

Ⅲ. 研究成果の刊行物・別刷



平成26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 一地方衛生研究所における検査実施体制について

(掲載日 2015/5/26) (IASR Vol. 36 p. 114-116: 2015年6月号)

背景

・地方衛生研究所(以下地衛研)は、公衆衛生に関連する調査研究、試験検査、研修、情報発信の中核機能を有する地方自治体に設置された試験研究機関である。

・病原体検査では核酸検出による迅速診断手技は広く普及しているが、偽陽性/偽陰性防止のために、検査の質の管理、機器などの保守管理、新技術導入の研修、等の取り組み強化が必要である。

・また、季節性インフルエンザに代表される病原体収集は、ワクチン株選定、耐性株監視等で依然として大きな意義があり、病原体分離等の技術を一定レベル維持しなければならない。

・かかる背景から2014(平成26)年1月30日以降の感染症部会の議論において病原体に関する情報収集体制の強化について提言がなされたところである。

・今後の施策の参考とするため、「病原体サーベイランス等に関する調査について」(平成26年5月15日 厚生労働省結核感染症課事務連絡)により地方自治体および地衛研の協力を得てアンケート調査を実施した。

・第187回臨時国会にて成立した感染症法一部改正案には、これら感染症部会提言・厚生労働省アンケート結果も反映された。

・今般、アンケートのうち検査実施体制に関する回答の一部についてとりまとめと考察を行った。

1.地衛研の施設の現状

病原体検査におけるバイオセーフティ対応を確認したところ、汚染区と非汚染区は、ほとんどの機関(73/75)で物理的に区別されていた。次いで病原体遺伝子検査施設の状況について、試薬調製場所を、PCR反応等核酸増幅を行う場所と物理的に部屋として区別している機関は68%、専用キャビネット等で区別している機関は28%であった。

専用の部屋の確保は対応困難な場合もあり、そのような場合は、検査時の動線の工夫や、偽陽性防止のための対応(内部精度管理等)を行っているという回答した地衛研も多かった。

2.技術研修

2009~2013(平成21~25)年度の研修種別ごとの実績を図1に示す。1~2日程度の短期講習(希少感染症、運搬搬送講習)への参加自治体数に比べ、数週にわたる長期技術研修(ウイルス・細菌研修および新興再興感染症技術研修)への参加は少ない。このことは、自治体側の研修負担、検査体制(少人数の場合長期間の参加は困難)、受け入れ施設における実習用設備のキャパシティ(国立感染症研究所の場合、1回につき約20~30人が限度)、等の要因が反映していると考えられる。検査職員の仕事異動が数年ごとの自治体が多いこと、他方検査では常に新たな技術が導入されることを踏まえ、教育・研修は重要である。必要性に応じた各種短期研修を企画開催するメカニズムを検討すべきかもしれない。

3.試薬等の管理の状況について(図2)

標準作業書(SOP)を作成している機関は12%(9/75)、SOPは作成していないが、すべて、あるいは一部の試薬ごとに必要な事項を表示させ、適切に管理していると回答した機関が71%(53/75)であった。検体および検査に使用する試薬を保管する冷蔵庫等の温度記録状況についての回答は、すべて記録している、一部記録している、記録していない、の順で、20%(15/75)、55%(41/75)、25%(19/75)であった。

以上の結果より、問題が生じた際に追跡が可能(traceability)なようにSOPを整備し、かつ機器の温度記録を行っている機関は地衛研全体の2割弱と考えられる。

病原体検査の信頼性確保のためには、温度管理システム、SOP、記録台帳等、万一問題が生じたときの追跡可能な記録システムの構築が望まれる。ただ、現状として少人数で多種類の病原体検査を行っている地衛研も多いため、病原体検査の質確保に向け、効率的かつ持続可能な方法は、検討課題である。

4.検査機器等の保守管理状況および保守管理に関する予算措置について(図3)

回答を得た75機関の安全キャビネットの保有台数は平均4.8台であった。68%(51/75)の機関が保守管理を目的として個別に予算を計上しているが、11%(8/75)は保守管理を目的とする予算を計上しておらず、また、捻出もできていないと回答した。

一方、安全キャビネット以外の機器の保守に関しては、十分な予算措置をしておらず、不具合が生じたときに修理を依頼している実態が明らかになった。病原体の迅速診断に用いられるリアルタイムPCR装置の保有は平均2.4台/機関、シーケンサーは平均1.3台(保有していないところは75機関のうち6カ所)であるが、いずれも保守契約費は高額であり、予算措置はないとの回答は、それぞれ13、18機関であった。

これらの遺伝子解析機器は迅速診断に必須であるため、精度を維持するための定期保守コスト、修理、試薬更新のための予算確保が必要である。

5.外部精度管理調査(EQAS)参加状況

国際機関、欧米などでは病原体検査の信頼性確保のためにEQASが普及しつつある。わが国では法令に則り、臨床検査、食品衛生、水道、環境分野等で実施されているが、感染症分野では限定的である。地衛研が参加したEQASは、細菌検査では、89%(67/75)が過去調査に参加したと回答した。厚生労働科学研究班で実施しているインフルエンザウイルスEQASにも95%(71/75)参加しており、関心の高いことを示している。しかし、ウイルス検査においては、これまで研究班ベースで実施されており、恒久的な実施体制を整備することが必要である。

6.まとめ

- ・地衛研における病原体検査の実施体制を把握するためアンケート調査を行った。
- ・感染症法が対象とする病原体検査は多岐にわたるため、長期間の網羅的な研修が望まれるが、自治体内の人員配置、予算等の事情により、実際の参加は困難である。このため既存のスキームのほかに、短期間の特定分野の研修を充実させ、これらを併用することが検討課題である。
- ・病原体検査に必要な試薬、標準品の管理は、万一問題が生じた場合に備え、追跡可能な体制を整備することが望まれる。
- ・検査に必要な機材保守管理は、十分な予算措置が取られておらず、平時から維持管理の措置が図られるべきである。特に遺伝子解析用機器等は検査の信頼性を担保するためにも配慮すべきである。
- ・病原体検査の信頼性確保に向けた外部精度管理、内部精度管理の実施体制の整備が重要である。
- ・今般の感染症法改正では、都道府県知事等による病原体検査が明文化されており、2016(平成28)年4月施行に向け、省令並びに病原体検査指針(仮題)にて検査の質確保の取り組みについて示されることとなっている。

