

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークを強化するための研究」
分担研究報告書

真菌検査における汚染防止策の検討と標準作業手順書の改訂

研究分担者 梅山 隆 国立感染症研究所 真菌部
研究協力者 星野泰隆 国立感染症研究所 真菌部
宮崎義継 国立感染症研究所 真菌部(研究代表者)

研究要旨 病原体検査において、品質・精度を維持・向上させるため標準作業手順書(Standard Operating Procedure, SOP)の作成とSOPに基づいた検査の施行が求められる。本研究では、国立感染症研究所真菌部における真菌検査において、汚染防止のための対策を検討し、検討内容を反映させるべく、SOPを改訂した。今後も定期的に改訂は必要ではあるが、他の病原体に関する遺伝子検査のSOPを作成する際に本報告書のSOPが参考になると考える。

A. 研究目的

感染症法に基づく病原体の行政検査は、ほとんどの自治体において地方衛生研究所(以下、地衛研)が行っている。対象となる病原体の種類は、ウイルス・細菌・真菌・原虫・寄生虫と多種に及び、それぞれの病原体に対応して、高度な検査技術によって同定される必要がある。近年、様々な事情により、地衛研の検査基盤の継承が困難になってきており、検査品質・精度の維持・向上のためにも標準作業手順書(Standard Operating Procedure, SOP)の作成が必須となってきた。

病原体検査において、遺伝子検査は中心的なものとなってきたが、遺伝子検査の精度を適正に保つために、遺伝子断片の交差汚染防止のための対策を講じる必要がある。また、真菌の場合は特に、真菌の生育に伴って生じる分生子・胞子の飛散による汚染からの防止も必要になる。

本研究では、国立感染症研究所真菌部において、遺伝子断片・真菌胞子の汚染を防止するための対策の検討を重ね、その対策を真菌検査に反映させることを目的とする。その結

果として真菌検査 SOP を改訂する。

B. 研究方法

国立感染症研究所真菌部の真菌検査実験室内において、汚染防止対策として作業動線を重視したレイアウト変更を行った。今年度のレイアウト変更を反映させるべく、真菌検査についての標準作業手順書(SOP)の改訂を行った。

C. 研究結果

国立感染症研究所真菌部の実験室内の作業動線を検討し直し、遺伝子検査の試薬調製を行う場所と、遺伝子増幅産物の検出作業を行う場所を明確に分け、動線が逆戻りしないようにレイアウトの変更を行った。その変更を反映させるように、真菌検査を実施する上での統一ルールを記載した SOP の改訂を行った。国立感染症研究所真菌部内での意見を集約し、改訂を重ね、2021年4月1日施行予定の標準作業手順書(SOP)の概要を附1に示す。

D. 考察

真菌症検査における遺伝子検査の汚染防止対策を反映させた SOP の改訂を行った。本研究で改訂した SOP は検査の関係者全員が閲覧可能で、各自の理解が前提とされており、定期的に見直して改訂する必要がある。病原体検査における品質・精度の向上のためにも SOP の作成は基本である。本報告書で示すような SOP が他の病原体で作成され、遺伝子検査の精度管理基盤となることを期待する。

E. 結論

汚染防止対策のための実験室レイアウト変更を行い、真菌検査のための標準作業手順書(SOP)に反映させた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

標 題	真菌検査の実施手順		
SOPNo		版 No	0.01G
発 効 日	2021	年 4	月 1 日
作 成 者	真菌部 主任研究官	2021	年 4 月 1 日
	星野 泰隆 (署名)		
監 査 者	真菌部 第2室 室長	2021	年 4 月 1 日
	梅山隆 (署名)		
承認者	真菌部 第3室 室長	2021	年 4 月 1 日
	山越智 (署名)		
承認者	真菌部 部長	2021	年 4 月 1 日
	宮崎義継 (署名)		

1. 目的

真菌検査を行うに当たり、検査依頼の受付から検査終了まで実施手順と検査結果の判定の手順を記載する。

2. 適用範囲 (手順の対象)

