

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に対する  
外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の  
構築に関する研究(H28-健危-一般-002)

平成29年度 総括研究報告書

研究代表者 皆川 洋子

平成30(2017)年4月

## 目 次

． 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に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究（H28-健危-一般-002）」	
皆川 洋子（研究代表者、愛知県衛生研究所） .....	1
． 分担研究報告書	
1. 精度保証の手法を取り入れたウイルス遺伝子検査法の研修	
木村 博一（国立感染症研究所・群馬パース大学） ほか	.13
2. 感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査（EQA）導入の研究	
吉田 弘（国立感染症研究所） ほか .....	19
3. 地方衛生研究所を対象にした赤痢菌検査の外部精度管理調査	
滝澤剛則（富山県衛生研究所） ほか .....	45
4. 地域の病原微生物検査の質の維持向上に資する地方衛生研究所の役割に関する研究	
松本 昌門（愛知県衛生研究所） ほか .....	79
5. 地方衛生研究所における病原微生物検査体制と「検査の質の確保」に関する研究	
皆川 洋子（愛知県衛生研究所） ほか .....	95
． 研究成果に関する刊行一覧表.....	103
． 資料	
1) 第一回ウイルス・細菌小班 WG 会議資料（2017.5.24 感染研） （プログラム） .....	105
2) 保健所・大学連携 WG 会議資料（2017.9.7 愛知県衛研） （プログラム） .....	106
3) 細菌小班コア WG 会議資料（2017.10.24 感染研） （プログラム） .....	107
4) 全体班会議資料（2018.1.10 感染研） （プログラム） .....	108
5) 平成 29 年度希少感染症診断技術研修会 第 2 日（2018.2.28 感染研） 赤痢菌の検査と精度管理 （抄録、パワーポイント資料抜粋） .....	109

# . 総括研究報告書

平成29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に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な  
事業体制の構築に関する研究（H28-健危-一般-002）  
総括研究報告書

研究代表者：皆川 洋子

愛知県衛生研究所

**研究要旨** 改正感染症法に基づいて自治体を実施する病原体検査に特化した、食品GLP及び水質GLP等とは一線を画す外部精度管理システムの構築を目的として、平成28年度より2年計画で地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所（感染研）を主体とする三つの小班を編成して各々(1)ウイルス及び(2)細菌外部精度調査試行及びプロトコルひな形案の作成、(3)28年度に実施した全国地衛研に対する病原体検査精度に関わる体制及び検体配付等のアンケート調査解析及び地域における地衛研の役割に関する検討、を実施した。(1)ウイルス小班ではエンテロウイルス遺伝子検査外部精度調査を試行し、市販核酸を活用する外部精度調査プロトコル案が完成した。また、国立保健医療科学院が計画し感染研が実施する地衛研担当者を対象とする研修受講者を対象とする精度保証の手法を取り入れたウイルス遺伝子検査法研修の成果を解析した。(2)細菌小班では28年度に選定した精度調査用赤痢菌菌株を全国27地衛研に配布して外部精度調査を試行し、一連の流れから細菌外部精度調査プロトコルひな形案を得た。(3)項目小班では、28年度にほぼ全ての地衛研の協力を得て実施したアンケート調査結果に基づいて地衛研が抱える課題の解析を継続するとともに、地域における検体配付実績等について追加調査や保健所・大学とのWG会議を通じて、自治体における病原体検査担当者育成や、地域における病原体検査体制の維持強化に向けて地衛研の果たすべき役割についての検討結果をまとめた。

**研究組織**

研究代表者	皆川 洋子	愛知県衛生研究所
研究分担者	調 恒明	山口県環境保健センター
	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
	佐野 一雄	名古屋市衛生研究所
	岸本 壽男	岡山県環境保健センター
吉田 弘、村上 光一、大石 和徳、	宮崎 義継、脇田 隆字	国立感染症研究所
	木村 博一	国立感染症研究所（現 群馬パース大学）
	松本 昌門	愛知県衛生研究所
研究協力者	高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
	北川 和寛	福島県衛生研究所
	水越 文徳	栃木県保健環境センター
	猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所
	峯岸 俊貴、岸本 剛	埼玉県衛生研究所
長谷川道弥、新開 敬行、河村 真保、小西 典子、平井昭彦、貞升 健志、千葉 隆司、大井 洋		東京都健康安全研究センター
	佐野貴子、近藤真規子	神奈川県衛生研究所
	小澤 広規	横浜市衛生研究所
	清水 英明	川崎市健康安全研究所
磯部 順子、板持雅恵、小淵 正次		富山県衛生研究所
	中田 恵子、勢戸 和子	大阪健康安全基盤研究所
	木田 浩司	岡山県環境保健センター
	豊嶋 千俊	愛媛県立衛生環境研究所
吉富 秀亮、濱崎 光宏、世良 暢之、香月 進		福岡県保健環境研究所
	西澤 香織	熊本市環境総合センター
泉谷 秀昌、大西 真、梅山 隆		国立感染症研究所
	長澤 耕男	千葉大学大学院医学研究院小児病態学
	山下 照夫	修文大学健康栄養学部
	猪飼 薫、奥田 健司	愛知県一宮保健所
伊藤 雅、山田 和弘、垣添 寛和、鈴木 裕子		愛知県衛生研究所

研究協力者（つづき）

アンケート調査に協力いただいた全国地方衛生研究所の担当者

ウイルス研修時の調査等に協力いただいた全国地方衛生研究所の受講者

班会議出席者（オブザーバー）

厚生労働省結核感染症課

## A. 研究目的

地方衛生研究所（以下地衛研）は、自治体の（感染性食中毒を含む）感染症健康危機対応における重要な科学的根拠となる病原体検査を担当しており、平成 28 年 4 月の改正感染症法施行により法的根拠が付与された病原体情報の収集では、国立感染症研究所（以下感染研）との密接な連携のもとに、中心的役割を担っている。本研究においては、地衛研が実施する病原体検査の質の維持・確保にあたり、内部精度管理に並んで必須となる外部精度調査を実施する上で必要なシステム構築を開始した。具体的には ウイルス及び細菌について、各々地衛研の検査対応が感染症対策上重要な病原体の精度管理試行（必要な文書ひな形案の作成等を含む）を通じて、全国の地衛研・感染研の連携による外部精度管理システムの基盤形成をめざした。 28 年度の予備調査の結果、全国地衛研の約 1/4 が自治体内（都道府県における保健所設置市を含む）の民間衛生検査所や保健所等に精度管理用検体を提供している実態について追加調査を実施して現状を把握するとともに、地域の病原体検査体制維持強化において地衛研が果たせる役割について検討した。

本研究の実施にあたっては自治体における病原体検査担当者確保上の課題把握を特に重視した。

## B. 研究方法

### 1. 3 小班編成による研究分担

平成 26-27 年度に実施された先行研究（佐多班）の成果(1)を参考に、班全体及び「ウイルス小班」「細菌小班」「項目小班」の 3 小班に分かれて研究を実施した。

平成 29 年度「ウイルス小班」は、感染研感染症疫学センター 木村室長（現群馬パース大教授）を中心に精度保証手法をとりこんだウイルス遺伝子検査法の研修成果の解析（分担研究報告書 1 参照）、感染研ウイルス第二部吉田主任研究官を中心にワーキンググループ（WG）地衛研担当者が協力して、エンテロウイルス 71 遺伝子検体を用いた精度

調査試行及び他のウイルスに応用可能な精度調査プロトコルひな形作成（分担研究報告書 2 参照）を実施した。「細菌小班」は、感染研感染症疫学センター 村上室長、富山県衛生研究所 滝澤所長、愛知県衛生研究所 松本部長を中心に、コア WG 地衛研の細菌担当者及び感染研細菌第一部 泉谷室長らが協力して、三類感染症「赤痢」の赤痢菌検査を対象とした病原細菌検査の精度管理を試行し、精度調査実施に必要な事務手続きを含むひな形書類のセットを作成した（分担研究報告書 3 参照）。「項目小班」では、自治体における地域の保健所・大学等との連携に関するニーズや地衛研の在り方について検討（分担研究報告書 4 参照）するとともに、28 年度に全国地衛研を対象に実施したアンケート調査結果（28 年度分担研究報告書 5 参照）に基づき追加調査を実施し、地域におけるニーズ等を検討した（分担研究報告書 5 参照）。

### 2. 全体班会議等による小班間の相互連携

項目小班による検討にはウイルス・細菌の専門家の関与が不可欠であるとともに、ウイルス小班及び細菌小班活動は、地衛研の所長や企画調整担当者が主な構成員となっている項目小班的視点からも評価する必要がある。旅費はじめ限られた予算の効率的活用も念頭に、ウイルスと細菌の外部精度調査試行準備は小班内に設置した WG を中心に進めるとともに、検討班会議はウイルスと細菌担当者が一堂に会する形で活発な意見交換を図った。さらに全体班会議には、3 小班及び感染研関係者及び厚生労働省結核感染症課の参加を得て、活発な議論が行われた。大学・保健所等に属する研究協力者は、日程の都合で 28 年度は班会議出席がかなわなかったため、29 年度は WG 会議を設定して意見していただく機会を設けた。

（倫理面への配慮）検体提供者の個人情報を取り扱わない。研修に参加した地衛研職員に対しては、成績の取扱いについて個人が特定されないこと等を分担研究者より事前に説明が行われたのち、個

別にインフォームドコンセントが得られた。動物実験は実施しない。

## C. 研究結果

### 1. 精度保証の手法を取り入れたウイルス遺伝子検査法の研修（木村らの報告書1を参照）

地衛研職員23名を対象に実施された精度保証の手法を取り入れたウイルス遺伝子検査（ノロウイルス（NoV）リアルタイムPCR法）に関する研修（初回研修）後のフォローアップ研究を行った。初回研修と同様に同一試薬・同一機器を用い、3日間連続で、リアルタイムPCR法による標準曲線の作成を実施した。初回研修受講者23名中解析に十分な研修時と研修後のデータが得られた8名について、標準曲線の精確度、最小測定感度の確保を統計学的に比較した。その結果、初回研修後は検量線の相関係数（R<sup>2</sup>）、標準物質のコピー数毎の変動係数（CV；%）において、有意な改善が認められた。さらに、検出限界値（10コピー/well）も研修後は安定して検出することができた。研修後の試験結果の精度が向上していることから、微生物検査の精度保証の手法を取り入れた研修は、地方衛生研究所の検査精度の確保・改善に貢献することが示唆された。

### 2. 感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査（EQA）導入の研究（吉田らの報告書2を参照）

感染症発生動向調査における五類定点把握対象かつ病原体検索対象となっており手足口病検査について、地衛研ごとに検査体制が異なる実情を踏まえつつウイルス検出感度と遺伝子検査の質について、12施設の協力を得て試行的に調査を行った結果、検査試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、ウイルス検出感度のばらつきと反応諸条件の情報、施設間塩基配列の差異の情報、を改善に向け活用すべく施設内で機材保守、内部精度管理の実施など Plan・Do・Check・Act（PDCA）を動かすためのメカニズム構築が必要、

EQAの結果は地衛研間で共有し、2類ポリオ対応のため国内のサーベイランス体制の向上に向け活用すべき、少数の参加施設ならば比較的容易に市販の非感染性試料を用いて他の疾患に対してもEQAをパッケージ化可能、病原体サーベイラ

ンス全体の質を改善するには検体採取から検査結果までのフローを評価、把握する指標開発が必要であることが認められた。

### 3. 地方衛生研究所を対象にした赤痢菌検査の外部精度管理調査（滝澤らの報告書3を参照）

地衛研で実施する細菌検査の信頼性確保のため、「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」を実施項目とする外部精度管理調査を、27施設の参加を得て試行した。本試行を通じて、四種病原体の送付等諸手続きに必要な書式等を一式準備でき、今後他の病原体の外部精度調査にも応用可能なひな形等が得られた。3検体の結果報告をみると赤痢菌か否かについては全27施設が誤りなく回答していたが、施設により検査の進め方が異なること等を回答書式に十分に反映できていなかった等の問題点も明らかになった。本研究を通じて、綿密な準備が必要であることが明らかとなった。

### 4. 地域の病原微生物検査の質の維持向上に資する地方衛生研究所の役割に関する研究（松本らの報告書4を参照）

自治体における地衛研の役割のなかで地域の保健所等との連携は重要である。保健所・大学職員を招聘して、衛生研究所の連携について検討する会議を開催した。事前アンケートを実施し、衛生研究所に期待する具体的な項目が明らかになるとともに、人材育成等における問題点が共有された。地衛研は管内人口等の条件が大きく異なる自治体に各1施設設置されることから、期待される役割も一様ではないが、病原微生物検査体制の維持向上を継続するためには、関係機関も巻き込む形で、現状の問題点（専門家の不足・研修機会の不足等）と期待される役割（人材育成・最新最適な検査法の情報提供・精度管理用検体提供等）を把握し、常に優先順位を考慮しながら対応を立案する必要がある。

### 5. 地方衛生研究所における病原微生物検査体制と「検査の質の確保」に関する研究（皆川らの報告書5を参照）

28年度に本研究で実施した「病原体検査の質確保」体制構築状況の調査に際して各自治体の保健所、衛生検査所等の外部精度管理実施への協力実

績ありと回答された 17 機関に対して追加調査を実施した。配付実績のある検体等には、感染症法に基づく検査対象病原体のみならず食中毒原因菌や内部精度管理用病原体等が含まれていた。今後検体提供継続を縮小～中止する予定と思われる 2 機関を除く 15 機関は地全協の地域別に置かれている 6 支部全てに分散しており、将来支部単位若しくは支部相互に検体提供を実施する可能性についても、一定の素地はあると考えられた。

## D. 考 察

### 1. ウイルス遺伝子及び細菌菌株検体を検体とする外部精度管理システムの構築

改正感染症法施行に伴い病原体情報の収集に法的根拠が付与され、地衛研等検査機関は内部精度管理実施とともに外部精度（管理）調査を定期的に受ける義務を負うが、平成 28 年 4 月の時点では細菌・ウイルス検査において食品以外の地研全体の外部精度管理の仕組みはなかったため、新たに病原体外部精度管理システムを構築する必要が生じ、26-27 年度佐多班の研究成果(1)もふまえて 28 年度に厚生労働省により、国立感染症研究所に「外部精度管理事業企画検討委員会」が設置された。本研究で得られたエンテロウイルス 71 遺伝子(分担研究報告書 2 参照)及び赤痢菌菌株(分担研究報告書 3 参照)の外部精度調査システムのひな形は、いずれもエンテロウイルス 71 や赤痢菌以外のウイルス・細菌検査用検体配付に応用可能なものとなっており、今後国により（感染研が担当して）実施される外部精度管理に加えて、地衛研が地域や支部等で精度調査用検体配付を計画する際にも活用が期待される。

### 2. 今回とりあげなかった検体等に対する外部精度調査への備え

今回ウイルス小班では、季節性インフルエンザの分離等を念頭に、感染性を保持した検体を配付するシステムの必要性についても繰り返し議論したが、感染力を保持した状態で全国各地に同時に発送するシステム構築を遺伝子発送と並行して実施することは、本研究ではマンパワー等を考慮して困難と判断し、着手していない。ウイルス分離

検査用検体配付システムについても、今後構築が必要である。

### 3. 感染症検査の外部精度調査で求められる検査の感度に関する考察

地衛研が担当する病原体検査の信頼性確保は、定常状態の把握に資する感染症発生動向調査における診断精度並びに病原体サーベイランス精度の確保や、食中毒や集団発生等健康危機事例発生時の積極的疫学調査等健康危機事例や輸入感染症疑い検査等の検査の「質」確保が目的である。したがって、多くの地衛研において導入から既に 20 年以上経過している食品や水質の規格基準検査における GLP(Good Laboratory Practice)、特に理化学分析検査とは若干の異同がある。感染症法に基づく病原体あるいは血清学検査は、しばしば定性的判定（陽性か陰性か）が決定的に重要であり、施設間で判定が大きくばらつくことは望ましくない。全国の地衛研間において、検出限界が一定の範囲に収まること（均てん化・平準化）や、検査結果に基づいて下される行政的判断に重大な影響をもたらす定性的結果（陽性・陰性・判定保留）に十分な再現性が担保され、プレ（検査室間並びに室内-検査員間-誤差）が生じ難い検査体制を構築する必要がある。検査感度と結果再現性のバランスをとる観点から、分担研究報告書 1 に記載されている担当職員の技能研修で求めた検査感度（検査プロトコルに左右される）が定性結果判定に用いられる閾値より 1~2 段階希釈高感度になっている。因みに現在食中毒検査で実施されるノロウイルス検出では、2 つのウェルにおいて実測値 10 コピー以上を陽性と判定している(2)。

### 4. 輸入感染症対策強化における地衛研検査機能強化の必要性

国際保健機関(WHO)による国際保健規則(IHR)(3)及び WHO 西太平洋支部(WPRO)等による Asia Pacific Strategy for emerging diseases (APSED)(4)に示された感染症の検査は、日本においては感染研が一義的には対応することとなるが、近隣諸国でのアウトブレイク等に際して検査依頼が急増した場合に、しばしば地衛研の検査がスク

リーニングに活用される。IHR Appendix 2 に疾患名が記されている痘瘡、野生型ポリオ、新型インフルエンザ、SARS、コレラ、肺ペスト、黄熱、ウイルス性出血熱(エボラ・ラッサ・マールブルグ)、ウエストナイル熱、デング熱、リフトバレー熱、髄膜炎菌感染症のうち 2009 年の新型インフルエンザ発生に際しては、感染研インフルエンザウイルス研究センターが国内発生前にリアルタイム RT-PCR 法による診断プロトコルを開発し、厚生労働省から配布された陽性対照品・プライマー・プローブ等を用いて全国の地衛研でスクリーニング検査(その後地衛研の検査結果をもって確定扱いに変更)が実施された。 Event of potential international public health concern (PHEIC)とされた 2016 年のジカウイルス感染症においても、同様の対応がとられている。地衛研における病原体検査精度の確保は、輸入感染症対応体制の維持強化にもつながる。なお今回ウイルス小班で対象とした「手足口病」の病原体エンテロウイルス 71 は、それ自身アジアで毎年のように死亡を来す(5)ばかりでなく、ポリオウイルスと同じエンテロウイルスに属しており、「手足口病」検査精度の向上は、二類感染症「急性灰白髄炎」への備えの強化につながる。

#### 5. 地域における中核機関としての地衛研による病原体検査体制維持強化に向けた取り組み

地衛研は各地域(都道府県内の保健所設置市を含む)における科学技術的中核機関としての役割も期待されており、17 機関が民間衛生検査所や保健所試験検査課等に精度管理用検体を提供している。全国に加えて支部レベルでの外部精度管理実施が可能になれば、運送費・フィードバック研修旅費等の節約になるばかりでなく近隣地衛研間の連携強化も期待できる。

#### 6. 地衛研における病原体検査担当者育成の現状及び課題の把握

近年ベテラン職員が定年を迎えた後、採用が少なかった「就職氷河期」世代への専門的技術の継承あるいは職員補充に苦勞している自治体は少なくない。地衛研に感染症や病原体を専門とする職

員の存在が不可欠であること(分担研究報告書 5)は自明と思われるが、一部の自治体人事担当部署においては専門性への理解は必ずしも十分ではない。精度調査の結果、個々の検査施設における検査精度や検査体制の問題点が外部から指摘されると、行政担当者にも検査精度維持向上ならびに担当自治体職員への専門研修等教育訓練機会確保の必要性が理解されやすいかもしれない。外部精度調査の実施が、地衛研における長期的展望にたった専門家の育成、さらには自治体の感染症による健康危機対応体制の維持強化につながることを望ましい。

#### 7. 平成 29 年度研究活動の総括

本研究事業の最終年度にあたる平成 29 年度は、分担研究報告書 2 及び 3 のとおり、ウイルス及び細菌検査について、各々他の病原体への応用も視野にいた精度管理実施システム試行を実施できた。さらに試行を通じて、地衛研の病原体検査部署が抱える課題も共有された。感染研における病原体専門家に研究分担あるいは研究協力者として本研究に参画のうえ綿密に計画・実行していただいた。地衛研の研究分担者・研究協力者は現場の代表として積極的に参加するとともに、書式の整備や報告書準備等に尽力した。

地衛研の課題や地域における在り方について分担研究報告書 4 及び 5 のとおり、調査及び会議を開催のうえ、考察した。

外部精度調査の結果をふまえた効果的な(地衛研の担当者育成や体制強化に結びつく)フィードバックや関連研修については、30 年度新たに立ち上がる研究班において検討を予定している。

#### E. 結 論

今般の感染症法改正に伴い、法に基づく検査を担当する自治体の機関は外部精度管理を定期的に受けることとなったため、ウイルス(手足口病の病原ウイルス)及び細菌(赤痢菌)について、感染研に所属する各病原体の専門家と検体検査の現場を熟知した地衛研ベテラン職員が協力する形で、外部精度管理システムを構築のうえ試行を実施した。他の病原体への応用も可能であるが、分離検査(感染性を保持したウイルスが必要)等今回取



り上げなかった性質の検査については、別途システム構築を図る必要がある。

法改正を契機に、病原体検査精度維持向上の必要性が、自治体行政関係者にも認知されるようになったと期待される。検査精度の維持には地衛研病原体担当職員の資質向上が不可欠であり、病原体の関わる健康危機対応力の向上につながるよう、本研究成果の活用を図るとともに、研修等についても検討する必要がある。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文発表

・吉田弘,環境水サーベイランスの意義並びに実態から見えてくる予防医学に関わる知見 東京小児科医会報 36(1):26-30, 2017

・吉田弘,高橋雅輝,濱崎光宏,山下育孝,四宮博人,山下照夫,皆川洋子,岸本剛,調恒明 エンテロウイルス検査の信頼性確保について 病原微生物検出情報(IASR) 38(10):199-200, 2017

・皆川洋子:地方衛生研究所の役割 臨床とウイルス(印刷中)

##### 2) 学会発表

・帖佐徹,吉田弘,滝澤剛則:環境水サーベイランス手法の中国への導入について、第76回日本公衆衛生学会 平成29年10月31-11月2日鹿児島市

・吉田弘,筒井理華,堀田千恵美,小澤広規,滝澤剛則,中田恵子,世良暢之,濱崎光宏:環境水サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題 第76回日本公衆衛生学会 平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

・濱崎光宏,世良暢之,吉田弘:環境水中の腸管系ウイルス量と感染症発生動向調査事業の患者数との関連について 第76回日本公衆衛生学会 平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

・帖佐徹,吉田弘,板持雅恵,滝澤剛則,Zhang Yong, Xiaohui Hou, Zheng Huanying, Wang Haiyang, Tao Zexin : Collaboration study of environmental surveillance for polio since 2005 between Japan and China グローバルヘルス合同大会 2017 平成29年11月24-26日 東京

#### 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

#### 参考文献

1. 佐多徹太郎ら. 2016. 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. 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)平成26-27年度総合研究報告書.
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. 2007. ノロウイルスの検出方法について. 最終改正 平成19年5月14日食安監発第0514004号.
3. World Health Organization. 2016. International health regulations (2005) - 3rd ed.
4. World Health Organization Regional Office for the Western Pacific (WPRO) and World Health Organization. Regional Office for South-East Asia (SEARO). 2011. Asia Pacific Strategy for emerging diseases : 2010.
5. World Health Organization Regional Office for the Western Pacific (WPRO). 2011. A Guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD).

(総括研究報告書添付資料)

2018年1月10日 全体班会議資料抜粋

平成28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に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究**  
 (H28-健危-一般-002)

1. 研究代表者: 皆川 洋子(愛知県衛生研究所)  
 2. 研究分担者: (地全協精度管理部会、感染研レファレンス委員会等)

**背景**

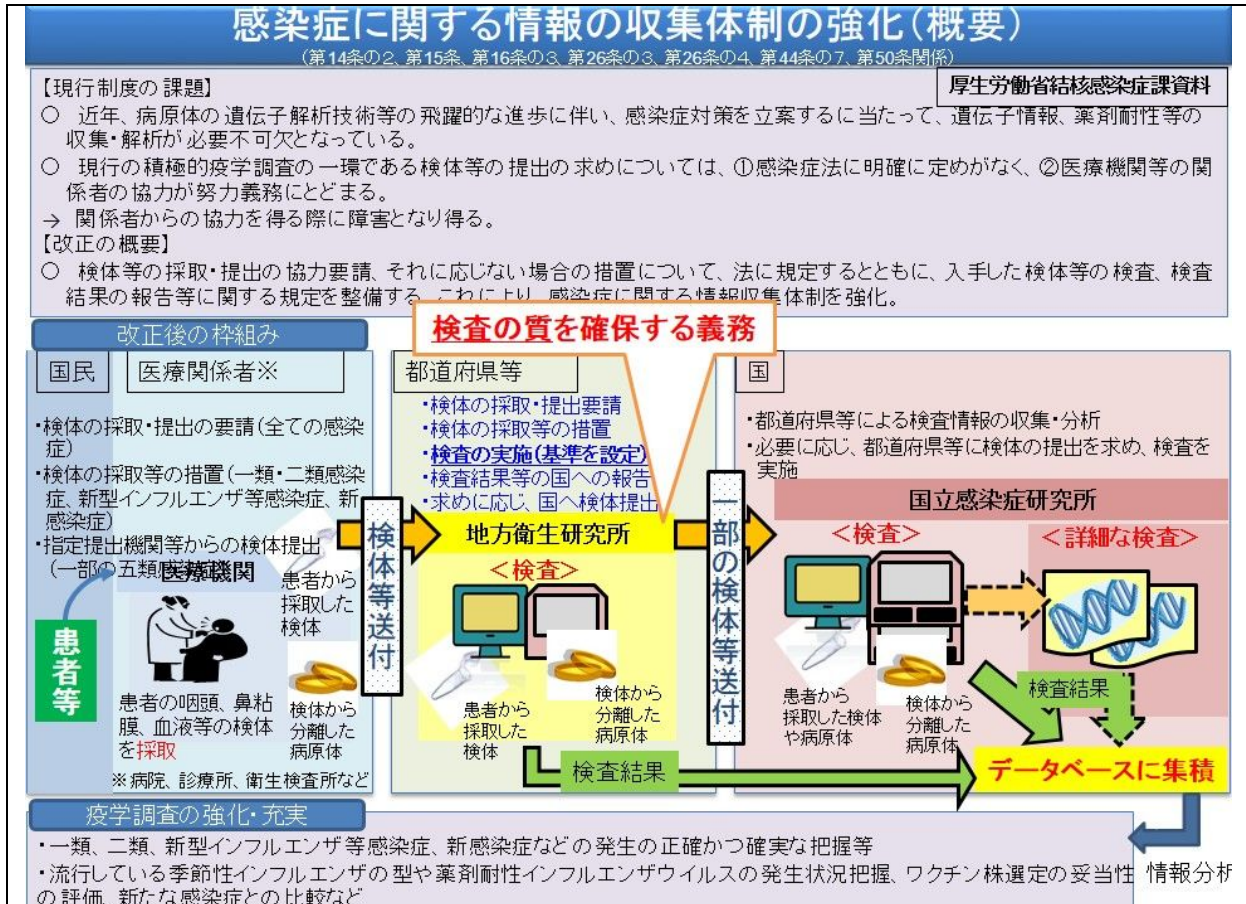
- ・平成28年4月改正感染症法施行に伴い知事等の事務となった病原体情報の収集を担当する地方衛生研究所等において「病原体検査の質」を確保する必要
- ・地衛研の検査水準確保、健康危機管理体制の維持、人材育成効果も期待(感染症発生動向調査、地衛研-感染研のネットワークの維持にも役立つ)

**研究目的**

- 地衛研全国協議会が主体となって、
- ・外部精度管理体制の導入にあたり、継続的实施に必要な条件を提言
  - ・具体的な外部精度管理項目の洗い出し・検査体制構築状況の把握
  - ・ウイルス・細菌に関する外部精度管理の試行

**求められる成果(公募要領)**

- ・包括的な外部精度管理調査のひな形 →細菌小班・ウイルス小班
- ・地方衛生研究所に求められる役割と機能強化のための他機関との連携の在り方についての検討結果



## H29年度精度管理班(3小班)の研究活動概要

2017年2月20日 28年度成果発表会(中間評価)

2017年3月31日付 29年度交付基準額等通知

- 5月9日(火) 地全協理事会後 一部関係者と打合せ
- 5月 赤痢菌外部精度調査試行(27機関へ送付)
- 5月24日(水) 第1回 WG会議(ウイルス・細菌) (感染研共用第二会議室)
  - ・29年度研究方針について検討、タイムテーブルの確認
  - ・追加アンケートの要否について検討
  - ・ウイルス外部精度調査試行について検討
- 9月7日(木) 保健所・大学連携WG会議(項目・細菌) (愛知衛研共同研究室)
  - ・保健所・大学ー地衛研の連携のあり方について検討
- 10月24日(火) 細菌コアWG会議 (感染研第一会議室)
  - ・試行結果評価・フィードバック法について検討
- 10月30日(月) 項目小班会議/地全協精度管理部会 (鹿児島市 城山観光ホテル)
- 12月 エンテロウイルス外部精度調査試行(12機関へ送付)
- 12月 自治体内他機関への検体提供に関する追加調査実施(17機関へ送付)
  
- 2018年1月5日(金) 国立保健医療科学院へ研究成果報告書を提出
- 本日 全体班会議 (感染研共用第二会議室)
  
- 報告書原稿締切 平成30年1月12日(金)
- 総括研究報告書・総合研究報告書(最終年度):年度内とりまとめ・フィードバック

4

H28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に対する外部精度管理の導入と  
 継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究

(H28-健危-一般-002) 研究代表者 皆川洋子

研究分担課題:

## ウイルス外部精度管理計画の作成・検証

研究分担者

木村博一(群馬パース大学・国立感染症研究所)

村上光一、宮崎義継、大石和徳(国立感染症研究所)

調恒明(山口県環境保健センター)

四宮博人(愛媛県立衛生環境研究所)

研究協力者

小淵正次(富山県衛生研究所)

千葉隆司、貞升健志(東京都健康安全研究所)

清水英明(川崎市健康安全研究所)

長澤耕男(国立感染症研究所)

○水越文徳(栃木県保健環境センター)

平成29年度「地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究」皆川班 2018.1.10

分担研究: 感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査(EQA)導入の研究

分担研究者 吉田 弘 国立感染症研究所

研究協力者

板持雅恵	富山県衛生研究所
伊藤雅 皆川洋子	愛知県衛生研究所
小澤広規	横浜市衛生研究所
木田浩司	岡山県環境保健センター
北川和寛	福島県衛生研究所
佐野貴子	神奈川県衛生研究所
新開敬行	東京都健康安全研究センター
豊嶋千俊	愛媛県立衛生環境研究所
中田恵子	大阪健康安全基盤研究所
西澤香織	熊本市環境総合センター
峯岸俊貴	埼玉県衛生研究所
吉富秀亮	福岡県保健環境研究所

## 外部精度管理班ウイルス小班分担研究: Research Question

感染症発生動向調査では手足口病の報告は臨床診断に基づく。届け出基準に検査法及び血清型分類の必要性は明示されていない。

では病原体検査で何を明らかにし、その結果の質はどうあるべきか(手足口病検査の報告は血清型でよいか。方法は細胞、乳のみマウス(CF)による分離同定、塩基配列による同定のいずれでもよいか)

塩基配列でエンテロウイルス血清型を同定し報告する場合、結果の妥当性を判断する評価の指標が必要

## 研究目的

感染症発生動向調査における手足口病検査の評価の指標の検討(CODEHOP-snPCRの場合)  
外部精度管理調査に用いるウイルス試料の調製方法の検討と試行

### 1年目

- ・送付に用いる安定なRNA調製法の検討(保管温度とGC量)
- ・CODEHOP snPCRの評価指標
- ・コストの検討

### 2年目

エンテロウイルスレファレンスセンター他の協力を得てCODEHOP法の感度比較、塩基配列の質評価のためのRNA試料を送付し、EQAの導入について検討

## 2年間の研究成果

先行研究班で実施したアンケートに基づき5類小児科定点把握疾患である手足口病検査に関するEQAの手法の開発、評価の指標について研究した。

文献より欧州などの感染症に関連するEQAは食中毒、VPDs、危機管理関連の疾患に対するEQAプログラムが存在。これらは官民がそれぞれ実施しており、手足口病に関してはかつて重篤例が社会問題化し対策を重視している中国で定期的を実施

国内で普及しているCODEHOP-snPCR法による同定検査の水平評価を目的として、RNA試料(自家調製、市販品)の保存条件のアッセイ法を作成し、濃度、温度など条件の検討をし、さらに試料送付用方法の比較

市販品のエンテロウイルスRNAコントロールと、輸送に用いるRNastableの組合せにより、少数の調査なら比較的簡便に実施可能なEQA調査をパッケージ化した。

12か所なら、エンドポイント比較とシーケンス比較、準備から送付まで1人で可能。宅配便による冷凍輸送利用。費用は1か所輸送費込み2万円以下

民間が実施するEQAと費用の面でも大差なし

## 平成29年度細菌小班試行 地域別参加機関

番号	ブロック	施設名	番号	ブロック	施設名
1	北海道・東北・新潟地区	札幌市衛生研究所	16	中国・四国地区	岡山県環境保健センター
2	北海道・東北・新潟地区	函館市衛生試験所	17	中国・四国地区	広島県立総合技術研究所保健環境センター
3	北海道・東北・新潟地区	秋田県健康環境センター	18	中国・四国地区	香川県環境保健研究センター
4	北海道・東北・新潟地区	茨城県衛生研究所	19	九州地区	熊本県保健環境科学研究所
5	関東・甲・信・静地区	さいたま市健康科学研究センター	20	九州地区	熊本市環境総合センター
6	関東・甲・信・静地区	千葉県衛生研究所	21	九州地区	鹿児島県環境保健センター
7	関東・甲・信・静地区	足立区衛生試験所	22	細菌小班	東京都健康安全研究センター
8	関東・甲・信・静地区	静岡県環境衛生科学研究所	23	細菌小班	富山県衛生研究所
9	東海・北陸地区	福井県衛生環境研究センター	24	細菌小班	愛知県衛生研究所
10	東海・北陸地区	名古屋市衛生研究所	25	細菌小班	大阪健康安全基盤研究所
11	東海・北陸地区	岐阜県保健環境研究所	26	細菌小班	愛媛県立衛生環境研究所
12	近畿地区	滋賀県衛生科学センター	27	細菌小班	福岡県保健環境研究所
13	近畿地区	京都市衛生環境研究所			
14	近畿地区	尼崎市立衛生研究所			
15	近畿地区	和歌山県環境衛生研究センター			