国立感染症研究所 吉田 弘
厚生労働省健康局結核感染症課 伊藤俊之 梅木和宣 中嶋健介

図1

病原体遺伝子検査(PCR検査等)は専用のものとして、他の工程(前処理及び試薬調製)を行う検査室及び使用する検査機器等と区別しているかどうか

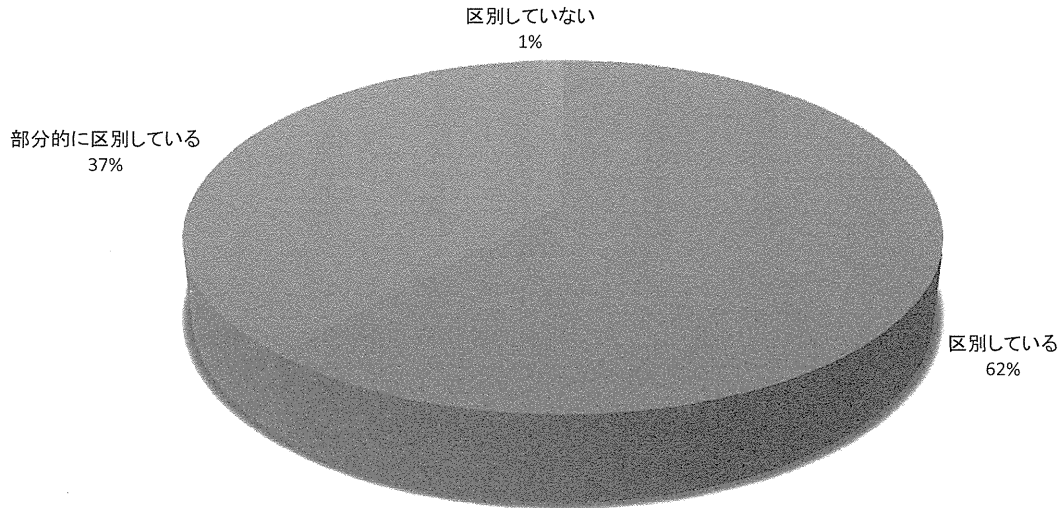


図2

病原体遺伝子検査の試薬調製場所は、PCR反応等核酸増幅を行う場所と物理的に分かっているかどうか

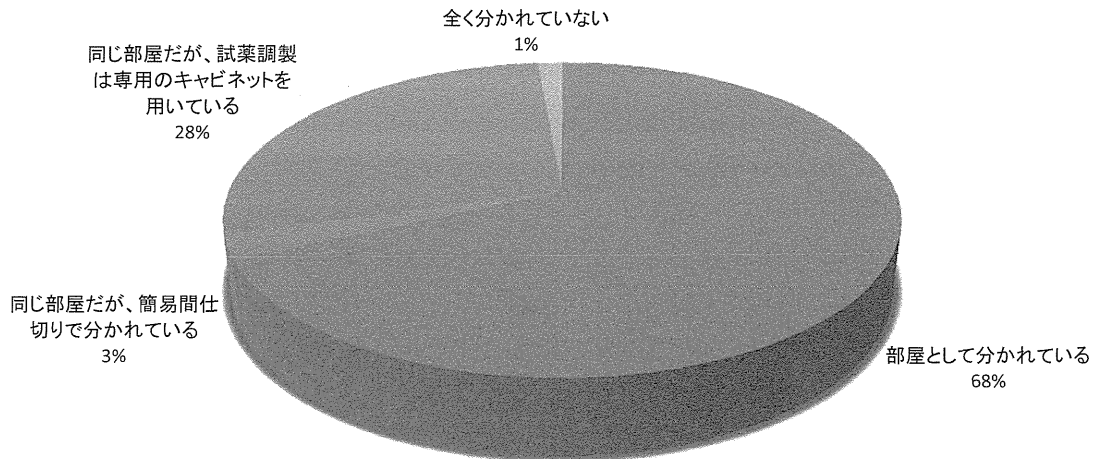
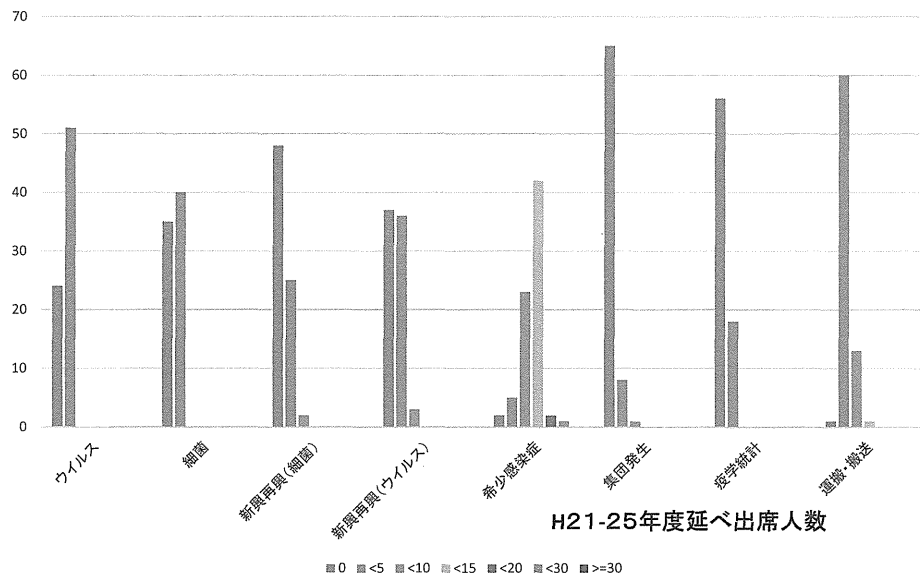


図3

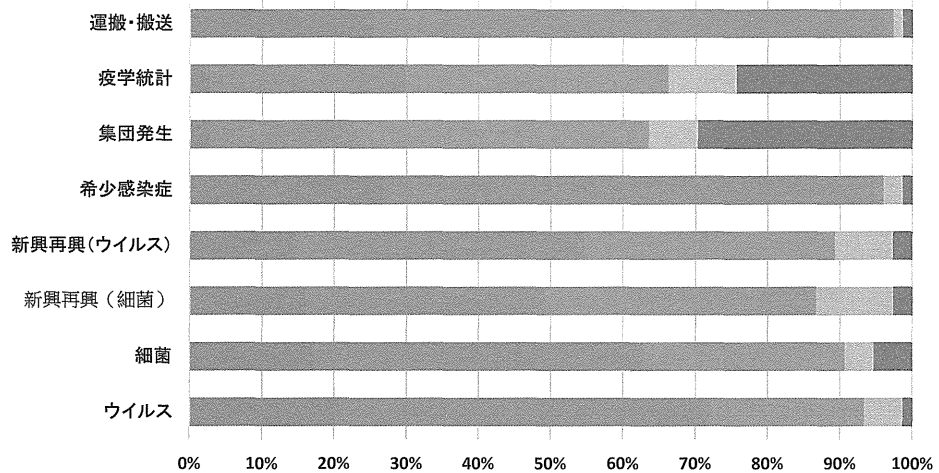
研修への参加状況



希少感染症と運搬・搬送は短期間(1日~2日)
 ウイルス、細菌コースは現在2週間、過去1か月
 新興・再興、集団発生は5日間
 疫学統計は3日間

図4

研修予算



	ウイルス	細菌	新興再興(細菌)	新興再興(ウイルス)	希少感染症	集団発生	疫学統計	運搬・搬送
■1 研修が必要な者全てに対し受講させている	15	13	12	11	20	2	2	19
■2 研修が必要な者のうち費用の問題から人数を制限して受講させている	39	34	25	30	51	15	20	53
■3 研修が必要な者はいるものの、費用の問題から受講させていない	16	21	28	26	1	30	27	1
■4 研修が必要な者はいるものの、人手不足のため研修を受講させていない	4	3	8	6	2	5	7	1
■5 研修が必要な者がいないため受講させていない	1	4	2	2	1	22	18	1

