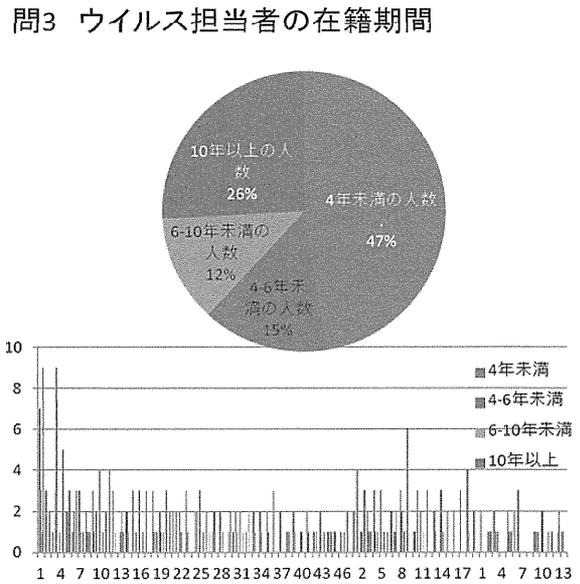
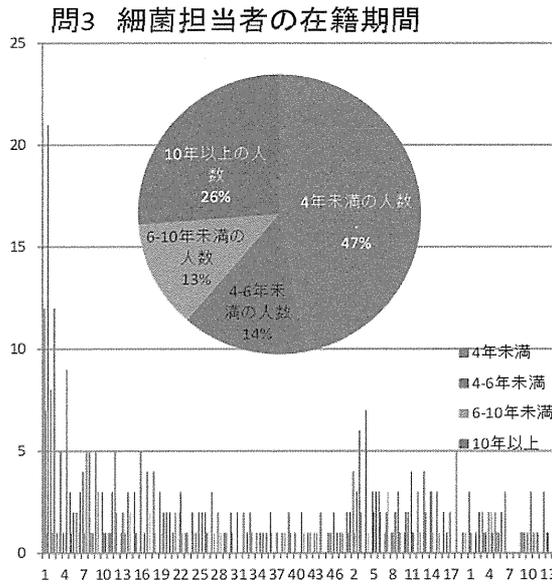


問3 病原微生物検査担当者の在籍期間

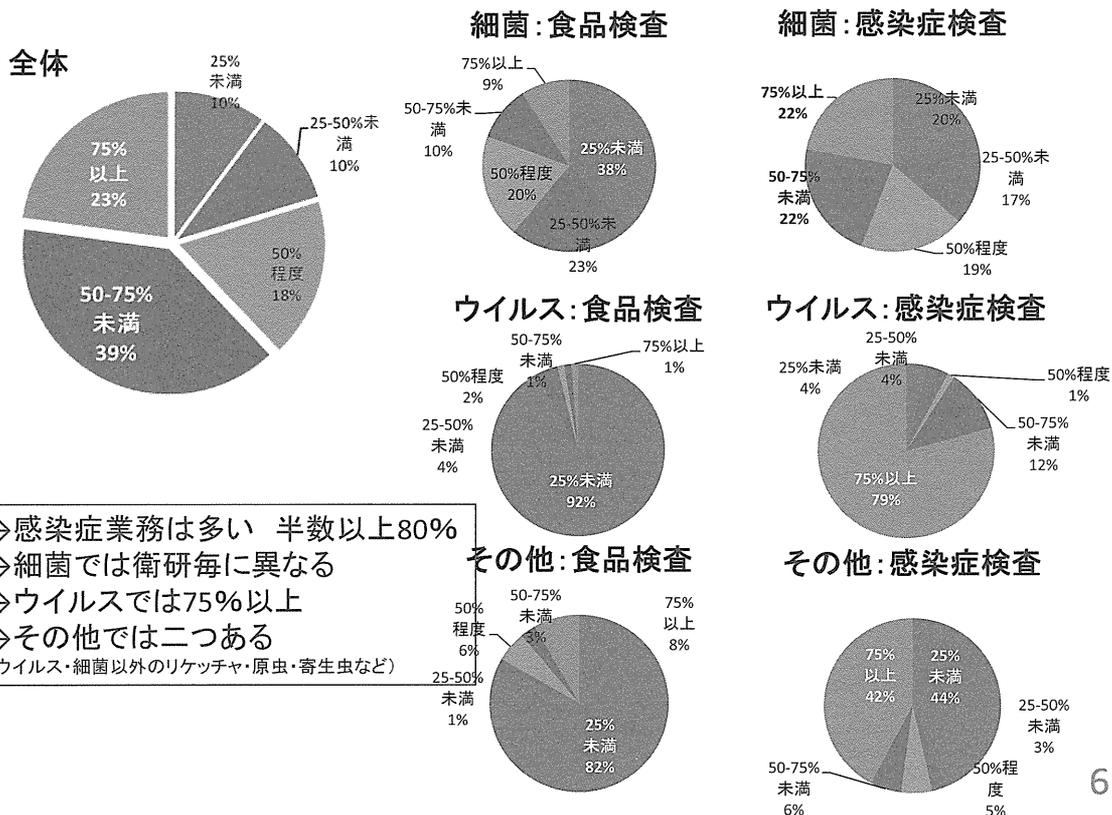


細菌とウイルス担当者の比率はほぼ同じ
 若い担当者47%と経験者26%が目立ち、中間層が少ない
 →県型地衛研では経験者が1/4以上(減少中)、中核市地衛研では経験者は1/4以下