## 平成29年度参加地方衛生研究所決定(H29.3)

地方 (地衛研数)	人口 (万人)	参加機関数
北海道・東 北・新潟(12)	1,686	3
関東・甲信・ 静岡(24)	4,944	5
東海・北陸 (8)	1,260	3
近畿(14)	2,276	4
中国・四国 (11)	1,170	3
九州・沖縄 (12)	1,323	3
計(81)	12,659	21

全81地衛研中  
参加希望64地衛研



細菌小班6地衛研を加え、  
計27地衛研を決定

図1 外部精度管理プロトコール案

### 検体の選択

- ・臨床分離または保存株から複数の候補株を選ぶ。
- ・選択分離培地で発育状況、色調、コロニーの大きさや形状の確認
- ・生化学的性状確認試験で性状の確認
- ・血清凝集試験でO、H抗原凝集の確認
- ・病原菌同定用遺伝子検査での確認。
- ・毒素産生菌の場合には遺伝子検査と毒素産生性試験を行い毒素遺伝子、産生性の確認

### 検体の作製と送付

- ・検体を平板培地で一夜培養する。非病原菌を加える時は同様に培養する。
- ・平板培地に発育した菌体を生理食塩水等で適切に希釈する。
- ・非病原菌を加える時は検体と非病原菌を希釈した後、適切な割合で混合する。
- ・希釈した検体を適量輸送用培地に加える。
- ・検体をジュラルミン製四次容器に梱包し、ゆうパックで送付。
- ・当日発送しない場合は冷蔵保管する。
- ・作成した検体を選択分離培地に塗抹し、性状等確認(作成当日と送付先到着日1から3日後まで検査)

### 結果の解析と評価

- ・検査結果報告書、検査経過報告書等を検体と同時に送付し、期日までに回答を得る。
- ・解析は、検査成績(菌名等)と選択分離培地での性状、生化学的性状確認試験、血清凝集試験、遺伝子検査での結果。毒素産生菌の場合には遺伝子検査と毒素産生性試験の結果を確認する。
- ・報告書の作成、報告会の開催を行い、参加者に結果の還元を行う。

## 項目小班

H28 アンケート実施・解析

H29

- ・保健所・大学との連携WG会議開催  
地域における地衛研の役割、  
保健所試験検査課との連携について検討
- ・追加アンケート実施  
(28年度実績のある17機関全てより回答)  
他機関への精度管理用検体等提供実績  
(保健所 13機関 衛生検査所7機関 その他6機関)

11

## 2年間の研究分担・協力ありがとうございました

pending, 他の研究で対応？

- 地衛研機能の維持強化につながる事項
  - ・28年度調査で目立った研修ニーズへの対応、  
支部単位研修の要望 ⇒在り方について30-31年度に研究
  - ・地衛研間の多様性(県型・指定都市・中核市等研究所の規模・守備範囲・管内人口、外国との往来)を考慮した体制 ⇒30-31年度研究において検討？
  - ・国際保健規則(IHR)に関わること⇒感染研との連携関連は30-31年度の課題
  - ・28年度調査で目立った外部精度管理・標準品ニーズへの対応
- 地域の健康危機対応力強化(維持)につながる事項
  - ・保健所・民間衛生検査所・病院検査室？を対象とした、地衛研による  
研修受け入れ・精度管理用検体の供与等⇒在り方について30-31年度に研究

26

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）  
分担研究報告書

地方衛生研究所における病原微生物検査に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究

研究代表者 皆川洋子 愛知県衛生研究所長

**精度保証の手法を取り入れたウイルス遺伝子検査法の研修**

研究分担者 木村博一 群馬パース大学 保健科学部検査技術学科 教授  
村上光一 国立感染症研究所感染症疫学センター第5室長  
宮崎義継 国立感染症研究所真菌部長  
四宮博人 愛媛県立衛生環境研究所長  
調 恒明 山口県環境保健センター長  
大石和徳 国立感染症研究所感染症疫学センター長  
研究協力者 水越文徳 栃木県保健環境センター主任研究員  
小淵正次 富山県衛生研究所ウイルス部長  
貞升健志 東京都健康安全研究センター微生物部長  
千葉隆司 東京都健康安全研究センター 微生物部ウイルス科 副参事  
清水英明 川崎市健康福祉局健康安全研究所課長補佐  
長澤耕男 千葉大学 大学院医学研究院小児病態学 医員

**研究要旨**

地方衛生研究所の職員を対象に実施された精度保証の手法を取り入れたウイルス遺伝子検査研修（初回研修）後のフォローアップ研究を行った。本研究においては、初回研修と同様に、同一試薬・同一機器を用い、3日間連続で、リアルタイムPCR法による標準曲線の作成を実施した。初回研修受講者23名のうち、8名から解析に十分なデータが得られた。本年度の研究では、8名の初回研修受講者の研修時と研修後のデータを比較して、標準曲線の精確度、最小測定感度の確保を統計学的に比較した。その結果、初回研修後は、検量線の相関係数( $R^2$ )、標準物質のコピー数毎の変動係数(CV；%)において、有意な改善が認められた。さらに、検出限界値( $10^1$  コピー/well)も研修後は安定して検出することができた。このように、研修後の試験結果の精度が向上していることから、微生物検査の精度保証の手法を取り入れた研修は、地方衛生研究所の検査精度の確保・改善に貢献することが示唆された。

**A. 研究目的**

各自治体の地方衛生研究所(地研)は、地域保健に関して科学的・技術的中核機関として位置づけられている。よって、国民の健康危機管理にかかわる各法律に定める自治体の行政検査には高い精度が求められる。さらに、平成27年には、感染症法の改正に伴い、同法における感染症発生动向調査病原体検査において、食品衛生法に定める食中毒検査と同様に、検査結果の精度が確保された行政検査を行うことが義務付けられた。このような背景から、地研にお

いては、精度保証の手法を取り入れた病原体検査を行うことが法令上必要不可欠になっている。

近年、病原微生物の検出・同定検査には遺伝子学的手法が幅広く取り入れられている。その中でも特に、種々のウイルス遺伝子を高感度に検出し、精密な定量ができるリアルタイムPCR法は、重要な検査法と位置付けられ、ノロウイルス(NoV)、インフルエンザウイルスおよび麻疹ウイルスなどの多くのウイルス感染症の検査診断法として、地研で多用されている。これ



らの検査診断における精度保証は、各機関における検査精度の確保・向上のみならず、地研全体での検査水準の確認および確保のためにも必要であることはいうまでもないことと思われる。しかし、我が国において、精度保証の手法を取り入れた病原体検査に関する研修は、ほとんど行われていないのが現状である。

このような背景から、平成 28 年度では精度保証の手法を取り入れたウイルス検査診断技術に関する研修を行った<sup>1)</sup>。さらに本年度では、このような研修の成果を評価するために、研修の後に実施した再試験の結果を比較解析した。

## B. 研究方法

### 1) 対象

平成 28 年に実施した短期研修ウイルス研修（国立保健医療科学院・国立感染症研究所共同主催）の受講者 23 名（地研在籍歴；7 か月～10 年7 か月、平均±標準偏差：3 年2 か月±2 年3 か月）を対象とした。受講者に、研修後に各所属施設に戻ってから、研修と同様の試験（リアルタイム PCR；3 重測定、3 日間連続測定）を実施するように指示した。23 名の受講者のうち、16 名から研修後の試験結果が得られた。なお、各受講者に対し、本研究への参加ならびに研修で得られたデータを秘匿化して使用することに関し、口頭で同意を得ている。

### 2) NoV リアルタイム PCR 法

平成 28 年度の短期研修ウイルス研修（初回研修）では、公定法<sup>2)</sup>に準じて研修用テキストを作成し、同一分注試薬・試料および同一機器の同一測定位置で研修生ごとに3重測定を実施した。研修後の再試験では、各所属施設で使用している試薬、標準物質、測定機器を用いて、平成 28 年度の研修と同様のプロトコールでリアルタイム PCR の再試験を実施した。

### 3) 解析データの評価

平成 28 年度のウイルス研修の時のデータと、研修後に各所属施設で実施したデータについて、比較解析を行った。標準物質の精確度を評価するため、検量線の相関係数( $R^2$ )、スロープ

の評価を実施した。また、標準物質のコピー数毎の Ct 値から変動係数(CV；%)を算出し、5%以上を適正とした。さらに、測定感度の精確度の指標として、最小測定感度( $10^1$  copies / assay)を評価した。統計学的な解析には、解析ソフト GraphPad Prism7 を用いて、研修時と研修後のデータを Paired t-test で評価し、 $p < 0.05$  を有意差とした。

## C. 研究結果

### 1) 研修後の結果報告

平成 28 年に実施した短期研修ウイルス研修に参加した 23 名の受講者のうち、16 名から研修後の試験結果が得られた。このうち、3 日間のデータがない受講者や、検量線や試験系の結果に問題があったケースなどを解析から除外した。最終的に、十分情報が得られた 8 名の受講者のデータを基に、研修時と研修後の結果を比較解析した。

### 2) 検量線の $R^2$ とスロープの比較

結果が得られた 8 名の受講者の検量線の結果を図 1 に示す。研修後の結果は、各所属施設の間での試薬や機器の違いも影響する可能性もある。そこで、より客観的に比較するために、 $R^2$  とスロープについて受講者毎の3日間の平均値を解析した（図 2）。その結果、半数の受講者の  $R^2$  が 0.99 未満だった研修前に対して、研修後ではほとんどが 1.00 に近い値であった。これらの  $R^2$  値を統計学的に比較すると有意差があり、研修後に改善されていることが明らかとなった。一方、リアルタイム PCR において、理想的な PCR 反応を満たした場合、スロープは -3.32 になる。統計学的な差はなかったが、研修時のスロープの平均値（平均±標準偏差：-3.779 ± 0.101）に比べて、研修後（平均±標準偏差：-3.625 ± 0.133）は理論値に近い値に変動していた。これらの結果より、ほとんどの受講者のピペット操作の手技が向上し、10 倍階段希釈が安定することで、より正確な検量線が作成できたと考えられる。

### 3) 標準物質の CV の比較

ピペット操作の精密度を評価するために、標準物質の各濃度の CV(%)の結果を研修時と研修後で比較した(図 3)。3 日間の CV の平均値を個人毎に比較したところ、 $10^1 \sim 10^4$  コピー/well の反応系で、統計学的に有意に低下していた。特に、研修前では、 $10^1$  および  $10^2$  コピー/well の CV は、研修後に全ての受講者で 5%未満となった。このように、3 重測定 of 精密度が向上していた。希釈が進むにつれてピペット操作の技量が結果に影響を及ぼすが、低濃度で CV が改善したことから、研修の成果が認められた。

#### 4) 測定感度の精確度

検出限界値の確保( $10^1$  コピー/well の検出)について、図 4 に示す。研修時では、ほとんどの受講者が 3wells 中 1well もしくは 2wells しか検出できなかった。しかしながら、研修後のデータでは、3wells 中、全ての反応系でシグナルが検出できた受講者が大半を占めていた。同様に、ピペット操作の手技の向上による結果と考えられた。

#### 5) 改善が認められた代表例(2例)について

研修後に改善が認められた代表例を図 5 に示す。まず、図 5-a に示す例では、研修後、低濃度( $10^1$  コピー/well)のバラつきが認められなくなった。次に、図 5-b では、研修時ではバラついていたスロープが、研修後には一定になった。これらの受講生において 10 倍段階希釈の精確度が向上したことが推定された。

### D. 考察

本研究では、精度保証の手法を取り入れたリアルタイム遺伝子検査法に関する研修におけるフォローアップ研究を行い、受講者の実験手技の水準向上を具体的に検討した。本研究に適用したノロウイルス遺伝子解析法は、地研において、既に確立されている方法<sup>1</sup>であり、ほとんどの地研において、行政検査のみならず、下痢症ウイルス感染症の分子疫学に関する調査研究にも用いられていると思われる。しかしながら、平成 28 年度に実施した初回研修の結果は、受講者間の技量に大きな差があることが示

唆された<sup>1</sup>。一方、研修後に実施した再試験では、そのほとんどが研修時よりも精度が向上していた。

解析から除外した受講者の結果の中には、研修前に比べて研修後の Ct 値が非常に高い値を示しているデータがあった。この原因として、受講者の所属施設が使用している標準物質の劣化、濃度計算のミスなどが疑われる。ほとんどの地研で On the Job Training による検査技術の伝達が行われているが、十分な知識と経験がある中堅職員が少ないことのために所属内でのトラブルシューティングが出来ないが問題視されていた<sup>3</sup>。今回の例でも、このような結果を外部に報告する前に組織内で他のベテラン職員がチェックする体制がなかったことに問題があると考えられる。所属内での技術伝達のためには、適切な技術を基盤とし、かつ一定期間の経験を有する技術者を各地研で確保・維持していくことが重要である。本研究の結果をフィードバックすることは、各地研内での技術伝達の一助となると考える。

過去の研究によれば、本方法における基礎知識や技術に関し、検査現場で習得する機会が乏しいとの指摘がある<sup>3</sup>。この原因として、地研における微生物検査において、予算・定員などの検査資源の削減が続き、職員の技術水準と検査精度の維持が困難となっていることが考えられる<sup>3</sup>。したがって、今後もこのような状況が続けば、検査精度を十分に担保した行政検査が各自治体で行うことが困難になる可能性がある。今後、このような状態を改善するため、本研究で行ったような、地研における微生物検査の精度保証の手法を取り入れた研修を継続的に実施できるような体制整備が極めて重要であると思われる。

### F. 参考文献

1. 地方衛生研究所における病原微生物検査の外部制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 (H28 健危 一般 002) 平成 28 年度 報告書

2. ノロウイルスの検出法について、食安監発第 1105001 号.
3. 地方衛生研究所における病原微生物検査の外部制度管理の導入と継続的实施のための事業体制の構築に関する研究 (H26 健危 一般 001) 平成 27 年度 総括・分担研究報告書

### G 研究発表

なし。

### H. 知的財産の出願・登録状況

なし。

### 謝辞

本研究にご協力いただいた各衛生研究所に感謝します。

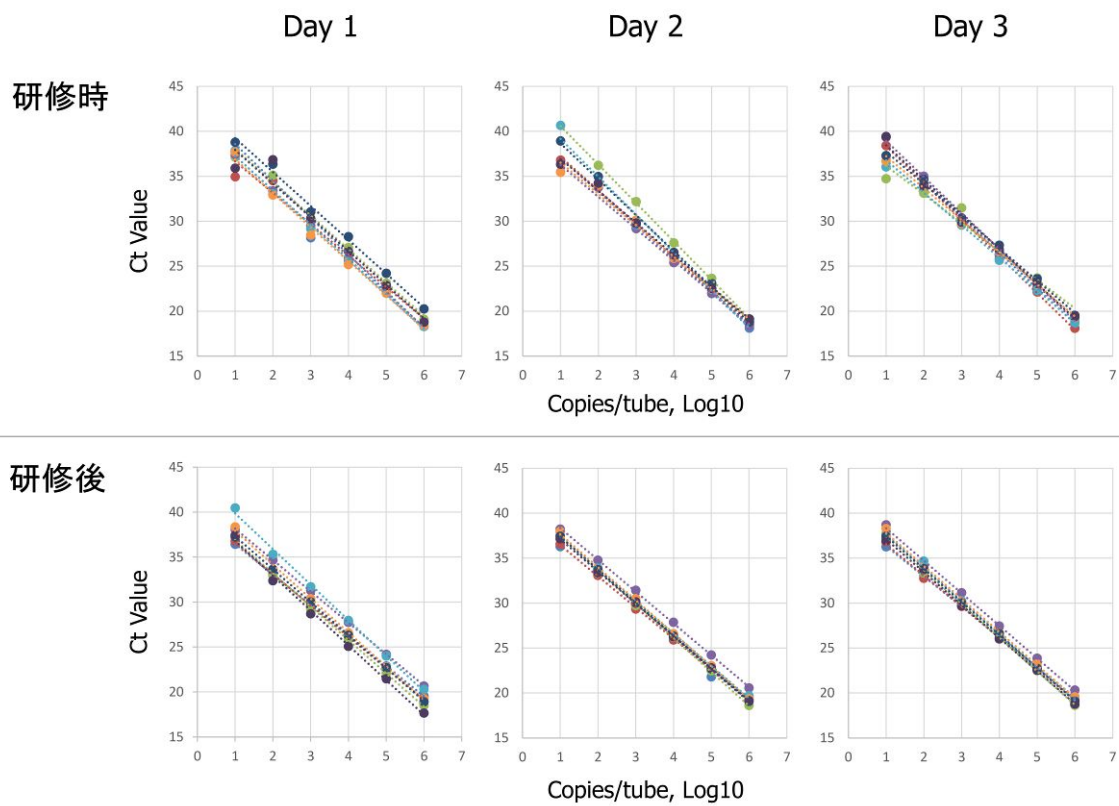


図 1. 研修時と研修後の検量線の比較

個人毎の3日間の平均値をPaired t-testで比較

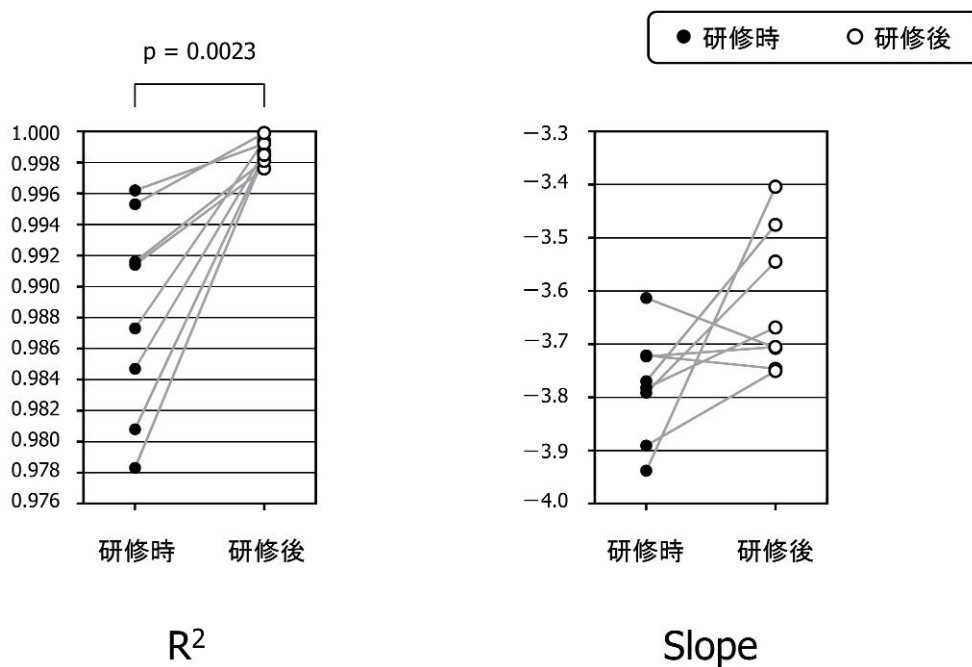


図2. 相関係数(R<sup>2</sup>)とスロープ値

個人毎の3日間のCV(%)の平均値をPaired t-testで比較

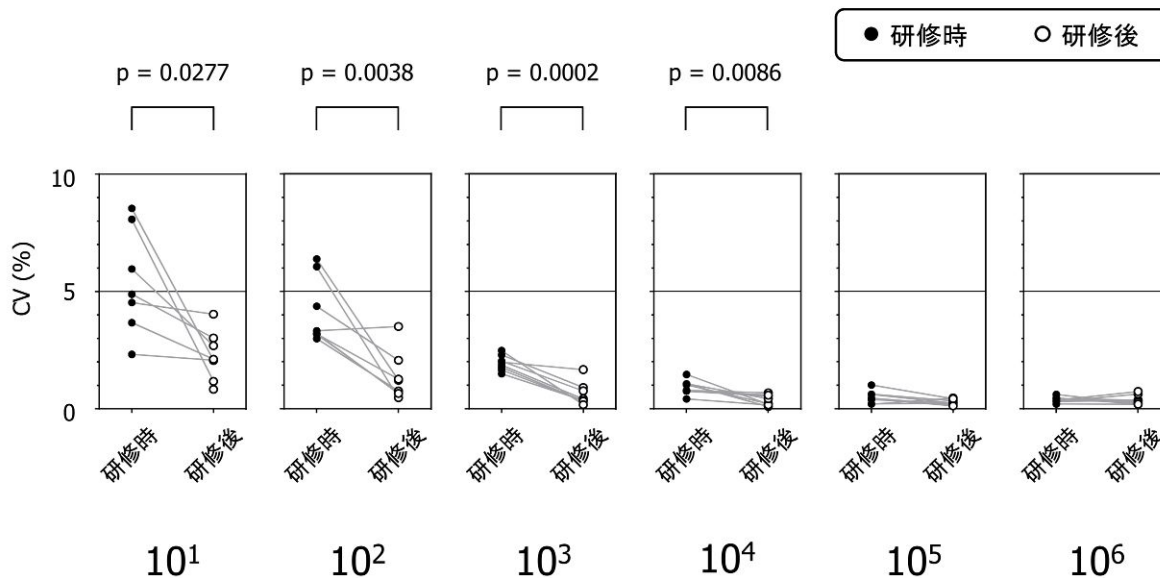


図3. 各濃度のCV値の比較

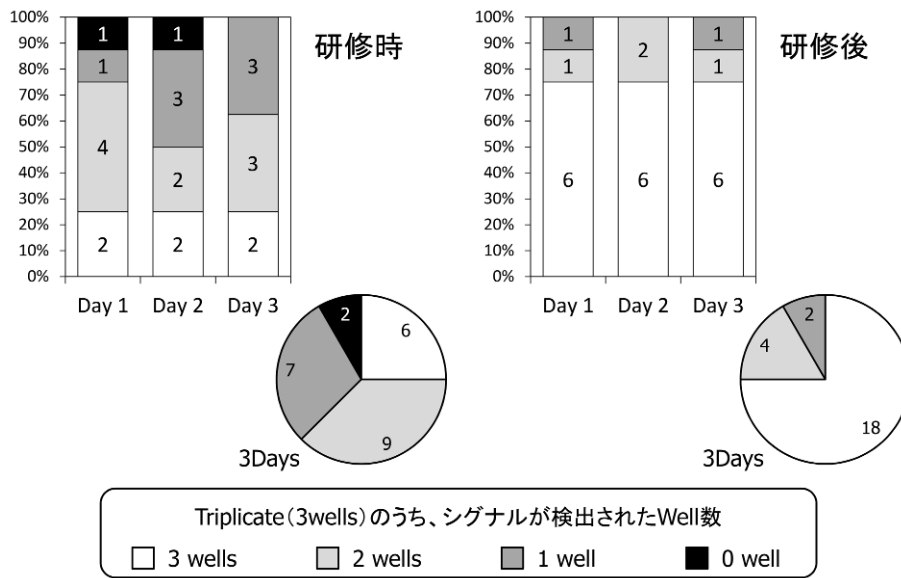


図4. 検出限界値の確保 (10<sup>1</sup>copiesの検出)

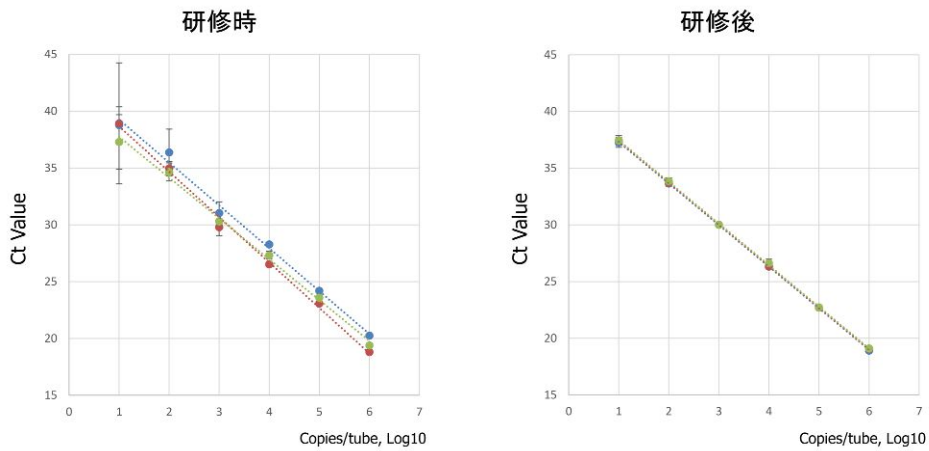


図5-a. 改善例1

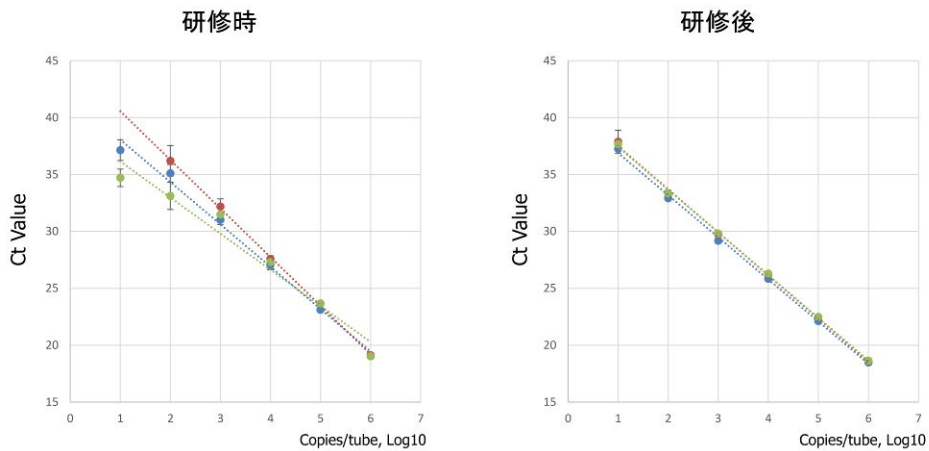


図5-b. 改善例2

分担研究報告書

感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査（EQA）導入の研究

研究分担者	吉田弘	国立感染症研究所
研究協力者	板持雅恵	富山県衛生研究所
	伊藤雅 皆川洋子	愛知県衛生研究所（レファレンスセンター）
	小澤広規	横浜市衛生研究所
	木田浩司	岡山県環境保健センター
	北川和寛	福島県衛生研究所（レファレンスセンター）
	佐野貴子 近藤真規子	神奈川県衛生研究所（レファレンスセンター）
	長谷川道弥 新開敬行	東京都健康安全研究センター
	豊嶋千俊	愛媛県立衛生環境研究所（レファレンスセンター）
	中田恵子	大阪健康安全基盤研究所（レファレンスセンター）
	西澤香織	熊本市環境総合センター
	峯岸俊貴	埼玉県衛生研究所
	吉富秀亮	福岡県保健環境研究所（レファレンスセンター）

研究要旨 5類小児科定点把握疾患の手足口病は臨床診断による報告を基本にしている。今般、改正感染症法施行に伴い、積極的疫学調査で実施する手足口病検査に関しても一定の検査の質を担保することが求められている。このことから地方衛生研究所では検査体制が異なる実情を踏まえた検査の質を評価する外部精度管理調査（EQA）の在り方について研究を行った。2年目は手足口病のウイルス検出感度と遺伝子検査の質について、12施設の協力を得て試行的に調査を行った。その結果、検査試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、ウイルス検出感度のばらつきと反応諸条件の情報、施設間塩基配列の差異の情報、を改善に向け活用すべく施設内で機材保守、内部精度管理の実施などPlan・Do・Check・Act（PDCA）を動かすためのメカニズム構築が必要であること、EQAの結果は地方衛生研究所間で共有し、2類ポリオ対応のため国内のサーベイランス体制の向上に向け活用すべきであること、2年間の研究の結果、少数の参加施設ならば比較的容易に市販の非感染性試料を用いて他の疾患に対してもEQAをパッケージ化可能であること、病原体サーベイランス全体の質を改善するためには検体採取から検査結果までのフローを評価、把握する指標開発が必要であることが認められた。

#### A. 研究目的

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下感染症法）における5類定点把握疾患のうち手足口病、ヘルパンギーナは主に

エンテロウイルスA群（EV-A）による感染が原因である。これらエンテロウイルス感染症は夏 - 秋季を中心に比較的大きな流行が見られる。1981年より開始した感染症発生動向調査事業では、手

足口病、ヘルパンギーナは臨床鑑別診断による報告が感染症法 12 条に規定され、全国の発生状況が速やかに還元されている。これらエンテロウイルス感染の多くの場合予後は良好であるが、手足口病の原因の一つであるエンテロウイルス 71 (EV71) 感染ではまれに重篤例が報告されており、またコクサッキーウイルス A 6 (CA6) 感染では、強い発疹像や爪甲脱落症を伴うケースも報告されている。このため積極的疫学調査の一環として、地方衛生研究所等では小児科定点の一部より検体を収集し、流行の原因を詳細に解析するため、血清型、遺伝子型等の解析を行ってきた。またウイルス同定結果の情報を全国共有することで、我が国の感染症対策に貢献している。

ウイルス分離による株収集は、詳細なウイルスゲノム解析に重要な技術であり、型特異的な抗血清を用いた中和反応による同定法は抗原性解析に必須な手法である。しかしこれらのウイルス分離・同定による検査は、結果を得るのに数週間必要なことから、近年では、遺伝子検査によるエンテロウイルス同定が普及している。

遺伝子検査によるエンテロウイルス同定は主要な抗原決定部位を含む VP1 領域のウイルス RNA を増幅し、塩基配列を調べ、標準株(参照株)との比較により 75%以上一致するものを、当該血清型とすることと定義されている。

エンテロウイルスは感染成立後、咽頭より糞便中に長期間排泄されるため、検査材料としては糞便を用いる方が検出率が高い。しかし採取面から、近年では咽頭拭い液を検体として用いる傾向にある。後者の場合、ウイルス量が少ない場合が多く、高感度な検出方法が求められてきた。またエンテロウイルス検査は広範囲な血清型を検出する必要がある。両目的を満たす手法

(CODEHOP-semi nested PCR 法) が米国 CDC の Nix らによって開発され、国内外で本法を導入している検査室は増加している (WHO-CDC マニュアル [http://www.euro.who.int/\\_\\_data/assets/pdf\\_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf](http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf))。なお本法でポリオウイルスも検出可能である。

el lines.pdf)。なお本法でポリオウイルスも検出可能である。

H28 年 4 月に施行された改正感染症法では 5 類定点把握疾患の病原体検査についても一定の信頼性を担保することが求められている。しかし各地方衛生研究所の検査体制は異なっており、検査の質を統一した基準で評価することは困難である。

しかしながら、先行研究班(佐多班)で実施した地方衛生研究所向けのアンケート結果では手足口病を対象とした EQA 実施について要望が多かったことを報告している。

そこで本研究では、地方衛生研究所における手足口病の病原体検査では検査実施体制が異なる現状を踏まえつつ、国内で普及している CODEHOP-snpPCR 法を対象とした外部精度管理調査 (EQA) の導入方法を検討することとした。

初年度は CODEHOP-snpPCR 法による検査プロセスを評価するための EQA 用試料(エンテロウイルス RNA) の調製条件と保管輸送方法の検討、手足口病病原体検査の信頼性の基準、について検討をした。初年度の結果を踏まえ、最終年度の 2 年目は以下の研究を行った。

ア. CODEHOP-snpPCR 法によるウイルス検出感度の比較

原著では CODEHOP 法は数ゲノムコピー (GC) まで検出可能となっている。国内の検査施設では様々な酵素系を用いているが、これまで反応系の違いによる検出感度について、横断的な調査はなされたことがないため、同一陽性コントロールを用いたエンドポイントの比較調査を行う。

イ. 塩基配列による同定法の比較

病原体サーベイランスでは手足口病についてエンテロウイルスの血清型を報告している。PCR ダイレクトシーケンス法により、標準株の塩基配列と比較する同定法が普及しているが、同定に用いる塩基配列の比較調査もこれまでなされたことはないため比較を行い評価の在り方を検討する。

今般、手足口病検査に関わる EQA 試行調査を踏まえ、コスト面を含め EQA の実施可能性や評価方法の考察を行い、CODEHOP 法以外の遺伝子検査法への応用できるかどうか検討したので報告する。

## B . 研究方法

### 1 . 手足口病検査に関わる EQA 試行調査参加施設数

エンテロウイルスレファレンスセンター 6 か所（福島県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、愛知県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、愛媛県立衛生環境研究所、福岡県保健環境研究所）と研究協力者の所属機関 6 か所（富山県衛生研究所、横浜市衛生研究所、岡山県環境保健センター、東京都健康安全研究センター、熊本市環境総合センター、埼玉県衛生研究所）の計 12 か所（A-L 施設）に参加を依頼した。


### 2 . 調査実施時期

EQA 試料は 2017 年 12 月 4 日に発送した。結果報告の締め切りは 12 月 25 日とした（3 週間）。調査要領は別添資料 1 のとおり。

### 3 . 調査に用いた試料

Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot16MBC019001, 19800GC/ul : メーカー表示) を EQA 用 RNA 試料とした。本試料は EV71 BrCr 株（標準株）を RD 細胞で増殖後、ウイルスを不活化し、精製 RNA を乾燥した製品である。本 RNA 試料を保管、送付するため、RNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001) を用いた。RNAstable に固定した試料のリカバーには TE buffer (pH8.0) を用いた。

CODEHOP-snpPCR 法によるウイルス検出感度の比較（エンドポイント比較）のため、RNA 試料を TE でリカバー後、メーカー表示換算 4,400GC/ul（Sample1）となるよう、また塩基配列による同定用試料として同じくリカバー後にメーカー表示換算 2,200GC/ul（Sample2）になるよう 1.8ml チューブに分注、乾燥固定し、リカバー用 TE buffer (pH=8.0) 1 本とともに計 3 チューブを宅

配便（冷凍）にて参加機関に送付した（ 図 1）。即ち Sample 1 と 2 の違いは濃度のみである。

### 4 . エンドポイント用試料の再現性試験と感染性否定試験

エンドポイント測定用試料の再現性を確認するため、事前に 2 施設（ア、イ）で検討を行った。Sample 1 として準備する同一ロットの RNA コントロールを 4,400GC/ul になるよう調製し、2 施設で各 3 本ずつエンドポイントを比較し再現性を確認した。