図5

試薬等(試薬、試液、培地、標準品、標準液及び標準微生物の株等)の管理の状況

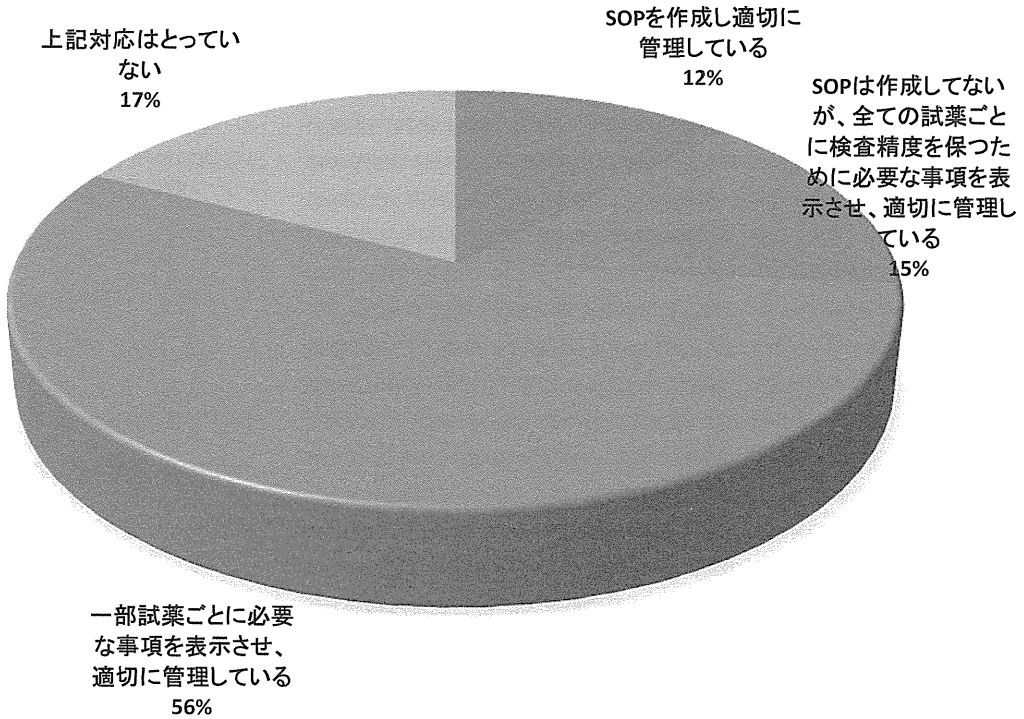
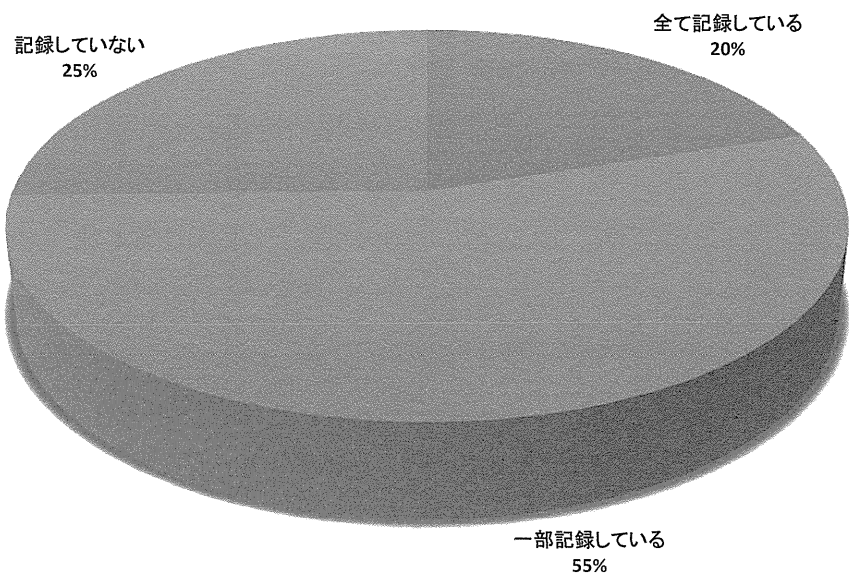


図6

検体及び検査に使用する試薬を保管する冷蔵庫、冷凍庫、超低温槽について、日常的な温度記録状況



地方衛生研究所の検査機器保守管理状況

図7

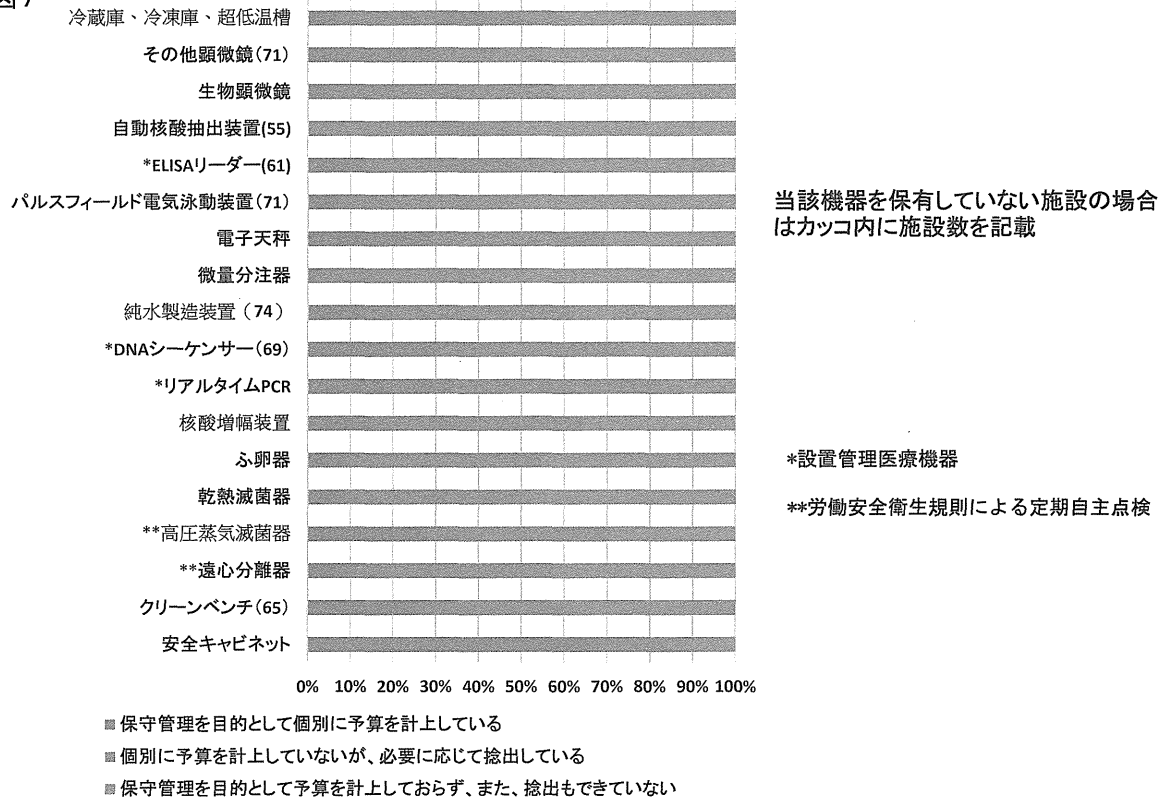
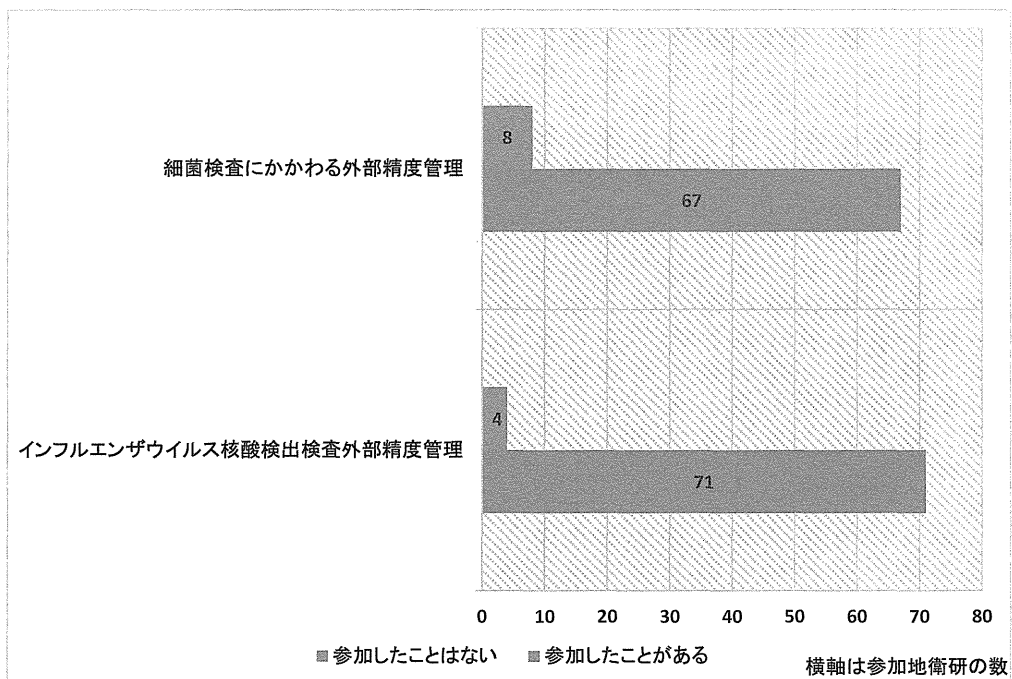