5

問15 感染症検査業務の割合

V. 4 (20150228Final)

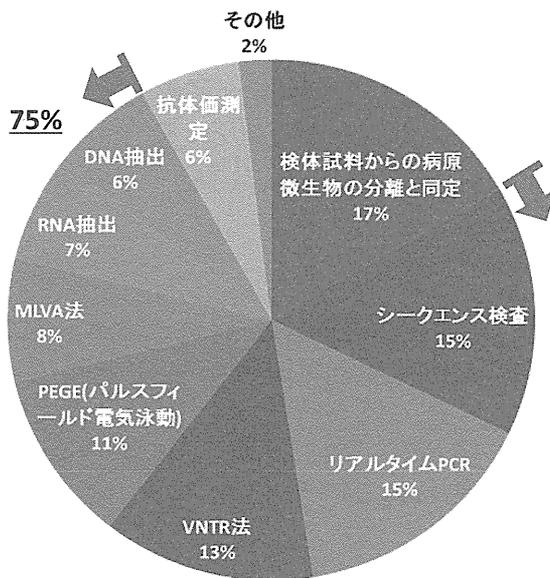


6

C. 外部精度管理の対象感染症について
問6 地衛研が検査可能な(している)感染症対象疾患(→30疾患)
地衛研のおよ80%以上ができる感染症を下記にリスト

感染症	疾病名	1. 検査対応											
		全体			都道府県			指定都市			中核都市		
		できる	できない	できる%	できる	できない	できる%	できる	できない	できる%	できる	できない	できる%
二類 5疾病	重症呼吸器症候群	61	15	80	38	8	83	16	3	84	7	4	64
	鳥インフルエンザ(H5N1)	72	5	94	46	1	98	18	1	95	8	3	73
三類 5疾病	コレラ	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
	細菌性赤痢	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
	腸管出血性大腸菌感染症	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
	腸チフス	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
	パラチフス	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
四類 43疾病	ウエストナイル熱	61	16	79	38	8	83	16	3	84	7	5	58
	A型肝炎	72	6	92	46	1	98	18	1	95	8	4	67
	重症熱性血小板減少症候群	70	6	92	45	1	98	18	1	95	7	4	64
	デング熱	71	7	91	46	1	98	17	2	89	8	4	67
	レジオネラ症	70	7	91	46	1	98	16	2	89	8	4	67
五類 18疾病	後天性免疫不全症候群	60	16	79	38	8	83	14	4	78	8	4	67
	先天性風しん症候群	58	16	78	39	6	87	15	3	83	4	7	36
	風しん	72	3	96	47	0	100	17	0	100	8	3	73
	麻疹	72	3	96	47	0	100	17	0	100	8	3	73
五類 (定点) 26疾病	RSウイルス感染症	63	12	84	45	2	96	16	1	94	2	9	18
	咽頭結膜熱	64	11	85	46	1	98	17	0	100	1	10	9
	A群溶血性レンサ球菌咽頭炎	56	19	75	38	9	81	15	2	88	3	8	27
	感染性胃腸炎	75	1	99	47	0	100	16	0	100	12	1	92
	手足口病	65	10	87	47	0	100	17	0	100	1	10	9
	ヘルパンギーナ	64	11	85	47	0	100	16	1	94	1	10	9
	流行性耳下腺炎	61	13	82	43	3	93	16	1	94	2	9	18
	インフルエンザ(鳥インフルエンザ及び新型インフルエンザ等感染症を除く)	71	4	95	46	0	100	17	0	100	8	4	67
	急性出血性結膜炎	58	16	78	41	5	89	17	0	100	0	11	0
	流行性角結膜炎	61	13	82	43	3	93	17	0	100	1	10	9
	感染性胃腸炎 (病原体がロタウイルスであるものに限る)	67	9	88	46	1	98	17	0	100	4	8	33
無菌性髄膜炎	65	10	87	47	0	100	17	0	100	1	10	9	
指定 感染症	中東呼吸器症候群	67	8	89	45	2	96	17	0	100	5	6	45
	鳥インフルエンザ(H7N9)	70	3	96	45	1	98	17	0	100	8	2	80

問8 外部精度管理が必要と思われる検査の方法・技術



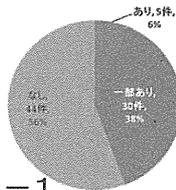
(その他)
IS-printing System,
コンベンショナルPCR,
LAMP,
電子顕微鏡検査,
結核:QFT検査,
薬剤感受性試験,
遺伝子抽出からPCRまでをトータルで

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

D. 感染症等の検査方法

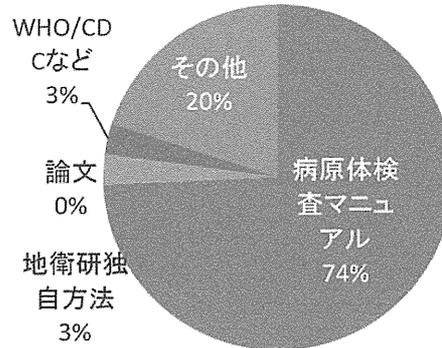
H

問9 地衛研で行う感染症検査における標準作業手順書(SOP)の有無を教えてください。



あり5件、6%
一部あり、30件、38%
なし、44件、56%

問10-2 SOP作成の基となる根拠は何ですか。



「その他」
厚労省通知、国衛研マニュアル(ノロ)、
食品衛生検査指針、結核検査指針、
微生物検査必携

「病原体検出マニュアル」が大部分
→更新や維持管理は重要!

