGGIAYRWACAT  
AN89 CCAGCACTGACAGCAGYNGARAYNGG  
AN88 TACTGGACCACCTGGNGGNAYRWACAT

8

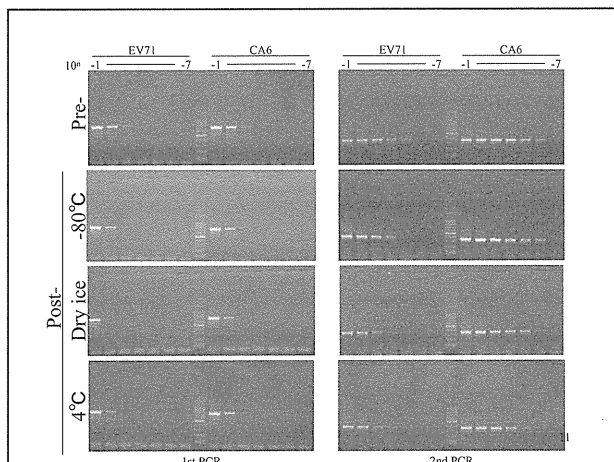
**2. 操作**

- 1) cDNAの合成
- 2) 1<sup>st</sup> PCR
- 3) 2<sup>nd</sup> PCR
- 4) 電気泳動
- 5) PCR産物の精製
- 6) シークエンス反応
- 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
- 8) 塩基配列の相同性検索

9

- 1) cDNAの合成(1.5時間)  
22°C 10 min  
42°C 60 min  
95°C 5 min
- 2) 1<sup>st</sup> PCR 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)  
60°C 45 sec
- 3) 2<sup>nd</sup> PCR(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

10



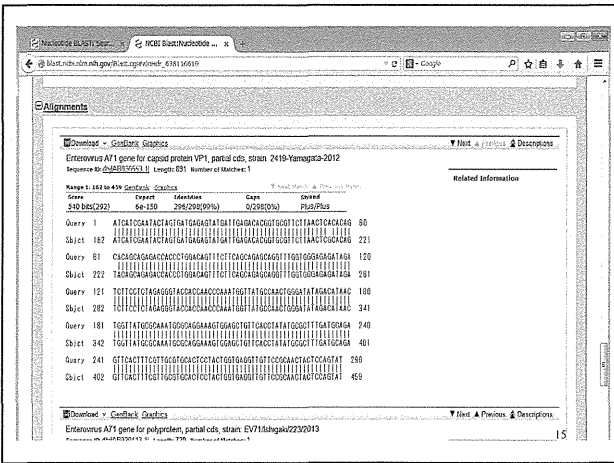
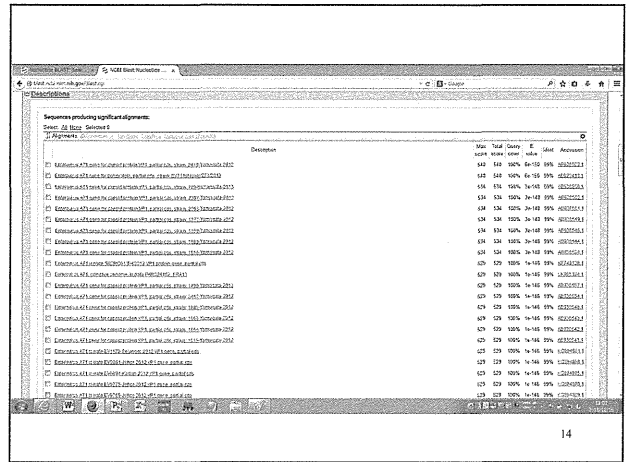
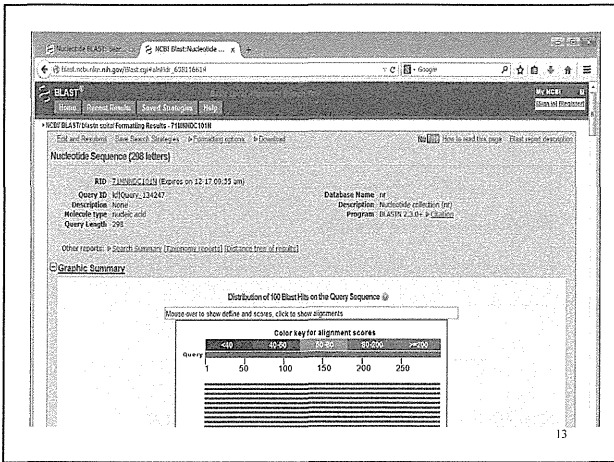
**シーケンスの結果**

```

ATCATCGAATACTAGTGATGAGAGTATGATTGAG
ACACGGTGCGTTCTTAACTCACACAGCACAGCAG
AGACCACCTGGACAGTTTCTTCAGCAGAGCAGG
TTTGGTGGGAGAGATAGATCTTCTCTAGAGGGT
ACCACCAACCCAAATGGTTATGCCAACTGGGATA
TAGACATAACTGGTTATGCGCAAATGCGCAGGAA
AGTGGAGCTGTTACCTATATGCGCTTTGATGCA
GAGTTCACTTTCGTTGCGTGCACTCCTACTGGTGA
GGTTGTTCCGCAACTACTCCAGTAT
    
```