また送付時の安全性を確認するため、Sample 1 として調整する前の試料 10ul（メーカー表示換算 13,200GC/ul）を RD-A 細胞に接種し、2 代継代し、感染性の有無を確認した。

### 5 . エンドポイント測定

#### 1 ) 方法と報告内容

- Sample 1 を 30ul TE buffer にてリカバー
- 10 倍希釈列（ $10^{-1}$  ~  $10^{-3}$  まで）を作成
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いて CODEHOP-snpPCR を実施し、エンドポイントを確認（原液、-1、-2、-3）。
- エンドポイント判定は電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイント判定結果とともに報告

することとした。なお測定回数は参加施設の任意とした。

#### 2 ) 比較に必要な情報

PCR 使用機器名、反応系（逆転写, 1 stPCR, semi nested PCR）の用いた酵素の種類、反応に用いたテンプレートの容量、電気泳動の条件（ゲル濃度、アプライ量など）についてエンドポイントとともに報告を求めた。

### 6 . 塩基配列による同定法の比較

#### 1 ) 方法と報告内容

- Sample 2 を 30ul TE で、Sample 1 と同様リカバー



- CODEHOP-snpPCR 法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法で PCR 産物を精製し、塩基配列解析を行い、同定し結果報告することとした。

## 2) 比較に必要な情報

塩基配列による同定法、同定に用いた編集済み塩基配列データ、ABI ファイルのデータを同定結果とともに報告を求めた。

## 7. EQA のパッケージ化検討

EQA 試料準備、送付に必要な費用、他の利用可能な EQA プロバイダとの比較を行った。

## 8. 倫理面の配慮

本研究では個人情報を取り扱わないため、個人情報に関する問題は生じない。

## C. 研究結果

### 1. エンドポイント用試料の再現性試験と感染性否定試験

2 施設で同一ロット試料を各 3 本に対してエンドポイント測定した結果、ア施設では 3 試料とも  $10^{-1}$  まで増幅を確認、イ施設では 3 試料中、2 試料が  $10^{-2}$ 、1 試料が  $10^{-1}$  まで増幅を確認できた。即ち、440GC/uI まで 2 施設で CODEHOP-snpPCR 法で再現可能であると判断された。

なおア施設では RNA2.5uI を用いて、Superscript II (ライフテクノロジー) により逆転写反応を 5uI で実施した。イ施設は PrimeScript RT(Takara) により RNA10uI を用いて反応を 20uI で行った。1stPCR, semi nestedPCR とも総容量 25uI で測定している。

高濃度の RNA 試料 (13,200GC/uI) を RD-A 細胞に接種し、2 代継代 (全 14 日間) したところ製品説明書記載通り、不活化されていることを確認した。

### 2. エンドポイント測定結果

#### 1) 結果報告期間

2 施設で実施した、再現性試験を踏まえ、

Sample 1 を同様に調製し、2017 年 12 月 4 日に一斉に送付。3 週間の期限内に原則として全 12 か所より結果の回答があった。

#### 2) エンドポイントの比較結果

あらかじめ 4,400GC/uI に調製した RNA コントロールを各施設において  $10^{-1}$  から  $10^{-3}$  まで希釈列を作成しエンドポイントを測定した。測定回数は任意 (1 回 ~ 4 回) とした。結果の概要は以下の通りで、詳細は図 2 に示す。なお、縦軸は希釈条件を、横軸は報告機関数と、該当する 12 施設のアアルファベット表記を示した (図 2)。

- 12 か所の施設間で原液 (4,400GC/uI) のみ検出の施設があった一方、100 倍希釈 (44GC/uI 相当) まで検出された施設もあり、施設間で検出感度に差が見られた。1000 倍希釈 (4.4GC/uI) が検出された施設はなかった。
- 10 倍希釈 (440GC/uI 相当) まで検出可能であった施設が最も多く、12 施設中 5 施設であった。

#### 3) CODEHOP-snpPCR 法の反応条件

(図 3) に A-L 施設の反応条件の情報を示す。逆転写反応、1stPCR, semi nestedPCR に用いられている酵素系について、米国 CDC が報告している試薬類を「手足口病検査マニュアル」で示しているが、同一であるのは I、J 施設のみであり、残り 10 施設は各々異なっていた。

また反応条件は同一であるが I、J 間では検出感度の差が見られた。

施設 A, B は 100 倍まで検出可能であったが酵素の種類は原法とは異なっていた。なお A, B では逆転写反応は同じ種類を用い、1stPCR と semi nested PCR には異なる DNA polymerase (3' 5' exonuclease 活性の有無) を用いていた。

CODEHOP-snpPCR 法に用いるプライマーにはイノシンが用いられているため 3' 5' exonuclease 活性のある酵素系 (ExTaq) の増幅効率の低下が懸念されたが、検出感度の最も高かった A, B 施設間には本比較調査 (1 回測定) では差が認められなかった。

### 3. 塩基配列による同定法の比較

あらかじめ 2,200GC/uI に調製した RNA 試料 (Sample 2) を用いて 12 施設で CODEHOP-snPCR と塩基配列によるエンテロウイルス同定を行った。全施設ともエンテロウイルス 71 との回答を得た。

なお、1 施設のみ増幅できなかったため Sample 1 の増幅産物を用いて塩基配列を解析し、正答を得ている。

#### 1) 塩基配列による同定法

エンテロウイルス VP1 領域を用いた同定法は標準株配列と 75% 以上一致する配列を当該血清株とし、オランダ RIVM が Web 上で提供するタイピングツールも本原則に基づいている。

塩基配列による同定法は 11 施設が RIVM タイピングツール、標準株配列との比較による同定を、単独あるいは複数組み合わせにより同定を行っていた (図 4)。

#### 2) 塩基配列の比較

12 施設の塩基配列と送付試料 BrCr 株の配列を (図 5) に示す。

送付試料 EV71 BrCr 株の RNA を CODEHOP-snPCR による増幅した場合の増幅サイズは 354bp であり、プライマー領域を除くと 301bp である。図 5 は 301bp にそろえてアライメント結果を示している。6 施設を除き 11 施設より回答のあった配列長は 301bp 以上であった。一施設の配列長は 301bp より短いですが、標準株 BrCr 株と 75% 以上一致し、同定には問題がないと判断された。

12 施設のアライメント配列上で多型サイトが 2 か所で見られた。(図 5) では赤丸で示す。

波形ファイルでは、多型として報告しているケース、シグナルが重なっているがピークの高いほうを選択したケース、バックグラウンドが高く判定困難、多型が見られないケース、が認められた (図 6)。

いずれも標準株 BrCr 株と 75% 以上一致したことから、塩基配列によるエンテロウイルス同定には問題がないと判断された。

### 4. EQA パッケージ化の検討

前年度に実施した、RNA 試料の安定化条件、輸

送・保管法の比較検討を踏まえ、市販品のエンテロウイルス RNA コントロールと、輸送に用いる RNA stable の組合せにより、少数の施設間比較調査であれば比較的簡便に EQA が実施可能であることを示した。

今般実施した 12 か所程度の施設なら、エンドポイント比較とシーケンス比較、準備から送付まで 1 人で可能であった。また宅配便による冷凍輸送利用。費用は 1 か所輸送費込み 2 万円以下であり、民間が実施する EQA と費用の面でも大きな差が出ないことが確認された (図 8)。ひな形を別添資料 2 に示している。

### D. 考察

本研究では、感染症発生動向調査による 5 類小児科定点把握疾患の一つである手足口病検査について、EQA 導入の検討を行った。手足口病は主に EV-A 群が起因ウイルスである。かつては乳のみマウスを用いた CF 試験や培養細胞と特異的中和抗血清を用いたウイルス分離・同定試験、が主な検査法であり、分離株を得るためには今も有用な手法である。しかし施設維持、手技習得期間、細胞への感受性、検査時間などの要因もあり、臨床材料から直接ウイルスゲノムを増幅後、塩基配列解析により同定を行う遺伝子検査法が普及している。

積極的疫学調査の一環で実施するエンテロウイルス検査は、検体採取、検査方法の選択など地方衛生研究所の裁量で選択する部分は大きいものの、全国調査により、血清型の検出状況を還元する病原体サーベイランスの目的からは、一定の検出感度、精度が担保されることが求められる。本研究では、手足口病検査に提供される検体は咽頭ぬぐい液が多いこと、少ないウイルス量で同定可能な CODEHOP - snPCR 法と直接塩基配列決定法による検査の信頼性を評価するための EQA 手法について検討した。なお本法でポリオウイルスも検出できることから、EQA による検出感度の比較は意義がある。

#### 1. エンドポイント用試料の再現性試験と感染性

## 否定試験

初年度研究により、EQA 試料調製、送付・保管条件を比較検討した結果、市販の RNA コントロールを使用する場合、低濃度に希釈すると再現性がばらつく傾向にあったため、リカバー時に数千 GC/uI になるよう調製することで、エンドポイント用試料として利用可能であった。

2 施設で事前に 3 回繰り返し再現性を確認したが、EQA によりエンドポイント比較のような定量的な試験を実施する場合は、事前に配布用ウイルス RNA の濃度、増幅領域の安定性、再現性について担保する必要がある。

## 2. エンドポイント測定

### 1) エンドポイントの設定について

事前に調製した EQA 用 RNA 試料を用いて、12 施設が測定したエンドポイントは、原液から 100 倍希釈 (44GC/uI 相当) まで検出可能であり、10 倍希釈 (440GC/uI 相当) した試料まで検出できた施設が最も多かった。なお 440GC/uI 相当の濃度は初年度検討したウイルス感染価 (RD-A 細胞使用) と GC 数の関係で  $\log_{10} \text{CCID}_{50} < 1.5$  未満に相当する。経験上、PCR 産物から直接塩基配列を決定する場合、数～数十 GC であるとゲノム RNA の増幅は可能でもシーケンスが読めない場合があるため、再現性の観点から 10 倍希釈 (440GC/uI 相当) が増幅できることが、塩基配列による同定を行う場合に望ましい条件であると考えられる。

このように望ましいエンドポイントの濃度に関しては、感染価、ウイルス GC 数、コントロール RNA の希釈倍率の相互関係を事前に検討しておく必要がある。

### 2) CODEHOP-snpPCR 法の反応条件

図に示すように 12 施設の反応条件は異なっているにもかかわらず、おおむね 10 倍希釈 (440GC/uI 相当) が検出可能であった。各施設では、酵素などの試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、EQA を、ウイルス RNA 検出感度のばらつきと反応諸条件の情報を各施設が情報共有する場として活用することが有用であると考えられる。

## 3. 塩基配列による同定法の比較

### 1) 塩基配列による同定法

VP1 領域を用いた同定の場合、1 施設を除き、標準株の塩基配列との比較、あるいは・並びに RIVM タイピングツール等により、同定を行っていた。方法は異なっているが、今回の EQA ではすべて正答を得ている。しかし、ウイルスゲノム塩基配列を用いた相同性検索 (BLAST など) による同定の問題点は病原体検出マニュアルにも記載されているように、同定結果を間違える場合もある。このため、方法論の継続的な周知の必要性が認められた。

### 2) 塩基配列の比較

アライメント配列上で多型サイトが 2 か所で見られ、波形データの確認より 多型として報告しているケース、シグナルが重なっているがピークの高いほうを選択したケース、バックグラウンドが高く判定困難、多型が見られないケース、が認められた。

いずれも標準株 EV71 BrCr 株と 75% 以上一致し、塩基配列を用いた同定上は問題がないと判断された。

しかしながら、定点におけるエンテロウイルス病原体サーベイランスはポリオウイルス検査と類似の点が多い。ポリオウイルスの場合、ワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) の鑑別時には数個の塩基置換でさえも、波形データと合わせた厳密な確認が必要であり、検査・調査目的に応じた塩基配列の質が求められる (図 9)。

このためエンテロウイルス同定においては、報告上問題がなくとも、同定に用いる塩基配列の波形データを、目視で確認、GAP の確認、アミノ酸置換で確認するなどして質を担保するとともに、適切に機材保守を維持するなど、2 類ポリオ検査時の備えとして質を維持してゆく必要がある。

波形のバックグラウンドの高い原因、乱れの原因を特定するための方法の一つとして、EQA 実施時に施設ごとにコントロール試薬 (sequencing standards) を用いた泳動解析データとの比較が有効と考えられた。

エンドポイント測定に用いた Sample 1 が 100 倍希釈まで検出可能だった A、B 施設においては、増幅産物を用いてシーケンスを行ったところ、10 倍希釈と 100 倍希釈では多型サイトの違いが認められている (図 7)。

今般の EQA では塩基配列のアライメントの結果、施設間で多型サイトの出現の有無に差が認められた。ウイルスは mix population のため、鋳型の量、反応系の違いが反映する。手足口病検査に関わるウイルス遺伝子検査の EQA では、施設間で異なる反応条件で実施する限り、塩基置換数に厳密な正答を得ることは困難であり、むしろ施設間のアライメント結果と多型サイトの解釈結果を示し、改善につながる情報を提供すること、が重要であると考えられる。

#### 4 . EQA のパッケージ化

本研究で行った市販 RNA コントロールはウイルスを不活化したフルゲノムであり、商用カタログでは様々な種類のウイルスコントロールが市販されている。やや高価であるが、不活化されていること、フルゲノムであり様々な領域の増幅が可能であること、から今般比較した CODEHOP-snpPCR 法以外にも当該 PCR 法にて検出可能な RNA 量を設定することで応用可能である。さらに RNastable により乾燥保存で安定化させることで検体輸送が比較的容易になる。

また費用面ではコントロールを適宜希釈することで、原価は国内外の EQA プロバイダが提供する参加費用と同等以下になることが明らかになった。

このため比較的小規模 (十数か所) を対象とした EQA であれば、外部委託などで実施することも可能と考えられる。この場合、配布試料の品質管理手法 (安定性の条件、確認方法) の開発も考慮しなければならない。

#### E . 結論

1 . 改正感染症法では施設の実情を踏まえた上での検査の質の確保を求めているが、類型に基づき、整備すべき検査 SOP などの技術文書の種類は異な

る。

信頼性確保の在り方についても、蔓延防止の観点から危機管理対応が必要な 2 類などの疾患に係る検査と国民に情報提供を行うことが目的の 5 類定点把握疾患の検査とでは、求められる精度管理の目的は異なると考えられる。

即ち 2 類感染症であるポリオの確定診断、あるいは退院時の感染の有無の検査には高感度かつ正確性が求められるが、流行状況について情報提供を目的とする手足口病、ヘルパンギーナなどのウイルス検査に関しては、地方衛生研究所・地方自治体が積極的疫学調査で実施する目的により必要とする検出感度、同定に必要な遺伝子解析の精度を判断することになる。

これらを踏まえた上で、機器管理上必要なポリオ検査に対応しうる検出感度、正確性を維持するためにはルーチンの病原体サーベイランスを通じて一定の精度を確保することが望まれる。

このため EQA による比較調査の結果は、施設間で情報共有を行い、施設内では機材保守、内部精度管理によるルーチン検査の質の維持、そして改善に向けた PDCA を動かすメカニズム (技術マネジメント研修等) を構築することが重要である。2 . EQA で評価するウイルス検出感度の差については、各施設では、酵素などの試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、EQA を通じて、ウイルス検出感度のばらつきと反応諸条件の情報を各施設が改善に向けて活用することが望まれる。また調査結果を各施設間で共有すべきである。

3 . EQA による遺伝子検査結果評価は施設間で異なる反応条件で実施する限り、塩基置換数に厳密な正答を得ることは困難であり、むしろ施設間塩基配列のアライメント結果と多型サイトの解釈結果を示し、改善につながる情報を提供すること、が重要である。

4 . 本研究では市販の非感染性試料を用いて EQA をパッケージ化し、他の疾患にも応用可能であることを示した。5 類定点把握疾患の病原体サーベイランスに関しては、積極的疫学調査で行っていることを踏まえ、EQA の実施主体は予算の担保を

前提に民間委託、レファレンスセンターの活用も検討する余地があると考えられる。この場合は配布試料の品質管理手法(安定性の条件、確認方法)の開発も十分考慮すべきである。

5. 手足口病、ヘルパンギーナの検査は咽頭ぬぐい液の検体提出が多い実情を踏まえ、医療機関による採取時期等、保管条件など検査以外の要因もサーベイランス実施上考慮する必要がある。即ち病原体サーベイランス全体の質を改善するためには検体採取から検査結果までのフローを評価、把握する指標開発が必要である。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 吉田弘, 環境水サーベイランスの意義並びに実態から見えてくる予防医学に関わる知見 東京小児科医会報 36(1): 26-30, 2017
- 2) 吉田弘, 高橋雅輝, 濱崎光宏, 山下育孝, 四宮博人, 山下照夫, 皆川洋子, 岸本剛, 調恒明 エンテロウイルス検査の信頼性確保について 病原微生物検出情報(IASR) 38(10):199-200, 2017

### 2. 学会発表

- 1) 吉田弘「改正感染症法における検査標準作業書と精度管理のあり方について」平成29年度 地域保健総合推進事業 地全協関東甲信静支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年10月11日千葉市
- 2) 吉田弘「改正感染症法における標準作業書と検査の信頼性確保について」平成29年度 地域保健総合推進事業 地全協九州支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年10月24日熊本市
- 3) 吉田弘「改正感染症法における検査標準作業書の精度管理の在り方について」平成29年度 地

域保健総合推進事業 地全協中国四国支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年11月8日岡山市

4) 吉田弘「改正感染症法における病原体検査の信頼性確保について」平成29年度 地域保健総合推進事業 地全協東海北陸支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年11月10日名古屋市

5) 帖佐徹、吉田弘、滝澤剛則:環境水サーベイランス手法の中国への導入について、第76回日本公衆衛生学会平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

6) 吉田弘、筒井理華、堀田千恵美、小澤広規、滝澤剛則、中田恵子、世良暢之、濱崎光宏:環境水サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題 第76回日本公衆衛生学会平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

7) 濱崎光宏、世良暢之、吉田弘:環境水中の腸管系ウイルス量と感染症発生動向調査事業の患者数との関連について 第76回日本公衆衛生学会平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

8) 帖佐徹、吉田弘、板持雅恵、滝澤剛則、Zhang Yong, Xiaohui Hou, Zheng Huanying, Wang Haiyang, Tao Zexin : Collaboration study of environmental surveillance for polio since 2005 between Japan and China グローバルヘルス合同大会 2017 平成29年11月24-26日 東京

## G. 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

図 1

## 手足口病EQA試料の作成

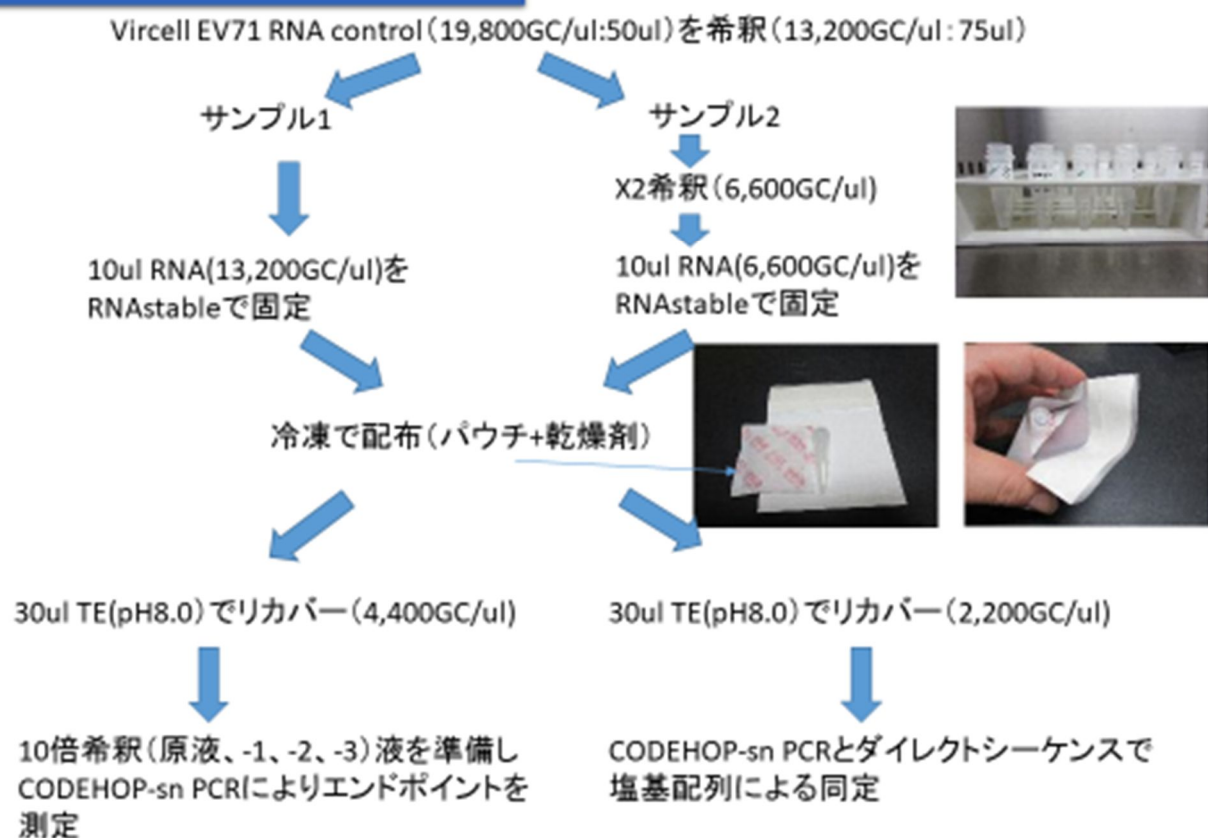


図 2

### CODEHOP-snpPCRによるエンドポイント測定

- あらかじめ約4,400GC/uIに調製したRNAコントロールを10<sup>-1</sup>から10<sup>-3</sup>まで希釈列を作成しエンドポイントを測定。
- 測定回数は任意結果

#### 結果

- 測定は1回~4回(1か所は4回、2か所は3回、9か所は1回測定)
- 12か所の施設間で下記のような検出感度に差が見られた。
- 5/12施設のエンドポイントは10倍希釈まで検出可能であった。



図 3

施設	RT			1st PCR			2nd		
	縮宮量 (uI)	RNA量 (uI)	酵素	縮宮量 (uI)	cDNA量 (uI)	酵素	縮宮量 (uI)	1st PCR量 (uI)	酵素
A	20	100	42-355 10:15 m	25	5	98-188-142-3 m	25	1	98-188-142-3 72:5 10: m
B	20	100	37-355 15:0 m	25	5	95-595-342-388-45 68:5 m	40	1	95-595-342-388-45 72:15 72:5 m
C	10	50	22-4549:5 19:5 m	25	5	95-594-342-388-45 8:0 m	40	2	95-594-342-388-45 72:1 8:0 m
D	10	50	22-4269:5 19:0 m	25	5	94-195-342-388-45 8:0 m	40	0.5	94-195-342-388-45 72:15 8:0 m
E	25	12.50	22-4269:5 19:0 m	25	2.5	94-294-342-372-45 72:5 8:0 m	40	2.5	94-294-342-372-45 72:5 8:0 m
F	15	50	55478:1 5m 5m	25	5	95-595-342-372-45 72:5 8:0 m	35	1	95-595-342-372-45 72:5 8:0 m
G	10	50	55-4189:5 1m 0m m	50	10	94-342-372-45 8:0 m	40	3	94-342-372-45 8:0 m
H	20	100	37-355 15:0 m	25	5	95-342-388-45 8:0 m	40	1	95-595-342-372-45 15: 8:0 m
I	10	50	22-4269:5 19:0 m	50	10	95-342-388-45 8:0 m	40	1	95-595-342-372-45 25: 8:0 m
J	10	50	22-4269:5 19:0 m	50	10	95-342-388-45 8:0 m	35	1	95-595-342-372-45 8:0 m
K	5	2.50	22-4269:5 19:0 m	25	5	95-595-342-372-45 72:5 8:0 m	40	1	95-595-342-372-45 8:0 m
L	15	50	55478:1 5m 5m	24	4	95-595-342-372-45 72:5 8:0 m	35	4	95-595-342-372-45 72:5 8:0 m

① PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (RR037A)  
 ② SuperScript III (200 U/L)  
 ③ SuperScript III (200 U/L) 0  
 ④ AMV Reverse Transcriptase XL (200 U/L) (1本) (TOYOBO)

⑤ Takara Taq Hot Start Version (5 U/L) (Takara, RR037A)  
 ⑥ Takara Ex Taq Hot Start Version (5 U/L) (RR036A)  
 ⑦ Taq DNA Polymerase, 5 U/L (シグマ)  
 ⑧ General Amp PCR Master Mix (Takara)  
 ⑨ DreamSqr MAX PCR Master Mix

⑩ Premix Ex Taq Hot Start version (5 U/L) (Takara)  
 ⑪ FastStart Taq DNA Polymerase, 5 U/L (シグマ)

塩基配列によるエンテロウイルス同定法の回答(12施設)

同定法	施設数
標準株との比較	1
EV タイピングツール(RIVM)	7
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較	1
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較、系統樹作成	1
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較、系統樹作成、BLAST検索	1
BLAST検索で相同性が高い株で判断	1



図 5

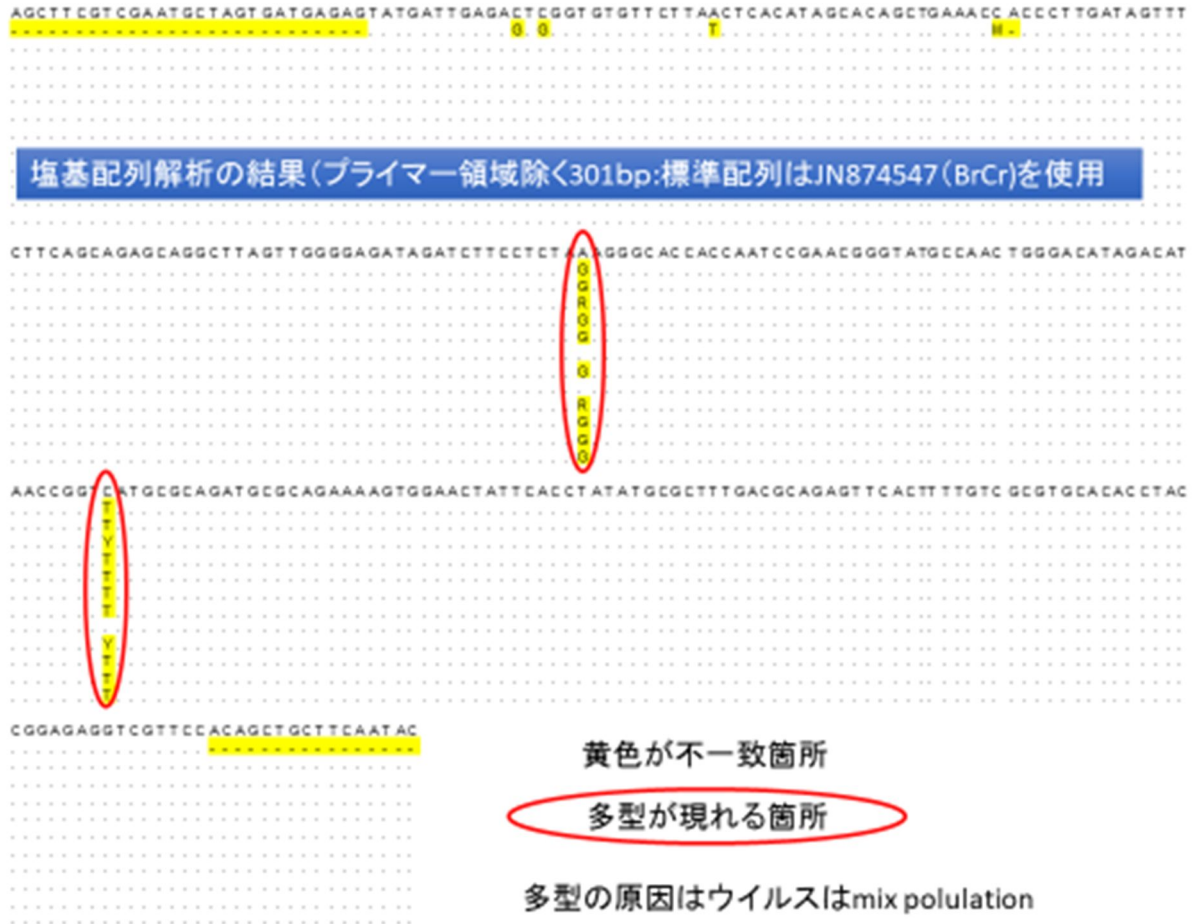


図 6

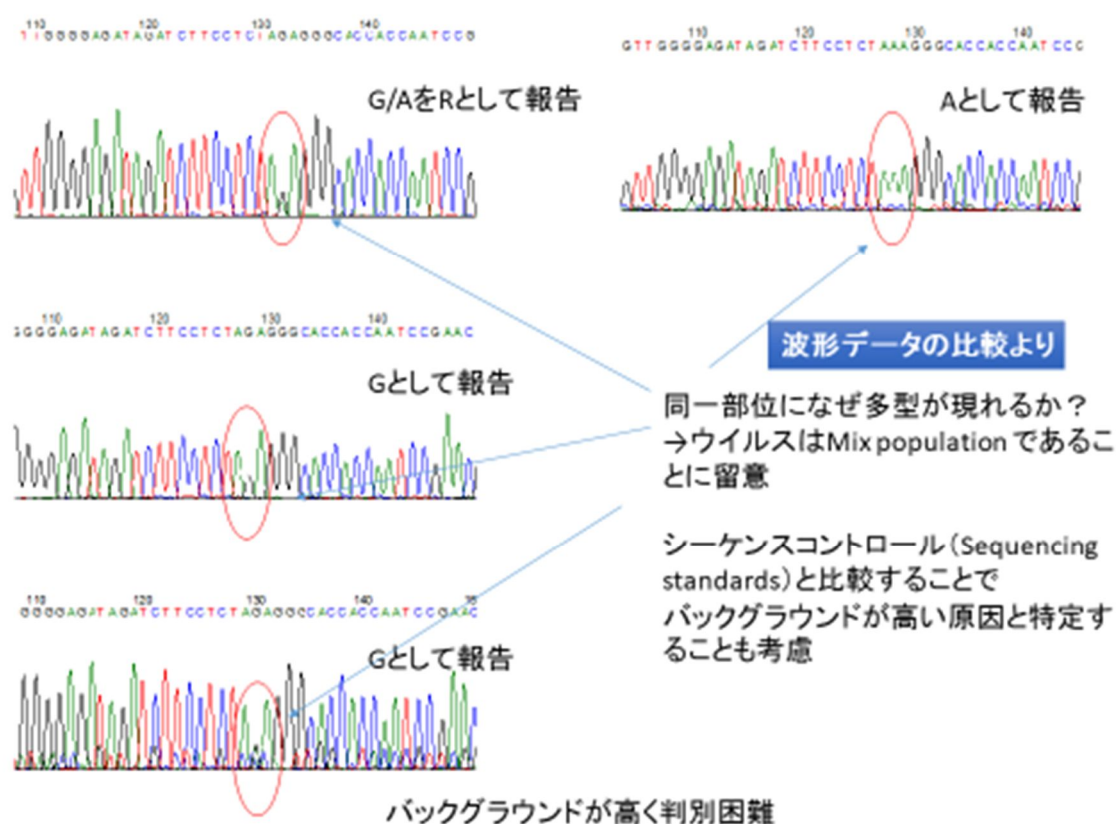


図 7

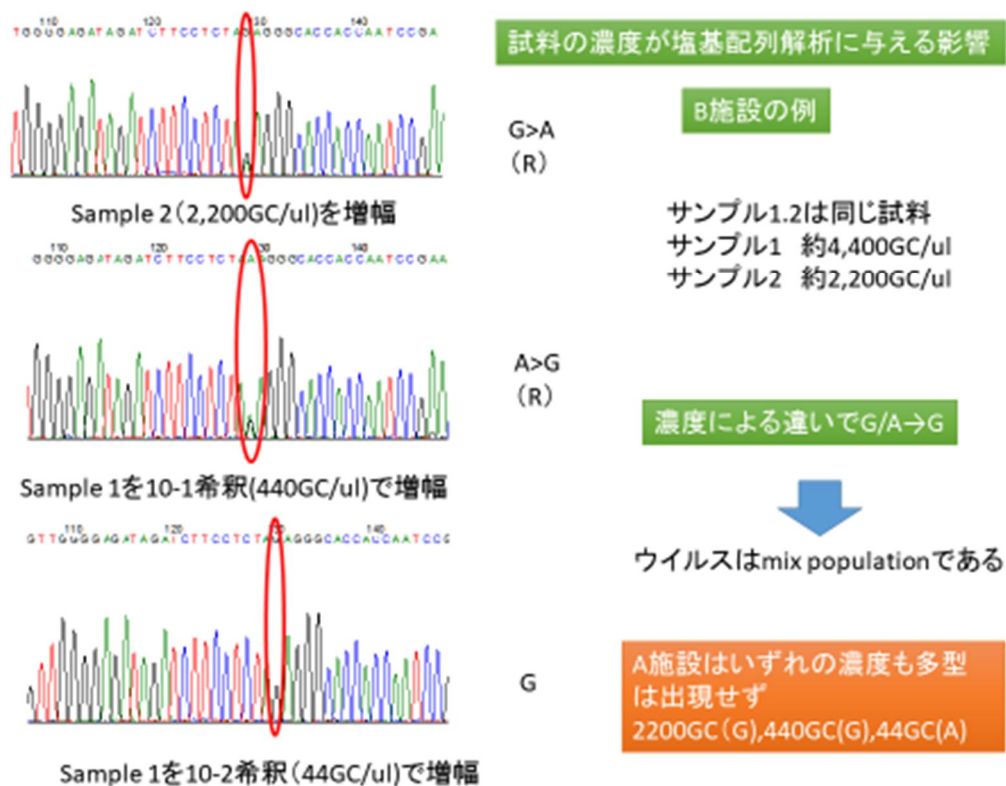


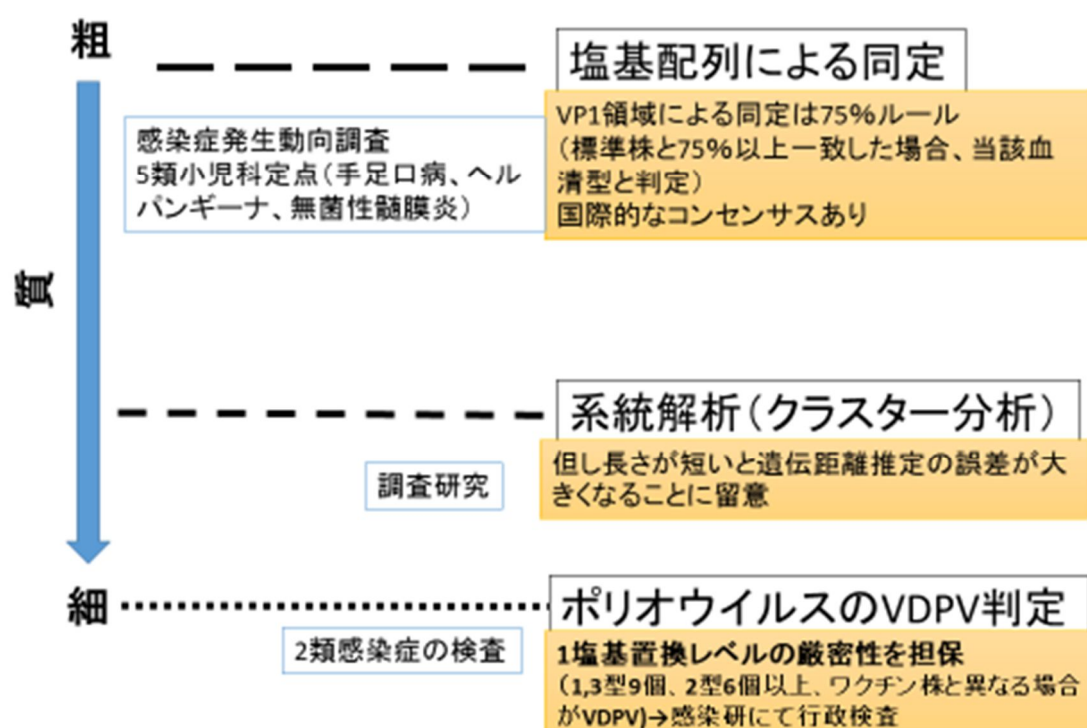
図 8

12か所(予備2セット)のEQAコスト(エンドポイント測定+塩基配列による同定)			
<b>RNAstable</b>			
Biomatrica社製			
(25チューブ入り @39,000円)	1560円/本x2種類=3120		3,120
<b>RNA陽性コントロール</b>			
Vircell社製(19800GC/ul:50ul @78,000円)		234000/14	
3本使用(78,000x3=234,000)し、2種類14セット作成可能		=16714	
エンドポイント測定用	10ulx14=140ul		
シーケンス用(x2希釈)	5ulx14=70ul (+70ul DW)		16,714
<b>輸送費(冷凍)</b>			
	12か所=17472	1か所平均	1,456
	2種類送付(1か所あたりのコスト)*		21,290