真菌部で実施する行政検査、依頼検査及び共同研究による真菌検査

行政検査:

“平成 12 年 5 月 8 日 健医感発第 43 号 (平成 19 年 11 月 26 日健感発第 1126002 号改正、平成 21 年 12 月 18 日健感発 1218 第 2 号改正)”の通知に従って、地方衛生研究所 (地衛研)・保健所等から、国立感染症研究所 所長宛に検査依頼が行われ、国立感染症研究所 (感染研) が行う検査である。これらのうち、真菌部が担当する真菌検査が適用範囲である。なお、行政検査において、依頼者 (地衛研・保健所等) からの行政検査の受付および依頼者への行政検査成績書の発行に関しては、業務管理課検定係が担当するため、ここで示す適用範囲外である。

依頼検査:

“国立感染症研究所試験検査依頼規程”に規定されている検査で、医療機関や大学等か

ら感染研 所長に対して依頼される検査のうち、真菌部が担当する真菌検査等が適用範囲である。

共同研究による真菌検査

医療機関や大学等と共同研究という形で実施され真菌部で実施される検査。

該当する検査内容は以下の通りとする。

- 培養菌 (すでに培養された真菌) の同定 (遺伝子検査)
- 培養菌 (すでに培養された真菌) の感受性検査
- 臨床検体 (未固定) からの、真菌の分離および遺伝子検査
- 臨床検体の抗体・抗原検査
- 固定された検体等からの遺伝子検査
- その他、真菌および真菌症に関連した内容で、真菌部部長が必要と認めた試験検査

3. 実施場所

国立感染症研究所 戸山庁舎

研究棟 3 階

研究室、セミナー室: 03-013, 03-014, 03-015, 03-016, 03-018

BSL2 実験室: 03-042, 03-044, 03-046, 03-049, 03-050, 03-051

研究棟 地下 3 階: BSL3 細胞 6 室

見取り図 (別紙)

4. 材料、機材・機器

4.1 作業環境

受付事務: 真菌部研究室 (03-013, 03-014, 03-015, 03-016)

真菌部セミナー室 (03-018)

試験検査: 一般実験エリア

洗浄室: 03-038

BSL2 エリア

共通実験室 (03-044, 03-046, 03-050)

糸状菌専用実験室 (03-049, 03-051)

旧 R1 実験室 (03-042)

BSL3 エリア

BSL3 細胞 6 室

4.2 設備

真菌部研究室: 真菌検査用コンピューター1台

真菌検査用ファイルキャビネット1台

BSL2 レベル実験室:

機器名	用途	台数	設置場所	ドア番号
安全キャビネット	臨床検体処理用	1	共通実験室	03-044
安全キャビネット	糸状菌用	5	糸状菌専用実験室	03-049, 03-051
安全キャビネット	糸状菌以外の生菌用	7	共通実験室	03-044, 03-046
クリーンベンチ	PCR 反応液調製用	1	共通実験室	03-046
クリーンベンチ	DNA 添加用	1	共通実験室	03-046

4.3 機器

機器名	用途	台数	設置場所	ドア番号
培養器	臨床検体用	2	共通実験室	03-044
培養器	糸状菌用	3	糸状菌専用実験室	03-051
培養器	糸状菌以外の生菌用	2	共通実験室	03-044
振盪培養器	糸状菌用	4	糸状菌専用実験室	03-049, 03-051
振盪培養器	糸状菌以外の生菌用	2	共通実験室	03-046
オートクレーブ	培地作成用	4	旧 R1 実験室 洗浄室	03-042 03-018
オートクレーブ	廃棄用	4	共通実験室	03-046
遠心器	臨床検体処理用	1	共通実験室	03-042
遠心器	糸状菌用	2	糸状菌専用実験室	03-051
遠心器	糸状菌以外の生菌用	1	共通実験室	03-046
遠心器	PCR 産物用	1	旧 R1 実験室	03-042
顕微鏡	蛍光位相差微分干涉 倒立型顕微鏡	1	糸状菌専用実験室	03-051
顕微鏡	正立型顕微鏡	2	糸状菌専用実験室	03-049, 03-051
顕微鏡	実体顕微鏡	2	糸状菌専用実験室	03-051
分光光度計	DNA 用 NanoDrop	1	共通実験室	03-046