問10-1

SOPを作成している感染症リスト(多かった順)

順位	番号	疾病名	集計数
1	15	腸管出血性大腸菌感染症	16
1	82	感染性胃腸炎	16
3	12	鳥インフルエンザ(H5N1)	14
4	14	細菌性赤痢	13
4	16	腸チフス	13
4	17	パラチフス	13
7	78	麻疹	12
8	77	風しん	11
9	31	重症熱性血小板減少症候群	8
10	38	デング熱	7
11	9	結核	6
11	20	A型肝炎	6
12	11	重症呼吸器症候群	5
12	36	チクングニア熱	5
12	37	つつが虫病	5
12	58	レジオネラ症	5

「一部あり」を加えると44%にあり
SOPありは比較的大きい地衛研

病原体検出マニュアル(平成15年12月9日発刊)

<http://www.nih.go.jp/niid/ja/labo-manual.html>

<前書き 吉倉元所長>

法律に基づいて、感染症の報告がなされる場合、報告は一定の基準に依らなければならない。又、感染症の報告は科学的な証拠、即ち、病原体検査、で裏打ちされたものである必要があるが、そうであれば、少なくとも日本の中では基準化したものを使うべきである。

<国立感染症研究所Web site>

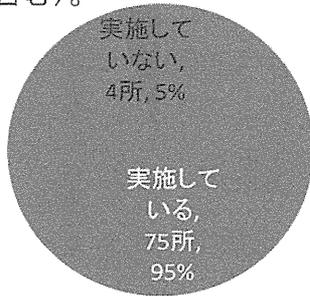
病原体検出マニュアルは、感染症法に基づいて感染症の報告がなされる際の検査の標準化のために、国立感染症研究所と全国地方衛生研究所の共同作業で作成されたものであり、感染症対策に係る行政対応における大きな根拠となっております。本マニュアルを使用し、常に評価し、科学の進歩にあつたものに改善していくことが常に求められています。

- 検出マニュアルは「日本の感染症法にもとづいた標準的な検査法」
- 検査結果は正確で信頼に値する方法による
- 感染症の検査の根拠にできるもの
- 科学的進歩にあつたものに改善していくことが求められる。

E. 感染症検査の精度管理

H

問20 感染症検査について外部精度管理を実施していますか(研究班で行われているものも含む)。

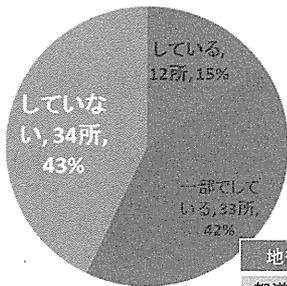


問21-1 その病原体名は何ですか(研究班で行われているものも含む)。

1. インフルエンザ 50
2. 麻疹・風疹 14
3. レジオネラ 33
4. 上記3つとも 5
5. その他
EHEC, 結核VNTR、ノロ、狂犬病、サルモネラ、ツツガムシ、ほか
→研究班のみで行われている

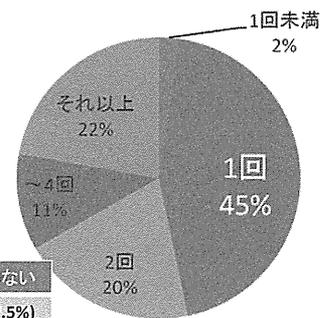
問22 内部精度管理を実施していますか。

実施頻度は年にどれくらい



していると一部しているについて

地衛研規模	している	一部している	していない
都道府県	6 (12.7%)	21	20 (42.5%)
政令指定都市	1 (5.3%)	9	9 (50%)
中核市	5 (38.5%)	3	5 (38.5%)

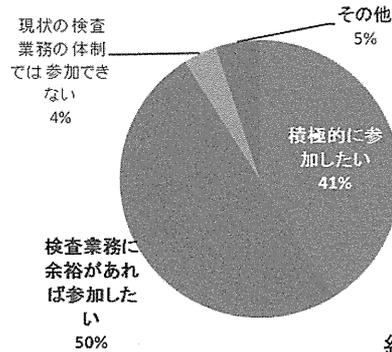


11

G. 感染症検査の外部精度管理実施に関する課題等

V. 4 (20150228Final)

問28 感染症検査に関する外部精度管理への参加意向について

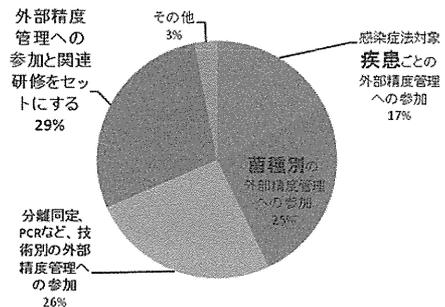
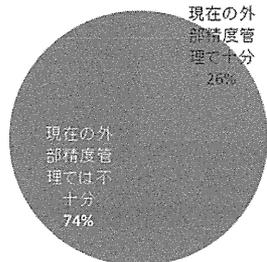


- ・実施項目次第
- ・業務への影響等で判断
- ・予算化が必要

→目的が明瞭であればほとんどが参加の意向

問29-1 細菌検査

細菌:不十分とした場合の望ましい外部精度管理



→70%程度は現在の外部精度管理は不十分。分離同定。研修とセットに。 12

感染症検査はGLPや精度管理になじまない？-1 (寄せられたご意見)

- 1) 独自に開発し工夫している、2) 新しいウイルスや検査法が登場、3) あらゆる手技で検出する病原体検査は、「逸脱」ができないGLPや精度管理にはなじまない
- ほか、定性検査である。検査対象が不明の場合もある。

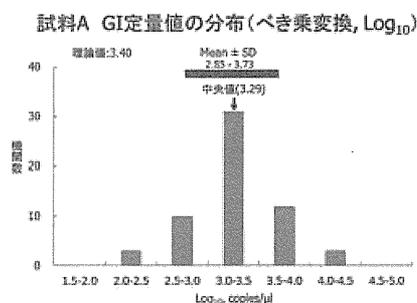
感染症検査の標準作業手順書？(私見)