\*希釈率を変えることによりコスト削減は可能-10か所を想定  
 例) 19800GC/ul:50ul→100ulでリカバー(9900GC/ul)  
 RNAstable使用(10本)→3300GC/ul(原液)  
 エンドポイント測定用試料をシーケンスにも兼用するなら1か所10000円程度

図 9

## エンテロウイルス塩基配列に求められる質について



## 資料 1

### 手足口病検査に関わる外部精度管理調査試行のための条件検討

#### 1.概要

- エンテロウイルス検査で普及している CODEHOP-snPCR 法の 感度比較、 遺伝子同定に用いる塩基配列の比較調査
- 参加施設は10カ所程度を予定
- 報告期限は到着後3週間以内(12月25日頃を目安)でお願いします
- 本報告による分析結果は皆川班の報告書に参加衛研名を匿名にして使用します

#### 2.目的

##### ア.エンドポイント測定

原著では CODEHOP 法は数 GC まで検出可能。国内では様々な酵素系を用いており、これまで反応系の違いによる横断的な調査はなされたことがないため、同一陽性コントロールを用いてエンドポイントの比較調査を行う。

##### ロ. 塩基配列による同定法の比較

病原体サーベイランスの手足口病はエンテロウイルスの血清型を報告。標準株の塩基配列と比較する同定法が普及しているが、用いる配列の比較調査もこれまでなされたことはない。のように酵素系も異なっているため、比較を行う。

#### 3.準備

##### 1) 外部精度管理調査用配布品の概要

##### 用いた市販 RNA コントロール

Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot16MBC019001, 19800GC/ul)

##### RNA 保管用試薬

RNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001)

##### TE buffer (pH8.0)

以上を吉田が調製し以下配布

##### 配布品は3種類

Sample 1:エンドポイント比較用試料 (TE 30ul でリカバーするとメーカー表示換算 4400GC/ul) 1本

Sample 2: 塩基配列による同定用試料 (TE 30ul でリカバーするとメーカー表示換算 2200GC/ul) 1本

TE buffer (pH=8.0) 分注品 1本

配布方法は冷凍(宅急便、ドライアイスなし)

## 2) サンプルの準備方法

チューブに添付した TE buffer 30ul を加え試料をリカバー  
(受領後、すぐに検査を行わなければリカバーせず-80度保管)

試料はチューブの底に黄色に着色し乾燥状態。

TE buffer 30ul を入れ 15 分放置 (室温)

穏やかに数回ピペティングし溶解\*(粘性あり)。

\*TEbuffer を入れ、溶解するとピンクに着色する。

## 4.比較調査の方法

### ア. エンドポイント測定

#### 1) 方法と報告内容

- サンプルを上記に従い準備
- 10 倍希釈列 (10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-3</sup> まで) を作成
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いて CODEHOP-snPCR を実施し、エンドポイントを確認 (原液、-1、-2、-3)
- エンドポイントは電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイントとともに報告 (以下、例)

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
サンプル	++++	+++	+/-	-	-

写真も添付 (マーカーの濃度とアプライ量も)

## 2) エンドポイント測定結果

(繰り返した場合は、その結果も示していただくようお願いします。)

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
Sample 1					

電気泳動写真

マーカの濃度、サンプルアプライ量

3) 比較に必要な情報(以下は例、貴研究所で実施している内容に適宜変更ください。マニュアルの写し添付でも結構です)

PCR 使用機器名:

例) ABI GeneAmp9700

2) 反応系(cDNA,PCR1,PCR2の酵素、容量など下記の例を参考)

cDNA 作成

以下例

SuperScript II (200 U/ul) (サーモフィッシャー)使用

	反応系 5 $\mu$ l
EV VP1 cDNA (RT) kit	1.5
0.1 M DTT	0.5
RNase Inhibitor (40U/ul)	0.25
SuperScript II (200 U/ul)	0.25

Total 2.5  $\mu$ l + vRNA 2.5  $\mu$ l

22 10min  
42 60min  
95 5min  
4 hold

1st PCR  
(以下例)

Taq DNA Polymerase (5U/ul), )(Roche) 使用

反応 25  $\mu$ l

---

*Enterovirus VP1 PCR 1KIT	15
DW + Taq DNA Polymerase (5U/ul)	5

---

Total 20  $\mu$ l + cDNA 5  $\mu$ l

95 30sec  
42 30sec  
60 45sec 35 cycle  
4

2nd PCR

反応 25  $\mu$ l

---

*Enterovirus VP1 PCR 2 KIT	19.5
DW+FS Taq (5U/ul)*	5

---

Total 24.5  $\mu$ l + 1st PCR 反応物 0.5  $\mu$ l

95 6min  
  
95 30sec  
60 20sec  
72 15sec 35 cycle  
4

\* 感染研の CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定のとおり作成

RNA のアプライ量 2.5  $\mu$ l

ゲルの濃度 2.0% agarose gel

PCR 産物のアプライ量 5  $\mu$ l

マーカーの種類と濃度 100bp DNA Ladder Markers (Genetics) 100  $\mu$ g/ml

アプライ量 5  $\mu$ l (約 100ng/ $\mu$ l)

## イ. 塩基配列による同定法の比較

### 1) 方法と報告内容

- Sample 2 を 30ul TE で、Sample 1 と同様リカバー
- CODEHOP-snPCR 法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法で PCR 産物を精製し、塩基配列解析

### 2) 結果の報告

	同定結果	同定法 (RIVM の EV タイピングツールの使用、標準株との比較、など)
Sample 2		

- 同定に用いた編集済み塩基配列データ (FASTA 形式で添付かメールにテキストでお願いします)
- ABI ファイル (センスとアンチセンス側をメールに添付し送付ください)





## 別添資料 2 (ひな形) A 検査に関わる外部精度管理調査実施要領

### 1.概要

- A 検査の迅速診断に用いる PCR 法の 感度比較、 遺伝子同定に用いる塩基配列の比較調査
- 参加施設は B 力所程度を予定
- 報告期限は到着後 3 週間以内 (C 月 D 日) をお願いします
- 本報告による分析結果は報告書に参加衛研名を匿名にして使用し返却します。

### 2.目的

#### ア.エンドポイント測定\*

A 検査の迅速診断に用いる PCR 法は XX コピーまで検出可能 (適宜、参照論文リファアする) とされている。国内では様々な酵素系を用いており、これまで反応系の違いによる横断的な調査はなされたことがないため、同一陽性コントロールを用いてエンドポイントの比較調査を行う。

\*アウトカムを想定。同じプライマーを用いた PCR 系で比較する、或はプライマーを指定せず各施設で実施する PCR で EQA を実施する場合などがある。

#### イ. 塩基配列による同定法の比較\*

感染症発生動向調査 X 類 A 検査では血清型 (ゲノタイプ) を報告。EQA にて 同定の基準になる方法、用いる配列の比較調査を行う。

\*機器の保守状況を含めて波形の質を評価するならば、同一ロットの **sequencing standards** を同時に配布することも考慮

### 3.準備

#### 1) 外部精度管理調査用配布品の概要

- 用いる市販 RNA コントロール (適宜変更)  
例) **Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot16MBC019001, 19800GC/ul)**
- RNA 保管用試薬  
**RNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001)**
- **TE buffer (pH8.0)**

以上を調製し以下配布

配布品は 3 種類

**Sample 1:**エンドポイント比較用試料 (例 **TE 30ul** でリカバーするとメーカー表示換算 **00GC/ul**) 1 本

**Sample 2:**塩基配列による同定用試料 (例 **TE 30ul** でリカバーするとメーカー表示換算 **2200GC/ul**) 1 本

**TE buffer (pH=8.0)** 分注品 1 本

配布方法は冷凍\*宅急便、ドライアイスなし)

\*短いフラグメントを用いるリアルタイム PCR なら常温でも可。ただし事前に要検討

## 2) サンプルの準備方法

チューブに添付した **TE buffer 30u\***を加え試料をリカバー

試料はチューブの底に黄色に着色し乾燥状態。

(受領後、すぐに検査を行わなければリカバーせず**-80**度保管)

\*リカバーする **TE** の量を変えて濃度調整可能。少ないとリカバー困難。**30ul** 以上を勧める。

**TE buffer 30ul** を入れ **15** 分放置 (室温)

穏やかに数回ピペティングし溶解\*(粘性あり)。

\***TEbuffer** を入れ、溶解するとピンクに着色する。

## 4.比較調査の方法

### ア. エンドポイント測定

#### 1) 方法と報告内容

- サンプルを上記に従い準備
- **10** 倍希釈列 (**10<sup>-1</sup> ~ 10<sup>-3</sup>**まで) を作成\*  
\*エンドポイントが中心になるよう事前に条件を検討しておくこと評価しやすく、批評家者の負担も軽減 (試薬)
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いて **A** 検査の **PCR** を実施し、エンドポイントを確認 (原液、**-1**、**-2**、**-3**)
- エンドポイントは電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイントとともに報告 (以下、例)

	原液	<b>-1</b>	<b>-2</b>	<b>-3</b>	陰性コントロール
サンプル	++++	+++	+/-	-	-

- 写真も添付（マーカーの濃度とアプライ量も）

2) エンドポイント測定結果

（繰り返した場合は、その結果も示していただくようお願いします。）

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
<b>Sample 1</b> （1回目）					
（2回目）					
（3回目）					

電気泳動写真

マーカーの濃度、サンプルアプライ量

- 3) 比較に必要な情報（以下は例、貴研究所で実施している内容に適宜変更ください。マニュアルの写し添付でも結構です）

**PCR** 使用機器名：

例) **ABI GeneAmp9700**

- 2) 反応系（逆転写、**DNA polymerase** などの酵素、容量など下記の例を参考）

**cDNA** 作成

以下例

**SuperScript II (200 U/ul) (サーモフィッシャー)使用**

		反応系 5 $\mu$ l
<b>EV VP1 cDNA (RT) kit</b>		<b>1.5</b>
<b>0.1 M DTT</b>		<b>0.5</b>
<b>RNase Inhibitor (40U/ul)</b>		<b>0.25</b>
<b>SuperScript II (200 U/ul)</b>		<b>0.25</b>
		<b>Total 2.5 <math>\mu</math>l + vRNA 2.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>22</b>	<b>10min</b>	
<b>42</b>	<b>60min</b>	
<b>95</b>	<b>5min</b>	
<b>4</b>	<b>hold</b>	

**1st PCR**

(以下例)

**Taq DNA Polymerase (5U/ul), (Roche) 使用**

		反応 25 $\mu$ l
<b>*Enterovirus VP1 PCR 1KIT</b>		<b>15</b>
<b>DW + Taq DNA Polymerase (5U/ul)</b>		<b>5</b>
		<b>Total 20 <math>\mu</math>l + cDNA 5 <math>\mu</math>l</b>
<b>95</b>	<b>30sec</b>	
<b>42</b>	<b>30sec</b>	
<b>60</b>	<b>45sec</b>	<b>35 cycle</b>
<b>4</b>		

**2nd PCR**

		反応 25 $\mu$ l
<b>*Enterovirus VP1 PCR 2 KIT</b>		<b>19.5</b>
<b>DW+FS Taq (5U/ul)*</b>		<b>5</b>
		<b>Total 24.5 <math>\mu</math>l + 1st PCR 反応物 0.5 <math>\mu</math>l</b>
<b>95</b>	<b>6min</b>	
<b>95</b>	<b>30sec</b>	
<b>60</b>	<b>20sec</b>	
<b>72</b>	<b>15sec</b>	<b>35 cycle</b>

#### 4

\* 感染研の **CODEHOP PCR** によるエンテロウイルス同定のとおり作成

**RNA** のアプライ量     **2.5  $\mu$ l**  
ゲルの濃度             **2.0% agarose gel**  
**PCR** 産物のアプライ量         **5  $\mu$ l**  
マーカーの種類と濃度     **100bp DNA Ladder Markers (Genetics) 100  $\mu$ g/ml**  
アプライ量                 **5  $\mu$ l (約 100ng/ $\mu$ l)**

#### イ. 塩基配列による同定法の比較

##### 1) 方法と報告内容

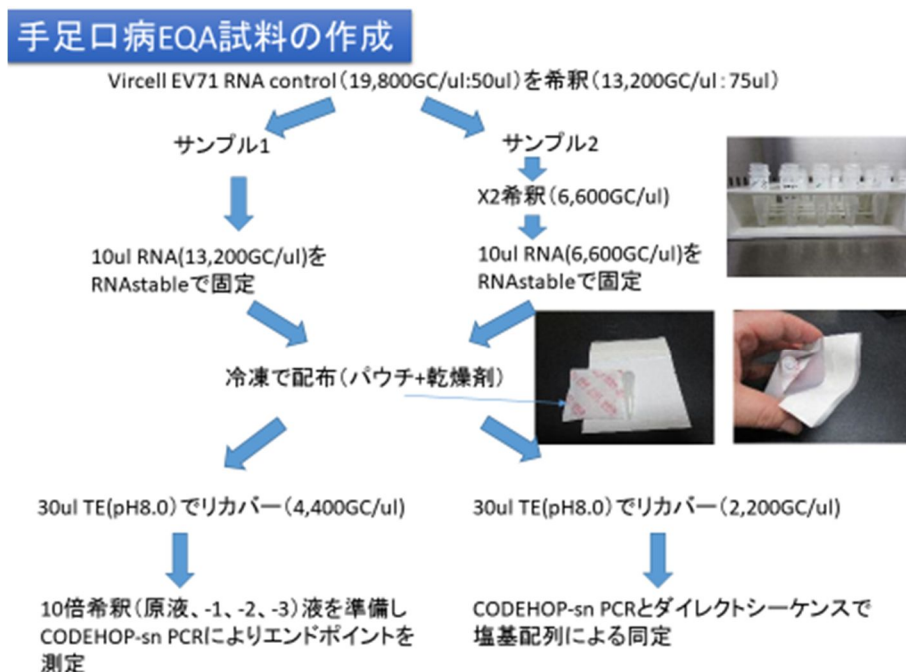
- **Sample 2** を **30ul TE** で、**Sample 1** と同様リカバー
- **PCR** 法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法で **PCR** 産物を精製し、塩基配列解析

##### 2) 結果の報告

	同定結果	同定法 (A 検査に用いる標準法など)
<b>Sample 2</b>		

- 同定に用いた編集済み塩基配列データ (**FASTA** 形式で添付かメールにテキストでお願いします)
- **ABI** ファイル (センスとアンチセンス側をメールに添付し送付ください)

## 試料調製法の例



- **RNastable** を用いた **RNA** の乾燥固定は添付マニュアルを参照のこと。
- マニュアルにはキャビネット内で、ふたを開けて **1 晩** 放置あるいは SpeedVac による遠心濃縮を示している。
- なお密閉容器と乾燥剤を用いればチューブ当たり 10ul 程度なら冷蔵庫内で乾燥可能 (1 晩)



密閉し、乾燥剤をいれ乾燥

- 乾燥した RNA 試料は、リカバー時に TE 量を変えることで濃度の調整が可能最初から薄く調製すると RNA は不安定。したがって固定時は、濃く調整しリカバー時の TE で調整することがポイント。
  - 事前に固定化した RNA の回収効率を定性的あるいは定量的に確認しておくこと。
- 注釈：フルゲノムの **RNA** コントロールを使用する場合は検出方法を指定せず、プラインドテストにも適応可能。この場合、想定される各 **PCR** 系について事前に再現性を確認しておくことが必要

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に対する外部精度管理の導入と  
 継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究  
 分担研究報告書

地方衛生研究所を対象にした赤痢菌検査の外部精度管理調査

研究協力者	河村 真保	東京都健康安全研究センター
	小西典子	東京都健康安全研究センター
	平井昭彦	東京都健康安全研究センター
	貞升健志	東京都健康安全研究センター
	磯部順子	富山県衛生研究所
	勢戸和子	大阪健康安全基盤研究所
	世良暢之	福岡県保健環境研究所
	濱崎光宏	福岡県保健環境研究所
	山田和弘	愛知県衛生研究所
	泉谷秀昌	国立感染症研究所
	大西 真	国立感染症研究所
研究分担者	滝澤剛則	富山県衛生研究所
	四宮博人	愛媛県立衛生環境研究所
	村上光一	国立感染症研究所
	大石和徳	国立感染症研究所
	松本昌門	愛知県衛生研究所
研究代表者	皆川洋子	愛知県衛生研究所

**研究要旨**

地方衛生研究所（地衛研）で実施する細菌検査の信頼性確保のため、外部精度管理調査を実施し、検査能力の実態を把握するとともに、継続的な実施に必要な手順や問題点を検証した。実施項目は「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」とし、27施設の参加を得た。検査試料は地衛研の保存株から、事前に5か所の地衛研及び国立感染症研究所（感染研）で性状を確認した上で3株（試料1: Escherichia coliボイド9型(+)、試料2: Shigella sonnei、試料3: Shigella flexneri 2a）を選び、感染研から発送した。検査結果報告書の集計の結果、正答は試料1: 27施設、試料2: 27施設、試料3: 27施設で、全地衛研が正しい同定結果であった。しかし、「根拠とした検査結果」は検査結果報告書の記載例が適切でなかったためか、地衛研によって表記に相違が見られた。検査結果報告書や赤痢菌検査経過記録書から、全体として地衛研では概ね適切に赤痢菌検査が実施されていることがわかった。検査開始は検体到着当日が望ましいが、当日実施していない地衛研が3施設認められた。試料1の血清凝集検査では「陰性」と回答した地衛研が11施設認められた。血清凝集検査について菌液濃度の異なった菌懸濁液を用いる。複数で確認する。赤痢菌は生菌を用いる等の対応が必要である。コロニーを1個のみ釣菌していた地衛研が2か所認められたが、複数個（3から5個）釣菌することが望ましい。遺伝子検査では赤痢菌同定の標的遺伝子を invEのみ実施した地衛研が3施設認められた。invEはプラスミド上に存在しているため脱落し検査結果が「陰性」となる場合があるため、検査対象（標的遺伝子）には染色体上に存在する ipaH を加える必要がある。検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書に単純な誤記、明らかな知識の誤り及び未記入が散見された。提出書類は病原体知識のある複数の職員が確認することが必要である。また、検査経過記録書やアンケート等については、多様な回答を想定し記入しやすい様式を作成することも必要である。

**A. 研究目的**

地方衛生研究所（地衛研）で実施する細菌検査

の信頼性確保に向けて、外部精度管理を実施して  
 地衛研の検査能力の実態を把握するとともに、外



部精度管理を大規模に実施するにあたって必要な手順や問題点を検証した。

## B. 研究方法

### 1. 実施項目

前研究班で実施したアンケートの結果、多くの地衛研が三類感染症の検査を実施していた。赤痢菌の決定は地衛研で行う場合があること、赤痢菌検査の経験がある職員が少なくなったこと、及び他の病原菌に比べ同定が困難である場合が多いことから実施項目を「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」とした。

### 2. 実施組織

6 地衛研と国立感染症研究所（感染研）の研究協力者からなるワーキンググループ（細菌 WG）を立ち上げ、配付株の選定、実施計画の立案、検査結果やアンケートの集計などの実務を担った。細菌 WG で検討した内容や文書は細菌小班に諮った上で関係者に送付した。検査試料（検体）の準備と発送は、感染研が担当した。

### 3. 配付株の選定と輸送

配付する試験菌株は、赤痢菌の免疫血清ボイド 9 型に凝集する *Escherichia coli* 1 株、典型的な赤痢菌 2 株（*Shigella sonnei*、*Shigella flexneri* 2a）とすることが細菌 WG で決定された。

菌株選定のための確認項目として、直接・増菌培養での発育の有無、SS 培地・DHL 培地での発育及びコロニーの形態、O 血清群、生化学的性状、*invE*、*ipaH* 遺伝子を用いた遺伝子検査を挙げた。これらの性状が明瞭であること、特に選択培地での発育の悪い（遅い）ものや、コロニー形態が異常なもの、特異的生化学的性状を示さないもの、あるいは遺伝子試験の性状が異常なものを除外し候補株を選抜した。この中から最も典型的と考えられた 5 株を細菌 WG メンバー（感染研、東京都健康安全研究センター、富山県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、愛知県衛生研究所）にプレチェックのために送付した（平成 28 年度本研究班報告書 II-15）。

感染研の病原体等の分与等に関する取扱い要領

に則り、研究・検査依頼として取扱様式 8「特定病原体等分与（譲渡）申請書」（添付略）を整えた。取扱様式 8 に添付する送付先リストを作成し、BSL2(3)実験室確認書、各参加施設からの誓約書（参加申込書）（別添 1 別紙 3）を添付することとした。

病原体輸送に関する手続きを国立感染症研究所 バイオセーフティ管理室と協議し、輸送容器の事前確認、「国立感染症研究所での病原体等輸送に関わるチェックシート輸送分類 “カテゴリー-A”」の簡易版作成を行った。搬送用容器は事前に参加施設に配付した資料「菌株搬送容器の準備」（別添 1 別紙 1）および「菌株搬送容器発送チェックシート」（別添 1 別紙 2）に基づいて参加施設で用意され、指定された期日（5 月 15 日）に感染研に集められた。搬送容器は、5 月 18 日にバイオセーフティ管理室員立会いのもと事前確認を行い、必要な表示等を確認し、感染研の規定に沿っていない搬送容器に関しては感染研で準備した搬送容器を使用した。

3 種の試料は 5 月 15 日に輸送用培地に接種し、3 種 1 セットを真空パックに入れ密封したのち、培養を開始した。5 月 19 日に 3 次容器におさめ、バイオセーフティ管理室員とともにチェックシートをもとに確認作業を行いながら適切に搬送準備が整えられていることを確認した後、試料を同日発送した。

### 4. 実施スケジュール（表 1）

実施時期は 5 月 22 日から 6 月 12 日とし、5 月 15 日に地衛研代表メーリングリストを使って実施案内を送付した（別添 2）。参加にあたっては、規定に沿った菌株搬送容器を準備して指定日に感染研へ送付することとし（別添 3）、四種病原体に関する各種基準（厚生労働省令）を遵守するよう誓約を求めた。

検査法は各機関の標準作業書に準拠して行うこと。また、あわせて、「赤痢菌検査・診断マニュアル、平成 24 年 6 月改訂」感染研 HP（<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/shigella.pdf>）を参考とすることとした（別紙

6に記載)。検体の発送は、ゆうパックで5月22日に到着するよう指定した。検体受領後はすみやかに検査を実施し、6月12日までに検査結果報告書(別添1別紙4)および検査経過記録書(別添1別紙5)を提出するよう依頼した。また、試料培養時の注意点を記載した赤痢菌検査注意書(別添1別紙6)を作成して送付した。

#### 5. アンケート

赤痢菌検査に日常使用している選択分離培地、確認培地、免疫血清、及び遺伝子検査についてアンケートを作成し、参加施設へ回答を依頼した(別添1別紙5)。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した赤痢菌については、すでに患者情報が連結不可能匿名化されており、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針の対象とされない。

### C. 研究結果

#### 1. 配付株の選定と輸送

感染研で選択した5株について5施設の細菌WGメンバーが実施した検査の結果をもとに、3株を試験株として選択した。3株は試料1: *Escherichia coli* ボイド9型(+)、試料2: *Shigella sonnei*、試料3: *Shigella flexneri* 2aとした。

取扱様式8「特定病原体等分与(譲渡)申請書」はゆうパックを利用した27施設を1枚に集約すること、参加施設の誓約書を添付することで、通常求められる「フロア図・ラボ配置図」は添付しないこととした。これらを感染研総務部調整課研究支援係に提出した。

#### 2. 参加地衛研

平成29年2月27日付けで全81地衛研に参加希望の照会を行ったところ、64地衛研から参加申込があった。参加希望の全地衛研が参加することは細菌WGの規模では困難であるため、全国のブロックごとに参加地衛研数を3~5施設割り振り、抽選で21地衛研を選び、細菌WGの6地衛研を加えた計27地衛研が参加することとした。

#### 3. 同定結果の提出

6月12日までに、全地衛研から依頼の様式で検査結果報告書、赤痢菌検査経過記録書、及びアンケートが提出された。

#### 4. 検査結果報告書のまとめ

結果判定は試料1、2、3何れも全27施設で正しく判定されていた(表2)。根拠とした検査結果では試料1で、0抗原(+)  
赤痢菌の(以下同)生化学的性状(-)  
赤痢菌遺伝子(-)、0抗原(-)  
生化学的性状(-)  
赤痢菌遺伝子(-)、生化学的性状(-)  
赤痢菌遺伝子(-)等記載が認められた。一方、試料2、3ではほぼ全地衛研が0抗原(+)  
生化学的性状(+)  
赤痢菌遺伝子(+)と記載していた。また、試料2で群血清(3)4を3(4)とした軽微な誤記や *Shigella sonnei* 相を *Shigella flexneri* 相とした等重大な誤記も認められた。

#### 5. 赤痢菌検査経過記録書のまとめ

検査担当者情報として、5地衛研は1名、10地衛研は2名、11地衛研は3名、1地衛研は4名を記載しており、合計63名の担当と検査経験を表3にまとめた。検査担当者の赤痢菌検査および細菌検査の経験年数については、約7割が赤痢菌検査の経験5年以内と回答していた。

検体は、27地衛研には5月22日の指定日どおりに到着した。検体の状況は全27地衛研で良好であった。検体到着日に検査を開始した地衛研は13か所、翌日が2か所、翌々日が1か所、検査開始日を明らかに誤記した地衛研が1か所あった。

保管条件については、直ぐに検査を開始した地衛研は13か所、冷蔵庫保管は11か所、室温保管が3か所であった。

分離培養検査に使用した選択分離培地は、25地衛研でSSが使われており、SS+DHLが最も多く16か所(59.3%)、SS+DHL+BTB及びSS+DHL+マッコンキーが各2ヶ所であった。残りはSSに各種培地を加え2から4種類の分離培地を使用していた。また、1か所は普通寒天を使用していた(表4)。

釣菌したコロニー数の記載は1~12個で、2か所はコロニーを1個のみ釣菌していた(データ未

掲載)。しかし、記載様式の不備で平板あたりか  
検体あたりかの区別がつかなかった。

生化学的性状検査の検査項目ではブドウ糖発酵  
試験、乳糖及び白糖発酵試験、ブドウ糖からのガ  
ス産生試験、リジン脱炭酸試験、インドール産生  
性試験、及び運動性試験は 27 か所全てが実施し  
ていた。一方、クエン酸利用試験(23 施設)、VP  
(アセトイン産生性)試験(21 施設)、酢酸ナト  
リウム利用試験(20 施設)、オルニチンデカルボ  
キシラーゼ試験(18 施設)、アルギニンジヒドラ  
ーゼ試験(16 施設)及びウレアーゼ試験(15 施  
設)は半数以上の地衛研が実施していた(表 5-1、  
5-2)。

検査項目に対する検査結果(表 6-1,6-2)では、  
試料 1、*Escherichia coli* は実施した全ての地衛  
研でブドウ糖発酵陽性、乳糖及び白糖発酵、リジ  
ン脱炭酸、運動性、VP、クエン酸利用、アルギニ  
ンジヒドラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、  
マロン酸利用試験、ウレアーゼ試験陰性であった。  
一方、インドール陰性、酢酸ナトリウム利用試験  
陰性、及び粘液酸利用試験陰性がそれぞれ 1 か所  
認められたが、全て誤記であった。乳糖、白糖発  
酵試験陽性の 1 か所は糖代謝培地を用い 1 週間観  
察した結果であった。ブドウ糖からのガス産生陽  
性と回答した施設(1 か所)は確認したが「誤記  
ではない。」との回答を得た。試料 2 *Shigella*  
*sonnei* は実施した全ての地衛研でブドウ糖発酵、  
オルニチンデカルボキシラーゼ陽性、乳糖及び白  
糖発酵、白糖発酵、リジンデカルボキシラーゼ、  
インドール、運動性、VP、クエン酸利用試験、ア  
ルギニンジヒドラーゼ、マロン酸・酢酸ナトリウ  
ム・粘液酸利用試験、及びウレアーゼ陰性であっ  
た。一方、乳糖発酵陽性と回答した施設は糖代謝  
培地を用い、1 週間観察した結果であった。確認  
したところ、ブドウ糖からのガス産生陽性は誤記  
であった。試料 3 *Shigella flexneri* 2a は実施  
した全ての地衛研でブドウ糖発酵陽性、乳糖及び  
白糖発酵、乳糖発酵、白糖発酵、リジンデカルボ  
キシラーゼ、インドール産生性試験、運動性、VP、  
クエン酸利用試験、アルギニンジヒドラーゼ、オ

ルニチンデカルボキシラーゼ、マロン酸、酢酸ナ  
トリウム、粘液酸利用試験、及びウレアーゼ陰性  
であった。一方、ブドウ糖からのガス産生陽性 1  
か所は該当地衛研に確認したが「誤記ではない。」  
との回答を得た。

使用した培地を表 7-1,7-2 にまとめた。ブドウ  
糖の検査は TSI が 26 か所、糖代謝確認培地が 1  
か所であった。乳糖及び白糖は糖代謝確認培地が  
それぞれ 6 及び 4 ヶ所で、その他は主に市販同定  
キットが使用されていた。ブドウ糖からのガス産  
生については 20 か所が TSI、7 か所は糖代謝確認  
培地であった。リジン脱炭酸は 24 か所が LIM、残  
りはメラー培地等を使用していた。インドール産  
生性は全て LIM、運動性は 17 か所が LIM、7 か所  
が SIM、3 か所が半流動培地を使用していた。ア  
ルギニンジヒドラーゼ、オルニチンデカルボキシ  
ラーゼ、マロン酸、ウレアーゼは市販の同定キッ  
トが最も多く使用されていた。また、粘液酸利用  
試験については培地が市販されていないので自  
家調製であった。その他の培地として CLIG、クリ  
ステンゼンクエン酸塩培地がそれぞれ 4 及び 3 ヶ  
所で使用されていた。

血清凝集反応は 26 か所の地衛研が試料 1 から 3  
について、1 か所は試料 2、3 の赤痢菌のみ実施し  
ていた(表 8)。試料 1 は 15 か所がボイド 9 型陽  
性と報告したが、残りの 11 か所は陰性と報告し  
た。その内訳は 7 か所が複数の多価血清に凝集す  
る非特異凝集のため、4 か所は凝集が認められな  
かったため陰性としていた。試料 2 は 27 か所全  
てが陽性と報告していた。その内訳はソネ 1 相  
と記入が 20、I+II 相が 5 か所、II 相が 2 か所  
であった。試料 3 も 27 か所全てが陽性と報告し  
ていた。その内訳は *Shigella flexneri* 2a 等菌型  
記入が 6 か所、B 多価 II 型(3)4 等血清型記入が  
19 か所、うち 2 か所は血清型の誤記、1 か所は群  
血清の記入がなかった。菌型と血清型記入は 2 か  
所であった。

全 27 か所の地衛研が赤痢菌同定のため遺伝子  
検査を実施していた(表 9)。ipaH は 24 か所が検  
査していた。試料 1 及び 3 は 24 か所全てがそれ

ぞれ陰性及び陽性であったが、試料 2 では 23 か所が陽性で 1 か所は陰性であったが誤記であると確認した。invE は 25 か所が検査していた。検査を実施した全ての地衛研が試料 1 は陰性、試料 2、3 は陽性と報告していた。また、ipaH、invE 何れも検査していたのは 22 か所、ipaH のみは 2 か所、invE のみは 3 か所であった。試料 2 に関して 2 か所からソネ 11 相の場合、invE が陰性と報告していた。