図8 外部精度管理調査参加状況



第36回衛生微生物技術協議会 2015.7.24

感染症法改正と病原体検査指針 ④検査の信頼性確保

～研究班の活動報告と感染症法改正～

地方衛生研究所の皆様のご協力ありがとうございます

富山県衛生研究所
佐多徹太郎

平成26年度厚生労働科学研究費補助金(健康安全・危機管理対策総合研究事業)
地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精度管理の
導入と継続的実施のための事業体制の構築に関する研究
(H26-健危-一般-001)

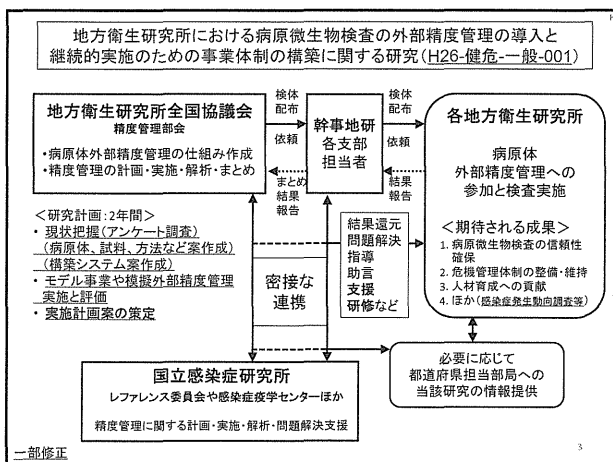
- 研究代表者: 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)
- 研究分担者: (地全協精度管理部会、感染症リファレンス委員会等)

背景

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

研究目的

- 地方衛生研究所の微生物検査の技術水準を維持・向上させるために、外部精度管理の手法を導入し、全国的な仕組みを構築し、地衛研全国協議会が主体となって、継続的に実施することの体制整備・構築およびその妥当性評価を目的。



H26年度の研究成果の概要

- 地衛研の感染症に関する精度管理の実態についてのアンケート調査**
→10月8日から21日まで調査実施。全79地衛研から回答。12月5日に班員に報告資料配付。1月9日の班会議で報告し議論した。
- ウイルスの外部精度管理実施**
→ノロウイルスのリアルタイムPCRで実施。10月上旬に参加公募し59地衛研の参加を得た。11月上旬に試料を配布、12月中旬から解析、1月班会議で結果報告し議論。参加地衛研に結果を返すとともに、追加調査を行う。
- 細菌の外部精度管理実施**
→サルモネラ属菌分離同定について実施。検体発送の制限から、部会員等の11地衛研に、12月上旬試料配布。1月の班会議で10地衛研の結果を集計報告。今後、参加地衛研に結果を返すとともに、追加調査を行う。
- 外部精度管理実施要綱(案)の作成**
→実施案・要綱の項目案について提示し議論。これまで地衛研で行ってきた研究資料を収集し、案の作成を行った。

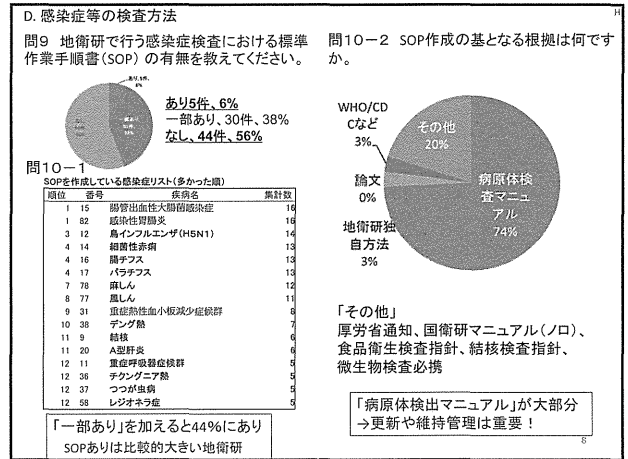
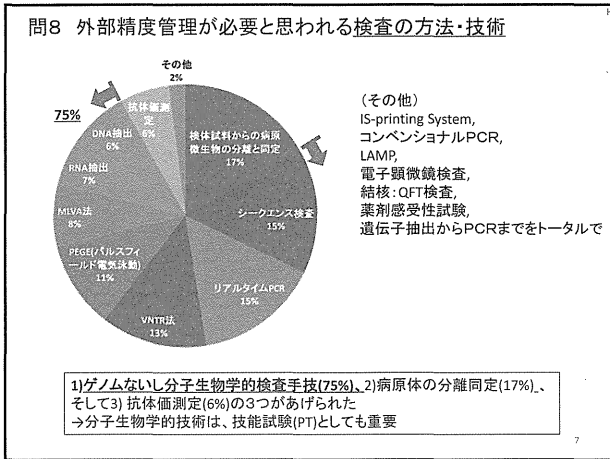
全地衛研に2部ずつ配布 2015.5-6 (報告書、検討経緯、資料含む)