↓  
BLAST検索

12



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:	ATGATCGAATACTAGTGATGAGAGTATGATTGAGACACGGTGCCTTCTAACTCACACAG CACGACGAGACACCCTGGACAGTTCCTTTCAGCAGAGCAGGTTTGGTGGGAGAGATAG ATGTTCTCCTCTAGAGGGTACCACCAACCCAAATGGTTATGCCAAGCTGGGATATGACATAA CTGGTTTATGGCAAATGGCGAGGAAGTGGAGCTGTGACCTTATGCGGCTTTGATCGAG AGTTGACCTTTCGTTGGTGCACCTCCTACTGTTGAGGTTGTTCCGCAACTACTCCAGTAT				
使用機種:	<table border="1"> <tr> <td>PCR</td> <td>ABI Veriti</td> </tr> <tr> <td>シーケンス</td> <td>ABI 3130 Genetic Analyzer</td> </tr> </table>	PCR	ABI Veriti	シーケンス	ABI 3130 Genetic Analyzer
PCR	ABI Veriti				
シーケンス	ABI 3130 Genetic Analyzer				

8) 塩基配列の同源性検索  
 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  
 プ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同源性が75%以上であることを確認する。
4. 次に近縁の型との同源性が70%以下であることを確認する。

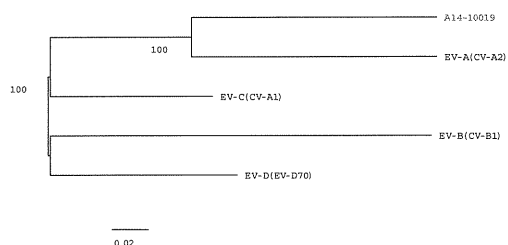
エンテロウイルス標準株のVP1(CODEHOP)領域データベース

- 種別用ファイル(1)
- 型別用ファイル(A~D)

種別用ファイル

- CV-A2 (EV-A)
- CV-B1 (EV-B)
- PV-1 (EV-C)
- EV-D68 (EV-D)

19



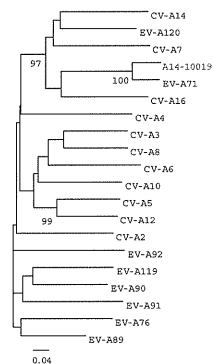
種別用データベースを用いた系統樹解析(NJ法)