1. いわゆる食品検査の公定法に類似したような標準作業手順書(SOP, 全国レベル)
(全国レベル、どこでも誰でも同じ結果が得られることを目標)
→検査結果に信頼性が確保され、法的な人の行動制限に係わる場合
 2. 外部精度管理のときに用いる標準作業手順書？(SOP?、使用目的限定)
(全国レベル)
→個々の検査施設の全国レベルでの比較、問題点の把握、検査の改善に役立てる
 3. 各施設の各部署で用いる標準作業手順書？(検査プロトコールか、施設レベル)
(個々の施設レベル、検査の分担、施設の検査の信頼性担保、結果を得る)
→複数の担当者が同じように作業でき、同じ結果が得られることを担保する
→より良い検査法につねに改善(創意工夫可)
- 複数以上の種類の標準作業手順書？があってもいい？便利な文言だが正確な意味

H26年度ウイルスおよび細菌の外部精度管理調査の実施

1. ウイルス

- ✓ リアルタイムPCR法によるノロウイルス遺伝子定量
- ✓ NoV遺伝子挿入プラスミッド配布し、定量値、Ct値、標準曲線、相関係数、試薬、機器、ほかを報告
- ✓ 59地衛研が参加し報告(37/47, 8/19, 14/14)



- 20機関(33.9%)の定量値の一部あるいはすべてが1SD基準値範囲外であった。
- 検量線用の標準物質の劣化、ピベッティングのばらつきおよび機器保守点検の問題などがあげられた。
- さらに事後のアンケート調査・解析中。
→標準品の再配布を行った。
→H27にトラブルシューティング研修

2. 細菌

- ✓ サルモネラ属菌検査に関する標準的な精度管理実施手順の作成
- ✓ 試料として人由来糞便(胃腸炎患者を想定)
- ✓ 対象病原体は*Salmonella Infantis*, *Cerro*
- ✓ 11地衛研(精度管理部会機関)
- ✓ ゆうパック(チルド便)を利用し、臨床検体(病原体)として感染研村山庁舎から発送

試料からのサルモネラ検出結果

	試料 1	試料 2
陰性検出数	11	0
阳性検出数	0	11
計	11	11

試料1から検出されたサルモネラの血清型

	<i>Salmonella</i> <i>Cerro</i> のみ	<i>Salmonella</i> <i>Infantis</i> のみ	<i>Salmonella</i> <i>Cerro</i> + <i>Infantis</i>
分種 機数	3	0	8

* 検定および血清型、H血清型、P抗原の表記を含む

- 参加全機関ともサルモネラ属菌を検出した(全機関試料2は陰性)
- 一部の機関で硫化水素非産生サルモネラ(*S. Infantis*)が検出されなかった
- 試料作製方法、試料送付方法、および機関の募集方法および実施時期の検討
→増菌培養の有無

厚生科学研究費補助金(保健医療福祉地域総合調査研究事業) 衛藤班1 表1
「地方衛生研究所の機能強化に関する研究」分担研究
「行政検査における精度管理システム構築に関する研究」
分担研究者 衛藤繁男(神奈川衛研) H9(1997)年3月(最終年度)

目 次 PDF化し配布

1.	分担研究報告書	1
2.	行政検査における精度管理システムの構築に関する提言	5
3.	アメリカ合衆国における Public Health Laboratories の役割と精度管理システム	9
➡ 4.	外部精度管理調査(総括)	51
5.	外部精度管理調査「微生物部門:細菌系」	55
6.	外部精度管理調査「微生物部門:寄生動物系」	79
7.	外部精度管理調査「理化学部門:食品添加物」	83
8.	外部精度管理調査「理化学部門:農薬」	95
➡ 9.	内部精度管理マニュアル作成(総括)	109
10.	内部精度管理の進め方と留意点(微生物部門)	111
11.	内部精度管理の進め方と留意点(理化学部門)	119
12.	業務管理文書作成のための一般的考え方	123
13.	標準作業書作成のための標準作業書(案)	127
14.	寄生動物に対する抗体測定に用いる ELISA のための標準作業書(案)	131
➡ 15.	研修	135

資 料

1. 外部精度管理調査資料
 - 微生物部門細菌系外部精度管理調査票、配付試料調査票、供試菌株参考性状
 - 微生物部門寄生動物系外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考回答
 - 理化学部門(食品添加物)外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考値
 - 理化学部門(農薬)外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考値
2. 研修資料
 - 研修に関するアンケート調査集計結果
 - 赤痢アメーバ、クリプトスポリジウムを中心とした腸管寄生原虫の検査法

15

H9年度の報告書(3年目の総括研究報告書)から

衛藤班2

精度管理システムの目的は、地方衛生研究所の強化による公衆衛生への貢献で、内部精度管理活動推進の支援体制、外部精度管理事業、レファレンスシステム、研修・教育システムおよび情報システムから構成される。

1. 行政検査における精度管理システムの構築に関する提言

H9.3の地衛研設置要綱に試験検査業務に行政検査の精度管理が定められている。

A. 行政検査の特性(一般の検査と異なる特徴):

- 1) 社会性: 検査結果は個人にとどまらず一般社会や広く国内外社会にまで波及する(複数地域での発生、行政・法律上の処置、行政上・国際問題化の要素)。よって検査結果の再現性・整合性・信頼性が要求され、事例の解析には他地域の情報が不可欠。
- 2) 能動性: 検体の選択は結果に関わるので、検査実施側が被験者や物を選択する。
- 3) 集団性: 多くの場合集団を対象として検査する。
- 4) 多様性: 検体の種類がヒト由来のみならず、食品や環境由来のことまで多岐にわたる。よって処理法・検査の進め方が複雑になる。