機器名	用途	台数	設置場所	ドア番号
分光光度計	96 穴 plate 用	2	共通実験室	03-046
分光光度計	キュベット用	1	共通実験室	03-046
サーマルサイク ラー		3	共通実験室	03-044
ゲル撮影装置		1	旧 R1 実験室	03-042
電気泳動装置	DNA/RNA 分析用マイク ロチップ電気泳動装 置 (shimadzu MultiNA)	1	旧 R1 実験室	03-042
スキャナー		1	糸状菌専用実験室	03-049
DNA シクエンサー	ABI3130	1	共通実験室	03-044
フリーザー (-80)		1	共通実験室	03-046
フリーザー (-30)		1	共通実験室	03-046
フリーザー (-30)		1	旧 R1 実験室	03-042
冷蔵庫		1	共通実験室	03-046

4.4 材料

1. 試薬類

滅菌蒸留水、滅菌生理食塩水、リン酸緩衝生理食塩水

PCR 試薬、培地用試薬

2. ディスホ製品

1) チューブ類

DNA、RNA および病原体フリーの、0.2 ml PCR チューブ、1.5ml のチューブ (10-50 本/袋) および 1.5 ml のチューブ (DNA 低吸着)、15ml および 50ml (10-20 本/袋) の遠心管を用いる。常に、包装されたものを各作業毎に新規に開封し使用する。

2) ピペットチップ類

DNA、RNA および病原体フリーのピペットチップおよびピペットを用いる。常に、包装されたものを新規に開封し使用する。

3) 遠沈管

滅菌済みの 15 ml および 50 ml の物を用いる。培養に供する場合は、フィルター付き

のものを使用する。

4) 個人防護具 (PPE)

グローブ、マスク、前掛け

3. キット類

- DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)
- DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN)

4. その他

ハサミ、ピンセット、カミソリ刃、ビベットマン、ビベットコントローラー、感受性検査用プレート、ディスポーザブルキューベット、ディスポーザブルリザーバー、ストレーナー、消毒用アルコール、次亜塩素酸ナトリウム

4.5 管理

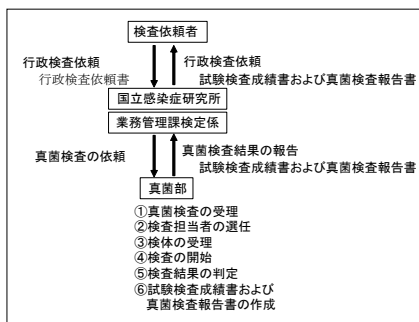
1. 専門業者に依頼する機器 (オートクレーブ、安全キャビネット)
専門業者に保守点検を依頼 (原則 1 年に 1 度) し、保守点検記録を保管する。
2. 使用者が定期点検を行う機器 (冷凍庫、冷蔵庫)
温度監視モニターを適宜チェックする。
3. 使用者が機器使用時に点検・校正を行う機器
4. その他の機器: 目視にて大きな異常がないかを確認する。問題が生じた場合は、検査に使用しない。