20

型別用ファイル

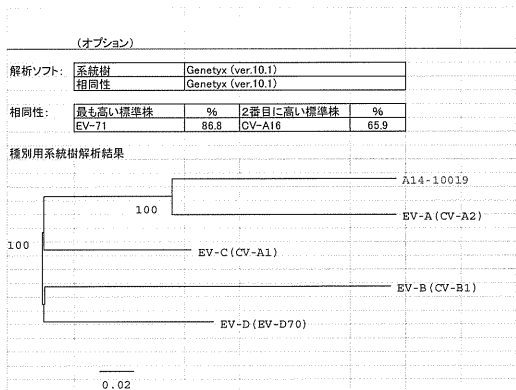
EV-A (21型)	EV-B (60型)	EV-C (60型)	EV-D (4型)
CV-A2	CV-B1	E-28	PV-1
CV-A3	CV-B2	E-29	PV-2
CV-A4	CV-B3	E-30	PV-3
CV-A5	CV-B4	E-31	CV-A1
CV-A6	CV-B5	E-32	CV-A11
CV-A7	CV-B6	E-33	CV-A13
CV-A8	CV-A9	EV-B69	CV-A17
CV-A10	E-1	EV-B73	CV-A19
CV-A12	E-2	EV-B74	CV-A20
CV-A14	E-3	EV-B75	CV-A21
CV-A16	E-4	EV-B77	CV-A22
EV-A71	E-5	EV-B78	CV-A24
EV-A76	E-6	EV-B79	EV-C95
EV-A89	E-7	EV-B80	EV-C96
EV-A90	E-8	EV-B81	EV-C99
EV-A91	E-11	EV-B82	EV-C102
EV-A92	E-12	EV-B83	EV-C104
EV-A114	E-13	EV-B84	EV-C105
EV-A119	E-14	EV-B85	EV-C109
EV-A120	E-15	EV-B86	EV-C113
EV-A121	E-16	EV-B87	EV-C116
	E-17	EV-B88	EV-C117
	E-18	EV-B89	EV-C118
	E-19	EV-B97	
	E-20	EV-B98	
	E-21	EV-B100	
	E-24	EV-B101	
	E-25	EV-B106	
	E-26	EV-B107	
	E-27	EV-B111	

21



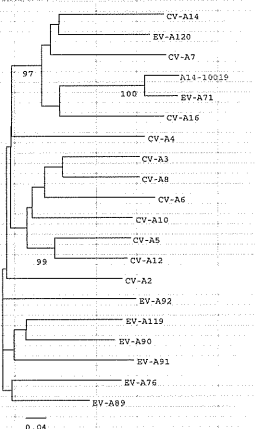
型別用データベースを用いた系統樹解析(NJ法)

22



23

型別用系統樹解析結果



24

まとめ

- ・ウイルスRNAを送付してRT-PCR法で増殖・遺伝子解析を実施する。
- ・VP1領域を標的とするCODEHOP PCR法の実施手順書案を作成した。
- ・オプションとしてCODEHOP PCR法で増殖される領域についてエンテロウイルス標準株のデータベースを作成し系統樹解析により同定する。

25

「手足口病」外部精度管理検討項目

1	送付検体の性状1	・ウイルス分離を行う? ・感染性物質? RNA? ・室温? クール?	備考
2	送付検体の性状2	・咽頭拭い液模擬検体? FTAカード?	
3	精度管理を行う項目(手技)	・分離? →行う場合は次スライド ・遺伝子検査→次スライド参照 エンテロウイルス検出まで? 遺伝子型別まで? 中和? 疫学解析まで?	
4	精度管理を行う項目(個票等)	模擬個票をつける?	
5	実施時期・事後研修について		
6	その他(下記参照)		

先行事例を参考にする:  
・インフルエンザ(リアルタイムRT-PCR)  
・麻疹(リアルタイムRT-PCR)

26

感染研担当者と地研の連携

「手足口病」外部精度管理検討項目(追加)

- 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索法)
- 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

27

## 昨年度のサルモネラ 「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)

【方法】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の結果より推察された事象を基に問題点等を検証した。

北海道立衛生研究所 森本 洋  
H28.1.8 第二回研究班会議

1

## 昨年度供試試料

- 材料:ヒト由来糞便(胃腸炎患者を想定)
- 対象病原体  
添加血清型:  
*Salmonella* Infantis(鶏肉由来)  
→ 硫化水素非産生性の非典型株  
*Salmonella* Cerro(鶏盲腸便由来)  
\* 両血清型とも食肉衛生検査所から分与  
\* それぞれ100000CFU/g添加し、シードスワブで対応



感染研保有の菌株から供試するのは  
困難だった、とコメントされていた。

(ヒト由来株では、倫理審査の問題が発生する可能性?)