遺伝子検査に使用した遺伝子増幅装置については PCR が 25 か所で、機種は Veriti、GeneAmp PCR System 9700 等現サーモフィッシャーサイエンティフィック社製が 13 か所、TaKaRa 社が 9 か所、バイオラド社が 2 か所、ASTECC 社が 1 か所であった。残りはリアルタイム PCR、LAMP がそれぞれ 1 か所であった。電気泳動装置は 24 ヶ所から回答があり、さまざまなタイプの Mupid が 19 ヶ所で最も多く、E-gel が 2 か所、キャピラリー電気泳動装置等その他のアガロース電気泳動装置が 3 か所で使用されていた。

## 6. アンケートのまとめ

アンケートは、全 27 か所から回答を得たが、1 か所は免疫血清の項目の記入がなかった。

日常赤痢菌検査に使用している培地や試薬について尋ねた。選択分離培地では SS、DHL 寒天培地が最も多く 24 か所で使用されていた。そのほかマッコンキー寒天培地 (5 か所)、BTB 乳糖寒天培地 (3)、SSB 寒天培地 (2) を使用していた。記載様式の不備で何種類の分離培地を用いているかは不明であった (表 10)。

生化学的性状確認培地では TSI、LIM は 27 か所全てで使用していた。以下、クエン酸利用試験 (21 か所)、VP 試験 (19)、SIM (18)、簡易同定キット (17、うち必要に応じて使用が 2 か所) 及び酢酸ナトリウム利用試験 (15) を半数以上の地衛研が使用していた (表 11)。

使用する免疫血清は赤痢菌免疫血清「生研」1 号セットは 25 ヶ所、2 号セットは 4 か所、3 号セットは 2 か所であった。1 か所は回答がなかった (表 12)。

遺伝子検査では 25 か所が日常検査で実施していた (表 13)。未実施の 1 か所から今回の外部精度管理を受けて今後実施する予定との記載があった。実施している 25 か所では PCR が 23 か所、リアルタイム PCR、LAMP が各 1 か所であった。標的遺伝子は ipaH & invE が 20 ヶ所、ipaH のみ、invE のみがそれぞれ 2 か所、ipaH & invE & virA が 1 か所であった。プライマーに関しては市販のプライマー (全て TaKaRa 社) が 20 ヶ所、その他 5 か所は病原体検出マニュアル及び学術論文から塩基配列を引用していた。

## D. 考察

細菌性赤痢患者の届出数は最近では年間 150 名前後で推移し、腸管出血性大腸菌感染症 (年間 4,000 前後) に比べると発生件数はかなり少ない。しかしながら、細菌性赤痢は三類感染症に属し、食品関係従事者の場合、就業制限がかかり社会的影響が大きい。また、届出基準には臨床症状に加え、便からの分離・同定による病原体の検出が明記されている。地衛研では医療機関、保健所等から赤痢菌の最終同定を求められることがあるが、地衛研では赤痢菌検査数が減少し、検査経験がない若しくは少ない職員が増えている。加えて、赤痢菌は他の病原菌に比べ誤同定が多いことが報告されている (参考文献 1)。このようなことから、本研究班の細菌 WG では地衛研に対して赤痢菌の外部精度管理試行を実施することとした。その際、留意すべき赤痢菌検査の 5 つのポイントを挙げ (表 14)、これらのポイントを確認することが出来る試料菌株を細菌 WG で「B. 研究方法 3. 配付株の選定と輸送」で記載したとおり準備した。

検査結果報告書の「判定結果」が全ての地衛研から正しく報告されていたことから赤痢菌の検査について、地衛研では適切に実施されていることが明らかとなった。また、「根拠とした検査結果」では試料 1 のボイド 9 型に凝集する *Escherichia coli* で結果記載例が不十分であったため、検査結果報告書の結果表記に相違が認められた。この項目は 0 抗原 (凝集が認められれば

+、非特異凝集または凝集が認められない場合 - ) 生化学的性状 ( 赤痢菌に性状が一致すれば+、一致しなければ - ) 赤痢菌遺伝子 ( 陽性ならば+、陰性ならば - ) とカッコ内の+または - のみ を付けて選択とする等、統一した回答を得るためには今後、記入欄や記載例に工夫が必要である。また、「根拠とした検査結果」に菌型、血清型を記入した地衛研で軽微な誤記及び重大な誤記が1及び2か所に認められた。これらの記載ミスは病原菌の基礎知識を持った職員ならば容易に指摘できる。今後、各地衛研においては病原菌の知識を持った複数の職員での検査結果のチェック体制を確立することが急務である。

赤痢菌検査経過報告書の「担当者情報」から、検査担当者の約7割、検査区分責任者も8名中6名が赤痢菌検査経験なしあるいは5年以内であり、前述したとおり赤痢菌検査経験がない若しくは少ない職員が増えている現状が明らかとなった。このため、国立保健医療科学院の細菌研修受講、ブロック内での連携関係の強化等を実施し対策に努める必要がある。また、ブロック単位での希少病原体の研修会も必要となるであろう。

検査開始日時について23か所(85.2%)は到着当日に実施していた。残り2か所は翌日、1か所は翌々日に実施していた(1か所は記入不備)。多忙な日常業務の中で外部精度管理試行を実施したことも当日着手出来なかった一因と考えられるが、実際の赤痢菌検査の際には速やかな検査着手が望まれる。また、保管場所ではSOPで指定された室温保管が3か所あったが、このうち1か所では検査を翌日開始していた。可能ならば当日検査開始が冷蔵保管が望ましい。

分離培養検査では25か所(92.6%)でSS培地に加え各種分離培地を併用していた。ソクネ菌検査の場合には病原プラスミド脱落のないソクネ1相菌を検査することが重要である。SS培地は1相菌を選択することが出来るので赤痢菌検査の場合SS培地の使用が望ましい。生化学的性状検査の実施状況では20ヶ所で酢酸ナトリウム利用試験を実施していた。本試験は粘液酸試験と共に

赤痢菌と大腸菌鑑別に必須の検査である。粘液酸試験は培地が市販されていないため自作する必要があるが、酢酸ナトリウム利用試験は日本ベクトン・ディッキンソン(日本BD)から生培地、粉末培地共が市販されているので容易に使用できる。

各地衛研の試料1から3の生化学的性状検査結果のまとめから乳糖、白糖の検査結果が2か所の地衛研は陽性と報告された。これは使用培地がTSIの場合には翌日判定のため陰性となるが、陽性となった地衛研は単糖代謝確認培地を用い1週間観察したため、遅分解で陽性となったと考えられる。通常の赤痢菌検査では短期間で結果を出す必要があるためTSIを用いることが望ましい。また、軽微な誤記(陽性、陰性の誤り)が4か所で認められた。また、「ブドウ糖からのガス産生」で明らかに赤痢菌の性状を誤って認識していると思われる誤記が1か所に認められた。当該地衛研はTSI培地を用いてブドウ糖からのガス産生を検査していた。培地が古い場合、亀裂が入りガス産生陽性と見誤ったことも考えられる。しかし、病原菌の基礎知識を持った職員ならば容易に指摘できる。今後、病原菌の知識を持った複数の職員での検査結果のチェック体制を確立することが望まれる。

使用した培地では運動性の確認にLIMが17か所、SIMが7か所、半流動培地が3か所であった。運動性の確認は赤痢菌と大腸菌鑑別で重要な項目である。経験的にLIMよりもSIMを用いた方が運動性を確認しやすい。また、今回は培養温度について回答を求めなかったが、30℃培養を行うと運動性を確認しやすい場合があるので37℃と併用することも一助となる。また、アルギニンジヒドラーゼ、オルニチンデカルボキシラーゼ、マロン酸利用、及びウレアーゼの検査に市販の同定キットが最も多く使用されていた。年間の検査件数が少ない赤痢菌検査の場合、同定キットを使用することは粉末培地等を購入するより経済的である。しかし、同定キットは運動性の確認が出来ないため、必ず運動性を確認する培地を併用する必

要がある。釣菌するコロニー数では2ヶ所は1個のみであった。コロニーによって性状が異なる場合は多々あるので1平板あたり3から5コロニーを釣菌することが望ましい。

血清凝集試験では試料1で11か所が複数の多価血清に凝集するため、または凝集が認められなかったため陰性と報告した。これらの地衛研は、1) 菌液濃度の異なった懸濁液で行う、2) 複数の職員で確認する、3) 赤痢菌の凝集反応は生菌で行うに留意して再度検査を行ってほしい。今後は実習を含めた研修会の実施も必要であると思われる。

遺伝子検査では3か所が *invE* のみの実施であった。*invE* は病原プラスミド上に存在し、継代培養等で脱落する可能性があることが知られている。事実、試料2で2か所からソンネⅡ相の場合、*invE* が陰性と報告していた。赤痢菌同定PCRのプライマーセットは1種類の場合には *ipaH* を用いることが望ましい。加えて、前述のとおりSS培地でソンネⅠ相菌を選択することも重要となる。

使用している赤痢菌免疫血清についてのアンケート集計から大半の地衛研ではAからDまでの多価血清に各多価血清の因子血清を加えたフルセットの1号セットを使用していた。1か所では2号セットのみ使用していた。2号セットはAからDまでの多価血清に我が国で検出される赤痢菌の大部分を占めるB(フレキシネル)とD(ソンネ)の因子血清のみを備えたセットである。1号セットは定価132,000円と高価であるが、2号セットは定価56,280円と半額以下で購入ができる。我が国でA(志賀菌)、C(ボイド菌)がほとんど検出されないことからそれぞれの地衛研の予算状況等を考慮に入れた対応が必要である。

遺伝子検査のアンケートではこれまで赤痢菌検査に遺伝子検査を実施していなかった1ヶ所の地衛研から以下のコメントがあった。「現行の標準作業書では血清型別試験の結果で判定を行うこととされており、遺伝子検査まで記載していません。今回、血清型別試験で非特異的凝集(乳白色の背景に凝集塊を観察)が疑われたため、PCR

を実施し判定を行いました。新血清型赤痢をはじめ、今後は遺伝子検査が必要と思われるので、標準作業書の改定を行う予定です。ただしPCRでは腸管侵入性大腸菌(EIEC)と赤痢菌の鑑別はできないので、酢酸ナトリウム利用試験など、生化学的性状試験に関しても標準作業書改定の際には検討したいと考えています。」標準作業書の不備に気づき、改定を行うこととなったことは今回の赤痢菌外部精度管理試行のひとつの大きな成果と言える。

今回の精度管理試行の結果を基にして、細菌検査の外部精度管理を実施するために、全体のプロセスを検体の選択、検体の作製と送付、結果の解析と評価の3段階分けた外部精度管理プロトコル案を作成した(図1)。

最後に参加地衛研のご協力に感謝するとともに、本調査結果が検査能力の向上につながることを期待したい。

## E. 結論

三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定について外部精度管理調査を実施し、27施設の地衛研で概ね適切に検査が行われていることがわかった。今後も、赤痢菌の届出基準を正しく理解し、地衛研で正確に判定できるよう準備しておくことが大切である。

赤痢菌同定には0抗原検査、生化学的性状、遺伝子検査結果を総合的に判断すべきである。

## F. 健康危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

関連発表なし

### 2. 学会発表

1) 松本昌門、皆川洋子 「地方衛生研究所に対する外部精度管理調査の試行について」第54回日本細菌学会中部支部総会 名古屋市 2017.10.13

2) 松本昌門 「赤痢菌検査と精度管理」平成 29  
年度希少感染症診断技術研修会 東京都  
2018.2.28

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

なし

#### 参考文献

1) ISAR 編集委員会等 ミニ特集 赤痢菌の検査  
法の問題点と解決策 病原微生物検出情報  
(IASR) 24(9):208-214, 2003.

#### 添付資料

図 1 外部精度管理プロトコール案

別添 1 実施時送付書類書式等

別紙 1 菌株発送容器の準備

別紙 2 病原体等輸送チェックリスト(簡易版)

別紙 3 参加申込書(誓約書)書式

付) BSL2(3)実験室確認書 記載例

(赤痢菌送付に合わせたもの)

別紙 4 検査結果報告書

別紙 5 検査経過記録書

付) アンケート

別紙 6 赤痢菌検査注意書

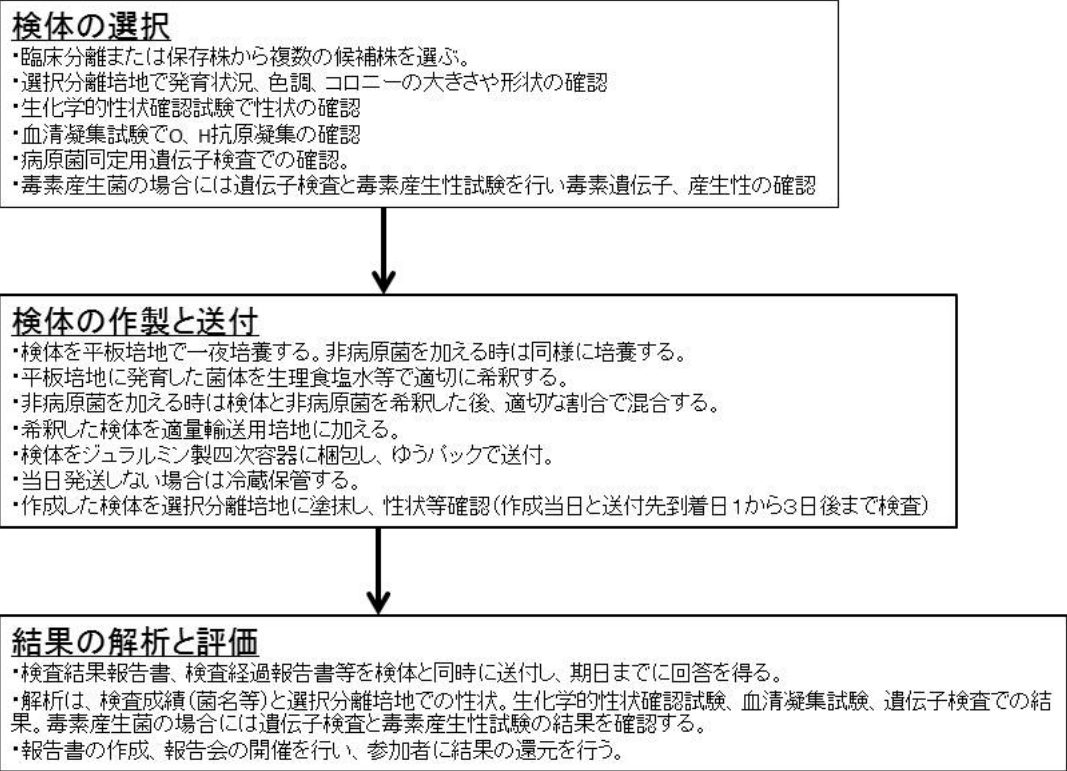
別添 2 実施案内(2017年5月15日)

別添 3 菌株搬送容器送付案内(2017年5月8日)

表 1~14

図1 外部精度管理プロトコル案

図1 外部精度管理プロトコル案



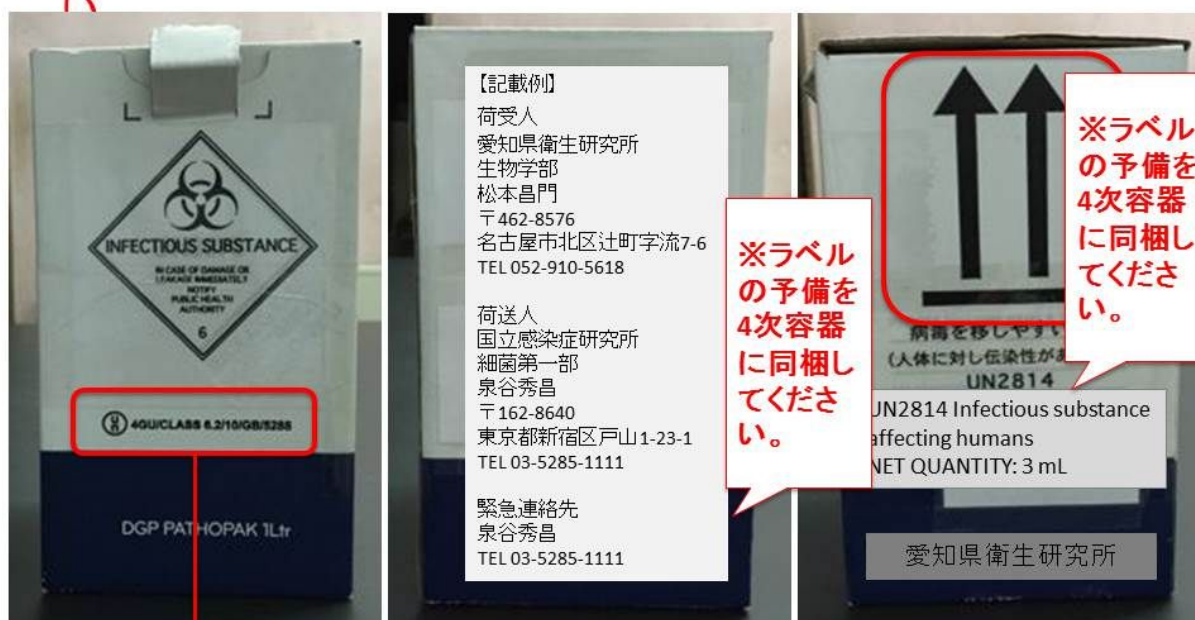


## 別紙1 菌株発送容器の準備

1. 地研名を記載した二次容器に、一次容器を包むための吸収材（ペーパータオルなど）とエアクッションとを入れます。

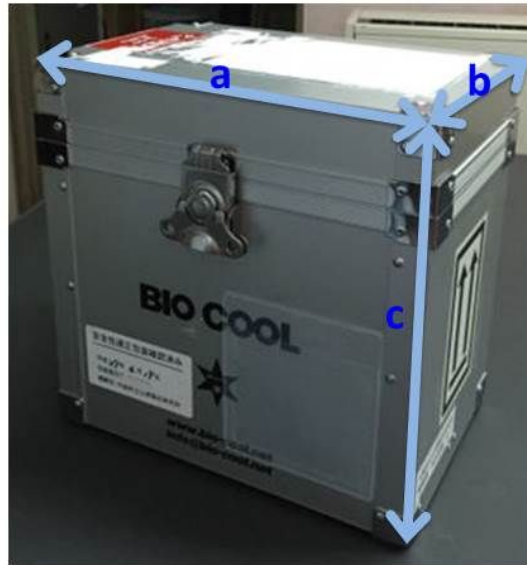
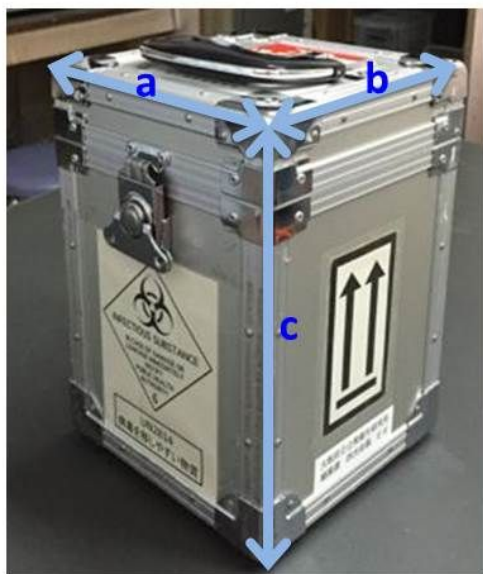


2. 三次容器には国連規格容器を使用し、①感染性物質であること、UN2814、内容量（3 mL）、②荷受人（地研名）、荷送人（感染研）、緊急連絡先（感染研）、③天地無用マークを表示します。（四次容器と同じ表示）。※ラベル①と②は予備を各1枚4次容器に同梱してください。



国連マークをラベルで隠さないようにしてください

3. 菌株搬送容器(四次容器)には、ゆうパック 80サイズ(三辺の計が 80cm以内)までの大きさのものを使用します。



$$a + b + c = 80 \text{ cm 以内}$$

4. 菌株搬送容器の1面に感染性物質であることを表示します。



5. 菌株搬送容器の別の1面に荷受人、荷送人、緊急連絡先を明示します。荷送人、緊急連絡先は下記のとおりにしてください。



荷受人【記載例】  
愛知県衛生研究所  
生物学部  
松本昌門(←貴機関担当者等のお名前)  
〒462-8576  
名古屋市北区辻町字流7-6  
TEL 052-910-5654

荷送人  
国立感染症研究所  
細菌第一部  
泉谷秀昌  
〒162-8640  
東京都新宿区戸山1-23-1  
TEL 03-5285-1111

緊急連絡先  
泉谷秀昌  
TEL 03-5285-1111

6. 菌株搬送容器に内容量(3 mL)、OVERPACK、天地無用マークの表示をしてください。



OVERPACK

UN2814 Infectious substance  
affecting humans  
NET QUANTITY: 3 mL

7. 三次容器と菌株搬送容器の間にクッション材を入れます。



今回は小型温度記録装置は入れません。

隙間にはクッション材を入れてください。

8. ゆうパック送り状に宛先、差出人などを記載して、菌株搬送容器に貼り付けます。

© 大切なお荷物を、しっかりと丁寧にお届けします。 同一あて先割引 お問い合わせ番号

**ゆうパック** JP POST

(ゆうパック専用)  
集荷お申込み先 0800-0800-111(無料)  
お問い合わせ先 0800-0800-222(無料)  
(携帯電話ご利用のお客様) 0570-0800-222  
配達状況お問い合わせ http://www.post.japanpost.jp

〜同一あて先割引〜  
※1回限り有効  
次回同じ住所へ送る場合、この「依頼主」をお持ちください。一度の条件で準備を切り引きます。有効期間は1年間です。

●この「依頼主」は、お問い合わせや損害賠償の請求の際に必要です。大切に保管してください。  
●損害賠償の限度額は原則として30万円です。  
●郵に補償が必要な場合はセキュリティゆうパックをご利用ください。  
●危険品・荷重のお取扱いはできません。  
●その他取扱いはゆうパック約款によります。

取扱所  
担当

TO 郵便番号 [ ][ ][ ][ ][ ][ ]  
おとこ 荷受人の住所  
施設名  
担当者名  
電話番号 様

お届け先  
おなまえ ( ) 様

FROM 郵便番号 1628640  
おとこ 新宿区戸山1-23-1  
国立感染症研究所  
おなまえ 細菌第一部  
泉谷 秀昌 様

でんわ 03-5285-1111

郵便事業株式会社 〒100-8798 東京都千代田区霞が関1-3-2  
運送料一万円未満 (印紙税は非課税) 記載された個人情報等は運送業務の遂行のために使用いたします。

お問い合わせ番号 6401-0404-3154

配達希望日 5月15日 受付日 年 月 日  
配達予定日 年 月 日

配達希望時間帯  
午前中 12時~14時 14時~16時 16時~18時 18時~20時 20時~21時 希望しない

品名 危険物, 病原体  
品名は必ず記載してください。  
「こわれもの」「なまもの」「ビン類」「逆さま腐敗」「下積み腐敗」

依頼主 依頼主 控

この送り状ではコンスタントに電子印字して送ります。この送り状は、送り状に添付されたQRコードから読み取ることができます。

この送り状により、この送り状の送り主・送り先・送り物の詳細が読み取れます。送り主・送り先・送り物の詳細が読み取れない場合があります。あらかじめご了承ください。

JP 日本郵便

a 6 4 0 1 0 4 0 4 3 1 5 4 a

太枠内を強くお書きください。電話番号・郵便番号をお忘れなく!

9. 準備が整った菌株搬送容器を紙袋に入れて封をし、元払いで送ってください。



**【送り先】**

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

国立感染症研究所 細菌第一部

泉谷 秀昌 先生

TEL 03-5285-1111

**【配達希望日】**

5月15日を記載する

**【品名】**

菌株搬送空容器(精度管理参加)

付録 適当な大きさに印刷してお使いください。



UN2814  
病毒を移しやすい物質

荷送人 国立感染症研究所 細菌第一部

泉谷 秀昌

〒162-8640

東京都新宿区戸山1-23-1

TEL 03-5285-1111

緊急連絡先 泉谷 秀昌

TEL 03-5285-1111

OVERPACK

UN2814 Infectious substance  
affecting humans

NET QUANTITY: 3 mL

## 菌株搬送容器発送チェックシート

### 二次容器（ねじ蓋プラスチック容器）

- 三次容器とセットになった国連規格容器を使用している。
- 二次容器に地研名を記載している。
- 二次容器にエアクッションと吸収材（ペーパータオルなど）を入れている。

### 三次容器（紙箱）

- 二次容器とセットになった国連規格容器を使用している。
- 三次容器に感染性物質であることを表記している。
- 三次容器に荷受人（地研） 荷送人（感染研） 緊急連絡先（感染研） 天地無用マークを表記している。
- 三次容器に内容量（3mL）を記載している。
- 三次容器に二次容器を入れている。

### 菌株搬送容器（四次容器；ジュラルミンケース）

- 菌株搬送容器に感染性物質であることを表記している。
- 菌株搬送容器に荷受人（地研） 荷送人（感染研） 緊急連絡先（感染研） 天地無用マークを表記している。
- 菌株搬送容器に内容量（3mL）を記載し、OVERPACK と表記している。
- 菌株搬送容器に三次容器を入れている。
- 菌株搬送容器に、別紙 1 1.及び 2.で指定した予備のラベル 3 枚を入れている。
- 菌株搬送容器に記入済みのゆうパック送り状を貼っている。
- 菌株搬送容器を紙袋に入れて封をしている。

### 発送

- 感染研への到着日は、5月15日を指定している。
- 品名に「菌株搬送空容器（精度管理参加）」と記入している。

## 参加申込書及び誓約書

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会

厚生労働科学研究「精度管理研究」班

研究代表者 皆川 洋子 様

(検体発送担当：国立感染症研究所 細菌第一部 大西 真 様)

平成 29 年 2 月 27 日 付けでご案内いただいた「細菌感染症検査における外部精度管理」について、参加条件を了承し、参加を申し込みます。実施にあたっては、特定病原体四種に応じた施設基準、保管、使用、運搬、滅菌等の基準(厚生労働省令)を遵守いたします。

施設名 \_\_\_\_\_

所属部課名 \_\_\_\_\_

実施担当者 \_\_\_\_\_

住所 \_\_\_\_\_

電話番号 \_\_\_\_\_

メールアドレス \_\_\_\_\_

特定病原体移動責任者 \_\_\_\_\_

申込書送付先： 細菌小班外部精度管理調査事務局(愛知県衛生研究所) E-mail : eiseiken@pref.aichi.lg.jp
---

付) BSL2(3)実験室確認書 記載例 (赤痢菌送付に合わせたもの)

BSL2-(3)実験室確認書

(分与様式5に添付)

2017年 4月21日

BSL2-(3)実験室確認書

実験室名: 安全実験室 (BSL2)

上記 実験室はBSL2-(3)実験室としての設備および運営の要件を満たしています。

なお、以下に該当する場合、

- (1) 特定病原体等の場合、所持許可 (二種)を得ている、又は届出(三種)をしている (或いは受領後届出予定)
- (2) 監視伝染病病原体の場合、所持許可 (重点管理、又は要管理)を得ている、又は届出をしている
- (3) 遺伝子組換え生物の場合、実験承認を得ている

ことを確認しています。 今回(1)~(3)には該当しません。

バイオセーフティ管理者: 松本 昌門

(またはそれに該当する方)

所属・役職: 愛知県衛生研究所・生物学部長

注: WHO コラボレーションセンターを除く、検査研究依頼時に依頼先施設に作成を依頼する。



別紙 4 検査結果報告書

地衛研精度管理研究班による平成 29 年度外部精度管理細菌検査報告書

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

住所 〒

TEL 番号

FAX 番号

連絡先 E mail

「地衛研精度管理研究班」による平成 29 年度外部精度管理細菌検査結果について、以下のとおり報告します。




		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、生化学的性状、遺伝子等)	
<b>例示</b>		<b>陽性</b>	<b>陰性</b> O 抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)
赤痢菌の 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

なお、報告の詳細は別添の「H29 赤痢菌検査経過書」に記載願います。



細菌感染症検査の精度管理 検査記録書 (H29 年三類感染症赤痢菌疑いの検査)

本検査記録書は、今後の外部精度管理調査の結果の解析等の基礎データ作成のために使用いたしますので、実施した内容について、できる限り正確にご記入願います。

-  緑のセル: クリックすると選択肢が表示されます。表示された選択肢リストより該当するものを選択してください。
-  ピンクのセル: 緑色のセルで「その他」を選択した場合のみ具体的に記述してください。
-  紫のセル: ご自由に記述してください。

**検査** 開始日時 月 日 時 分




**分離培養検査**

検査に使用した選択分離培地





















1		2		3	
					

**生化学的性状検査**

釣菌したコロニー数

検体番号		
1	2	3
		

実施した検査項目を記載してください

	検査項目	使用した培地	結果			
			検体番号 1	2	3	
1	ブドウ糖発酵試験					
2	乳糖及び白糖発酵試験					
3	乳糖発酵試験					
4	白糖発酵試験					

5	ブドウ糖からのガス産生試験					
6	リジン脱炭酸試験					
7	インドール産生性試験					
8	運動性試験					
9	VP(アセトイン産生性)試験					
10	クエン酸利用試験					
11	アルギニンジヒドラーゼ試験					
12	オルニチンデカルボキシラーゼ試験					
13	マロン酸利用試験					
14	酢酸ナトリウム利用試験					
15	粘液酸					
16	ウレアーゼ試験					
17	その他					
18	血清凝集試験					

**血清凝集試験**

血清型または凝集した血清

## 遺伝子検出試験

実施した検査項目を記載してください

1	PCR 法による赤痢菌遺伝子検査		使用プライマー	検体番号			
				1	2	3	
2	増幅した遺伝子	増幅した遺伝子名1	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	
			市販プライマーのメーカー名 その他のプライマーの参考文献	<div style="background-color: #e57373; width: 100%; height: 100%;"></div>			
		増幅した遺伝子名2	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>
		市販プライマーのメーカー名 その他のプライマーの参考文献	<div style="background-color: #e57373; width: 100%; height: 100%;"></div>				
		増幅した遺伝子名3	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	<div style="background-color: #c8e6c9; width: 100%; height: 100%;"></div>	
		市販プライマーのメーカー名 その他のプライマーの参考文献	<div style="background-color: #e57373; width: 100%; height: 100%;"></div>				
3	使用した機器名						
4	電気泳動装置機器名						
5	その他 (リアルタイム PCR 装置等) ご協力ありがとうございました。						

付) 平成 29 年度赤痢菌外部精度管理アンケート

検査結果報告書、検査経過記録書と重複する内容もありますが、ご回答くださいますようお願いいたします。

緑のセル: クリックすると選択肢が表示されます。表示された選択肢リストより該当するものを選択してください。選択肢が読めない場合は、「データ」> データの入力規則 > データの入力規則を選択するとそのセルの選択肢を見ることができます。

紫のセル: ご自由に記述してください。

地研名	
回答者氏名	
連絡先 e-mail	

A. 日常使用している培地や試薬についてお答えください。

選択分離培地	SS 寒天	
	SSB 寒天	
	DHL 寒天	
	マッコンキー寒天	
	BTB 乳糖寒天	
	その他	

性状確認培地	TSI	
	LIM	
	SIM	
	VP	
	クエン酸利用試験	
	マロン酸利用試験	
	酢酸ナトリウム利用試験	
	ウレアーゼ試験	

単糖代謝確認培地	
アミノ酸脱炭酸培地	
粘液酸塩からの酸産生確認用培地	
簡易同定キット	
その他	

血清凝集反应用試薬	赤痢菌免疫血清「生研」1号セット	
	赤痢菌免疫血清「生研」2号セット	
	赤痢菌免疫血清「生研」3号セット	
	セットではなく単品血清のみ	
	その他	

PCR 法による赤痢菌遺伝子検査

PCR 法による遺伝子検査	
標的遺伝子名1	
標的遺伝子名2	
標的遺伝子名3	

プライマー	市販プライマーのメーカー名	その他のプライマーの参考文献
プライマー	市販プライマーのメーカー名	その他のプライマーの参考文献
プライマー	市販プライマーのメーカー名	その他のプライマーの参考文献

質問 A について、追加事項、ご意見などを自由にご記入下さい

ご協力ありがとうございました。

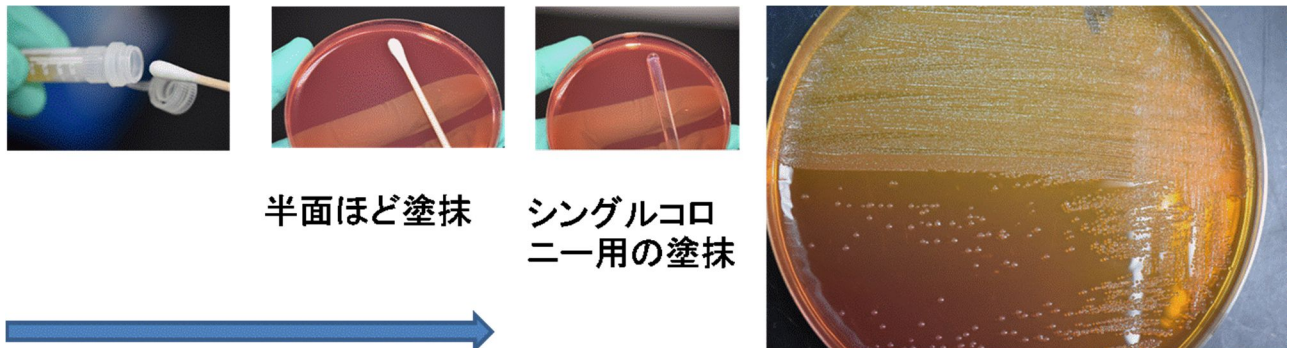
地衛研精度管理研究班による平成 29 年度外部精度管理細菌検査  
検体処理注意書き

精度管理内容

地衛研精度管理研究班による平成 29 年度外部精度管理細菌検査については、模擬臨床検体（分離株）から赤痢菌の同定を実施することとする。

なお、検査法は各機関の標準作業書に準拠して行うこと。また、あわせて、「赤痢菌検査・診断マニュアル、平成 24 年 6 月改訂」感染研 HP (<http://www.nih.go.jp/niid/images/lab-manual/shigella.pdf>) を参考とされたい。