B. 地衛研はレファレンス機能を担う

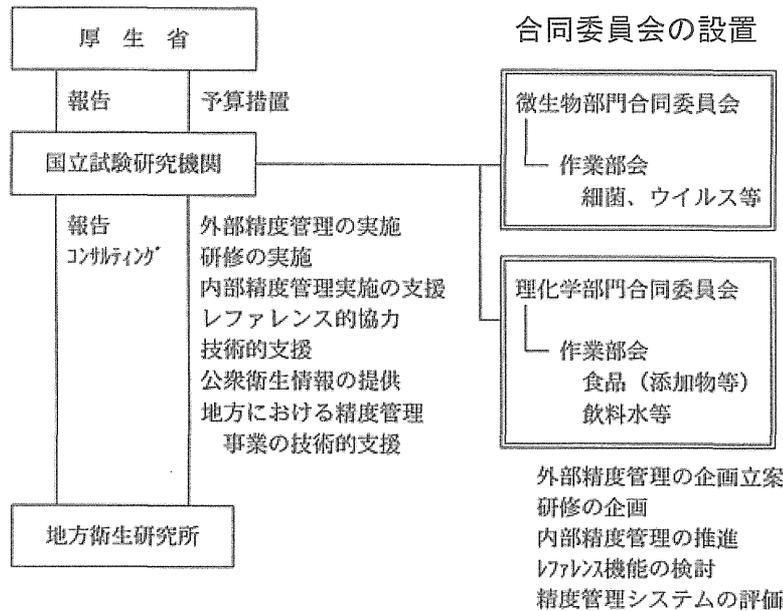
C. 地衛研の検査には、1)高度の技術・知識を要する検査、2)希少事例の検査、3)研究レベルで行われる技術・手法を利用する検査があるため、精度管理の確立は困難な場合が多いが、こういった状況に応じた精度管理システムをめざすことが必要。

16

衛藤班4

図1. 行政検査における精度管理システムの概略図

2. 概略(図1)



国立試験研究機関が行政検査の精度管理システムの中核となる役割を担うことが期待される。

1)合同委員会、2)精度管理システム、(1)外部精度管理調査:実施は合同委員会、試料は国研と地研で作業、予算は国研、(2)研修の実施:外部精度管理の結果にもとづく研修、(3)公衆衛生情報システム、(4)内部精度管理実施の支援、(5)レファレンスセンター機能の整備・拡充、(6)地方における検査機関の精度管理業務の支援
精度管理システムの構築は、行政検査の質の向上を意図するのみならず、国民の健康と財産を守ることを目的とする。国レベルの事業は不可欠である。

17

衛藤班6

提言(全体の概要)

1. 活動

1) 内部精度管理(個々の検査機関で実施)、2)外部精度管理(内部精度管理の機能チェックと検査機能を第三者的立場から評価)、3)レファレンス(情報や標準株標準品、特殊項目の集中実施、試薬等の品質、検査法の検討など)、4)研修・教育、5)公衆衛生情報システム

2. 概略(図1)

国立試験研究機関が行政検査の精度管理システムの中核となる役割を担うことが期待される。

1)合同委員会、2)精度管理システム、(1)外部精度管理調査:実施は合同委員会、試料は国研と地研で作業、予算は国研、(2)研修の実施:外部精度管理の結果にもとづく研修、(3)公衆衛生情報システム、(4)内部精度管理実施の支援、(5)レファレンスセンター機能の整備・拡充、(6)地方における検査機関の精度管理業務の支援

精度管理システムの構築は、行政検査の質の向上を意図するのみならず、国民の健康と財産を守ることを目的とする。国レベルの事業は不可欠である。

3. 外部精度管理調査: 1. 実行委員会組織、調査、問題点指摘・実施方法の評価等、2. 試料作製配布は国立試験研究機関で調整し梱包し配布、3. 回答の回収、4. 結果の参加施設への還元(菌株は参考株として利用)、5. 調査票の配布(試料受領月日、検査開始日と終了日、送付容器・試料の破損の有無、試料配布法、検査項目、回答期間、その他の問題点・意見など)。内部精度管理の重要性と外部精度管理調査の必要性が認められた。

4. 内部精度管理マニュアル作成と標準作業書案の作成(様式)

5. 研修:恒常的実施。ブロックごとに実施。

国立公衆衛生院の特別コースと希少感染症検査技術研修会があるが分野すべてをカバーしているわけではない。限られた人数しか受講できない。そして新興再興感染症への対応が必要。見直しと新しい研修システムの構築が望まれる。

18

<p>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</p> <p>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)</p> <p>平成26年度 総括・分担研究報告書</p> <p>平成27年3月</p> <p>研究代表者 佐多 徹太郎 (富山県衛生研究所)</p>	<p>目 次</p> <p>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実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) 1</p> <p>II. 分担研究報告書</p> <p>1. 感染症検査の精度管理に関する実態調査—アンケート調査結果— 佐多徹太郎ほか 13</p> <p>2. 地方衛生研究所へのウイルス検査に関する精度管理に係わる技術的支援 木村博一ほか 43</p> <p>3. 地方衛生研究所への細菌検査に関する外部精度管理導入に関する技術的支援 石岡大成ほか 65</p> <p>4. 地方衛生研究所への細菌検査に関する継続的外部精度管理導入に向けての 試行と課題 大石和徳ほか 83</p> <p>5. 外部精度管理に関する要綱案等の作成について 佐多徹太郎ほか 89</p> <p>6. 病原体検査の施設指針案 宮崎義雄ほか 101</p> <p>III. 研究成果に関する発行一覧表</p> <p>IV. 資料</p> <p>1) 第一回研究会会議資料 (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料) 105</p> <p>2) ウイルス・細菌小班会議資料 (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料) 123</p> <p>3) 第二回研究会会議資料 (プログラム、会議概要、パワーポイント配布資料) 167</p>
--	--