目 次

1. 報告書概要 「地衛研が検査可能な(している)感染症対象疾患(→30疾患) 地衛研のおよそ80%以上が検査可能な感染症を下記にリストアップ」
2. 感染症発生動向調査
3. 地方衛生研究所への精度管理に関する外部精度管理導入に関する報告書
4. 地方衛生研究所への精度管理に関する外部精度管理導入に関する報告書
5. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
6. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
7. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
8. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
9. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
10. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
11. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
12. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
13. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
14. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
15. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
16. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
17. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
18. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
19. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
20. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
21. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
22. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
23. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
24. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
25. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
26. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
27. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
28. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
29. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について
30. 病原体検査に関する外部精度管理の導入について

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) 地衛研のおよそ80%以上が検査可能な感染症を下記にリスト

病 類	病 名	検査可能率											
		検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率	検査可能率 できる 検査可能率		
二類	重症呼吸器感染症	61	15	80	38	8	83	16	3	84	7	4	84
5疾病	鳥インフルエンザ(H5N1)	72	9	84	46	1	98	18	1	95	8	3	73
三類	コレラ	78	1	99	47	0	100	18	1	95	13	0	100
5疾病	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
	カンジダ症	61	16	79	38	8	83	16	3	84	7	5	86
	炭疽芽胞	72	6	92	46	1	98	18	1	95	8	4	87
四類	重症熱性血小小板減少症候群	70	6	92	45	1	98	18	1	95	7	4	84
43疾病	デング熱	71	7	91	46	1	98	17	2	89	8	4	87
	ジカ熱	70	7	91	45	1	98	16	2	89	8	4	87
	後天性免疫不全症候群	60	16	76	38	8	83	14	4	78	6	4	81
	先天性免疫不全症候群	58	16	78	39	6	87	15	3	83	4	7	85
18疾病	炭疽	72	3	96	47	0	100	17	0	100	8	3	73
	菌しん	72	3	96	47	0	100	17	0	100	8	3	73
	RSV肺炎感染症	63	12	84	45	2	96	16	1	94	2	9	18
	呼吸器肺炎	64	11	85	46	1	98	17	0	100	1	10	9
	A群溶血性連鎖球菌感染症	55	19	75	38	9	81	15	2	88	3	8	27
	腸炎性胃腸炎	75	1	99	47	0	100	16	0	100	12	1	92
	百日咳	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
	流行性下痢症	61	13	82	43	3	93	16	1	94	2	9	18
五類	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	87
(定)	急性出血性結膜炎	58	16	78	41	5	88	17	0	100	0	11	0
26疾病	流行性角結膜炎	61	13	82	43	3	93	17	0	100	1	10	9
	腸炎性胃腸炎	67	9	88	46	1	98	17	0	100	4	8	33
	(病原体がノロウイルスであるものに限る)	67	9	88	46	1	98	17	0	100	4	8	33
	腸炎性胃腸炎	65	10	87	47	0	100	17	0	100	1	10	9
	中央神経線維炎	61	6	89	45	2	96	17	0	100	5	6	45
指定 感染症	鳥インフルエンザ(H7N9)	70	3	96	45	1	98	17	0	100	8	2	80



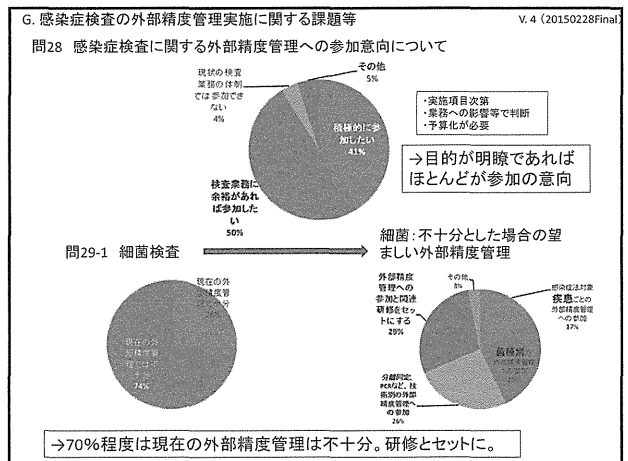
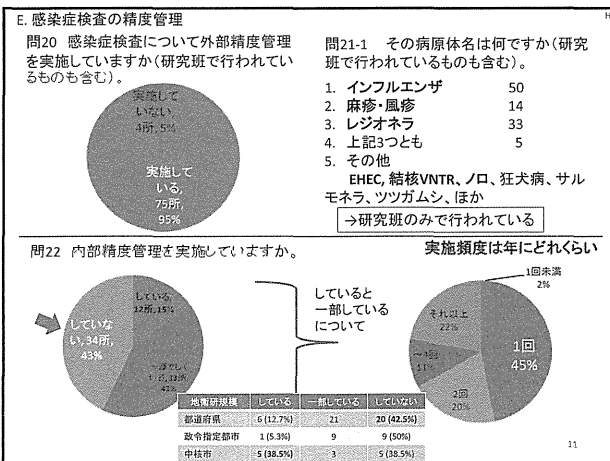
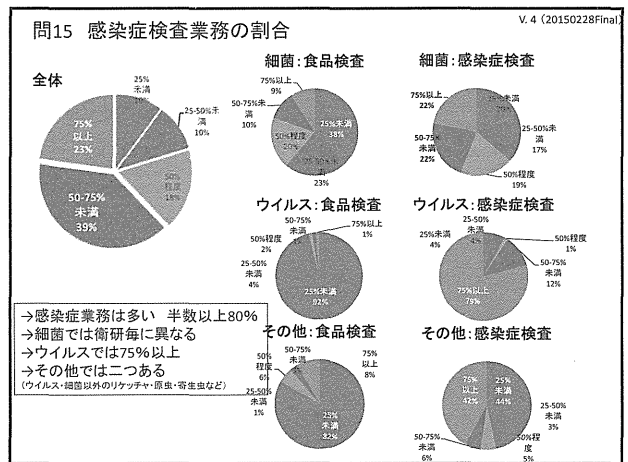
病原体検出マニュアル (平成15年12月9日発刊)

<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りません。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標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、科学の進歩にあっ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
→科学的進歩にあったものに改善していくことが求められる。



感染症検査はGLPや精度管理になじまない？-1 (寄せられたご意見等)

- 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性検査は、「逸脱」ができないGLPや精度管理になじまない
- 定性検査である。検査対象が不明な場合もある。

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なげ改善(創意工夫可)

→便利な文言だが混同(回答に迷った)?