5. 実施手順

5.1 概要

1. 行政検査

国立感染症研究所 業務管理課 検定係を通じて、真菌検査の依頼を受け真菌の検査を実施し、その結果を試験成績書にまとめ、業務管理課検定係に提出する。



2. 依頼検査

国立感染症研究所 業務管理課 検定係を通じて、真菌検査の依頼を受け真菌の検査を実施し、その結果を試験成績書にまとめ、業務管理課検定係に提出する。

3. 共同研究による真菌検査

医療機関や大学等と共同研究という形で依頼をうけ、真菌部で真菌検査を実施し、その結果を試験結果報告書にまとめ、依頼元に報告する。

5.2 受付・検体の受領

5.2.1 行政検査

- 1) 依頼者 (地衛研・保健所等) からの行政検査の依頼を業務管理課検定係が受理した検査に関して、真菌部長は行政検査の依頼が可能と判断した場合、真菌部での真菌検査を受託する。
- 2) 真菌部長は、検査を受託した旨を真菌部検査メーリングリスト (staff-mycoses@nih.go.jp) にて周知する。
- 3) 真菌部長もしくは担当室長は、検査担当者を選定し注 1)、依頼者 (地衛研・保健所等) から送付された行政検査依頼書の写しを業務管理課検定係から受領する。検査担当者は、受領した行政検査依頼書の写しを真菌部長もしくは担当室長から受けとる。

4) 検査担当者は、行政検査の依頼者および業務管理課検定係と連絡を取り、検体の輸送方法や日程に関して調整を行う。なお、必要に応じて、検体の梱包・輸送方法 (持参、ゆうパック、他の宅配業者等の選択) の指示、必要ならば輸送容器の発送等を行う。

5) 検査担当者は、行政検査依頼者から送付された検体を受領する注 2)。

6) 検査担当者は、検体を受領した旨を検査依頼者に連絡する。

7) 検査担当者は、検査を開始する。

5.2.2 依頼検査

1) 依頼者から検査依頼を業務管理課検定係が受理した検査に関して、真菌部長は依頼された検査内容が可能と判断した場合、真菌部での真菌検査を受託する。

2) 真菌部長は、検査を受託した旨を真菌部検査メーリングリスト (staff-mycoses@nih.go.jp) にて周知する。

3) 真菌部長もしくは担当室長は、検査担当者を選定し注 1)、依頼者から送付された試験検査依頼書の写しを業務管理課検定係から受領する。検査担当者は、受領した試験検査依頼書の写しを真菌部長もしくは担当室長から受けとる。

4) 検査担当者は、行政検査の依頼者および業務管理課検定係と連絡を取り、検体の輸送方法や日程に関して調整を行う。なお、必要に応じて、検体の梱包・輸送方法 (持参、ゆうパック、他の宅配業者等の選択) の指示、必要ならば輸送容器の発送等を行う。

5) 検査担当者は、行政検査依頼者から送付された検体を受領する。

6) 検査担当者は、検体を受領した旨を検査依頼者に連絡する。

7) 検査担当者は、検査を開始する。

5.2.3 共同研究による真菌検査

1) 真菌部長は、依頼者からの検査依頼に関して、検査内容が可能と判断した場合に真菌部での真菌検査を受託する。また、部長以外に直接依頼があったものについては、部長へ報告、承認を経て正式な受託とする。

2) 真菌部長、担当室長とする (ただし、不在等の場合は、担当主任研究官等が代行する)。真菌部長もしくは、は、検査を受託した旨を真菌部検査メーリングリスト (staff-mycoses@nih.go.jp) にて周知する。

3) 真菌部長もしくは担当室長は、検査担当者を選定し、依頼者から試験検査依頼書

の写しを受領する。検査担当者は、受領した試験検査依頼書の写しを真菌部長もしくは担当室長から受けとる。

4) 検査担当者は、検査の依頼者と連絡を取り、検体の輸送方法や日程に関して調整を行う。なお、必要に応じて、検体の梱包・輸送方法 (持参、ゆうパック、他の宅配業者等の選択) の指示、必要ならば輸送容器の発送等を行う。

5) 検査担当者は、検査依頼者から送付された検体を受領する注 2)。

6) 検査担当者は、検体を受領した旨を検査依頼者に連絡する。

7) 検査担当者は、検査を開始する。

5.2.4 検査従事者 (検査担当者および検査実施者) の選定

1) 検査担当資格を有する資格者 (別途定める) の中から、真菌部長または担当室長 (ただし、不在時は、担当主任研究官等が代行) が検査担当者の選定を行う。通常は 1 名を選定するが、2 名以上を選定した場合には、1 名を主担当者とし、その他を副担当者とする。