## H26年度トラブルシューティング(TS)ポイント

- 外部精度管理調査全体のTSを考えた場合  
1)実施側(システム、菌株選定、予備調査、送付方法等)のTS  
\* 試行段階だったこともあり、いくつかの検討課題が認められた。
- 2)検査結果のTS
- 1) → 実施側の課題解消  
2) → 参加側の課題解消 → 研修

3

## 昨年度の外部精度管理調査について-検討課題-

(石岡先生H26年度第二回班会議スライドより)

- 細菌検査精度管理実施要領の改訂
- 他の添加菌種の検討および菌株の入手方法
- 試料の作製について(臨床検体、菌株)
- 試料送付方法
- 試料送付に関わる送料
- 対象参加機関および実施時期

4

## 報告書には(1)

- 全国70以上の地衛研に同時に同一条件で臨床検体を送付することは現状の体制では難しい。  
(石岡先生報告書結論)
- 感染研での実施においては、  
\* BS室への届け出、審査、当日のチェック、梱包  
\* 対象11機関→7機関、4機関の2回に分け発送  
\* 79地衛研へ対応する場合、安定した大量の試料を作製し、同一期日に到着するよう発送するのはかなり困難。

5

## 報告書には(2)

- まずは、精度のしっかりした試料を作製することが必要であり、そのためには素性のはっきりした菌株の収集も重要であることが示唆された。  
(石岡先生報告書結論)

6



### 微生物学調査試料の作製

➢ 微生物学検査用調査試料の最大の問題点は、添加菌の増殖、死滅、変異をいかに抑えるのか

➢ 定性検査で結果に影響を及ぼさないことを前提とした場合には、いかに死滅させないか  
⇒調査試料中の添加菌の均一性、安定性の担保

➡ **妥当性評価**

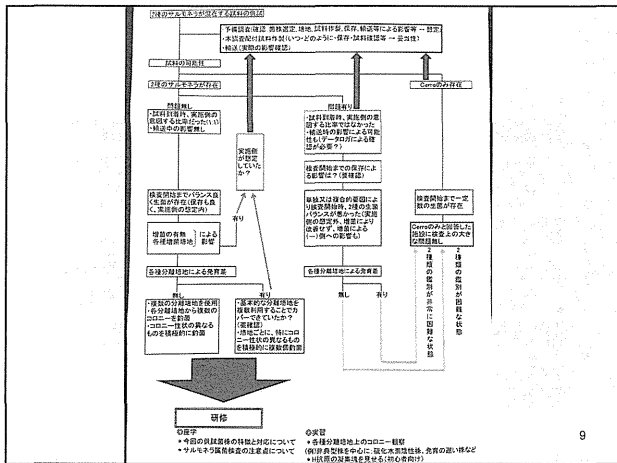
これらは定量検査では結果のばらつき、定性検査では誤判定につながる可能性がある

外部精度管理調査期間中にどの容器を用いても、いつ検査を実施しても一定の結果が得られることが調査試料に求められる前提条件

➡ **実施側の想定**

7

- ### 全国規模の精度管理を行うためには
- ①外部精度管理用菌株の検討(安定性と管理)
  - ②配付試料の安定化に向けた検討(作製・輸送法・温度管理)
  - ③外部精度管理参加条件の設定(設備が対象菌に「適」?)
  - ④配付方法の検討(梱包は?、配送機関は?)
  - ⑤検査方法の検討(定義:どの部分に重きを置くのか)
  - ⑥プレ外部精度管理実施
  - ⑦評価と解析方法の検討
  - ⑧内部精度管理の必要性
  - ⑨外部機関との協力(将来的な外部精度管理委託機関)
  - ⑩その他(検査法の標準化、研修会等)
- 8



- ### 実施側のTS①
- 予備調査は行ったか。  
\* 行っていた場合、①菌株選定、②選定菌株と各種培地との相性、③実際の実施をどこまで想定し確認したか(試料作製直後、試料到着時及びそれ以降、輸送による影響:分割・温度・時間、適切な保存法等)。→ 確認後の想定
  - 本調査配付試料作製  
→ ③と同等の確認による妥当性評価  
特に接種ミスが無いか2人以上での確認
  - 輸送:実際にどのような影響があるか確認が必要か?
- 10

- ### 検査結果のTS&研修①
- 配付試料から実施側が想定していたこと(推定)
    - ①急性期のサルモネラ症
    - ②血清型の異なる2種類のサルモネラがほぼ同程度混在しているサルモネラ症
    - ③硫化水素(-)で選択分離平板によっては、発育が遅い非典型的なタイプと抗原構造が変異する可能性のあるタイプによるサルモネラ症
    - ④増菌や選択分離平板によって、発育が異なるタイプが混在するサルモネラ症
  - 参加機関側は、実施側が想定するようなサルモネラ症に対応するための検査意識向上が必要だ