但し、送付検体（チューブ）の菌株を発育させる際には、以下の方法に準拠すること。チューブ内の発育菌量は少ないので、滅菌綿棒にて、チューブの培地表面から菌を十分採材する。寒天平板培地の半面に、当該綿棒で検体を十分に塗抹する。その後、白金耳等にて単独集落の形成を目的に塗抹する。SS 寒天培及び他の寒天平板培地を使用すること。



以上



別添 2 事前連絡先確認(2017年4月17日付電子メール文)及び実施案内(2017年5月15日)

2017年4月17日

昨年度試行参加が内定している地方衛生研究所全国協議会会員各位  
(細菌検査部門管理者様)

このお知らせは、平成29年3月22日付にて、下記の赤痢菌精度管理試行へのご参加が内定している会員(地研)に送信しています。

今後の連絡を確実にを行うため、担当者連絡先(氏名・電子メール及び電話)及び菌株等送付先住所(確実に郵送されるよう必要な場合は部署等も明記してください)を確認させていただきたいので、添付ファイル形式により、4月24日(月)までに電子メールにて返信をお願いします。

#### 記

1. 実施項目: 三類感染症検査に係る「赤痢菌」の同定

赤痢菌を含む試験菌株3種類程度をお送りする予定。

2. 実施時期: 平成29年4月 参加申し込み案内

平成29年5月中旬～下旬頃検体配付(参加施設に到着予定)

平成29年6月末 結果提出締切り(予定)

3. 参加条件:

(1) 検体(四種病原体)は国立感染症研究所(感染研)からゆうパックで送ります。参加施設は、「菌株搬送容器」を後日連絡する指定日に到着するよう発払いにて送付いただきます。

(2) 配付検体は特定病原体を含む試料ですので、その取扱いや保管等については、あらかじめ参加申込書の中で誓約し提出していただきます。

(3) 締切日までに検査結果を送付いただくほか、実施に関連したアンケート調査に回答していただきます。

愛知県衛生研究所 松本昌門、皆川洋子

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

TEL:052-910-5604(直通), 5618(代表)

FAX:052-913-3641

平成29年5月15日

各衛生研究所長 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会  
厚生労働科学研究「精度管理研究」班  
研究代表者 皆川 洋子（愛知県衛生研究所長）

細菌感染症検査における外部精度管理の実施について（ご案内の2）

地方衛生研究所全国協議会および研究班の活動にご協力いただきありがとうございます。

さて、平成29年2月27日付けでご案内しました標記の件について、参加の申込をいただきまして、ありがとうございました。

つきましては、実施に当たり、下記の書類を送付いたしますので、締切日（平成29年6月12日）までにご回答くださるよう、お願い致します。

記

1. 実施項目：三類感染症検査に係る「赤痢菌」の同定
2. 実施時期：平成29年5月19日検体配布（参加施設に22日到着予定）  
平成29年6月12日結果提出締切り
3. 送付書類： 検査結果報告書（別紙4）  
H29赤痢菌検査経過記録書（アンケートシート有）（別紙5）  
赤痢菌検査注意書（別紙6）

4. 結果の送付：平成29年6月12日締切り

検査結果報告書（別紙4） H29赤痢菌検査経過記録書（別紙5）を下記メールアドレスへ送信してください。

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

5. 問い合わせ先：研究代表者 皆川洋子

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

別添 3 菌株搬送容器送付案内

平成 29 年 5 月 8 日

細菌感染症外部精度管理調査・参加担当者 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会  
厚生労働科学研究「精度管理研究」班  
研究代表者 皆川洋子  
(愛知県衛生研究所長)

細菌感染症検査における外部精度管理用菌株搬送用容器の感染研への送付について

地方衛生研究所全国協議会および研究班の活動にご協力ありがとうございます。

さて、平成 29 年 2 月 27 日付けで参加希望の照会を致しましたところ、ご参加の申込をいただきありがとうございました。つきましては、別紙 1 菌株搬送容器の準備、別紙 2 菌株搬送容器発送チェックシートを参考にして菌株搬送容器を 5 月 15 日(月)に感染研に到着するよう送付お願いします。感染研からの搬送状況確認のために、送付する容器に貼り付けた送付状(郵パック伝票)の番号を必ず記録しておいてください。なお、ご都合の悪い機関については、ご連絡ください。調整させていただきます。

併せて別紙 3 参加申込書及び誓約書を愛知県衛生研究所まで電子メールでの送付よろしく申し上げます。

記

送付書類

別紙 1 菌株搬送容器の準備

別紙 2 菌株搬送容器発送チェックシート

別紙 3 参加申込書及び誓約書

送付及び問い合わせ先：研究代表者 皆川洋子(愛知衛研)

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

表1 実施スケジュール

日時	内容
平成29年1月11日	平成29年度実施計画案作成
2月27日	参加希望地衛研案内
3月13日	参加地衛研選考
4月17日 4月17日以降	参加地衛研内定案内 参加地衛研へBSL2実験室確認書発送
5月8日 15日 19日 22日	菌株搬送用空容器の感染研への送付案内 外部精度管理実施案内 感染研から試料発送 地衛研への試料到着
6月12日まで	検査結果回収
10月24日	細菌コアWG会議
11月17日	正解の送付
平成30年2月28日	希少感染症技術診断研修会で報告

表2 検査結果報告書の集計

試料	判定結果	根拠とした検査結果	施設数
1. <i>Escherichia coli</i> ボイド9型(+)	陽性		0
	陰性	0抗原(+)、生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-) 0抗原(-)、生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-) 生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-)等	27
2. <i>Shigella sonnei</i>	陽性	0抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)	27
	陰性		0
3. <i>Shigella flexneri 2a</i>	陽性	0抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)	27
	陰性		0

表3 担当者の内訳と検査経験

担当	記載数	細菌検査の経験			赤痢菌検査の経験		
		なし	5年以内	6年以上	なし	5年以内	6年以上
検査担当者	53	1	31	21	11	28	14
検査区分責任者	8	1	2	5	2	4	2
その他	2		2		2		
合計	63	2	35	26	15	32	16

表 4 分離培養検査に使用した培地

使用培地	施設数
SS+DHL	16
SS+DHL+BTB	2
SS+DHL+マッコンキー	2
SS+BTB	1
SSB+DHL	1
SS+DHL+SSS	1
SS+DHL+SSSB	1
SS+DHL+白糖加 SS	1
SS+DHL+BTB+SSK	1
普通寒天	1
計	27

表 5-1 生化学的性状検査(1)

検査項目	実施	未実施
ブドウ糖発酵試験	27	0
乳糖及び白糖発酵試験	27	0
ブドウ糖からのガス産生試験	27	0
リジン脱炭酸試験	27	0
インドール産生性試験	27	0
運動性試験	27	0
クエン酸利用試験	23	4
V P (アセトイン産生性) 試験	21	6
酢酸ナトリウム利用試験	20	7

表 5-2 生化学的性状検査(2)

検査項目	実施	未実施
オルニチンデカルボキシラーゼ試験	18	9
アルギニンジヒドラーゼ試験	16	11
ウレアーゼ試験	15	12
白糖発酵試験	12	15
マロン酸利用試験	12	15
乳糖発酵試験	7	20
粘液酸	6	21
その他	14	13

表 6-1 試料 1 から 3 の検査結果 (1)

検査項目	1.		2.		3.	
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Shigella flexneri 2a</i>	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
ブドウ糖	26	0	27	0	27	0
乳糖及び白糖	0	27	0	27	0	27
乳糖	1	5	1	6	0	7
白糖	1	10	0	12	0	12
ブドウ糖からのガス産生	1	25	1*	26	1	26
リジン	0	26	0	27	0	27
インドール	26	1*	0	27	0	27
運動性	0	27	0	27	0	27

\* : 誤記

表 6-2 試料 1 から 3 の検査結果 (2)

検査項目	1.		2.		3.	
	<i>Escherichia coli</i>		<i>Shigella sonnei</i>		<i>Shigella flexneri</i>	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
V P	0	20	0	21	0	21
クエン酸	0	22	0	23	0	23
アルギニン	0	15	0	16	0	16
オルニチン	0	17	18	0	0	18
マロン酸	0	11	0	12	0	12
酢酸ナトリウム	18	1*	0	20	0	20
粘液酸	5	1*	0	6	0	6
ウレアーゼ	0	14	0	15	0	15

\* : 誤記

表 7-1 使用した培地 (1)

検査項目	TSI	単糖代謝	その他	
ブドウ糖	26	1		
乳糖及び白糖	27			
乳糖		6	1	
白糖		4	8	
ブドウ糖からのガス産生	20	7		
検査項目	LIM	SIM	その他 (培地名)	
リジン脱炭酸	24		3	メラー培地、リジン脱炭酸
インドール	27			
運動性	17	7	3	半流動培地

表 7-2 使用した培地 (2)

検査項目	培地等
VP 試験	VP 培地 (17) 市販キット (4)
クエン酸	シモンズ (18) シモンズ+クリステンゼン (4) 市販キット (1)
アルギニンジヒドラーゼ	市販キット (10) メラー培地 (6)
オルニチンデカルボキシラーゼ	市販キット (11) メラー培地 (7)
マロン酸	市販キット (8) マロン酸 (4)
酢酸ナトリウム	酢酸ナトリウム (18) 酢ナト加シモンズ (2)
粘液酸	自家調製 (3) K-P 粘液酸培地 (1)
ウレアーゼ	市販キット (12) ウレアーゼプロス (1) Urea 培地 (1)
その他	CLIG 培地 (4) クリステンゼン (3) 等

表 8 血清凝集試験

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i> (ボイド 9 型)		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
血清凝集	15	11	27	0	27	0

表 9 赤痢菌遺伝子検査

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i> (ボイド 9 型)		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
<i>ipaH</i>	0	24	23	1*	24	0
<i>invE</i>	0	25	25	0	25	0

\* : 誤記

表 10 日常使用している選択分離培地

選択分離培地	使用している	使用していない
SS 寒天	24	3
DHL 寒天	24	3
マッコンキー寒天	5	22
BTB 乳糖寒天	3	24
SSB 寒天	2	25

表 11 日常使用している確認培地

生化学的性状確認培地	使用している	使用していない
TSI	27	0
LIM	27	0
クエン酸利用試験	21	6
VP	19	8
SIM	18	9
簡易同定キット	17 (2)	11
酢酸ナトリウム利用試験	15	12
単糖代謝確認培地	12	15
アミノ酸脱炭酸培地	9	18
マロン酸利用試験	6	21
粘液酸塩からの酸産生	5	22
ウレアーゼ試験	5	22

(再掲): 必要に応じて使用

表 12 日常使用している免疫血清

血清凝集反应用試薬	使用している	使用していない
赤痢菌免疫血清「生研」1号セット	25	1
赤痢菌免疫血清「生研」2号セット	4	22
赤痢菌免疫血清「生研」3号セット	2	24
セットではなく単品血清のみ	0	26

表 13 日常実施している遺伝子検査

	実施している	実施していない
遺伝子検査	25 (PCR:23, Real time PCR:1, LAMP:1)	2
標的遺伝子(25)		
<i>ipaH</i> & <i>invE</i>	20	
<i>ipaH</i>	2	
<i>invE</i>	2	
<i>ipaH</i> & <i>invE</i> & <i>virA</i>	1	
プライマー (25)		
市販プライマー	20 (TaKaRa)	
その他	5 (病原体検出マニュアル、学術論文等)	



表 14 赤痢菌検査のポイント

		ポイント
1	血清型別試験	赤痢菌の血清に凝集する大腸菌があることを知っているか。 多価と因子血清を検査できる免疫抗血清を備えているか。
2	生化学的性状試験	赤痢菌と大腸菌と鑑別する生化学的性状（培地）を知っているか。
3	運動性の確認	運動性がないことが赤痢菌の絶対的な性状であることを認識して、運動性の確認に適した培地を使用しているか。
4	遺伝子検査	<i>invE</i> はプラスミド上に存在し、脱落する可能性を知っているか。 <i>ipaH</i> を検出しているか。
5	類似菌との鑑別	類似菌として <i>E. coli</i> 、 <i>Morganella morganii</i> 、 <i>Plesiomonas shigelloides</i> を認識しているか。

#### 4. 地域の病原微生物検査の質の維持向上に資する地方衛生研究所の役割に関する研究

研究分担者 松本 昌門、皆川 洋子 愛知県衛生研究所

研究協力者 山下 照夫 修文大学  
猪飼 薫、奥田 健司 愛知県一宮保健所  
鈴木 裕子 愛知県衛生研究所

#### 研究要旨

自治体職員として病原微生物検査部門の管理業務、臨床検体及び病原体搬送業務、及び衛生検査所立入関連業務に従事経験のある技術者6名を招聘して、地域の保健所等と衛生研究所の連携について検討する会議を、愛知県において開催した。参加者には事前アンケートを実施し、会議においてはアンケート集計結果を中心に検討したところ、衛生研究所に期待する具体的な項目が明らかになるとともに、人材育成等における問題点が共有された。地衛研は管内人口や保健所数、登録衛生検査所数等、病原体検査の需要やマンパワーに関わる条件が大きく異なる自治体に各1施設設置されることから、個々の地衛研に期待される役割も一様ではないが、病原微生物検査体制の維持向上を継続するためには、関係機関も巻き込む形で、現状の問題点（専門家の不足・研修機会の不足等）と期待される役割（人材育成・最新最適な検査法の情報提供・精度管理用検体提供等）を把握し、常に優先順位を考慮しながら対応を立案する必要がある。

#### A. 研究目的

平成28年4月に施行された改正感染症法に基づき病原体情報の収集に法的根拠が付与されて、知事等の事務となり、自治体の地方衛生研究所（地衛研）及び保健所等で病原体検査を担当する施設には、検査精度の維持向上とともに定期的な精度管理への参加や検査員への研修実施等が課せられた。本分担研究では、地域における病原体検査レベルの維持強化を図る上で、保健所及び（学術面の相互刺激を期待して）大学等との連携の在り方や、地衛研に期待される役割について、保健所・大学・地衛研の立場から検討し、地域における地衛研のあり方及び今後の方向性を考えた。

#### B. 研究方法

##### 1. 会議開催及び事前アンケート

連携WG会議出席予定者に対して、主に地衛研の地域における役割に関する事前アンケート調査（資料1 調査票参照）を実施し、その結果を9月7日に開催した連携WG会議等の機会に検討した（資料1 調査結果概要参照）。

#### C. 研究結果

##### 1. 参加者の背景等

参加者6名は全員愛知県職員の経験（5名は現職・1名は退職者で現在は大学教授）があり、資料1に記載したとおり病原体検査経験者が5名、うち4名は5年以上の経験を有していた。さらに全員が病原体検査用検体若しくは菌株等の運搬業務や、衛生検査所立入検査業務の経験があった。

##### 2. 地衛研による精度管理用検体等の提供

2-1 現在実施中の県及び中核市保健所（合計7施設）に対するものは、「現状維持若しくは回数増が望ましい」という意見で一致していた。

配付する病原体の候補はBSL2の三類感染症原因菌（コレラ菌、赤痢菌、腸管出血性大腸菌）及び食中毒原因菌（サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸炎ピブリオ、カンピロバクター、ウエルシュ菌）が適当という意見であった。

2-2 現在実施中の県内で微生物検査を実施している衛生検査所を対象とするものについても、全員が「現状維持若しくは回数増が望ましい」という意見で一致していた。配布対象となっている衛生検査所は、名古屋市所在を含む21施設と保健所

に比べて多く負担感もある。しかし行政上（衛生検査所の実態を直接的に把握）及び検体準備を行う衛研職員の技術面にとっても、菌株を起こして増殖させ、性状を確認する過程がトレーニングの機会として資質向上にプラスとなるほか、毎年赤痢菌を配付することが、使用期限が1年程度の同定用抗血清を毎年度更新する根拠の一つとなっている。

一方、2-3 で尋ねた、現在愛知県では実施していない県内の医療機関内臨床検査室等に対する検体提供は、「他機関に任せる」「わからない」という意見であった。

### 3. 地衛研による人材育成や研修

3-1 で衛生研究所が提供している研修について尋ねたところ、「内容は問題ないが量が不足」という意見が最多であり、とりわけ初任者研修（資料2 別紙参照）のニーズが大きかった。県・中核市とも担当する業務の専門性が変わるような人事異動が頻繁にあり、初任者に加えて久しぶりに検査業務に戻った職員の研修ニーズも示された。3-2 において初任者 OJT の実施について尋ねたところ、将来とも自施設で継続して実施するという意見が半数を占めたが、指導者が不足した場合は自治体内での集約を考慮すべき、との意見もあった。Off-JT 教育訓練・研修については、受講機会と予算の確保（人的・予算的余裕）の必要性が確認された。信頼性確保に関する研修については、国から研修内容を示してほしいという意見が大勢を占めた。

3-3 で大学等に対する研修機会の提供について尋ねたところ、「現状維持」が多かった。大学等研究機関との交流促進は、学術面での刺激等得るものは少なくないが、人手不足の現状では優先順位を上げることは困難との認識があった。一般人への施設公開についても、県民へのアピール効果は期待できるものの、優先順位については大学からの研修受け入れと同様の認識であった。

参考までに、平成 28 年度に県保健所等の微生物検査担当者を対象に、技術面では衛生研究所が県保健所試験検査課職員のサポートも得て保健

所精度管理事業の一環として実施した研修の概要を、資料 2 に示す。

### 4. 病原体検査全般に関する質問

現状では法に基づく記録等の対象は検査施設内の作業に限定されていることから、4-1 において、検体採取や搬送についての標準化の可否等について尋ねたところ、意見は分かれた。「手順書」を参考程度に医療機関等に示すことに反対意見はなかったものの、工程の全てを標準化することは現実的ではないとの認識で一致した。食品 GLP、水質 GLP との差異の認識が重要と考えられた。

### 5. 連携会議における追加討議事項

アンケートに提示した論点を拡げる形で、「検査の質」確保及び地衛研・保健所・地域の衛生検査所等の連携、地衛研・保健所の健康危機対応能力の維持向上に不可欠な人材確保に関する現状の問題認識や今後の方向性を中心に議論した。

#### 5-1 保健所 - 地衛研の連携のあり方

・愛知県においては病原体等検査業務管理要綱に基づき研究監が健康対策課職員とともに全ての保健所試験検査課を年 1 回以上訪問する体制となった。（資料 3 参照）県庁職員が病原体検査の実情を把握する初めての機会となっており、今後試験検査への理解が深まることが期待できる。

・現在実施している精度管理用検体提供は有用。  
・保健所職員への初任者研修は、質的には問題ないが量を増やすほうがよい。

・SOP や関連する手引書等の書式は、（保健所とも連携して）地衛研が積極的に準備してほしい。

#### 5-2 感染症・食中毒等の健康危機対応における現状の問題点、今後のあり方。

・県職員の人事異動においては、引継は一般事務と同様に 1 日程度しかとれないが、試験検査の業務引継ぎは本来 1 年程度かけて（複数担当体制で）行われなければ信頼性を維持できない性質のものであり、前任者が作成した（各職場に最適化された）マニュアルの引継ぎが 100%できないこともある。部門単位で（留任者も含めた）引継を行い、マニュアルや指南書等も適切に引き継がないと感染症の検査を確実に実施することは難しい。

・法改正により標準作業書(SOP)等は食品 GLP と同様に後任に引き継がなければならなくなった点は向上といえる。

・現行の検査実施要領等では義務付けられていないが、検体運搬に関するマニュアルも整備すべき。(以前は、特に成文化しなくても担当者間で引き継がれていた「常識」は、マニュアルなしでは若い世代に伝承できない。)

・担当者交替後、信頼性確保試験を実施するまでの間に実施する検査の信頼性を確保する手段がない。感染症検査は、年度末も休暇中も関係なく実施しなければならないので検査機関として1日も途切れることなく信頼性を確保する必要がある。

#### 5-3 行政の立場から、衛生研究所に望むこと

・感染研等とのネットワークを生かした広い視野での情報提供。

・検体採取にあたっての注意事項の確認・周知・できれば成文化(例:PCR 用検体は、決してキャリーブリア培地に刺さない! )。

#### 5-4 管内衛生検査所・病院内検査室における病原体検査の精度管理について

・愛知県全体で 21 か所の衛生検査所に対して外部精度管理を実施することによりスケールメリットと匿名性を担保できる。中核市単位では(管内に衛生検査所が 1 か所しかない市もあり)匿名性が担保できない。

・病院内検査室については、本年 6 月の局長通知により国や自治体が精度管理に関わることが求められており、今後の業務の候補として考えることは適切。

・全国には衛生検査所が 1 - 2 か所しかない自治体もあるので、スケールメリットを考慮して、支部あるいはブロック(例:東海)単位の検体提供もありうるのではないかと。

#### 5-5 病原体試験検査の現場から衛生研究所に望むこと

・追加検査等を衛研に依頼して結果が(通常より 1 - 2 日)遅れたことがあった。保健所の視点では遅れることが判明した時点で、地衛研から情報提

供(行政への配慮)がほしかった

#### 5-6 大学等研究教育機関から保健所・衛生研究所に望むこと。

・卒業研究等短期技術研修を受けてもらえないか。衛研の若手職員にとってもよい刺激になる。

#### 5-7 (臨床検査や食品 GLP とは一線を画する) 行政の病原体検査に従事する人材育成における問題点・今後のあり方

・愛知県の場合、周囲が初心者ばかりの状況で手本となる先輩が身近にいない等、若手の向上心を刺激することが困難になっている。

・指導者となるべき職員数をみると、40 代で特に希少となっており、人材育成(若しくは外部から確保)を急がないと枯渇しかねない。

#### (対策案)

・若手が外部研修や学会研究会に参加する機会を確保する(旅費の増額・人員配置の集中等により出張できる環境の確保)。書籍の予算を確保し、職場で自習できる環境を整える。

・長期的視野に立つ人材育成、能力と経験のある中途採用者に対する処遇の改善等を県庁等の人事担当部署に粘り強く働きかける。

・国が現在東京で実施する研修の一部を、地方でも(可能な地衛研が研修場所を提供する等して)開催してもらい、旅費等の負担を軽減して自治体職員の参加機会を確保する。

## D. 考 察

### 1. 本研究の調査対象選定理由

地域における地衛研の役割を考察するにあたり、今回は対象を愛知県に絞って検討した。愛知県の推計人口 753 万人(平成 30 年 2 月 1 日現在)は、都道府県別では東京都・大阪府・神奈川県に次いで 4 番目に多く、独自に地衛研を設置する政令指定都市(名古屋市)を除いても 520 万人を超える。名古屋市を除く県内で県 4 保健所及び 3 中核市保健所が試験検査を実施しているほか、微生物検査を行う衛生検査所も 20 以上あり、保健所や衛生検査所との連携の必要性が明白なモデルケースと考

えたためである。

## 2. 地衛研と保健所等との連携について

地域保健対策の推進に関する基本的な指針(2)は、地衛研に「地域における科学的かつ技術的に中核となる機関」としての役割を求めている。一部の地衛研は、30年以上にわたり地域の保健所試験検査課・民間衛生検査所等検査機関に対して細菌検査用精度管理検体の供給などを担当しており、27年度においても17機関の実績が明らかになった。法改正に伴い、感染症法に基づく検査を実施する保健所試験検査課にも研修や精度管理を行う義務が生じており、将来は全国規模に加えて地全協組織でいえば支部(全国に6つ)あるいはブロック(支部内に2つ程度)レベルの精度管理等連携を考えることも有益と思われる。

全国の地衛研は管内人口や保健所数、登録衛生検査所数の大きく異なる自治体に、原則として1施設設置される点が、保健所とは大きく異なる。全ての地衛研にあてはまる現状分析や改善案の提言は不可能に近いと考えられるが、今回はモデルケースを掘り下げることにより問題点の把握と方向性について考えた。

病原体検査を担当する保健所等が地衛研との連携を図ることで改善を期待する課題は、繰り返しになるが

- ・精度管理に用いる標準菌株等の確保
- ・人材の質的(専門性)量的不足
- ・とりわけ初任者における、研修若しくは訓練機会の量的不足
- ・感染症法で届出対象となる病原体等を扱う機会の不足
- ・最新の検査法や病原体の変化等に関する最

新の情報を把握する体制が全ての病原体について必ずしも十分ではない点等と考えられた。

## E. 結論

考察に記述した通り、地衛研は、自ら人材確保及び知識及び技術の研鑽に努めながら、保健所等に対して研修機会や精度管理用検体等を提供することが期待されている。人口減少局面にある日本において、今後顕著な人員増は期待できないので、今後は、感染研に加えて、近隣自治体の地衛研等とのより密接な連携も視野に、生き残りを図る必要がある。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

関連発表なし

### 2) 学会発表

なし

## 参考文献

1. 地域保健法第四条第一項の規定に基づく地域保健対策の推進に関する基本的な指針(平成6年12月1日厚生省告示第374号)最終改正:平成27年3月27日厚生労働省告示第185号

## 資料

- 1 事前アンケート調査票及び集計概要
- 2 平成28年度 保健所試験検査精度管理事業 実施計画(病原体検査関係を抜粋)
- 3 愛知県における病原体等検査業務管理体制組織図(平成28年度)

## 資料1 アンケート調査票及び解析概要

アンケート調査票（解答欄等の一部を省略）

病原体検査・取扱いにおける地衛研との連携に関するアンケート（17/9/7 連携会議準備用）

回答者ご所属：	
回答者氏名：	
連絡先 TEL：	
連絡先 e-mail：	

回答にあたっては、

**参考資料**：感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令の公布及び一部施行について(平成27年9月28日健発0928第1号 厚生労働省健康局長通知)

**参考資料**：検査施設における病原体等検査の業務管理要領(平成27年11月17日健感発1117第2号 厚生労働省健康局結核感染症課長通知)

**参考資料**：感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針(平成29年3月10日厚生労働省告示第69号)

**参考資料**：平成28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に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究」(H28-健危-一般-002)研究概要(平成29年3月)

等を参照してください。

(1) はじめに、回答者の病原体検査に関する現在の従事状況及び経験をお答えください。

1-1 現在、細菌又はウイルス検査業務(管理含む)に従事していますか？

下記の選択肢から選んで、番号を解答欄に記入してください。

(選択肢 1はい 1-3に進んでください 2いいえ 1-2に進んでください)

1-2 細菌又はウイルス検査の経験がありますか？

下記の選択肢から選んで、番号を解答欄に記入してください。

(選択肢 1はい 1-3に進んでください 2いいえ 1-4に進んでください)

1-3 大よその経験年数を、下記の選択肢から選んでお答えください。

(選択肢 11年未満 21～5年 35年以上)

1-4 病原体検査用検体あるいは菌株等を収集若しくは運搬業務の経験はありますか？

(選択肢 1はい 2いいえ)

1-5 衛生検査所立入検査を行った/随行した経験はありますか？

(選択肢 1ある 2ない)

(2) 地方衛生研究所(地衛研)による精度管理用検体の提供についてお尋ねします。

現在愛知県衛生研究所では、保健所及び衛生検査所の外部精度管理における検体(病原体)提供及び結果解析業務を年1回担当しています。このことについてお尋ねします。

2-1 保健所への検体提供を地衛研が行うことについて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

(選択肢 1現状維持若しくは回数増が望ましい 2地衛研以外の国や他機関から提供されることが望ましい 3わからない)

Ref) 参考資料 第七、同 II-54

2-1-1 現在、当所から外部精度管理用検体として保健所に配布する病原体は、封じ込めレベルがBSL2の三類感染症原因菌(コレラ菌、赤痢菌、腸管出血性大腸菌)及び食中毒原因菌(サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸炎ピブリオ、カンピロバクター)です。これら以外に配付候補として適当と思われる病原体がありましたら、下の解答欄に記入してください。

2-2 民間の衛生検査所への検体提供を地衛研が行うことについて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 1 現状維持若しくは回数増が望ましい 2 地衛研以外の国や他機関から提供されることが望ましい 3 わからない )

Ref) 参考資料 第七、同 11-54

2-3 医療機関の臨床検査室からも、精度管理用病原体の配付希望の声をきくことがあります。このことについて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 1 事情が許すなら地衛研による検体配付が望ましい 2 地衛研以外の国や他機関から提供されることが望ましい 3 わからない )

Ref) 参考資料 第七

### (3) 人材育成や研修等における地衛研のあり方についてお尋ねします。

3-1 現在愛知県衛生研究所が提供している( 県庁が企画し、当所職員が実施を担当する場合を含みます ) 研修は、本県における病原体検査体制の維持強化( 検査員の資質向上 ) に役立っているでしょうか? 次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 1 内容・量とも十分 2 内容が目的に合っていない 3 内容は問題ないが量が不足 4 内容は合っていないし量も不足 5 その他 6 わからない )

Ref) 参考資料 第一の五

3-2 国は、参考資料 「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」「19 教育訓練及び研修」において、各検査施設に対して教育訓練及び研修の実実施計画を定期的に策定すること、検査員に研修機会を与えること、指定した者に対して信頼性確保に関する研修機会を与えること を求めています。これらの研修について、お考えを選択肢及び自由記載でお教えてください。

3-2-1 検査員に対する教育訓練のうち初任者対象の OJT(On the Job Training)の実施について、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

Ref からは一部地衛研の窮状がうかがえます。

( 選択肢 1 現在自施設で実施しており今後も継続予定 2 現在実施しているが今後指導者が不在となったら自治体内他施設に任せたい 3 現在実施しているが体制の継続が厳しく他自治体等に任せたい 4 現職場に検査員初任者は配属されない 5 その他 6 わからない ) Ref) 参考資料 11-44

3-2-2 検査員に対する OffJT 教育訓練・研修について、どのような体制が望ましいとお考えですか? 該当する選択肢をすべて記載のうえ、差支えなければ選択理由もご記入ください。

( 選択肢 1 自治体内で研修が定期的開催されること 2 国等が実施する研修等を受けさせる旅費等が確保されること 3 学会・研究会に出席する旅費等が確保されること 4 現職場に検査員はいない 5 その他 6 わからない )

3-2-3 信頼性確保に関する研修について、現状をどうお考えですか? 次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

なお地衛研からは厚生労働省に対して( 水質や食品検査とは異なる ) 感染症に特化した信頼性確保部門に関する研修等の要望を予定しています。

( 選択肢 1 国が研修内容を示すべき 2 食品 GLP、水質 GLP の信頼性確保部門担当者研修で十分 3 現職場は検査施設ではない 4 その他 5 わからない )

3-3 地衛研による、自治体検査施設以外の( 例えば大学等に対する ) 研修機会の提供について、お尋ねします。

3-3-1 現在の提供形態は、所内見学、大学等が実施する実習への講師派遣が主となっています。このことについて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 1 大学等にも検体提供する等、現在より積極的な対応が望ましい 2 現状維持  
3 縮小する方向が望ましい 4 その他 5 わからない )

3-3-2 他県では、小学生や一般人に実験を含む施設公開を実施している機関もあります。当所は設計上一般人が実験室に出入りすることは想定されていませんが、見学は不可能ではないことをふまえて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 1 実習や見学受入れ等積極的な対応が望ましい 2 現状維持 ( 実施しない )  
3 その他 4 わからない )

**(4) 地方自治体が感染症法に基づいて実施する、感染症発生動向調査を含む病原体検査全般 ( 医療機関等における検体採取から疫学調査解析を含む結果還元まで ) のあり方について、お尋ねします。**

国は、参考資料 「指針」第二において「病原体に関する情報が統一的に収集、分析及び公表される体制を構築するとともに、患者に関する情報とともに全国一律の基準及び体系で一元的に機能する感染症発生動向調査体制を構築する必要」を述べていますが、食品衛生法における「収去」の体制とは異なり、参考資料 及び において記録等の対象とされているのは検査施設内の作業に限られています。このことに関して以下の質問にお答えください。

4-1 医療機関等での検体採取について、手順書を配布する等の標準化が必要でしょうか？

次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。( 選択肢 1 検査の実施主体である保健所 ( 県・市 ) が国から示されたひな形に基づいて作成した手順書を医療機関に配付する等して、標準化を進めるべき 2 検査を実施する機関 ( 地衛研等 ) が準備した手順書を配布すべき 3 感染研等から特段の指定がない限り採取を担当する医療機関に任せるべき ( 愛知県の現状 ) 4 その他 5 わからない )

4-2 採取された検体の搬送 ( ゆうパック利用を含む ) について、手順書等が必要でしょうか？ 次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 1 検査の実施主体である保健所 ( 県・市 ) が国から示されたひな形等に基づいて手順書を作成し、標準化を進めるべき 2 検体を受領するする機関 ( 地衛研等 ) が手順書を作成し、搬送者等に示すべき 3 搬送若しくは発出機関の判断に任せるべき 4 その他  
5 わからない )

**(5) その他病原体検査の精度管理及び検査体制全般について、ご自由にお答えください。**

5-1 感染症法に係る検査に関連して、地衛研の積極的関与を期待する項目等について、自由に記載して下さい。

5-2 地方自治体が担当する病原体検査の管理及び実施体制について、御意見等自由に記載して下さい。

5-3 法に基づく検査が開始されて改めて気づいたこと、懸念されること、今後とくに力を入れるべきと思われること、等自由に記載して下さい。

お尋ねは以上です。ご協力ありがとうございました。

8月28日(月)までに、電子メール添付ファイルにて回答の返送をお願いします。



## 病原体検査・取扱いにおける地衛研との連携に関するアンケートまとめ

**参考資料** :感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律施行規則の一部を改正する省令の公布及び一部施行について(平成 27 年 9 月 28 日健発 0928 第 1 号 厚生労働省健康局長通知)

**参考資料** :検査施設における病原体等検査の業務管理要領(平成 27 年 11 月 17 日健感発 1117 第 2 号 厚生労働省健康局結核感染症課長通知)

**参考資料** :感染症の予防の総合的な推進を図るための基本的な指針(平成 29 年 3 月 10 日厚生労働省告示第 69 号)

**参考資料** :平成 28 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に対する外部精度管理の導入と継続の実施に必要な事業体制の構築に関する研究」(H28-健危-一般-002)研究概要(平成 29 年 3 月)

回答者 6 名(大学 1、保健所行政 1、保健所試験検査 1、衛生研究所情報 1、衛生研究所微生物 2)