2) 検査実施資格者 (別途定める) の中から、検査実施者 (以下実施者) を選定する。検査実施者は、担当室長および検査担当者の依頼により、検査実務とその記録を行う。なお、検査担当者が検査実施者を兼ねてもよく、必要に応じて複数の検査実施者を選定することが出来る。

5.2.5 検体受領後の作業

1) 検体の種類、数を確認し、依頼書と照合する。真菌検査記録書の検査開始チェックシートに記入する。検体に検査固有の番号 (真菌部 ID) を振り当てる。

2) また、検体受領を依頼者へ報告し、依頼書にチェックを入れる。

5.3 検査の実施の規定

検査担当者は、依頼された検体を受け取り、検査を実施する。

個別の手順に関しては、作業別実施手順を規定し従う。

実施手順

- ・分離培養
- ・臨床検体の処理
- ・遺伝子検査 (遺伝子検査 (別紙))
- ・薬剤感受性試験 (感受性検査 (別紙))
- ・抗原抗体検査 (抗原抗体検査 (別紙))

5.3.1 菌株の取り扱い

- a) 糸状菌 (疑い含む)
- 培養菌の取り扱いは、03-051 および 03-046、内にある安全キャビネット内で行う。検体を、ディスクプラスチックループ (1 もしくは 10 μL サイズ) を用いて接種し、平板培地 (形態観察および継代)、斜面培地 (感受性検査用) で培養する。必要に応じてスライドカルチャーを行う。
- 遺伝子検査 (別紙) を定法により行う。
- 感受性検査 (別紙) を定法により行う。
- b) 酵母 (疑い含む)
- 培養菌の取り扱いは、03-044、03-046、03-049、03-050、03-051 安全キャビネット 2 で行う。
- 検体を、平板培地 (形態観察および継代、感受性)、液体培養 (遺伝子検査および保存用) で培養する。
- 遺伝子検査 (別紙) により行う。
- 感受性検査 (別紙) により行う。
- 生化学的的同定検査は、必要に応じて実施し、参考文献等に記載する。
- c) BSL3 対応が必要な真菌 (疑い含む)
- 培養菌の取り扱いは、B3F にある BSL3 区域実験室細胞 6 内の安全キャビネット内で行う。*Coccidioides* 属および BSL3 対応が必要と疑われる検体については、安全キャビネットにプラスチック製のグローブボックスを設置し、その中で取り扱う。
- 菌株の培養は、スクリューキャップ付き斜面培地 (など) で継代培養する (遺伝子検査、保存用、形態観察 (必要時))。培養は蓋付きプラスチック容器に収納のうえ培養器に入れる。
- d) 培養菌の保存・復元
- 基本的には、平板培地上に生育した菌体 (糸状菌の場合は、寒天ごと切り取り、酵母の場合はコロニーを掻き取る) を 20%グリセロール含有の液体培地 (YPD、BHI など) の形態で、セラムチューブ 3-5 本分を保存する。表示は真菌部 ID もしくは菌株につけられた識別可能な固有の番号とし、保存の際にはリスト記入を行う (保管箱番号も)。保管庫として、03-051 実験室前の超低温フリーザーに保存し、常時施錠する。BSL3 対応が必要な真菌についてはリスト記入、ならびに BSL3 細胞 6 室に備

えてある台帳両方に記入し、細胞 6 室内の超低温フリーザーに保管し、常時施錠する。

復元方法は、原則ウォーターバスなどを用いて 30~37℃ で急速に解凍する。自然解凍では多くの糸状菌類で生残性が低下をまねく。氷の結晶が融解したら (-80℃ 保存では 3 分) ただちに適切な培地にチューブ内の菌体を接種し培養する。

e) 遺伝子検査

培養した菌体から、ビーズ破砕法により DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いて DNA を抽出し、遺伝子検査 (別紙) に従って、実施する。なお、BSL3 の対応が必要な真菌に関しては、PBS 等の溶液に菌体を懸濁し、熱水抽出法により DNA を抽出する。