- ### 実施側のTS②
- 今回は、実施側が想定していたこと(推定)が複雑だったこと、それに基づく配付試料の妥当性評価が困難だったことから、  
\* 実施側は、
    - ①外部精度管理調査として参加機関に求める結果の適切な想定。
    - ②適切な妥当性評価が可能な配付試料の作製。
- 以上のことを踏まえて調査を実施することが必要。
- 12

### 検査結果のTS&研修②

- 配付試料の妥当性評価が困難だったことが否めな  
いたため、TSポイントの絞り込みが難しい状況。
- そのため、  
①事後研修の実施を見送ることに。  
②一般的な対処確認(培養温度、試薬期限、使用培  
地、経験値等)について別で細菌研修が必要か。  
\* 経験が浅い → ミスを誘発する可能性がある?  
大きく見て相関関係はあるかもしれないが、因  
果関係があると断定できない。機関内担当者全員  
が同様の認識で検査している可能性も。。。 13

### 検査結果のTS&研修③

- 検査意識向上と内部精度管理につながるような、サルモ  
ネラ属菌検査研修会の実施。
- ◎座学(案):サルモネラ属菌検査の注意点
  - \* 供試菌株の特徴と対応について(推定)
  - \* 培地:各特徴を理解、複数使用の推奨
  - \* 非典型的なタイプの可能性を視野に入れた検査
  - \* チフス菌、パラチフスA菌の検査について
  - \* 亜種ごとの性状について
  - \* Kauffmann-Whiteの抗原構造表について
- ◎実習(案)
  - \* 各種分離培地上のコロニー観察(非典型的株中心に)
  - \* H抗原の凝集塊を見せる(初心者向け) 14

### まとめ1

- 本課題は、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の結果より推察  
された事象を基に問題点等を検証した。
  - 結果、配付試料の妥当性評価が困難であり、  
問題点の絞り込みが難しい場合があった。
- 15

### まとめ2

- 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、内部精度管理ができる  
システムを導入し、日常検査の精度担保や外  
部精度管理の結果が思わしくなかった場合  
の適切な検証ができるよう、体制を整える必  
要があると思われた。
- 16

## コレラ菌(2015 EQA)の感染研 から地衛研への発送について (候補株の選定含む)

病原体検出マニュアルの改定と公開 (7月～、9月1日公開)  
配付菌株の確認と決定 (7月～9月)  
感染研内書類の確認 (病原体分与・輸送)  
輸送容器の事前確認 (9月29日)  
菌株の発送 (10月1・2日)

細菌WG 野川英二 (国立感染症研究所)  
大西真 (国立感染症研究所)  
桂芳喜久代 (国立感染症研究所)  
坂本圭 (北海道立衛生研究所)  
森田清志 (埼玉県衛生研究所)  
磯野緑子 (富山県衛生研究所)  
野村和子 (大阪府立公衆衛生研究所)

### 菌株選定一プレチェック (7月～9月)

コレラ: 多量の水様性下痢を主な症状とする急性感染性腸炎 脱水により死に至る場合がある。

原因: コレラの原因となる細菌をコレラ菌と呼ぶ = コレラ菌

コレラ毒素: コレラの主症状である多量の水様性下痢が起きる機序は、コレラ毒素によって説明される。

コレラ毒素 (CT) を産生する *Vibrio cholerae* のうち O 血清群 1, 139 (O1, O139) のみが公衆衛生学的には重要とされている。

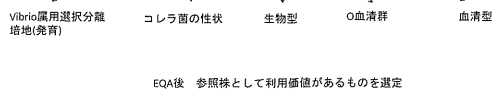
生物種としての名前

コレラと正しく診断するには、コレラ菌を正しく同定することが求められる

- 1 *Vibrio cholerae* としての同定
- 2 O 血清群の決定
- 3 CT 毒素産生性 (あるいは CT 毒素遺伝子の確認)



### *Vibrio cholerae* El Tor O1 Inaba CT(+/-)



### 菌株選定一プレチェック (7月～9月)

1 *V. cholerae* の同定の鍵となる性状は、以下となる。

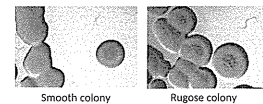
- 1) *Vibrio* 選択分離培地での増殖
- 2) 白糖の分解
- 3) リジン脱炭酸陽性
- 4) 無塩ブイヨンでの発育