ウイルスおよび細菌の外部精度管理調査の実施(H26)

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)
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(精度管理委員会機関)
 - ✓ やうパック(チルド剤)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A GI定量値の分布(べき乗変換, Log₁₀)

項目	計	合格	不合格
検出率	11	9	2
検出検体数	11	9	2
検出率	11	9	2

- 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。
- 検査線用の標準物質の劣化、ピペ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。
- 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
- 試料製法、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な考え方 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、供試菌株参考性状表
理化学部門食品添加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、参考回答
理化学部門(農薬)外部精度管理調査票、配付試料調査票、参考回答
2. 研修資料
研修に関するアンケート調査集計結果
赤崎アヌーバ、クリプトスピリジウムを中心とした腸管寄生原虫の検査法

図1. 行政検査における精度管理システムの概略図 衛藤班4 表3

2. 概略(図1)

厚生省
↓
報告 予算措置
↓
国立試験研究機関
↓
報告 資料提供

外部精度管理の実施
研修の実施
内部精度管理実施の支援
レファレンス的協力
技術的支援
公衆衛生情報の提供
地方における精度管理
事業の技術的支援

合同委員会の設置
微生物部門合同委員会
↓
作業部会
細菌、ウイルス等
理化学部門合同委員会
↓
作業部会
食品(添加物等)
飲料水等

外部精度管理の企画立案
研修の企画
内部精度管理の推進
研修機能の検討
精度管理システムの評価

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。

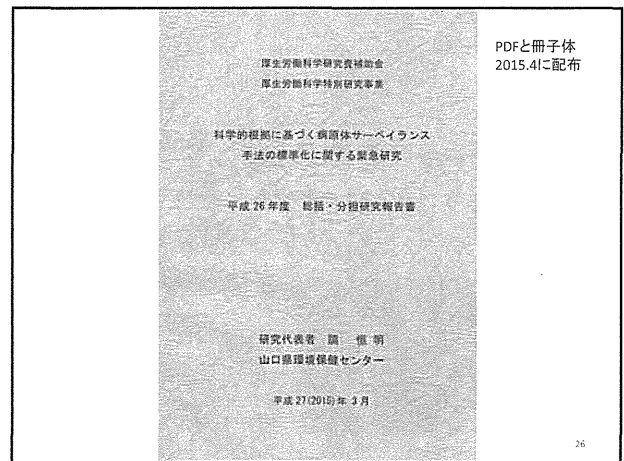
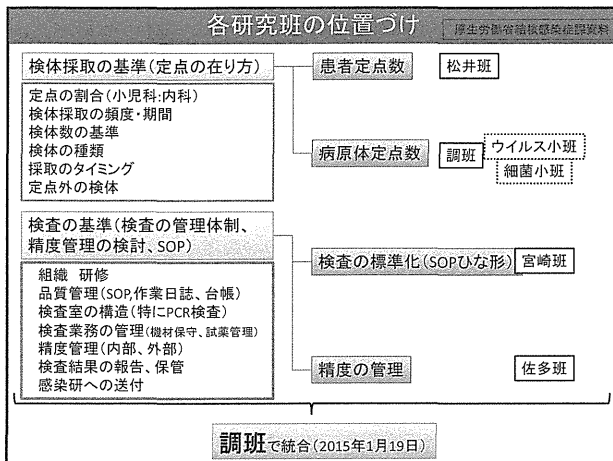
H26年度 の ま と め 1 (20150401) H26研究報告書から一部修正

- 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
- 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(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備(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・病原体サーベイランスに係わる

まとめ から 提案 (20150401) H26研究報告書から

<対応案>

- 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、
 - 1)「外部精度管理」、2)「内部精度管理支援」、3)研修
 の3つを関連・一体化させた導入が役立ち、そして、ひいては人材育成に役立てることが重要
- 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
→外部機関による地衛研の検査(質)優良性評価(確保): EQA
→参加は義務ではなく、調査は改善が目的で、成績が目的ではない。
- 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
- 3)研修は、検査担当者の知識・技術・問題解決能力を向上させ、検査能力を高める



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)

<p>> 現在では研究費の活用による試験的調査のみ</p> <p>> 以下は技術的な第三者評価を想定する考え方を示す</p>	<table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <tr> <td style="font-size: x-small;">✓ 調査案の作成と評価</td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">✓ ひな形準備</td> </tr> <tr> <td style="font-size: x-small;">✓ 継続的検討必要</td> </tr> </table>	✓ 調査案の作成と評価	✓ ひな形準備	✓ 継続的検討必要
✓ 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)

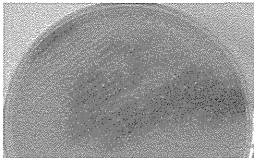
表2. ブランドテスト: 第三者機関が作成した試験品を用いて、病原体検査の正確性を評価: 分離とPCR(エンテロ、呼吸器)、分離(腸内細菌)など

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:

27

2016年2月18日
希少感染症診断技術研修会

コレラ菌の検査と精度管理



大阪府立公衆衛生研究所
感染症部 細菌課
勢戸和子
seto@iph.pref.osaka.jp

全国の3類感染症発生状況

感染症疫学センター

年	コレラ	細菌性赤痢	EHEC感染症	腸チフス	パラチフス
2006	45	490	3,922	72	26
2007	13	452	4,617	47	22
2008	45	320	4,329	57	27
2009	16	181	3,879	29	27
2010	11	235	4,135	32	21
2011	12	300	3,939	21	23
2012	3	214	3,770	36	24
2013	4	143	4,046	65	50
2014	5	158	4,153	53	16
2015	7	156	3,561	36	31

2015年は2016年1月14日更新データ

コレラ(三類感染症)

【定義】コレラ毒素(CT)産生性コレラ菌(*Vibrio cholerae* O1)又は*V. cholerae* O139による急性感染性腸炎

【届出基準】分離・同定による病原体の検出、かつ、分離菌におけるコレラ毒素の確認(毒素産生の確認あるいはPCR法による毒素遺伝子の検出)

「コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取扱い等について」
昭和63年9月28日付

コレラ菌の中で行政上の防疫対策の対象となるのは*V. cholerae* O1で(のちにO139追加)、かつ、コレラエンテロトキシンを産生する菌のみとし、コレラエンテロトキシン非産生性コレラ菌の取扱いについては特段の防疫措置は必要ない。

国内初発であるか否かを問わず、真性患者及び保菌者としての決定は地方衛生研究所における検査によって行うこと。

厚生労働科学研究費補助金(健康安全・機器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

コレラ菌に関する外部精度管理調査の結果

- コレラ菌検査・診断マニュアルを作成
- 精度管理株の選定
- 外部精度管理調査の実施
- 感染症検査体制アンケートの実施
- コレラ菌外部精度管理事後アンケートの実施

研究代表者 佐多徹太郎(富山県衛生研究所)
細菌WG 荒川英二(国立感染症研究所)
大西真(国立感染症研究所)
緒方喜久代(国立感染症研究所)
森本洋(北海道立衛生研究所)
倉園貴至(埼玉県衛生研究所)
磯部順子(富山県衛生研究所)
勢戸和子(大阪府立公衆衛生研究所)

外部精度管理調査の実施.....74施設が参加

実施項目: 三類感染症検査に係る「コレラ菌」の同定

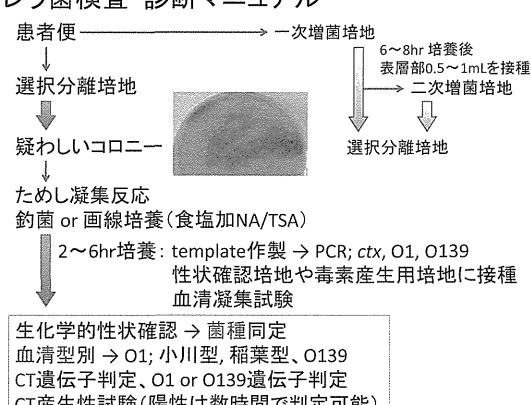
実施時期: 平成27年10月5日検体配付(参加施設に到着予定)
平成27年10月26日結果提出締め切り