5.3.2 臨床検体からの分離・遺伝子検査

a) 真菌の分離

未培養の臨床材料は、真菌の分離、遺伝子学的検査、血清検査のいずれか、または複数ないし全てを行うかどうかを考慮し、検体を分割する。

全検体 (小さな組織片など分割できない場合) または検体の一部を、寒天培地または液体培地 (無菌の液性検体など) に塗布・添加し、所定の培養器で、適切な温度下 (25℃ と 37℃ など) で培養する。糸状菌が培養された場合には、ただちに糸状菌用の培養器に移して培養を継続する。4 週間培養して真菌の生育が認められない場合は、真菌培養陰性と判定する。なお、BSL3 の対応が必要な真菌疑いの場合は、8 週間の培養を行う。

分離された後は、

遺伝子検査 (別紙) により行う。

感受性検査 (別紙) により行う。

b) 組織検体

無菌検体は、無菌的 (遺伝子検査を行う場合には DNA 等の汚染がないよう) に操作する。必要に応じて、細断・すりつぶし等の処理を行う。細断に際しては、滅菌したピンセット、ハサミあるいは使い捨てのメス等を用いる。

検体そのもの、あるいは細断・すりつぶした検体の全量または一部を寒天培地に塗布し、培養する。

また、必要に応じて、原則ビーズ破砕法により DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出・精製を行う。

c) 血液検体

全血は、全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。また、必要に応じて、血清分離等の調整を行い、血清検査や血清からの DNA 抽出等を行う。(原則ビーズ破砕法により DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用) 血清は、培養には原則として用いないが、必要に応じて考慮する。方法は、ビーズ破砕法により DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出・精製を行う。

- d) 液性検体 (血液以外の無菌検体)
- 必要に応じて、遠心分離し、沈下部分と上清部分に分ける。全量または一部を寒天培地または液体培地に塗布・添加し、培養を行う。また、必要に応じて、上清の血清検査や、沈下または上清からの DNA 抽出を行う。方法は、原則ビーズ破砕法により DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を用いて DNA 抽出・精製を行う。
- e) 液性検体 (上記以外の液性検体)
- 必要に応じて、遠心分離し、沈下部分と上清部分に分ける。全量または一部を寒天培地に塗布し、培養を行う。また、必要に応じて、上清の血清検査や、沈下または上清からの DNA 抽出を行う。(原則ビーズ破砕法により DNeasy Blood & Tissue Kit (QIAGEN) を使用)
- f) その他の検体
- 上記以外の検体については、疑われる真菌症に応じその都度考慮する。
- g) 遺伝子検査
- 上記の処理で得られた DNA 溶液に対し、遺伝子検査 (別紙) により行う。

5.3.3 抗体・抗原検査

全血の場合は、血清を分離する。血清はそのまま用い、脳脊髄液は遠心後その上清を使用する。その他の体液は、検査キットのプロトコールの指示に従う。ELISA 法では必ず 2 連以上で検体を測定する。

- ヒストプラズマ抗原および抗体
- コクシジオイデス抗原および抗体

検査陰性時の取り扱い

陽性対照、陰性対照が確実に指示書の範囲であることを確認できれば陰性と取り扱う。判定ボーダーライン上の場合は、再検査とする。

5.3.4 固定された検体の検査

ホルマリン固定された検体、パラフィン包埋された検体からの遺伝子検査等は、QIAGEN QIAamp DNA FFPE Tissue kit などを用いて DNA を抽出し、遺伝子検査 (別紙)

5.3.5 検体の保存

基本的に検査後に残った臨床検体は全てについて適切な容器に収納の上、キャップをシールし保管する。検体にはすべて真菌部 ID もしくは検体 ID を表示する。複数個の容器がある場合は、ビニール袋などにひとまとめにし、袋にも ID を表示する。チューブ検体のみの場合は臨床検体箱へ収納し、その他は保存用フリーザーの収納棚 (-30℃) に保管する。