H26年度 の ま と め (20150401) H26研究報告書から
一部修正・改

- 地衛研の検査技術・正確性の維持に不安(人および予算の減少による)
 - 感染症の検査には、これまで検査基準も外部精度管理もなかった
 - 感染症検査は、人由来臨床検体で、可能な限り、種々の方法を用いて病原体を検出し、診断治療や発生動向調査に役立てるもの
 - 感染症検査は、定性的なものである(定量的なものではない)
→食品等の「精度管理」と同じではない(精度=precision,個々の分析値のばらつき)
 - 近年、迅速性の観点から病原体の遺伝子検査が多くなった
 - 遺伝子検査は、定性的であるとともに、半定量的な検査法にもなる
 - 検査手技・技術のほか、試薬や、検査機器の管理等が重要
→いわゆる「内部精度管理」の実施が必要
- 迅速化
省力化
安定性
- および検査担当者のレベルの維持および向上(人材育成)
→教育・研修(アンケート等から、OJTは難しくなっている?)
 - 感染症法改正(平成26年11月) 感染症に関する情報の収集体制の強化 病原体検査指針に準拠(基準や「精度管理」が含まれる) 平成28年4月施行。
→H9にも「行政検査における精度管理システム構築に関する研究」が行われたが
事業化にはいたらなかった(?予算、組織?)
→今回は感染症法改正・病原体検査に係わる「精度管理」の導入(具体的には?)

検討課題と提案 (20150401)

改変20160222

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。迅速検査の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.ブラインドテストは難しい、c.検体提出による方法も可能。

21

H26年度調班「科学的根拠に基づく病原体サーベイランス手法の標準化に関する緊急研究」
総括・分担研究報告書

付属資料(P12) 病原体検査の信頼性確保にかかわる検討について

4. 病原体検査指針における病原体検査の基準(案)

10. 第三者機関による病原体検査の質評価について(P38)

いわゆるEQA(外部による質保証)

- 現在では研究費の活用による試験的調査のみ
- 以下は技術的な第三者評価を想定する考え方を示す

- ✓ 調査案の作成と評価
- ✓ ひな形準備
- ✓ 継続的検討必要

表1. 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する事を想定: 核酸検出系の精度管理(H5, H7)、培養細胞の精度管理(インフル)、分離が困難な病原体(レジオネラ)

表2. ブラインドテスト: 第三者機関が作成した試験品を用いて、病原体検査の正確性を評価: 分離とPCR(エンテロ、呼吸器)、分離(腸内細菌)など

表3. 検体提出による方法: 株収集の目的などで地衛研等から感染研へ検体提出時に、ダブルチェックし確認する方法:

表2と3は今回実際的ではない

22

「外部精度管理」調査の対象とすべき感染症(優先性の基準)改

1. 法的行動制限等が必要になるもの(一類、二類、新、指定感染症)
2. 感染拡大の可能性が高い
3. 重症化する
4. 社会的な影響が大きい
5. 頻度が高く、多くの地衛研で検査が行われている
6. 症候群でどの病原体かを明かにする必要があるもの(感染性胃腸炎等)
7. 調査試料として配布できるもの(特定病原体等の運搬基準)
8. など

ほか 1)感染症検査に必要な技術(技能試験など)は必須
1. 遺伝子検査に係わるもの
2. 病原体の分離・同定、ほか

2)研究班で継続的に行われているものは当対象外
ウイルス:インフルエンザ、麻疹、風疹、狂犬病 等
細菌 :レジオネラ、下痢原性大腸菌、結核VNTR 等

3)発生が稀で、発生したときは感染研が担当すべきものとして対象外
一類、四類感染症の一部が相当

→最終的な整理が必要

23

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

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

24

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

1. 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
2. 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

1. 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
2. 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

25

H27年度のシーケンス・系統樹解析精度管理調査

1)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

2)参加機関:62機関

3)解析結果

1. シーケンス解析
 - ・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

2. 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%)
- 3. 適切な系統樹解析: 59/62施設(95%)
- 4. 適切なgenotyping(GII.4): 62/62施設(100%)

4)シーケンス解析ミスと対処法

1. 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
2. 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
3. 手技:手技的不良による反応性の低下
→手技の統一・習熟、結果見直し、再検査

26

平成27年度コレラ菌の外部精度管理調査

調査目的

- 三類感染症であるコレラの原因となるコレラ菌の同定
(患者または無症状病原体保有者の決定は地衛研の検査による)
(性状と血清型、毒素産生性、届出基準が正答できるか)
- 生きた菌株を用いた精度管理体制構築(発送、輸送、温度管理等)、
- 菌株の安定性の確認と課題解決(菌株選択)

結果の要約

結果提出機関	74/74(100%)		
送付試料の状態	良好72?	一部不良2	
温度記録	データ提出 53	機器入忘れ 1	記録なし 20
検査結果	試料1	試料2	試料3
陽性回答	72	7	74
陰性回答	2	66(1*回答根拠誤)	

課題

菌株	生きた菌株での外部精度管理の課題が明らか ・発送する菌株を決定するために時間を要する ・Vibrio属である問題(表現形の変異)
回答シート	回答欄の選択肢の一部不備。自由記載欄設定?