提出書類: 検査結果報告書
コレラ菌検査経過記録書
感染症検査体制アンケート
温度記録ファイル

配付試料: 試料1 *Vibrio cholerae* O1 CT陽性
試料2 *Vibrio cholerae* O1 CT陰性
試料3 *Vibrio cholerae* O139 CT陽性

12月に事後アンケートを依頼し、70施設の回答を得た。

コレラ菌検査・診断マニュアル



患者便 → 一次増菌培地 → 6~8hr培養後 表層部0.5~1mlを接種 → 二次増菌培地

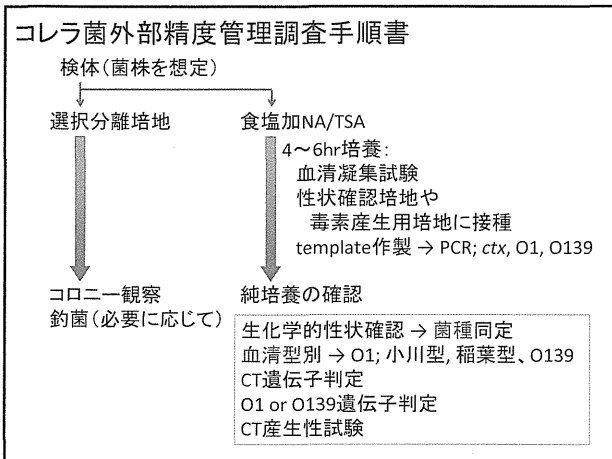
↓ 選択分離培地

↓ 疑わしいコロニー

↓ ためし凝集反応
釣菌 or 画線培養(食塩加NA/TSA)

↓ 2~6hr培養: template作製 → PCR; ctx, O1, O139
性状確認培地や毒素産生用培地に接種
血清凝集試験

生化学的性状確認 → 菌種同定
血清型別 → O1; 小川型, 稲葉型, O139
CT遺伝子判定、O1 or O139遺伝子判定
CT産生性試験(陽性は数時間で判定可能)



コレラ菌と類似菌の鑑別

菌種名	TCBS colony	ox	TSI	インドール	リジン	NaCl (%) 加ブロスでの発育				
						0	3	6	8	10
<i>V. cholerae</i>	Y	+	Y/Y	+	+	+	+	d	-	-
<i>V. fluvialis</i>	Y	+	Y/Y	d	-	-	+	+	d	-
<i>V. furnissii</i>	Y	+	Y/YG	d	-	-	+	+	d	-
<i>V. alginolyticus</i>	Y	+	Y/Y	+	+	-	+	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	G	+	R/Y	+	+	+	+	d	-	-
<i>V. parahaemolyticus</i>	G	+	R/Y	+	+	-	+	+	+	-
<i>V. vulnificus</i>	G	+	R/Y	+	+	+	+	+	+	-
<i>V. metschnikovii</i>	Y	-	Y/Y	-	d	-	+	+	d	-
<i>Aeromonas</i>	-	+	Y or R/Y(G)	d	d	+	+	-	-	-
<i>Plesiomonas</i>	-	+	R/Y	+	+	+	+	-	-	-

検査結果報告書の様式

様式1
地研研精度管理研究部による平成27年度外部精度管理検査報告書

平成 年 月 日

機関名
代表者氏名
検査責任者氏名
検査担当者氏名

該当する結果を○で囲み、必要な情報を記載下さい	
結果 根拠とした検査結果 (血清型・毒素等)	
例示	陽性 陰性 O1抗原(+), CT遺伝子(+)
コレラ菌の同定結果	試料1 陽性 陰性
	試料2 陽性 陰性
	試料3 陽性 陰性

結果について、以下のとおり記載下さい
根拠とした検査結果 (血清型・毒素等)
(+)、CT遺伝子(+)

※なお、報告の時期は必ず「第27コレラ菌検査結果報告書」に記載願います。おわせて、下段書と異なる方法を実施した報告には自認の無効な手順書を送付してください。

検査結果報告書の集計

試料	判定結果	検査内容	施設数
1. <i>V. cholerae</i> O1 CT陽性	陽性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	72
	陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陽性	2
2. <i>V. cholerae</i> O1 CT陰性	陰性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陰性	66
	陰性	O1抗原およびO139抗原陰性 CTまたはCT遺伝子陰性	1
	陽性	O1抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陰性	7
3. <i>V. cholerae</i> O139 CT陽性	陽性	O139抗原陽性 CTまたはCT遺伝子陽性	74

検査結果報告書のまとめ

- O抗原の決定
 - O1抗原について少ないながら陰性が見られた。
 - O139抗原の検出は一致していた。
- CT産生の確認あるいはCT遺伝子の検出
 - いずれの試料においても一致していた。
- 試料2では、正しい同定結果が得られたが「コレラ菌陽性」と判定した施設があった。

↓

実施項目を『三類感染症の原因となる「コレラ菌」の同定』としたほうがわかりやすかったとの意見をいただいた

検査経過記録書・事後アンケートのまとめ

- O抗原の決定
- CT産生の確認あるいはCT遺伝子の検出
- 検査の概要と生化学的性状
- 生物型別
- 対照(株)の使用状況
- 行政への報告に必要な検査項目
- 菌株の保存

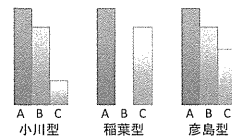
コレラ菌の血清型別試薬

<ul style="list-style-type: none"> コレラ菌免疫血清 <ul style="list-style-type: none"> 混合 小川型 稲葉型 	混合陽性→単味血清で型別 小川型血清に凝集 小川型 稲葉型血清に凝集 稲葉型 両方に凝集 彦島型 両方陰性 判定保留 生菌で凝集陰性の場合は加熱死菌で再試験する
<ul style="list-style-type: none"> コレラ菌AD(モノクローナル抗体) <ul style="list-style-type: none"> 感作ラテックスa 感作ラテックスb 感作ラテックスc 対照ラテックス 	a, b が陽性 小川型 a, c が陽性 稲葉型 a, b, c が陽性 彦島型 a が陰性 V. cholerae non-O1 対照が陽性 非特異凝集
<ul style="list-style-type: none"> ビブリオコレラ免疫血清 O139 "Bengal" 	

免疫血清のみ使用	45施設
免疫血清とラテックスキットの併用	26施設
ラテックスキットとO139免疫血清	3施設

コレラ菌の抗原因子と血清型の反応

血清型	抗原因子	コレラ菌免疫血清(各血清に含まれる因子抗体)		
		混合(A B C)	小川型(B)	稲葉型(C)
小川型	A B (C)	+	+	- (+)
稲葉型	A C	+	-	+
彦島型	A B C	+	+	+
O140:Hakata	C D	+	-	+



a 遅れて観察される凝集
B因子またはC因子を持つ海水ビブリオやV. fuvialis が確認されている。

コレラ菌免疫血清では「混合血清のみでコレラ菌の推定を行わないでください」

B因子は小川型の特異抗原であり、彦島型は小川型に統合されることが多い

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のみまとめ

試料1: V. cholerae O1 稲葉型 CT陽性

免疫血清	ラテックス	施設数
生菌で稲葉型	稲葉型	24
	判定不能	5
	未実施	27
加熱死菌で稲葉型	稲葉型	4
	判定不能	2
	未実施	2
生菌で彦島型	彦島型	1
	判定不能	1
加熱死菌で彦島型	彦島型	1
	判定不能	1
	未実施	1
混合のみ実施	判定不能	1
	未実施	1