固定された検体に関しては、薬品庫の検体保管ボックス内に保管する。複数ある場合は、ビニール袋などにひとまとめにし、袋にも ID を表示する。

5.3.6 遺伝子検査の管理

抽出した DNA を用いて PCR を行う。必要に応じて、シーケンスを行い、BLAST 等を用いた塩基配列のデータベース検索によって、菌種の同定を行う。遺伝子検査の詳細は、別途定める。

- 遺伝子検査を行う場合、遺伝子検査の精度を適正に保つため、以下の事項に留意する。
 - 核酸抽出作業等を行うエリア (03-044、03-046、03-049、03-050、03-051) と遺伝子増幅産物の検出作業を行うエリア (03-042) を区分する。
 - 試薬の調製を行うエリア (03-046) は、他のエリアと区分されているクリーンベンチを使用すること
 - ① で指定しているエリアは、空調設備は独立していること
 - 遺伝子検査については、交差汚染防止のため、次の事項を含む検査のための汚染防止要領を作成し、これに従うことが望ましい。
 - 試薬の調製を行うエリア、核酸抽出作業等を行うエリア (03-044、03-046、03-049、03-050、03-051) および遺伝子増幅産物の検出作業を行うエリア (03-042) での検査作業では、白衣等を各エリアで区分して運用する。
 - 作業動線の注意点: 試薬の調製を行うエリア、核酸抽出作業等を行うエリアおよび遺伝子増幅産物の検出作業を行うエリア、の順で作業を行う。
 - 機器の扱い
- ア DNA の汚染防止のために安全キャビネット、クリーンベンチおよび汚染の可能性のある実験台等においては、UV 照射、0.1% 次亜塩素酸による拭き取りにより、作業環境中の DNA の除去を行う。
- イ PCR による増幅産物の取り扱いは専用の器具・機器を使用する。
- 試薬消耗品

- ア 使用する試薬は、各エリアで専用のものを使用する。
- イ 各作業で使い捨て消耗品は、作業毎に新しいものを使用する。
- ウ 使い捨て手袋を使用し、そのエリアで処分する。
- エ PCR による増幅産物の汚染の可能性のある廃棄物は、次亜塩素酸処理で DNA の分解を行うか、可燃物で廃棄する。

6. 判定、報告および決裁

6.1 判定

担当者は、まず検査結果の確認を行う。次に、渡航歴や臨床情報と検査結果に大きな矛盾がないか（米国渡航歴のない患者からのコクシジオイデス真菌の検出や、病理結果とのかい離）を確認し、最終結果を出す。次に、真菌部内の真菌検査会議（真菌検査ミーティング）もしくはメールによる検査結果の連絡において、担当者、担当室長、部長および検査担当者資格保有者が、検査結果の妥当性を吟味し、結果に疑問が挟まれる場合は、再試験等の指示を出す。

矛盾がない場合や、再検査でも同じ結果が得られた場合には、検査を終了する。

6.2 報告

1. 中間報告

中間報告は、部長から検査依頼者宛に E メール等で行う（真菌検査に従事する職員等にも転送する）。なお、部長からの指示があれば、仮報告・中間報告を担当室長または検査担当者等が代行できる。

2. 最終報告

・行政検査

最終検査結果が出次第、検査報告者（通常は担当者または主担当者を当てる）が試験検査成績書および真菌検査報告書を作成する。報告書の内容を、検査責任者（通常は部長とし、部長の指示により、担当室長等が代行できる）が確認する。確認後の試験検査成績書および真菌検査報告書を業務管理課検定係に所内便で送付する。依頼者への報告は、業務管理課検定係の担当である。

・依頼検査

最終検査結果が出次第、検査報告者（通常は担当者または主担当者を当てる）が試験検査成績書および真菌検査報告書を作成する。報告書の内容を、検査責任者（通常は部長とし、部長の指示により、担当室長等が代行できる）が確認する。確認後