### (1)回答者の病原体検査に関する現在の従事状況及び経験。

1-3 現在、細菌又はウイルス検査業務(管理含む)に従事していますか？

(選択肢 1はい 3 2いいえ 3)

1-4 細菌又はウイルス検査の経験がありますか？

(選択肢 1はい 5 2いいえ 1)

1-3 大よその経験年数を、下記の選択肢から選んでお答えください。

(選択肢 1(1年未満) 0 2(1-5年) 2 3(5年以上) 4)

1-4 病原体検査用検体あるいは菌株等を収集若しくは運搬業務の経験はありますか？

(選択肢 1はい 6 2いいえ 0)

1-5 衛生検査所立入検査を行った/随行した経験はありますか？

(選択肢 1ある 6 2ない 0)

### (2)地方衛生研究所(地衛研)による精度管理用検体の提供についてお尋ねします。

現在愛知県衛生研究所では、保健所及び衛生検査所の外部精度管理における検体(病原体)提供及び結果解析業務を年 1 回担当しています。このことについてお尋ねします。

2-1 保健所への検体提供を地衛研が行うことについて(選択肢 1 現状維持若しくは回数増が望ましい

2 地衛研以外の国や他機関から提供されることが望ましい 3 わからない)

2-1 解答欄 1 全員

保健所では担当者が異動することが多く、地衛研が主体となって検体の提供から結果の評価・解析及び必要な技術研修等を一連の流れの中で実施することにより、組織として中核市を含めた総合的な技術力の維持・向上が期待できるため。

昭和 57 年度から実施している愛知県保健所試験検査精度管理事業の内部精度管理においても、同様の手法により成果をあげている。

第三者的な外部精度管理への参加は、今まで全くわからなかったことに気がついたりする利点もあると思うが、現在の方法は、県内の保健所の検査レベルを直接的に把握でき、その時点で必要に応じた検体として病源体を選ぶこともできるという点が現状にあっていと思う。

従来どおり、外部精度管理として、年 1 回の検体提供を希望する。

永年継続して実施している精度管理事業が保健所の検査精度の維持・向上に重要な役割を担っていると考える。

検体作成は地衛研にとって業務上プラスとなる。回数増は負担となるので年 1 回の現状が良い。

Ref) 参考資料 第七、同 11-54

2-1-1 現在、当所から外部精度管理用検体として保健所に配布する病原体は、封じ込めレベルが BSL 2 の三類感染症原因菌(コレラ菌、赤痢菌、腸管出血性大腸菌)及び食中毒原因菌(サルモネラ、黄色ブドウ球菌、腸炎ピブリオ、カンピロバクター)です。これら以外に配付候補として適当と思われる病原体がありましたら、下の解答欄に記入してください。

2-1-1 解答欄	特になし 法規制の影響で配布検体が限られてしまう現実があるが、衛生研究所が開催する研修の中で注意事項の修得などを行い、検査精度の向上を図っていくことは可能である。
	食中毒原因菌としては、実際の検査においてしばしば分離されるウエルシュ菌病原体検査の業務管理としては、三類感染症原因菌
	保健所の検査対象が三類感染症原因菌及び食中毒原因菌であるから現状のままでよい。

2-2 民間の衛生検査所への検体提供を地衛研が行うことについて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 **1 現状維持若しくは回数増が望ましい** 2 地衛研以外の国や他機関から提供されることが望ましい 3 わからない )

2-2 解答欄 1 全員

民間の衛生検査所はどこかの医療機関からの検体を受け付けても良く、また保健所設置市が登録先となっている場合もあり、必ずしも都道府県単位での業務を行っているわけではない。よって、検査機関個々の検査精度の確保が目的であれば、地衛研以外から提供される検体でもその役割を果たすことはできる。しかし実際には、これら衛生検査所の主たるユーザーは検体の集配が短時間で行える地元の医療機関であるため、地衛研から統一した検体を配布して精度管理を行うことにより当該地域における技術レベルの統一化がなされ、地域医療の向上に貢献できることになる。

また、調査結果の集計・解析を行うためには、一定数以上のデータ数が必要であるため、少なくとも現状維持での実施が望ましい。

なお、指針においても、県から民間検査機関等における検査等に対し技術支援等を実施すること、病原体等の情報の収集に当たって医師会等の医療関係団体、民間検査機関等と連携を図りながら進めることがそれぞれ重要とされている。

必要とされる作業量やコストは小さいものではなく大変と思うが、県内の衛生検査所の実態を直接的に把握することができ、利点は大きいと思う。

衛生研究所が実施するのが望ましいと思うが、衛生研究所の業務量が増加することを懸念している。現状のように、保健所への精度管理事業と同時に開催するなら民間の検査所への検体提供は可能か。

検体作成は地衛研にとって業務上プラスとなる。回数増は負担となるので年1回の現状で良い。

Ref) 参考資料 第七、同 11-54

2-3 医療機関の臨床検査室からも、精度管理用病原体の配付希望の声をきくことがあります。このことについて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

( 選択肢 1 事情が許すなら地衛研による検体配付が望ましい 2 地衛研以外の国や他機関から提供されることが望ましい 3 わからない )

2-3 解答欄 3 (4名)

指針では、感染症指定医療機関のみならず一般の医療機関における検査に対する技術支援等も重要としている。

しかしながら、自治体の登録を受けている民間衛生検査所を対象とする場合と異なり、医療機関の臨床検査室における業務範囲は様々であり、求めるレベルも大きく異なっているため、統一的な検体配布による指導は難しいと考える。

実際に外部精度管理に参加している臨床検査室が多いのか、少ないのか、また解決したい課題があるのか等現状を把握していないので、どのような形がいいのかわからない。

2-3 解答欄 2 (2名)

衛生研究所の負担が増加するため他機関に任せたいかがか。

地衛研の負担が大きすぎるため

Ref) 参考資料 第七

**(3) 人材育成や研修等における地衛研のあり方についてお尋ねします。**

3-1 現在愛知県衛生研究所が提供している(県庁が企画し、当所職員が実施を担当する場合を含みます)研修は、本県における病原体検査体制の維持強化(検査員の資質向上)に役立っているでしょうか? 次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答

(選択肢 1内容・量とも十分 2内容が目的に合っていない 3内容は問題ないが量が不足 4内容は合っていないし量も不足 5その他 6わからない)

3-1 解答欄 3(2名)

内容はバラエティに富み、テーマも最新の技術情報を取り込んでよく練られているなど、大変有用なものとなっている。ただし、初任者研修に関しては、受講できる人数枠が設けられているため、これを緩和していただけるとありがたい。

現在、中核市を含む各保健所では人事異動も頻繁に行われ、長期間のブランクがある担当者もしばしば見られることから、日程やカリキュラムを見直してでも研修生を幅広く受け入れていく必要があると考える。

内容については、その時々の方々の現場の検査員の意見をとりいれるのが最重要と思うが、保健所の試験検査課にいた経験から考えると、詳しい研修を受講希望する検査員の数は多く、受講する必要性は年々高まっているのではないかと推測する。

3-1 解答欄 1(1名)

現在、衛生研究所の状況に応じ、可能な限りの研修が実施されていると思う。さらに状況が改善されれば、初任者研修においては、検体塗抹から釣菌、判定までの一連を経験できる日程を希望する。

3-1 解答欄 6(3名)

**Ref) 参考資料 第一の五**

3-2 国は、参考資料 「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」「19 教育訓練及び研修」において、各検査施設に対して教育訓練及び研修の実実施計画を定期的に策定すること、検査員に研修機会を与えること、指定した者に対して信頼性確保に関する研修機会を与えること を求めています。これらの研修について。

3-2-1 検査員に対する教育訓練のうち初任者対象の OJT(On the Job Training)の実施について、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答し、差支えなければ選択した理由も記載してください。

Ref からは一部地衛研の窮状がうかがえます。

(選択肢 1現在自施設で実施しており今後も継続予定 2現在実施しているが今後指導者が不在となったら自治体内他施設に任せたい 3現在実施しているが体制の継続が厳しく他自治体等に任せたい 4現職場に検査員初任者は配属されない 5その他 6わからない) Ref) 参考資料 II-44

3-2-1 解答欄 4(2名)

現職場は検査を行っていないが、検体収集や運搬業務には携わっており、職員に対しては「1」の姿勢を持っている。

3-2-1 解答欄 2(1名)

現在の現場の検査員の方々の意見をとりいれていただくのが最重要と思いますが、今後、指導者の不足は明らかであり、系統だてて研修を行う施設が自治体内のどこかに必要なのではないかと。

3-2-1 解答欄 1(3名)

検査の OJT は、指導者が検査員と共に業務を行い初任者の検査手技を観察し指導しなければならないと考える。今後も所属毎に指導者となれる人員の配置を希望する。

3-2-2 検査員に対する OffJT 教育訓練・研修について、どのような体制が望ましいとお考えですか? 該当する選択肢をすべて記載。

(選択肢 1自治体内で研修が定期的開催されること 2国等が実施する研修等を受けさせる旅費等が確保されること 3学会・研究会に出席する旅費等が確保されること 4現職場に検査員はいない 5その他 6わからない)

3-2-2 解答欄 4(1,2,3)

現職場は検査を行っていないが、検体収集や運搬業務には携わっており、職員に対しては「1、2、3」を要望する。	
3-2-2 解答欄	4(2)
自治体内での研修も重要と思うが、全く外部の研修等も各自にとって大変勉強になるので、できるかぎり受講できる環境が必要。	
3-2-2 解答欄	1、2
1については可能な限りの研修が開催されているので継続し、2の予算を確保していただきたい。	
3-2-2 解答欄	4
3-2-2 解答欄	2、3
最新の手技、情報が得られるため。	
3-2-2 解答欄	1、2、3

3-2-3 信頼性確保に関する研修について、現状をどうお考えですか？ 次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答

(選択肢 1 国が研修内容を示すべき 2 食品 GLP、水質 GLP の信頼性確保部門担当者研修で十分 3 現職場は検査施設ではない 4 その他 5 わからない)

3-2-3 解答欄	3(1)
現職場は検査を行っていないが、検体収集や運搬業務には携わっており、職員に対しては「1」により全国レベルの均一化を要望する。	
3-2-3 解答欄	3(2 1?)
各自治体に対して、国がまずは統一した研修内容を示すべき。	
3-2-3 解答欄	1(2名)
病原体等検査の信頼性確保部門の担当者は食品及び水質検査の信頼性確保部門と異なる人員が勤めており、また、検査の種類により信頼性確保部門に求められるものも異なるため、研修が必要。	
3-2-3 解答欄	3

3-3 地衛研による、自治体検査施設以外の(例えば大学等に対する)研修機会の提供について、お尋ねします。

3-3-1 現在の提供形態は、所内見学、大学等が実施する実習への講師派遣が主となっています。このことについて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答。

(選択肢 1 大学等にも検体提供する等、現在より積極的な対応が望ましい 2 現状維持 3 縮小する方向が望ましい 4 その他 5 わからない)

3-3-1 解答欄	5(2名)
大学等からの要望について十分把握していないため。	
大学の状況を把握していないためわからない。	
3-3-1 解答欄	2(4名)
自治体検査施設以外の機関とより連携を深めていくのが理想と思うが、人員やコストの面から、実際には難しい。	
協力が得られるか疑問がある。	

3-3-2 他県では、小学生や一般人に実験を含む施設公開を実施している機関もあります。当所は設計上一般人が実験室に出入りすることは想定されていませんが、見学は不可能ではないことをふまえて、次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答。

(選択肢 1 実習や見学受入れ等積極的な対応が望ましい 2 現状維持(実施しない) 3 その他 4 わからない)

3-3-2 解答欄	1(1名)
遠足のようにその学年すべてを一律に招くのではなく、あくまでも学校のカリキュラムとは別に、希望者のみを限定して受け入れることができれば、科学者を目指す原点を生み出す良い活動になると考える。その意味で、一般人を対象とする必要性は感じない。	

すぐには難しいかと思うが、施設の業務の重要性や存在意義を理解してもらうためには、たとえ一部分の施設公開であっても大変大きな効果を生むと思う。

3-3-2 解答欄 2 (1名)

3-3-2 解答欄 3 (4名)

現状のままであると危機管理上、一般の方の見学は望ましくない。建て替えに伴い、立ち入り禁止区域と見学コースがしっかり分けられるのであれば、施設公開を行うことにより、衛生研究所を県民にアピールできる良い機会になると考える。

強い要望があれば検討する。

#### (4) 地方自治体が感染症法に基づいて実施する、感染症発生動向調査を含む病原体検査全般

(医療機関等における検体採取から疫学調査解析を含む結果還元まで)のあり方について、お尋ねします。国は、参考資料「指針」第二において「病原体に関する情報が統一的に収集、分析及び公表される体制を構築するとともに、患者に関する情報とともに全国一律の基準及び体系で一元的に機能する感染症発生動向調査体制を構築する必要」を述べていますが、食品衛生法における「収去」の体制とは異なり、参考資料及びにおいて記録等の対象とされているのは検査施設内の作業に限られています。このことに関して以下の質問にお答えください。

4-1 医療機関等での検体採取について、手順書を配布する等の標準化が必要でしょうか？

次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答。

(選択肢 1 検査の実施主体である保健所(県・市)が国から示されたひな形に基づいて作成した手順書を医療機関に配付する等して、標準化を進めるべき 2 検査を実施する機関(地衛研等)が準備した手順書を配布すべき 3 感染研等から特段の指定がない限り採取を担当する医療機関に任せるべき(愛知県の現状) 4 その他 5 わからない)

4-1 解答欄 1 (1名)

検体の採取方法は成績に大きく影響すると考える。できれば、検体採取の標準化を目指すことが必要。

4-1 解答欄 2 (1名)

どの施設が作成するにしても大変だとは思いますが、検査実施機関が直接、手順書を作成し配布するのがいいと思う。

4-1 解答欄 3 (2名)

食品G L Pや水質G L Pのように行政処分や適否判断を前提としたものではないので、手順書で工程のすべてを標準化するべきではないと考える。

ただし、必要最小限の注意事項は確実に遵守されるよう伝達しなければならない。

国の指示があってからが良い。

4-1 解答欄 5 (2名)

4-2 採取された検体の搬送(ゆうパック利用を含む)について、手順書等が必要でしょうか？

次の選択肢からお考えに近いものを一つ選んで回答。

(選択肢 1 検査の実施主体である保健所(県・市)が国から示されたひな形等に基づいて手順書を作成し、標準化を進めるべき 2 検体を受領する機関(地衛研等)が手順書を作成し、搬送者等に示すべき 3 搬送若しくは発出機関の判断に任せるべき 4 その他 5 わからない)

4-2 解答欄 1

全国的に標準化を進めるべきと考える。

4-2 解答欄 2

検体を受領する機関が手順書を作成し、直接、搬送者等に示すことができれば、受領の際、支障が起きにくい。

4-2 解答欄 3

食品G L Pや水質G L Pのように行政処分や適否判断を前提としたものではないので、手順書で工程のすべてを標準化するべきではないと考える。

ただし、必要最小限の注意事項は確実に遵守されるよう伝達しなければならない。

4-2 解答欄 4

ゆうパックを使用する場合は手順書を示す必要がある。

**(5)その他病原体検査の精度管理及び検査体制全般について、ご自由にお答えください。**

5-1 感染症法に係る検査に関連して、地衛研の積極的関与を期待する項目等について。

5-1 解答欄	<p>感染症対策を進めるに当たっては、何より地衛研での検査対応が頼りになっている。</p> <p>近年でも、鳥インフルエンザ H7N9 やジカウイルスなど過去に国内で流行したことの無い感染症について速やかに検査体制を確立し、患者の早期発見を可能にしている。</p> <p>これら技術力の確保には、地衛研において日常から幅広いウイルス・細菌検索が行われていることがベースになっている。</p> <p>感染症法に基づく検体採取が可能になったことを生かして、より効果的な検体の確保が行われるよう、感染症対策担当部局との十分な情報交換をお願いしたい。</p>
5-1 解答欄	<p>地衛研のマニュアルや文書ひな形等をしっかり整備し、保健所の試験検査課に提示し、各現場に則した文書整備ができるよう技術指導も含めて指導力を発揮することを期待。</p>
5-1 解答欄	<p>非典型的な性状を示す菌を分離した時などに相談するので、指導をお願いしたい。また、全国的に発生している感染症などの最新の情報を伝達してほしい。</p>

5-2 地方自治体が担当する病原体検査の管理及び実施体制について。

5-2 解答欄	<p>カルバペネム耐性腸内細菌科細菌などについて地衛研で必要な検査を進めるよう国から事務連絡が発出されているが、検査を行うために必要な県の予算計上が十分でなかったり、迅速な執行ができなかったりするため対応に苦慮している。</p> <p>全国からの幅広いデータが必要とされるなら、10/10 国庫補助事業として検査対応が推進されることを希望する。</p> <p>医療機関から検査を依頼される場合、行政的に受け入れるべきものと、衛生検査所への依頼が可能で単にその施設で検査ができないだけのものとの仕切りが難しい。</p> <p>0157 など当初は医療機関が検査できず、地衛研や保健所などで行政的に検査を行っていたが、院内検査室や衛生検査所での検査対応が確立されるに従い手を引いた。</p> <p> Deng熱など簡易キットが発売されているものもあるが、地域の技術的中核機関として、ある程度検体を受け入れることもやむを得ない面があり、判断に苦慮する。</p> <p>検査担当者も他の一般職員と同等に扱われ、ジョブローテーションが適用されている。</p> <p>また、健康危機管理対応の必要性とは別に、年々定数削減されており、このような状況での技術の継承が心配である。</p>
5-2 解答欄	<p>病原体等検査の業務管理は、食品や水質検査の業務管理とは異なり融通の利かせられる業務管理でなければならないという考え方に基づき、書類は、法に基づいた項目のみを記載できる様式としたため、それほど負担なく業務を遂行できている。このまま進めていきたい。</p>

5-3 法に基づく検査が開始されて改めて気づいたこと、懸念されること、今後とくに力を入れるべきと思われること等。

5-3 解答欄	<p>愛知県では、保健所試験検査室における患者の接触者検診や病原体消失確認等の健康診断においても業務管理を適用している。このため、患者への行政的対応においても、その根拠となる病原体等検査結果に係る信頼性の確保が図られている。</p> <p>ただし、この分の業務量が検査を実施する保健所に付加されており、今後新たな作業が求められた場合には、内容次第で日常の業務全体に影響が及ぶ可能性もあるため、その際は十分な調整が必要と考える。</p>
5-3 解答欄	<p>5-2 に記載した方針が今後維持されていくか不安。食品の GLP と同じように考え、詳細な部分まで型にはめてしまうような業務管理に変えないよう若い世代を教育していかなければならない。</p>

## 資料2 平成28年度に愛知県において実施された保健所試験検査精度管理事業の概要（病原体検査関係を抜粋）

### 2-1 平成28年度 保健所試験検査精度管理事業 実施計画

対象：県及び中核市（豊橋市、岡崎市及び豊田市）保健所 合計7施設

#### 1 検体配布方式

項目：病原細菌

検体：病原菌を接種した保存培地 3検体

#### 2 研修方式

微生物検査技術研修（半日）

場所：衛生研究所 研修室

内容：

- 1 全血対応、簡易迅速法の第四世代 HIV（抗原＋抗体）スクリーニング検査について
- 2 各施設における病原細菌の検出状況について

寄生虫検査技術研修（半日）

場所：愛知医科大学2号館（研究棟）組織実習室

内容：寄生虫及び寄生虫卵の同定等について（愛知医科大学医学部感染・免疫学講座の協力）

### 2-2 平成28年度保健所等試験検査初任者研修 概要

#### （1）方針

試験検査に関する技術とそれらの関係知識を習得するとともに、各検査実施施設の実務担当者間の交流を深めることを目的として、保健所試験検査（中核市保健所を含む。）及び衛生研究所の初任者を対象とした研修会（以下、「初任者研修」という。）を実施する。

初任者研修は、基礎的な試験検査技術及びその知識の習得を目的とした実習及び講義（以下、「基礎的技術研修」という。）を実施する。

#### （2）対象者

原則、実務経験が2年未満で県及び中核市（豊橋市、岡崎市及び豊田市）保健所において試験検査業務に従事する職員並びに衛生研究所職員の実務担当者を対象とする。ただし、初任者研修の受け入れ枠に空きがある場合は、生活衛生課が必要と認めた者（初任者研修未受講者及び試験検査業務を長期間行っていない者）も対象とする。

#### （3）実施内容

別紙1「平成28年度 初任者研修（微生物検査）実施結果」及び別紙2「平成28年度 初任者研修（理化学検査）実施結果」のとおり（別紙2は略）。

#### （4）参加者

微生物検査 実習5名、講義5名

理化学検査 実習6名、講義6名

#### （5）実施日程

微生物検査 平成28年7月13日（水）から7月15日（金）の3日間

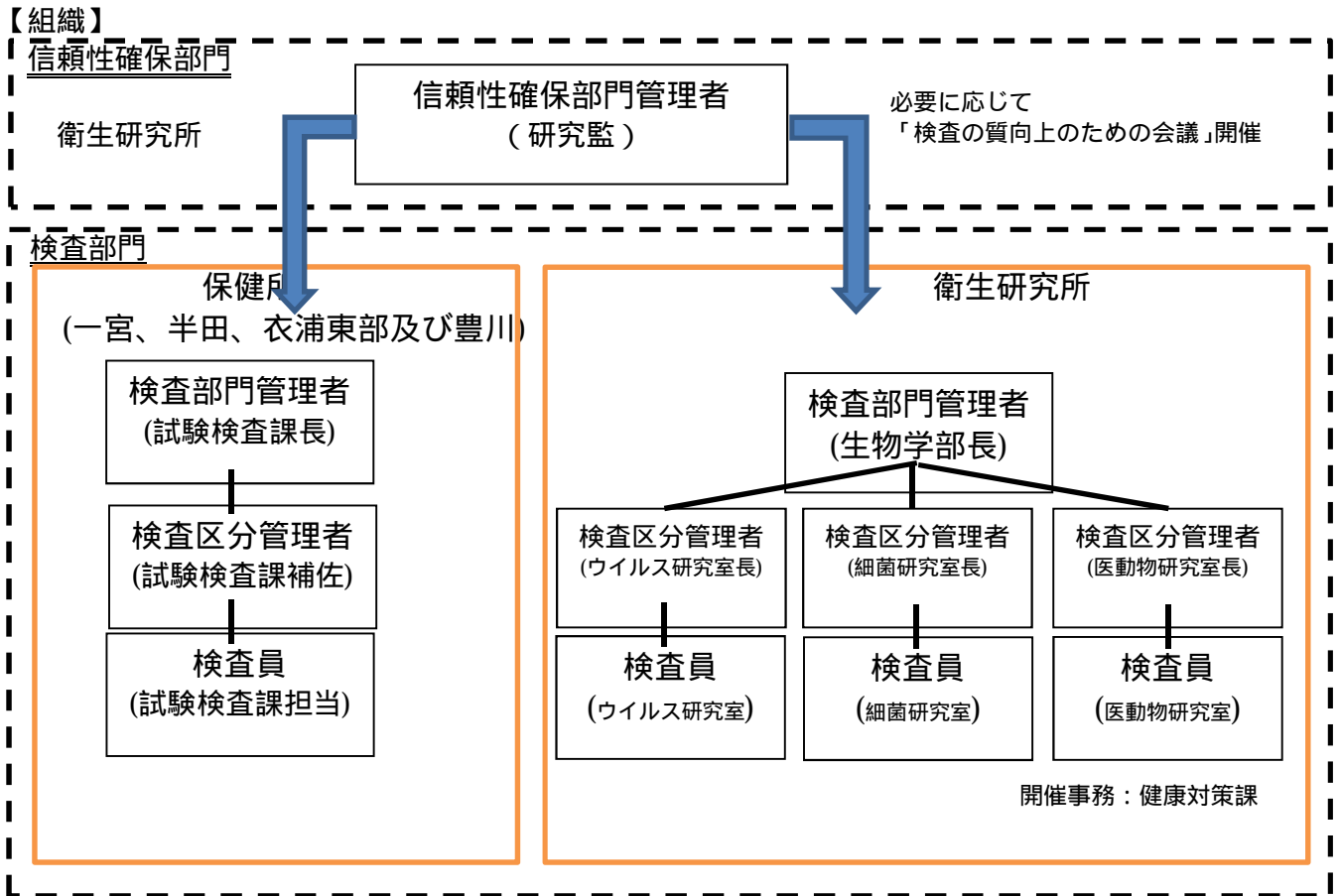
理化学検査 平成28年8月18日（木）から8月19日（金）の2日間

別紙 1 (一部省略) 平成 28 年度 初任者研修 (微生物検査) 実施結果

	講習名	講習内容	講師	実施 時間帯
講義	感染症法と病原体の管理 について	(管理区域立入者への教育訓練を含む。)	衛生研究所 所 長	第 1 日 午前
講義	分離培地と確認培地につ いて	培地の組成と選択剤を含む培地成分の役割 糖分解と培地変色の関係 確認培地に加える試薬について等	衣浦東部 保健所 再任用主任	第 1 日 午前
実習	培地作製	SS、DHL、TCBS、TSI、LIM 等の培地	衛生研究所 室 長 主 任 師 技 師	第 1 日 午前
実習	培地作製 安全キャビネットの使 用上の注意と病原体の 分離培地への塗抹	SMAC、CCDA、(Skirrow) 培地 安全キャビネットの使用上の注意点等  赤痢菌、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属 菌、ビブリオ属菌、セレウス菌、ウエルシ ュ菌、カンピロバクター、黄色ブドウ球菌 の分離培地への塗抹	衛生研究所 室 長 主 任 師 技 師	第 1 日 午後
実習	PCR	PCR 説明 DNA 抽出 反応試薬調製 PCR 反応、アガロースゲル作製	衛生研究所 室 長 主 任 師 技 師	第 2 日 午前
実習	分離培地の観察と 確認培地への接種	赤痢菌、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属 菌の分離培地の観察と確認培地への接種 ビブリオ属菌、セレウス菌、ウエルシュ菌、 黄色ブドウ球菌、チフス、パラチフス菌の 分離培地の観察 (チフス、パラチフス菌は衛研が確認培地 へ接種)	衛生研究所 室 長 主 任 師 技 師	第 2 日 午後
講義	試験検査体制	試験検査体制の概要	生活衛生課 検査管理 G 課長補佐	第 2 日 午後
講義	食品からの EHEC 検査法	食安発 1120 第 1 号「腸管出血性大腸菌 026, 0103, 0111, 0121, 0145, 及び 0157 につい て」の概要	衛生研究所 主 任 師	第 2 日 午後
実習	電気泳動	電気泳動 染色、撮影 質疑応答等	衛生研究所 室 長 主 任 師 技 師	第 3 日 午前
実習	分離培地、確認培地の 観察と血清型別	赤痢菌、腸管出血性大腸菌、サルモネラ属 菌の確認培地の観察と血清型別 カンピロバクターの分離培地の観察 チフス、パラチフス菌の確認培地の観察 質疑応答等	衛生研究所 室 長 主 任 師 技 師	第 3 日 午後



資料3 愛知県における病原体等検査業務管理体制組織図（平成28年度）



## 5. 地方衛生研究所における病原微生物検査体制と「検査の質の確保」に関する研究

研究分担者	皆川 洋子、松本 昌門	愛知県衛生研究所
	調 恒明	山口県環境保健センター
	四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
	岸本 壽男	岡山県環境保健センター
	佐野 一雄	名古屋市衛生研究所
	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
	宮崎 義継、脇田 隆字、大石 和徳	国立感染症研究所
研究協力者	猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所
	大井 洋	東京都健康安全研究センター
	香月 進	福岡県保健環境研究所
	岸本 剛	埼玉県衛生研究所
	（以上項目小班）	
	垣添 寛和、鈴木 裕子	愛知県衛生研究所
	及びアンケート調査に協力された地方衛生研究所担当者	

### 研究要旨

研究初年度に地方衛生研究所（地衛研）全国協議会（地全協）会員を対象として実施した「病原体検査の質確保」体制構築状況の調査に際して各自治体の保健所、衛生検査所等の外部精度管理実施への協力実績ありと回答された17機関（回答機関の21%）に対して追加調査を実施し、全機関より回答が得られた。配付実績のある検体等には、感染症法に基づく検査対象病原体のみならず食中毒原因菌や内部精度管理用病原体等が含まれていた。今後の検体提供継続については、2機関が業務集約等に伴い縮小～中止する予定と思われた。残り15機関は地全協の地域別に置かれている6支部全てに分散しており、将来支部単位若しくは支部相互に検体提供を実施する一定の素地はある、と考えられる。

### A. 研究目的

平成28年4月に施行された改正感染症法に基づき病原体情報の収集に法的根拠が付与され知事等の事務となり、地方衛生研究所（地衛研）・保健所等の実施施設には検査精度の維持向上とともに定期的な精度管理への参加が課せられた。本分担研究では、従来から設置要綱（参考文献1）等により「地域における科学的かつ技術的に中核となる機関」と位置づけられる地衛研が、地域における病原体検査レベルの維持及び強化対策のなかで、地域他機関への精度管理用検体等の供与実績を調査し、地域の検査機関、あるいは地衛研相互に外部精度調査等に用いる検体を配付する可能性等について検討した。

### B. 研究方法

#### 1. アンケート調査

平成28年11月に地方衛生研究所全国協議会（地全協）会員（全81機関）を対象として実施した「病原体検査の質確保」体制構築状況の調査において、「他機関への精度管理用検体提供等を実施している」と回答した17機関（回答機関の21%に相当）に対して、資料1のとおり追加アンケート調査への回答を依頼した。

### C. 研究結果

#### 1. 地衛研を対象とするアンケート調査実施

平成29年12月に上述のとおり17機関に依頼したところ、全ての機関より速やかに回答をいただいた（回答率100%）（資料1）。地全協には地区別に6支部（北海道・東北・新潟、関東・甲・信・静、東海・北陸、近畿、中国・四国、九州）が置かれているが、調査

対象となった 17 機関の分布は、関東・甲・信・静に 7 機関、他の 5 支部に各 2 機関と分散していた。以下に調査結果の概要を記す。

## 2. 保健所・衛生検査所等の外部精度管理への協力

前回調査時に実績ありと回答した 17 機関全てに、引き続き 29 年度も他機関への外部精度管理（用検体提供等）実施の実績があった。保健所に対して 13 機関、民間の検査センター等衛生検査所（臨床検査技師等に関する法律に定める場所を想定）に対して 5 機関、保健所・衛生検査所以外の試験検査機関への協力は 6 機関であった（表 1 及び参考）。保健所の実績のある 13 機関中 1 機関は衛生検査所及びその他の試験検査機関にも実績があり、3 機関は衛生検査所に、2 機関はその他の試験検査機関に対する配付実績があった。今回の回答では、28 年度調査に比べ衛生検査所に対する実績が 2 機関減少していたが 28 年度に「衛生検査所へ実績あり」と回答された 7 機関の中に、食品衛生検査所も含めていた機関のあることが判明した。これは 28 年度に実施したアンケート調査票において衛生検査所の定義を明記しなかったことが原因である。

28 年度に比べ 29 年度における実施回数等の増減を尋ねたところ、17 機関中減少した機関はなく、増加が 3 機関(18%)、不変が 14 機関であった。

配付実績のあった検体の性状（表 3 - 1）及び菌種等(表 3 - 2)は表に示す通りで、三類感染症病原体及び食中毒原因物質（細菌及びノロウイルス）に加えて、各種検査の内部精度管理等に用いられる指標菌など非病原菌の実績もあった。

検体配付の実施計画を実質的に決定する機関について尋ねたところ、回答した地衛研としたのは 6 機関（35.3%）、一部は地衛研が決定するとした 1 機関を含めると 7 機関(41.1%)であった。他は、自治体本庁であった（専門委員会を設置するケースを含む）。（表 4）

項目(3)-3 において外部精度管理実施体制に関する課題について尋ねた。課題があると回答した

のは 17 機関中 2 機関。具体的な内容は、

- ・検査技術力の維持・継続
- ・精度管理参加機関への結果の返し方について

検討したい

であった。他の 15 機関は、本項目では「課題はない」と回答していた。しかし、課題はないと回答した機関のなかにも、地全協への期待(表 6)や自由記載(表 8)において、研修開催の要望等がみられた。

項目(4)において 30 年度以降、外部精度管理の実施に関する見直しの有無について尋ねたところ、「はい」と回答した機関は 1 機関、回数・機関数・検体数は「不変」との回答であった。

現在見直しが行われているか、との問いに対して「いいえ」と答えた 16 機関からの追加記述等をみると、現在保健所への検体提供を実施しているが地衛研への検査集約化が検討中である、との回答が 1 機関からあった。他に次年度より対象となっていた衛生検査所が臨床検査技師会や医師会等で実施されている外部精度管理に参加することとなって、地衛研からの検体提供は行わない予定との回答が 1 機関からあった。

## 3. コメント等記載欄

表 5, 6, 7, 8 に、追加記載事項や地全協及び支部に期待すること、外部精度管理全般に関する自由記載を示した。

今後の検体配付に対する見通しや、地研間の連携への期待等について、コメントがよせられた。

一方、検体の準備等が地衛研担当部署の負担に関するコメントも複数あり、食品衛生検査における（一財）食品薬品安全センター秦野研究所のような全国の実施体制に言及するものもあった。

## D. 考察

地域保健対策の推進に関する基本的な指針(1)は、地衛研に「地域における科学的かつ技術的に中核となる機関」としての役割を求めている。一部の地衛研は、**30 年以上にわたり地域の保健所試験検査課・民間衛生検査所等検査機関に対して細菌検査用精度管理検体の供給などを担当して**

おり、29年度も17機関の実績が明らかになった。一部の自治体では自治体内の検査実施機関を集約する動きが進行中で、17機関中2機関の回答からは、近い将来検体提供を行わなくなる可能性が読み取れた。

一方今回の法改正に伴い、感染症法に基づく検査を実施する保健所試験検査課にも研修や精度管理を行う義務が生じており、検体配付の対象となる検査施設は、地衛研に加えて地全協に加入していない保健所の試験検査担当部署などがあり、100を優に超えている。因みに平成29年度に厚生労働省が72施設を対象として実施した外部精度管理課題1腸管出血性大腸菌に、参加を希望した自治体は103を数えた。病原体検査施設を複数設置する自治体は少なくない(例:愛知県の場合、独自に保健所を設置している名古屋市・豊田市・豊橋市・岡崎市を除いて1地衛研+4保健所試験検査課の5施設を設置)。