O1抗原陽性	68
稲葉型	64 (91.4%)
彦島型	2
PCRで判定	2
O1抗原陰性	2

CT陽性の場合 O1抗原判定不能を陰性と判断して良いのか

O1抗原確認PCR 未実施 → 生菌で再検査したら稲葉型

コレラ菌の血清型別の結果_事後アンケート70施設のみまとめ

試料2: V. cholerae O1 小川型 CT陰性

免疫血清	ラテックス	施設数
生菌で小川型	小川型	26
	判定不能	2
	未実施	28
加熱死菌で小川型	小川型	8
	未実施	4
混合のみ実施	小川型	1
	判定不能	1

O1抗原陽性	69
小川型	69 (98.6%)
O1抗原陰性	1

O1抗原確認PCR 未実施 CT陰性のため追究せず → 再検査で小川型

試料1で「稲葉型」と判定できなかった6施設 → 試料2では「小川型」

稲葉型血清は、混合血清、小川型血清に比較して反応が遅いことがあります

コレラ菌の血清型別の注意点と課題

- 判定不能または不一致の原因として、使用した免疫血清やラテックスの劣化、凝集反応に供した菌株が不適切(ラフ型)などの要因が考えられる。
- 稲葉型血清は、同じロットの試薬であっても、混合血清や小川型血清に比べて凝集が弱い可能性がある。
- 免疫血清は、まず生菌で実施する。
- 使用頻度を考慮すると、毎年、血清や試薬を更新するのは困難との意見が寄せられた。
- 免疫血清を凍結保存した場合の有効期限について質問があったが、デンカ生研の添付書類には、凍結を避けて保存するよう記載があり、凍結させた場合は使用しないでくださいと明記されている。

使用している免疫血清やラテックスについて、定期的に内部精度管理を実施する必要がある。

.....小川型および稲葉型、non-O1を使用し、陽性だけでなく陰性も確かめる。

血清凝集反応で判定不能の場合はPCR法で確認する。

毒素産生性試験の結果

どの方法でも判定結果は一致

- PCR法によるCT遺伝子検査実施 71施設 (95.9%)

マニュアルのプライマー	43	事後アンケートによると70施設中22施設で複数のプライマーを準備している(精度管理用に準備したものを含む)
市販プライマー	20	
小林プライマー	5	
マニュアルと市販の併用	2	
市販と自家製の併用	1	

- RPLAによるCT産生試験実施 35施設 (47.3%)

試薬: VET-RPLA(デンカ生研)	事後アンケートによる(n=33)
毒素産生用培地:	
CAYE培地, CAYE-L培地	16
Syncase培地	8
酵母エキスブイオン	2
AKI培地	1
BHIプロス	1
BHI寒天培地, 普通寒天培地	3
添付文書記載培地	1
未記入	1

添付文書にはコレラ菌用としてSyncase培地が記載
↓
エルトル型は毒素産生能低いとの報告ある

コレラ菌の生物型別_事後アンケート70施設のまとめ

実施した 31施設 エルトール型 (29), 判定不能 (2)
実施しなかった 39施設

鑑別性状	アジア型 (古典型)	エルトール型	実施 施設数 ^a
溶血性(ヒツジ)	-	+	1
赤血球凝集性 (ニフトリ)	-	+	3
ポリミキシンB 感受性	+	-	1
VP試験	-	+	16
ヘモリン遺伝子 の鑑別 ^b			25
rtx因子の有無	-	+	2

判定不能施設の実施項目
・VP試験
・VP試験と赤血球凝集性

未確認だが
改善点があるとすれば
VP半流動培地:食塩濃度
ニフトリ赤血球:採血日

a 複数実施した施設があり合計は48となる
b マニュアルに記載の生物型別用PCRなど

生物型別を実施している
施設は半数以下であった

対照(株)の使用状況_事後アンケート70施設のまとめ

検査項目	陽性対照		陰性対照	
	使用した	使用せず	使用した	使用せず
選択分離培地でのコロニー観察	12	58	5	53
生化学的性状の確認	10	59	5	52
血清凝集反応:コレラ菌免疫血清	12	58	16	42
血清凝集反応:コレラ菌AD	8	42	7	36
RPLA法によるCT産生 確認	21	14	15	18
PCR法によるCT遺伝子 確認	56	11	59	7
PCR法による <i>V. cholerae</i> 確認	26	9	29	5
PCR法によるO1, O139抗原 確認	38	12	40	7

血清凝集反応の陰性対照は多くが生食水
PCRの陰性対照は多くが滅菌水

内部精度管理のためにも陽性対照株、陰性対照株は必要

行政報告に必要な検査項目_事後アンケート70施設のまとめ

検査項目	陽性判定に必要	陰性判定に必要
TCBSでのコロニー観察	65	66
TSI寒天培地の性状	61	54
LIM培地の性状	61	54
オキシダーゼ	54	47
無塩ブロスでの発育	52	47
VP試験	46	2施設でどちらも選択 していなかった
血清凝集反応	67	
PCRによるO1抗原, O139抗原の確認	27	27
CT遺伝子の確認	65	1施設でどちらも選択 していなかった
CT産生性の確認	25	
PCR法による <i>V. cholerae</i> 確認	15	19
生物型の確認	13	3

コレラ菌の保存培地_事後アンケート67施設のまとめ

保存 温度	スキム ミルク	マイクロ バンク	グリセリン 加培地	カジトン 培地	ドルセット 卵培地	その他 ^c
-80°C	23	20	5			4
-20~70°C	1	1	1			1
4°C				2		
室温 ^a				18	2	7
永年 ^b	20	9	5	12		6
10~20年	1	2		1		
数年	1	4	1	3	1	
1年		3		1		1
数ヶ月				1		4
未記入	2	3		2	1	1

a 常温, 22.5°C, 25°Cを含む

b 無期限, 20年以上を含む

c 半流動培地, 軟寒天培地, ゼラチンディスクなど

17施設では複数の方法で保存

外部精度管理調査のまとめ

- コレラ菌の届出基準を正しく理解し、地衛研で診断できるよう準備しておくことが大切である。
- 陽性対照株、陰性対照株を適切に保存し、血清や試薬等の内部精度管理を実施することが必要である。
- O1抗原の検出について、血清凝集反応で判定不能の場合はPCR法を実施することが望ましい。
- CT産生性またはCT遺伝子の確認については、どのような方法であっても検査能力に問題はないと考えられた。
- 行政への報告に必要な検査項目について、「コレラ菌検査・診断マニュアル」を周知する必要がある。

報告書は3月末までに各地衛研にお送り致します。
ご協力いただきありがとうございました。