2 O 血清群の決定 (O1, O139)

3 CT 毒素産生性 (あるいは CT 毒素遺伝子の確認)

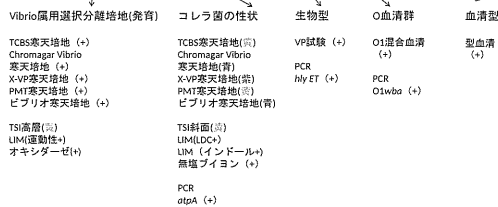
今回は試験菌株として、

- 選択分離培地での発育性、生化学的性状、O 抗原血清に対する反応性について、性状が明瞭であるものを選択
- 選択分離培地での発育の悪いものやコロニー形態の異常なもの、VP 試験 (*V. cholerae* の生物型を決める重要な性状) 陰性の株は除く。



### 菌株選定一プレチェック (7月～9月) チェックポイント

#### *Vibrio cholerae* El Tor O1 Inaba CT(+/-)



### 菌株選定一プレチェック (7月～9月)

送付する菌株  
*V. cholerae* O1 コレラ毒素産生  
*V. cholerae* O1 コレラ毒素非産生  
*V. cholerae* O139 コレラ毒素産生

STEP 1: 保存株のなかから計 17 の候補株を感染研で確認。

STEP 2: 9 株を 3 回にわたり北海道衛研、埼玉県衛研、富山県衛研、大阪府衛研に送付。各所で性状を確認。

最終的な 3 株を選定。

保存株は新鮮分離株ほどコロニー性状、生化学的性状、血清型別が明確にでないことがある。

配付作業に実施困難なことがあるのか確認が必要。  
希望する施設には全て配付することとした（上限を決めず）。

### 74施設が参加

### 感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領

This is a screenshot of a document titled "感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領". It contains several sections with text and tables, detailing the procedures for the distribution and handling of pathogens. The document is organized into numbered sections and includes a table with columns for various categories.

### 感染研 病原体等の分与等に関する

特定病原体等分与（申請書）

申請種別	申請内容	申請書	申請書
1. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
2. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
3. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
4. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
5. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
6. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
7. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
8. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
9. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
10. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
11. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
12. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
13. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
14. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
15. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
16. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
17. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
18. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
19. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
20. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
21. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
22. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
23. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
24. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
25. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
26. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
27. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
28. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
29. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
30. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
31. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
32. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
33. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
34. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
35. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
36. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
37. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
38. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
39. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
40. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
41. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
42. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
43. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
44. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
45. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
46. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
47. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
48. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
49. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
50. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
51. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
52. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
53. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
54. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
55. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
56. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
57. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
58. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
59. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
60. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
61. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
62. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
63. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
64. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
65. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
66. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
67. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
68. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
69. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
70. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
71. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
72. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
73. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書
74. 病原体等の分与	病原体等の分与	申請書	申請書

参加施設の取扱様式Bを1枚にまとめることで、簡素化

書類が参加施設ごとに必要。その整理・書類管理のための事務局機能が必要。

### 感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領

This is a screenshot of a document titled "感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領". It features a table with columns for various categories and a list of items. The document is organized into numbered sections and includes a table with columns for various categories.

参加申込書からリスト作成が必要

### 感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領

This is a screenshot of a document titled "感染研 病原体等の分与等に関する取り扱い要領". It features a table with columns for various categories and a list of items. The document is organized into numbered sections and includes a table with columns for various categories.

今後、EQIに関する依頼検査はWHOCCと同等とする検討を実施。

外部精度管理調査の研究班がおこなった事務局機能を担う部門が必要

### 感染研 病原体輸送に関する手続き、提出書類

This is a screenshot of a document titled "感染研 病原体輸送に関する手続き、提出書類". It features a table with columns for various categories and a list of items. The document is organized into numbered sections and includes a table with columns for various categories.

担当者が細色、チェックシートを用いて確認  
管理運営委員が点検、確認のサイン  
発送場所（総務部庶務）  
バイオセーフティ管理室員が最終確認、サイン  
運搬業者へ渡す