29年度の課題1は国立感染症研究所(感染研)の細菌研究者数名が、72施設に対して各3菌株を送付するプロセスを含む全ての工程を、外注することなく担当されたと理解している。しかし健康危機対応並びに微生物学研究推進の観点からは、検体配付等のシステムの確立が確認された後には(感染研の指導のもと)実務は他機関に担当させる体制が考慮されるべきではないかと考えられる。現在食品衛生法に基づく試験検査の分野で全国の検査施設に検体提供等の実績をもつ、(一財)食品薬品安全センター秦野研究所は、病原菌配付の予定があるとは聞いていない。精度管理が法により求められる以前から菌株等を地域の検査機関等に提供する実績をもち、従来から感染研との交流が盛んな地衛研は、感染症法に基づく検査体制を自ら維持強化する観点からも、精度管理用菌株配付実務を担当するメリットがある

かもしれない。その際は、衛生検査所や病院内に設置された臨床検査室が受けている臨床検査に関する外部精度評価も参考に必要がある。

地衛研間の協力体制として、将来は「全国規模」と「自治体内」の中間的な規模、すなわち地全協の支部(全国に6つ)あるいはブロック(支部内に2つ程度)レベルでの精度管理等連携を考えることも有益と思われる。

## E. 結 論

地衛研の病原体検査管理体制について、地全協会員を対象に調査したところ、全ての機関から回答の協力を得られた。実績のある機関は地全協の地域別に置かれている6支部全てに分散しており、将来支部単位若しくは支部相互に検体提供を実施する一定の素地はある、と考えられる。

## F. 研究発表

### 1) 論文発表

皆川洋子:地方衛生研究所の役割 臨床とウイルス(印刷中)

### 2) 学会発表

なし

## 参考文献

1. 地域保健法第四条第一項の規定に基づく地域保健対策の推進に関する基本的な指針(平成6年12月1日厚生省告示第374号)最終改正:平成27年3月27日厚生労働省告示第185号

## 資料

- 1 アンケート調査依頼文、調査項目及び結果概要(図表)

## 資料

### 1-1 アンケート調査依頼文

平成 29 年 12 月 12 日

前年度回答いただいた地方衛生研究所全国協議会会員各位  
(病原体検査部門管理者若しくは担当者様)  
感染症法に基づく病原体検査体制に関する追加調査協力のお願い(依頼)

いつもお世話になっております。ワクチン不足のなかでインフルエンザ流行期を迎え、多忙な毎日をお過ごしのことと拝察します。

昨年度の精度管理班によるアンケート調査には御協力賜り、ありがとうございました。今年度は班会議及び精度管理部会において、他機関に対する精度管理検体供与等を実施されている全国 17 機関を対象に追加調査を実施することとなりました。御多忙のところまことに恐縮ですが、答えにくい設問の回答は省略されても結構ですので御協力賜りたく、よろしくお願い申し上げます。

なお調査結果概要は機関が特定されない形で研究報告書に記載するとともに、地全協ネットワークを介して会員に還元します。ご参考までに 28 年度研究報告書の関係部分を添付いたします。

つきましては別添のシートについて、12 月 25 日(月)までに電子メール(eiseiken@pref.aichi.lg.jp)又は地研 info にてご回答のほどお願いいたします。

次年度以降の精度管理部会活動方針にも関連する事項であり、重ねてご協力のほどよろしくお願い申し上げます。

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に対する外部精度管理の導入と継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究(H28-健危-一般-002)」班 研究代表者・地全協精度管理部会 部会長 皆川 洋子

(愛知県衛生研究所)

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

TEL:052-910-5618(代表)5604(直通)

FAX:052-913-3641

## 1-2 アンケート調査項目

感染症法改正に伴い「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」が示され、感染症検査の業務管理が強化されました。アンケートにご協力をお願いいたします

**選択肢** 緑のセル: プルダウンメニューから適切な選択肢を選んでください。

### (1) 研究所・回答者情報をお願いします

研究所名:	
回答者所属部署:	
回答者職名・氏名:	
連絡先 TEL:	
連絡先 e-mail:	

### (2) 29 年度も引き続き保健所、衛生検査所等の外部精度管理を実施(あるいは実施に協力)していますか。

「はい」の場合、29 年度実施回数、配布対象機関数及び機関あたり配布検体数を右記の属性毎にお答えください。

	実施回数	機関数	機関あたり検体数
(2)-1 保健所			
(2)-2 衛生検査所(検査センター等)			
(2)-3 その他			

その他を選んだ場合、具体的に記入してください。

(2)-4 実施回数や検体数は 28 年度に比べて増えましたか、減りましたか、不変ですか？

### (3) 外部精度管理の実施(あるいは実施に協力)業務の実施体制についてお尋ねします。

(3)-1 検体として具体的には何を配付していますか？(菌株・遺伝子検出用等に不活化した検体・その他)

その他を選んだ場合、具体的に記入してください。

(3)-1A 菌株を配付されている機関にお尋ねします。28-29 年度の間に配布した菌の種名等を差支えない範囲でご教示ください。

例: 赤痢菌

(3)-1B 遺伝子検出等の検査に供する不活化検体を配付されている機関にお尋ねします。28-29 年度の間に配布した検体の病原体名等について、差支えない範囲でご教示ください。

例: 結核菌

例: ノロウイルス

(3)-1C 「その他」検体を配付されている機関にお尋ねします。28-29 年度の間に配布した検体の病原体名等について、差支えない範囲でご教示ください。

例: 結核菌

例: HIV-1

例: マラリア原虫

(3)-2 実施計画を実質的に決定する機関は貴所ですか？

(「いいえ」を選択された場合は、具体的に記入してください。)

例: 県庁事業課

(3)-3 外部精度管理の実施における貴所の体制において現在若しくは近い将来解決を要する課題がありますか？

(「はい」を選択された場合は、具体的に記入してください。)

(3)-4 貴所が外部精度管理を実施(あるいは実施に協力)するにあたり、地全協若しくは支部に期待する活動等ありましたら、下欄に記載してください。

(3)-5 外部精度管理の実施体制について追加記述、御意見等ありましたら記載してください。

(4)30 年度以降、外部精度管理の実施(あるいは実施に協力)に関して、見直し(貴所が関与する形で)行われていますか。

「はい」の場合、可能な範囲で以下の設問にお答えください。

(4)-1 実施回数を増やす方向ですか、減らす方向ですか、不変ですか。

(4)-2 対象機関数を増やす方向ですか、減らす方向ですか、不変ですか。

(4)-3 機関当たり検体数を増やす方向ですか、減らす方向ですか、不変ですか。

(4)-4 外部精度管理の見直し(変更)について追加記述、御意見等ありましたら記載してください。

(5)外部精度管理実施に関するご意見等ありましたら、自由に記載して下さい。

### 1-3 アンケート回答概要

表1 質問項目(2) 外部精度管理等協力の実績1

	実施 衛研数	対象機 関数計	配布対象機関数の分布											
			23	21	20	17	7	6	5	4	3	2	1	
保健所	13	81	1			1		1		2	3	2	3	
衛生検査所	5	49		1	1				1		1			1
その他	6	20						1		1	2	1	1	
	17	150												

実施回数は全て1回(ウイルス・細菌各1回を含む)

表1-1 「その他」の内訳

「その他」の回答記載	地衛研数
中核市地衛研、地衛研内(支所・他課)	2
食肉衛生検査所	5
公衆衛生センター	1

(参考)保健所・衛生検査所等の外部精度管理への協力(平成28年度調査より)

	実施 衛研数	対象機 関数計	配布対象機関数の分布										
			23	21	10	7	6	5	4	3	2	1	
保健所	13	81	1		1	2	1	1	3	2	2	1	
衛生検査所	7	66	1	1				1	1	3	2		
その他	3	10					1			1		1	
総計	17	157											

表2 質問項目(2) 外部精度管理等協力の実績2

	実施 衛研数	配布機関あたり検体数の分布						
		6	5	4	3	2~3	2	1
保健所	13	1	1	2	6	1	2	
衛生検査所	5			1	2			2
その他	6			1	2		2	1
	17							

実施回数は全て1回(ウイルス・細菌各1回を含む)

表 3 - 1 質問項目(3)-1 配付した検体に関する事項 1

配付した検体の性状	菌株(感染症病原体・食中毒原因菌・内部精度管理用指標菌など)	遺伝子検出用検体	その他
地衛研数	16	1	4
検体の性状			模擬水様便、模擬尿 生菌数測定用芽胞液 菌株を混和した食材 糞便乳剤

表 3 - 2 質問項目(3)-1 配付した検体に関する事項 2

配付した検体の性状	菌株(感染症病原体・食中毒原因菌・内部精度管理用指標菌など)	遺伝子検出用検体	その他
地衛研数	16	1	4
菌種等(地衛研数)	赤痢菌(6)	赤痢菌	サルモネラ (1)
	コレラ菌(2)	コレラ菌	ビブリオ属菌 (1)
	腸管出血性大腸菌 EHEC(11)	ノロウイルス	黄色ブドウ球菌 (1)
	サルモネラ(9)		非病原性大腸菌 (1)
	腸炎ビブリオ(3)		枯草菌 (1)
	カンピロバクター(3)		ノロウイルス (1)
	黄色ブドウ球菌 (2)		
	エルシニア・エンテロコリチカ(2)		
その他 1 地衛研から回答のあった菌種	百日咳菌、肺炎桿菌(MBL+, ESBL+)、リステリア菌、組織侵入性大腸菌、エンテロバクター、エロモナス、プロテウス、サイトロバクター、 <i>Enterococcus faecium</i> , <i>Staphylococcus saprophyticus</i>		

表 4 質問項目(3)-2 実施計画を実質的に決定する機関について

決定する機関	地衛研数
地衛研(回答機関)	6
保健所は地衛研、衛生検査所は本庁医療政策部	1
本庁(保健所)	2
本庁医務薬務課及び衛生検査所精度管理専門委員会	1
本庁薬務課	1
本庁事業課(健康課、健康対策課、医療対策課、衛生管理課、食品・衛生課、生活衛生課)	6

表 5 質問項目(3)-5 外部精度管理の実施体制に関する追加記述等

	現在行っているものは、「外部精度管理」というよりも、県内検査機関の「内部精度管理」という位置づけで行っている。
	実施回数と機関あたり検体数は不変であったが、29年度は中核市の一部が部分参加(一部の検体について参加しない)となった。30年度以降は元に戻る見込み。
	3菌種を1つの検体とし、キャリアブリア培地に混ぜ2検体作り(合計6菌種)、全施設に同じものを配付している。(ただし、食肉検査所にはビブリオ属は除く。)
	本県ではすべての保健所の検査係が当所に統廃合されたため、当所から保健所に対して感染症に係る精度管理を実施することはない。 なお、食肉衛生検査所に対しては食品 GLP に関する精度管理を実施している。

表 6 質問項目(3)-4 地全協若しくは支部に期待する活動等



	現状実施している外部精度管理については特になし。
	県や保健所設置市保健所試験検査担当者に対する研修項目について、地全協(研究班活動等により)で検討する機会があるとよい。将来支部単位で研修を合同で開催できる体制を構築できると助かる。
	感染症法や感染症マニュアルにないが、病院等の細菌検査で扱う菌種には地研では扱うことのない菌種も多い。それらについて相談することができれば有り難い。
	精度管理を実施している他機関との情報交換
	技術研修会の開催

表7 質問項目(4)-4 外部精度管理の見直し(変更)について追加記述、意見等

	当所においては、平成2年度より衛生検査所への外部精度管理調査を実施しているが、予算減の対象になっており、調査方式、規模等が縮小し続けている。その結果、適切な外部精度管理調査を維持させることが厳しくなっている。次年度以降については不明な点が多く、どのような対応になるのか当所では把握できていない。
	従来は食中毒と感染症を同様に病原体同定を実施していたが、県等が実施する3類感染症病原体検査については29年度よりオープン方式(例:赤痢菌が陽性か陰性が報告)を導入した。
	本年度まで、市内の登録衛生検査所における精度管理の微生物検体の作成を行ってきた。検体はその年によって異なるが、市販の菌株を数種類混合し、同定させる方法で行っている。平成30年度以降は、臨床検査技師会や医師会等で実施されている外部精度管理に参加することになり、当所で検体提供を行わない予定である。

表8 質問項目(5) 外部精度管理実施に関する意見等自由記載

	外部精度管理で「不適」となった施設の中には、どこに問題があるのかが見えていない施設もある。本来は内部精度管理で対応するところであるが、適切な内部精度管理につなげるためにも、外部精度管理後のフォローアップ研修等があることが望ましいと考える。現在、厚労科研で実施母体を民間としたレジオネラの外部精度管理調査の構築に努めているが、民間で有るが故の継続性の難しさ(収益性の考慮)がある。そのような中、前述同様、外部精度管理で「不適」となった施設の中には、問題点が分からず困惑している施設が多くある。レジオネラ属菌の環境水検査において、予防的観点においては施設の日常点検検査としてその大半が民間検査機関に委ねられている。一方、患者発生時には行政機関での対応が必要となる。本外部精度管理には、民間および行政機関が参加しているが、現在、官・民に関係なく継続的に適切な研修体制を組むための具体的な方策が無く、研究班においても苦慮している。将来的には官・民に関係なく継続的な研修が開催されることが望ましい。このようなことから、地全協において外部精度管理後のフォローアップ研修についてご検討頂きたいと考える。
	昨年及び今回のアンケートについては、「県試験検査精度管理事業」に該当するものとして回答している。この事業は、理化学及び微生物関係を5部門に分け、微生物部門は、一般細菌数の測定及び指定された細菌を食材から検出するという内容で実施しています。昭和57年から県の事業として実施しており、現在のところは、感染症法(の改正)を念頭に置いたものではないことを申し添える。
	精度管理の実施は、行政検査等が重なる中で、検体の準備や検査結果の評価など担当部署にかなりの負担となっている。食品衛生検査のように全国的に実施される体制が望まれる。(食品衛生検査は、一般財団法人食品薬品安全センター秦野研究所によって全国的に実施されている。)
	精度管理検体の準備は、緊急行政検査が重なる等であると担当部署にかなりの負担となるが、地域における健康危機対応力強化につながる地道な取り組みと位置づけて今後も積極的に関わっていきたい。
	現在、自治体内3保健所において食中毒菌等の検査を実施しているが、当地衛研への検査集約化が検討されているため、集約化になれば外部精度管理は実施しない。

## 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍 なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
吉田 弘	環境水サーベイランスの意義並びに実態から見えてくる予防医学に関わる知見	東京小児科医学会報	36(1)	26-30	2017
吉田弘, 高橋雅輝, 濱崎光宏, 山下育孝, 四宮博人, 山下照夫, 皆川洋子, 岸本剛, 調恒明	エンテロウイルス検査の信頼性確保について	病原体検出情報	38(10)	199-200	2017
皆川 洋子	地方衛生研究所の役割	臨床とウイルス	印刷中	印刷中	印刷中

. 資 料

## ウイルス小班・細菌小班合同 WG 会議

### 平成 29 年度ウイルス小班・細菌小班合同 WG 会議 プログラム

日 時：平成 29 年 5 月 24 日（水）13 時 00 分から 18 時 00 分まで

場 所：国立感染症研究所共用第 2 会議室

1. 挨拶 国立保健医療科学院（厚生労働省） 武村 真治先生
2. 出席者紹介
3. 皆川 洋子（愛知県衛研）  
28 年度総括研究報告及び本年度の研究班活動計画について
4. 木村 博一（感染研）  
平成 29 年度ウイルス検査精度管理に関する研究の概要
5. 吉田 弘（感染研）  
ウイルス関連調査研究計画について
6. 出席者全員  
ウイルス小班活動について
7. 滝澤剛則（富山衛研）村上光一（感染研）松本昌門（愛知衛研）  
赤痢菌に関する外部「精度管理」調査試行について
8. 出席者全員  
細菌小班活動について
9. 皆川 洋子（愛知衛研）  
今後の予定について（検査の質確保・他機関との連携等を含めた全体討論）

## 保健所・大学連携 WG 会議

### 平成 29 年度保健所・大学連携 WG 会議 プログラム

日 時：平成 29 年 9 月 7 日（木）13 時 30 分から 17 時 00 分まで

場 所：愛知県衛生研究所 1 階 共同研究室

1 . 研究班長挨拶

2 . 出席者紹介

3 . 皆川 洋子（愛知県衛研）

28 年度研究概要の報告（ウイルス・項目）及び本年度の研究班活動計画について

4 . 松本 昌門（愛知県衛研）

細菌小班活動について（細菌検査精度管理概要）

5 .（15:00-15:30）皆川 洋子

事前アンケート集計結果について

6 .（15:50-16:50）出席者全員

今後の予定について（検査の質確保・他機関との連携等を含めた全体討論）

## 細菌小班コア WG 会議

### 平成 29 年度細菌小班コア WG 会議 プログラム

日 時：平成 29 年 10 月 24 日（火）10 時から 16 時まで

場 所：国立感染症研究所共用第 1 会議室

- 1．ワーキンググループによる検討について（松本 昌門・愛知県衛研）
- 2．全体討論（出席者全員）
- 3．意見交換（出席者全員）
- 4．事務連絡（松本 昌門）

## 全体班会議

### 平成 29 年度全体班会議 プログラム

日 時：平成 30(2018)年 1 月 10 日(水) 13 時 00 分から 18 時 00 分まで

場 所：国立感染症研究所共用第 2 会議室

- 1 . 挨拶 国立保健医療科学院(厚生労働省)
- 2 . 出席者紹介
- 3 . 皆川 洋子(愛知県衛研)  
29 年度研究概要について
- 4 - 1 . 滝澤剛則(富山県衛研)・松本昌門(愛知県衛研)・細菌小班 WG  
赤痢菌に関する外部「精度管理」について
- 4 - 2 . 出席者全員  
細菌小班活動について
- 5 . 皆川 洋子(愛知県衛研)・出席者全員  
項目小班(保健所大学連携 WG 会議について、追加アンケート経過報告)
- 6 - 1 . 水越文徳(栃木県保健環境センター)・木村 博一(感染研)他  
精度保証の手法を取り入れたウイルス遺伝子定量法の研修について
- 6 - 2 . 吉田 弘(感染研)・皆川・ウイルス小班 WG  
ウイルス小班的調査研究について
- 6 - 3 . 出席者全員  
ウイルス小班活動について
- 7 . 皆川 洋子(愛知県衛研)  
2 年間の総括及び今後の方向性について(全体討論含む)
- 8 . (17:40-17:55)  
講 評

## 平成 29 年度希少感染症診断技術研修会 第 2 日

### 赤痢菌の検査と精度管理

愛知県衛生研究所 松本 昌門

#### 【目的】

平成 28 年 4 月の改正感染症法施行に伴い、病原体情報の収集を担当する地方衛生研究所（地研）は病原体検査の質を確保する必要性から外部精度管理を定期的にする義務が付与された。そこで国立感染症研究所（感染研）と地研が連携して、全国の地研に対して病原体検査外部精度管理を実施するシステムを構築するために平成 28 年度から 29 年度までの 2 年間、厚生労働科学研究活動を行った。その一環として赤痢菌を用いた外部精度管理調査の試行を 27 地研に対して実施したので報告する。

#### 【方法】

参加地研の選定は全国 6 地域の地研数等を考慮して各地域から合計 27 の地研を選んだ。外部精度管理調査試行は、予め、平成 29 年 5 月 8 日に検査結果報告書、赤痢菌の生化学的性状等を記入する赤痢菌検査経過記録書等を参加地研にメールで送付した。5 月 19 日、感染研で準備した外部精度管理調査検体 3 件（赤痢菌陽性 2 株、赤痢菌陰性 1 株）をジュラルミン製 4 次容器に入れ、ゆうパックで 5 月 22 日に各地研到着で送付した。各地研で検査を行い、6 月 22 日までに愛知衛研に送付された記入済み検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書の解析・評価を実施した。11 月 17 日に外部精度管理細菌検査正解の送付を行った。

#### 【結果と考察】

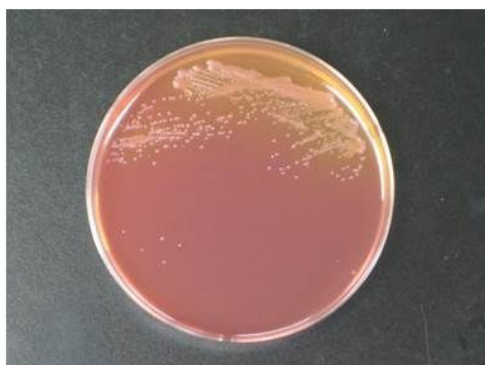
検査結果報告書の解析・評価では、判定結果は全ての施設から正しく報告された。しかし、「根拠とした検査結果」で記載例が適切でなかったため、試料 1（赤痢菌陰性）の表記に相違が見られた。また、血清型、菌型の誤記が見られたことから、複数人でのチェック体制が必要である。赤痢菌検査経過記録書では、一部の施設で検体受付当日に検査を開始していなかった。検査開始は受付当日が望ましい。結果記入の誤記、記入漏れも散見されたことから、複数人でのチェック体制が必要である。血清凝集検査では結果に相違が見られたことから、血清反応を菌液濃度の異なった複数の懸濁液で行う、複数人で確認を行う等対応が必要である。また、コロニーを 1 個のみ釣菌していた施設があったが、複数個釣菌することが望ましい。

大学等研究教育機関との連携、病原体の精度管理における保健所との連携を図りながら、赤痢菌以外の細菌への応用を視野に入れた外部精度管理実施体制を提言していきたい。



平成30年2月28日  
希少感染症診断技術研修会

## 赤痢菌の検査と精度管理



愛知県衛生研究所  
生物学部  
松本昌門

### 研究班分担表(平成29年度)

担当小グループ	とりまとめ	担当(研究分担者と協力者)
項目小班 ・法改正への対応状況 ・地域の検査精度維持向上における地研の役割	皆川 (愛知)	脇田・宮崎・大石(感染研) 滝澤(富山) 佐野(名古屋) 岸本(岡山県) 調(山口) 四宮(愛媛) 猿木(群馬) 大井(東京) 香月(福岡県) 岸本(埼玉県) 脇田・宮崎・大石(感染研) 奥田・猪飼(愛知県一宮保健所)
ウイルス小班 「精度管理」試行・評価 実施要領・手順(案)作成	皆川 (愛知)	吉田・木村・宮崎(感染研) 岸本(岡山県) 滝澤(富山) 高橋(岩手) 北川(福島) 近藤(神奈川) 中田(大阪) 伊藤(愛知) 山下(修文大)
細菌小班 「精度管理」試行・評価 実施要領・手順(案)作成	滝澤(富山)	大石・村上・大西・泉谷(感染研) 平井・貞升・河村・小西(東京) 磯部(富山) 勢戸(大阪) 世良・濱崎(福岡県) 松本(愛知) 四宮(愛媛)

厚労省:地域保健室  
結核感染症課

## 細菌性赤痢

### 【定義】

赤痢菌 (*Shigella dysenteriae*、*S.flexneri*、*S.boydii*、*S.sonnei*) の経口感染で起こる急性感染性大腸炎である。

### 【臨床的特徴】

潜伏期は1～5日。主要病変は大腸、特にS状結腸の粘膜の出血性 化膿性炎症、潰瘍を形成することもある。発熱、下痢、腹痛を伴うテネスマス(tenesmus; しぶり腹)、膿・粘血便の排泄などの赤痢特有の症状を呈する。近年、軽症下痢あるいは無症状に経過する例が多い。症状は一般に成人よりも小児の方が重い。

### 【届出基準】

ア 患者(確定例)

医師は、(2)の臨床的特徴を有する者を診察した結果、**症状や所見から細菌性赤痢が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、細菌性赤痢患者と診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を直ちに行わなければならない。**

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

検査方法	検査材料
分離・同定による 病原体の検出	便

## 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
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
2016	10	121	3,641	52	19
2017	7	141	3,890	37	14

2017年は2018年1月15日更新データ

## 赤痢菌検査の重要性

■ 三類感染症であり、届出基準に便からの分離・同定による病原体の検出が明記されている。また、食品関連業務に従事する人の場合、就業制限がかかり、社会的影響が大きい。



地衛研は医療機関や保健所等から同定を依頼をされ、最終同定が求められる。

■ 地衛研では赤痢菌検査数が減少し、検査経験がない職員が増えている。

■ 赤痢菌は他の病原菌に比べ、誤同定が多い。



病原微生物検出情報  
国立感染症研究所  
感染症疫学情報センター

IASR Vol.24 No.9 (No.283) September 2003

*The Topic* **HIV/AIDS 2002年**

### 特集関連情報

- [エイズ予防教育のエビダンスー長崎プロジェクト](#)
- [保健所における性感染症検査の導入による効果ー岡山市](#)
- [HIV感染症診断の検査手順の見直し](#)

### ミニ特集

- [赤痢菌の検査法の問題点と解決策：IASR編集委員会序文](#)
- [赤痢菌の同定に関する問題事例ー沖縄県](#)
- [医療機関で大腸菌が赤痢菌\(\*S. boydii\*\)と誤同定された事例ー滋賀県](#)
- [下痢症患者から分離された\*M. morganii\*が赤痢菌と誤同定された事例ー千葉県](#)
- [赤痢菌同定の問題点ー東京都](#)
- [赤痢菌同定における留意点](#)
- [赤痢菌同定検査の問題点と現場からの提案](#)

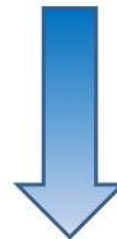
## 赤痢菌検査のポイント

試験	ポイント
1 血清型別試験	赤痢菌の血清に凝集する大腸菌があることを知っているか。 多価と因子血清を検査できる免疫抗血清を備えているか。
2 生化学的性状試験	赤痢菌と大腸菌と鑑別する生化学的性状(培地)を知っているか。
3 運動性の確認	運動性がないことが赤痢菌の絶対的な性状であることを認識して、運動性の確認に適した培地を使用しているか。
4 遺伝子検査	<i>invE</i> はプラスミド上に存在し、脱落する可能性を知っているか。 <i>ipaH</i> を検出しているか。
5 類似菌との鑑別	類似菌として <i>E. coli</i> 、 <i>Morganella morganii</i> 、 <i>Plesiomonas shigelloides</i> を認識しているか。

## 参加地方衛生研究所の決定 (H29.3)

地方 (地衛研数)	人口 (万人)	参加機関数
北海道・東北・新潟(12)	1,686	3
関東・甲信・静岡(24)	4,944	5
東海・北陸(8)	1,260	3
近畿(14)	2,276	4
中国・四国(11)	1,170	3
九州・沖縄(12)	1,323	3
計(81)	12,659	21

全81地衛研中  
参加希望64地衛研



細菌小班6地衛研を加え、  
計27地衛研を決定

別紙4様式1

## 検査結果報告書の様式

地衛研精度管理研究班による平成29年度外部精度管理細菌検査報告書

平成 年 月 日

機関名  
代表者氏名

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、生化学的性状、遺伝子等)	
		陽性	陰性
例示	陽性	陰性	O抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)
赤痢菌の 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  
記載下さい  
検査結果  
性状、遺伝子等)  
生化学的性状(+)、赤  
(+)

赤痢菌の 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

なお、報告の詳細は別添の「H29赤痢菌検査経過書」に記載願います。

## 検査結果報告書の集計

試料	判定結果	根拠とした検査結果	施設数
1. <i>Escherichia coli</i> ボイド9型(+)	陽性	O抗原(+)、生化学的性状(-)、赤痢菌 遺伝子(-)	0
	陰性	O抗原(-)、生化学的性状(-)、赤痢菌遺 伝子(-) 生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-)等	27
2. <i>Shigella sonnei</i>	陽性	O抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌 遺伝子(+)	27
	陰性		0
3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	陽性	O抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌 遺伝子(+)	27
	陰性		0

## 検査結果報告書のまとめ

### ■ 判定結果

全ての施設から正しく報告された。

### ■ 根拠とした検査結果

試料1で記載例が適切でなかったため、施設によって表記に相違が見られた。

### ■ 血清型、菌型に明らかな誤記が見られた。

検査(結果報告まで)に病原菌検査の知識を持った複数人でのチェック体制が必要である。

## 赤痢菌検査経過記録書の集計

- 担当者情報
  - 1名 5施設
  - 2名 10施設
  - 3名 11施設
  - 4名 1施設(合計 63名)

### ■ 担当の内訳と検査経験

担当	記載数	細菌検査の経験			赤痢菌検査の経験		
		なし	5年以内	6年以上	なし	5年以内	6年以上
検査担当者	53	1	31	21	11	28	14
検査区分責任者	8	1	2	5	2	4	2
その他	2		2		2		
合計	63	2	35	26	15	32	16

・検査担当者の約7割は赤痢菌検査の経験が5年未満

## ■ 到着検体の状況

全ての施設で良好

## ■ 保管場所

すぐに検査を開始した施設は13か所、冷蔵  
庫保管は11か所、室温保管は3か所

## ■ 検査開始日時

検体到着日23か所、翌日は2か所、翌々日  
は1か所、開始日を誤記した施設が1か所

## ■ 分離培養検査

使用培地	施設数
SS+DHL	16
SS+DHL+BTB	2
SS+DHL+マッコンキー	2
SS+BTB, SSB+DHL, SS+DHL+SSS, SS+DHL+SSSB, SS+DHL+白糖加SS, SS+DHL+BTB+SSK, 普通寒天	各1

・赤痢菌分離培養にはSS寒天培地の使用が望ましい。

## ■ 生化学的性状検査(1)

検査項目	実施	未実施
ブドウ糖発酵試験	27	0
乳糖及び白糖発酵試験	27	0
ブドウ糖からのガス産生試験	27	0
リジン脱炭酸試験	27	0
インドール産生性試験	27	0
運動性試験	27	0
クエン酸利用試験	23	4
VP(アセトイン産生性)試験	21	6
酢酸ナトリウム利用試験	20	7

・赤痢菌同定に最低限必要な項目は全ての施設で行われていた。

## ■ 生化学的性状検査(2)

検査項目	実施	未実施
オルニチンデカルボキシラーゼ試験	18	9
アルギニンジヒドラーゼ試験	16	11
ウレアーゼ試験	15	12
白糖発酵試験	12	15
マロン酸利用試験	12	15
乳糖発酵試験	7	20
粘液酸	6	21
その他	14	13



## ■ 生化学的性状検査(3)

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i>		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri 2a</i>	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
ブドウ糖	26	0	27	0	27	0
乳糖及び白糖	0	27	0	27	0	27
乳糖	1	5	1	6	0	7
白糖	1	10	0	12	0	12
ブドウ糖からの ガス産生	1	25	1	26	1	26
リジン	0	26	0	27	0	27
インドール	26	1	0	27	0	27
運動性	0	27	0	27	0	27

赤字は誤記

## ■ 生化学的性状検査(4)

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i>		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri 2a</i>	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
VP	0	20	0	21	0	21
クエン酸	0	22	0	23	0	23
アルギニン	0	15	0	16	0	16
オルニチン	0	17	18	0	0	18
マロン酸	0	11	0	12	0	12
酢酸ナトリウム	18	1	0	20	0	20
粘液酸	5	1	0	6	0	6
ウレアーゼ	0	14	0	15	0	15

赤字は誤記

## ■ 使用した培地(1)

検査項目	TSI	単糖代謝 確認培地	その他
ブドウ糖	26	1	
乳糖及び白糖	27		
乳糖		6	1
白糖		4	8
ブドウ糖からのガス産生	20	7	

検査項目	LIM	SIM	その他(培地名)
リジン脱炭酸	24		3 メラー培地、リジン脱炭酸
インドール	27		
運動性	17	7	3 半流動培地

・運動性の確認はSIM培地がよい。

## ■ 使用した培地(2)

検査項目	培地等
VP試験	VP培地(17)、市販キット(4)
クエン酸	シモンズ(18)、シモンズ+クリステンゼン(4)、市販キット(1)
アルギニンジヒドラーゼ	市販キット(10)、メラー培地(6)
オルニチンデカルボキシラーゼ	市販キット(11)、メラー培地(7)
マロン酸	市販キット(8)、マロン酸(4)
酢酸ナトリウム	酢酸ナトリウム(18)、酢ナト加シモンズ(2)
粘液酸	自家調製(3)、K-P粘液酸培地(1)
ウレアーゼ	市販キット(12)、ウレアーゼブロス(1)、Urea培地(1)
その他	CLIG培地(4)、クリステンゼン(3)等

・赤痢菌と大腸菌の鑑別に酢酸ナトリウム培地を用いる。  
 ・市販キットは検査項目に運動性がない。

## ■ 血清凝集試験

全ての施設が実施

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i> (ボイド9型)		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
血清凝集	15	11	27	0	27	0

- ・非特異凝集(7):C、C1多価(+w)、C~C3多価(+w)
- ・凝集なし(4)

- ・菌液濃度の異なった複数の懸濁液で行う。
- ・複数人で確認を行う。
- ・赤痢菌は生菌を用いる。

## ■ 赤痢菌遺伝子検査

全ての施設が実施

PCRを用いた施設は25ヶ所(Veriti等:13, TaKaRa:9, BIO-RAD:2, ASTEC:1)、リアルタイムPCR、LAMPは各1か所

検査項目	1. <i>Escherichia coli</i> (ボイド9型)		2. <i>Shigella sonnei</i>		3. <i>Shigella flexneri</i> 2a	
	陽性	陰性	陽性	陰性	陽性	陰性
<i>ipaH</i>	0	24	23	1	24	0
<i>invE</i>	0	25	25	0	25	0

赤字は誤記

- ・*ipaH* & *invE* (22), *ipaH*(2), *invE*(3)

- ・PCRプライマーセット1種類の際は*ipaH*を用いる。

## 赤痢菌検査経過記録書のまとめ

- 検査開始は当日が望ましい。
- 誤記、記入漏れが散見された。検査(結果報告まで)に病原菌検査の知識を持った複数人でのチェック体制が必要である。
- 血清凝集検査は菌液濃度の異なった複数の懸濁液で行う、複数人で確認を行う、赤痢菌は生菌を用いる等対応が必要である。
- コロニーは複数個釣菌することが望ましい。