27

外部精度管理との関連が考慮される研修等(2015.2.28)

表6

1. 地衛研の感染症等外部精度管理の現状

- 1) 感染研レファレンス研究班等(インフルエンザ、麻疹・風疹、レジオネラ、結核等)
- 2) 国衛研と秦野研がおこなう食品衛生法関連外部精度管理
- 3) 日臨技 ほか →フォトサーベイ?
- 4) 各地衛研が行う食品衛生関連精度管理(各地域のほかの機関を対象)
- 5) 厚労科研の研究班ないし厚労省等が必要に応じて行うもの
(インフルエンザAH1pdm2009など実習を含むことがある)

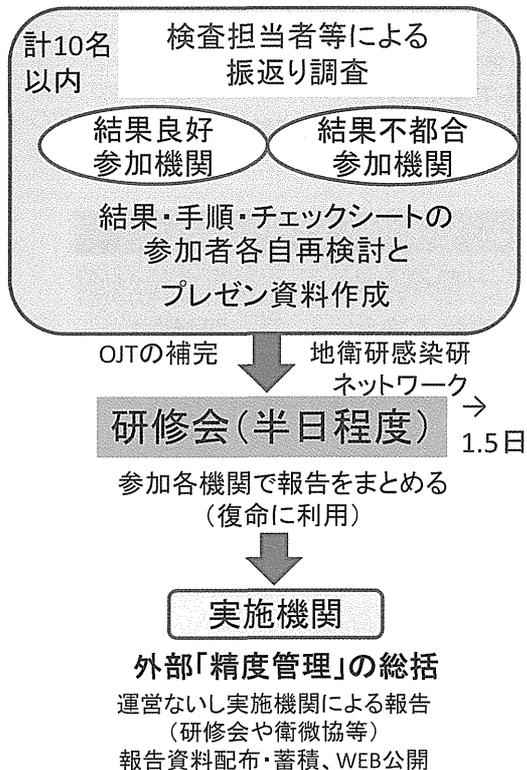
2. 地衛研の病原体検査担当者が受講できる研修

- 1) 国立保健医療科学院主催で国立感染症研究所村山庁舎で行うもの
 1. 技術研修: ウイルスと細菌の研修を隔年開催
 2. 新興再興感染症技術研修 ウイルスと細菌を隔年開催 経験者を対象
～実習込みで、感染研疫学センター第5, 6室が担当～
- 2) ほか(情報交換が中心で技術研修プログラムはない)
 1. 希少感染症診断技術研修会(感染研2月)
 2. 衛生微生物技術協議会、公衆衛生情報研究協議会、(全国衛生化学技術協議会)
 3. 地全協支部の微生物部会
 4. 地域保健総合推進事業の a) 地域専門家会議、b) 模擬訓練(検査を含む)
 5. 各地域における研修(外部精度管理?)
 6. 厚労科研の研究班ないし厚労省等が必要に応じて行うもの
 7. 学会等

28

平成27年度 外部精度管理調査実施後研修(ウイルス検査)

➤ これまでの研修等は、座学 or 座学と実習



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。

実施内容(1グループ6名の少人数)

- ・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
- ・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
- ・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し、参加者は職場で研修が問題解決に役立ったか後日回答(フォローアップ調査)

参加機関

昨年度の外部精度管理参加機関から、下記の各群より選出した代表10機関

- 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

29

研修のポイント

- 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)
- 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
- 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
- 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
- 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?)

30

研修後アンケートの意見のまとめ

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。

31

今回のリアルタイムPCR法の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	◆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	■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→検体サンプリング→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	◆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	■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) ■標準物質希釈液の水冷
●標準曲線の傾きが急(各希釈のCt値の間隔が3.3以上)	◆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	■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) ■標準物質希釈液の水冷
●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)	◆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	■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	◆プライマー・プローブの劣化 ◆プライマー・プローブプレミックスの劣化	■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)	◆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	■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ダウンを確実に実施(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

32

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)

33

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

山下照夫、皆川洋子(愛知衛研)

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。

34

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

2. 操作

1) cDNAの合成

2) 1st PCR

3) 2nd PCR

4) 電気泳動

5) PCR産物の精製

6) シーケンス反応

7) シーケンス反応物の精製および
シーケンサーによる塩基配列解析

8) 塩基配列の相同性検索

35

平成28年度地衛研外部精度管理(細菌) について

磯部順子 (富山県衛生研究所 細菌部)

細菌性赤痢の判定を調査項目とするか？

- 三類感染症である
- 食品関連業務に従事する人の場合、就業制限がかかる
- 原因菌を同定する公定法はない
- 原因菌の誤同定が他に比べると多い
- 腸管侵入性大腸菌との絶対的な鑑別点がない



医療機関や保健所からの同定依頼がしばしば発生する

地衛研での最終同定が求められる

36

赤痢菌検査に関する現状調査のまとめ

(20160105時点)

糞便検査	ある	(その件数/年)			ない
		0-10	10-100	100-1,000	
食中毒や感染症発生動向調査等の糞便検査	41	15	11	15	25
赤痢患者の接触者検便や服薬後検便	40	32	8	0	26
その他	7				59

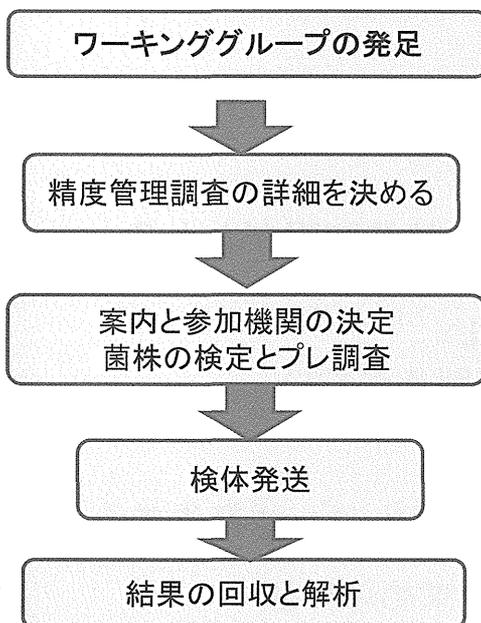
菌株同定検査	ある	(その件数/年)		ない
		5以下	10-20	
菌株同定検査	35	33	2	31
同定された菌名	菌数			
<i>Shigella dysenteriae</i>	6			
<i>Shigella flexineri</i>	11			
<i>Shigella boydii</i>	4			
<i>Shigella sonnei</i>	16			
EIEC	3			
EIEC以外の大腸菌	13			
<i>Morganella morganii</i>	5			
その他	6			

その他の内容	件/年
外来・公立施設からの依頼	3,000
行幸啓に係る検査	11
一般依頼検査	10
チフス患者の接触者検便や服薬後検査	10
一般依頼検査	100
食品等従事者検便	870
調理従事者からの依頼検査	900

37

細菌性赤痢を対象とする精度管理調査

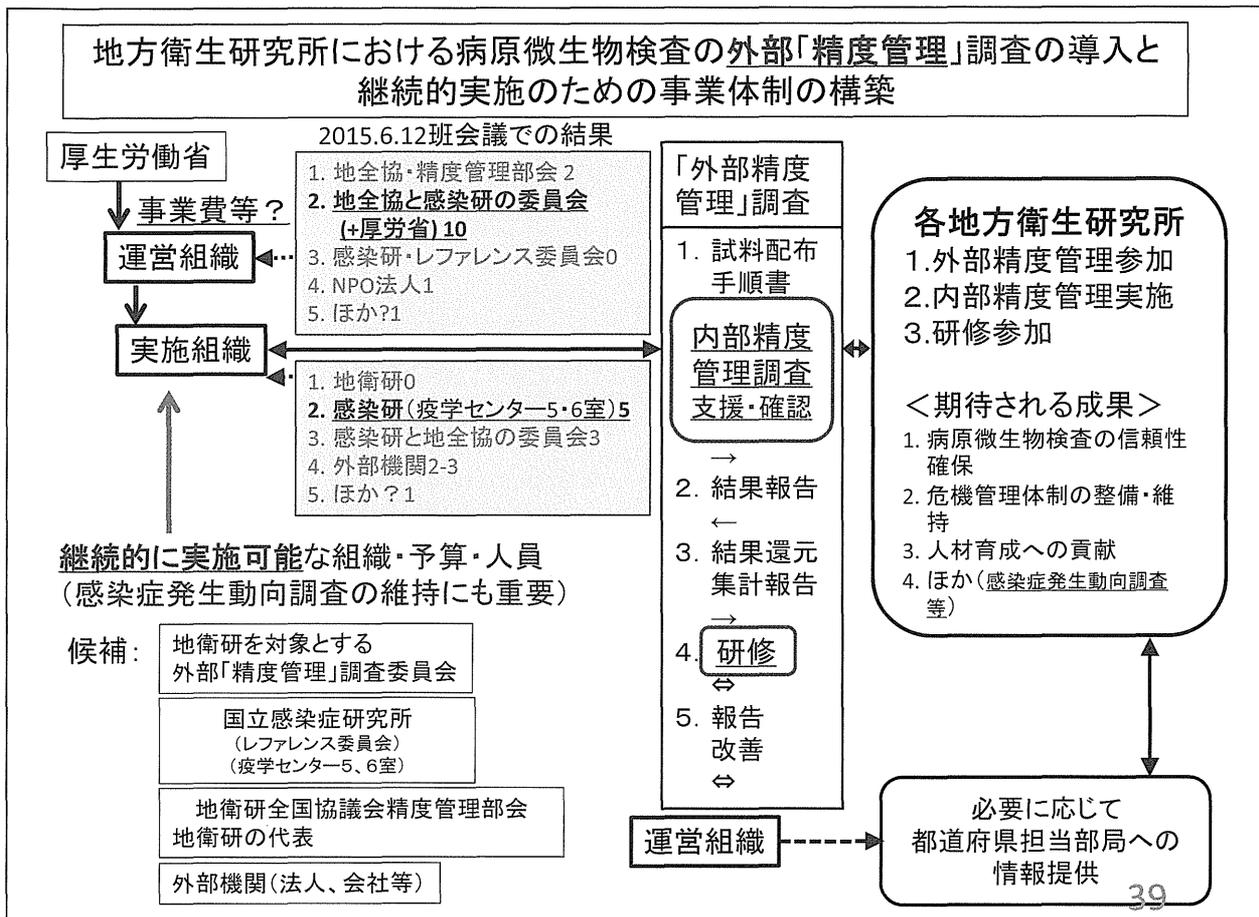
精度管理調査準備手順



平成27年度に作成した書類

1. 病原体検出マニュアル (改定版)
2. 実施予定案内文
3. 搬送容器の準備説明書
4. 搬送容器チェックシート
5. 参加申込書兼誓約書
6. 精度管理細菌検査実施手順書
7. 案内文(part2)
8. 結果報告書
9. 検査経過記録書
10. 検査体制アンケート
11. 事後アンケート
12. まとめ??

38



平成26・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
(H26-健危-一般-001)

まとめと結論

1. 地方衛生研究所全国協議会が主体となって、感染症検査の外部「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を目的。
2. 地研の「精度管理」実態調査、および、リアルタイムPCR、シーケンス解析、サルモネラ属菌やコレラ菌の同定をテーマにした外部「精度」管理調査、リアルタイムPCRのトラブルシューティング研修等を、多くの地研や感染研の研究協力者を得て、企画・実施し、関連書類等を作成。
3. 感染症検査の外部「精度」管理は質の保証に有意義で、さらに地研の人材育成にも役立てられる。
4. 外部「精度」管理、内部「精度」管理、トラブルシューティング研修を一体化して実施することが効果的。
5. 外部「精度」管理を継続的に実施するには、恒常的な運営組織や実施組織・予算・人員が必要不可欠で、案を提示。
6. 臨床検体からの病原体の分離同定をテーマとした調査等が必要。

Ⅱ. 研究成果の刊行に関する一覧表

論文発表

著者氏名	タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
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 ー地方衛生研究所における検査実施体制について	国立感染症 研究所	病原体検出情報 36	国立感染症 研究所	東京	2015	114-116

学会発表

著者氏名	タイトル名	学会名	開催日	開催地
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
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	東京