の試験検査成績書および真菌検査報告書を業務管理課検定係に所内便で送付する。依頼者への報告は、業務管理課検定係の担当である。

・共同研究による真菌検査

最終検査結果が出次第、検査報告者（通常は担当者または主担当者を当てる）が検体解析報告書（以下報告書）をまとめる。報告書の内容を、検査責任者（通常は部長とし、部長の指示により、担当室長等が代行できる）が確認し、押印する。報告書は、添付文書等の必要な書式とともに、部長が依頼者に郵送する。

6.3 決裁

最終報告終了後に、担当室長が検査データベースに終了の入力を行う（担当室長の指示により担当者等が代行できる）。検査担当者は、検査終了チェックリストで、最終確認を行い、真菌検査結果記録書の作成を行う。関連情報（一部の生データや依頼者からの情報）も印刷し、真菌検査結果記録書に含める。作成した真菌検査結果記録書は、検査実施者の確認を得た後、担当以外の職員、部長に提出し、それぞれの署名を得る。

7. 記録の保存・保管

検査リストの記録はおよび個別の検査の記録について記載する。

1) 記録の様式

デジタル記録およびハード記録（紙媒体）とする。

2) 保存方法

デジタル記録は、保存用のストレージに個別のフォルダーを作成し、保存する。ストレージの不具合等に備え、バックアップを別のストレージに作成する。

真菌検査結果記録書は、施設可能な棚に保管する。（指定場所：03-013、03-014、03-015、03-016、03-018 の事務室内）、一つのファイル内に複数の真菌検査結果記録書を保存できる。

3) 保存期間

最短 5 年保存する。保存スペースが可能な限り長期に保存する。保存期間の延長や廃業に関しては、部長の指示のもと行う。

8. 関連文書

SOP 真菌検査にかかる教育訓練

9. その他

9.1 本検査にかかる会議

個別案件の協議、検査技術の向上、情報共有および収集、および教育訓練を目的として、真菌検査ミーティングを週一回程度行う。

9.2 教育訓練

SOP 真菌検査にかかる教育訓練 に定める。概要は以下の通りである。

● 新規従事者教育訓練

新規従事者（検査担当者および検査実施者に従事するものを指す）の資格認定を目的として、実地訓練を行う。実地での見学および実技研修を行う。実技研修は、熟練した従事者と同伴で行う。

● 継続者教育訓練

検査担当者および検査実施者に従事するものために教育訓練を実施する。

9.4 代替手段、代替機器

検査が感染研内で不可能な状態となった場合には、その検査の必要性を判断した上で、部長は、依頼先にその旨を説明し、検査を延期または中止するか、他の代替施設を紹介し、再依頼する。

設備または機器が、故障またはメンテナンス等により使用不可能になった場合には、部内の代替設備または機器を用いて検査を行う。

試薬等が入手できない場合には、代替試薬を入手し試行後に問題がなければ、部長の承認を得て、変更後の試薬を用いる。永続的に元の試薬が入手できない場合には、検査手順書を変更する。

9.5 届け出関係

感染症法における報告義務、所内の届け出義務等に準じて行う。

9.6 情報の取り扱い

真菌検査を実施するにあたり入手した情報は、“国立感染症研究所 情報セキュリティポリシー”に従い、取り扱いを行う。また、患者個人情報を含む情報は、“国立感染症研究所個人情報管理規程”に従い、適切に取り扱う。なお、検査依頼者から提供される情報は、患者個人を特定できる情報（氏名・生年月日など）を含まない形での提供をお願いする。なお、患者個人を特定できる情報を削除したものは、真菌検査に従事する資格が認定されている職員等は閲覧できる。

9.7 定められた手順からの逸脱への対応

真菌部で実施される真菌検査の運用において、規定された手順から逸脱が生じた場合、影響を受ける検査等を適正に取り扱い、必要に応じて手順を是正する。

1) 規定された手順から逸脱を免じた場合は、速やかに真菌部長に報告する。真菌検査担当者は、逸脱発生報告書を作成し、真菌部長に提出する。また、逸脱に関しては、真菌検査記録書に記録する。

2) 逸脱に対するするために、真菌検査ミーティングにて対応を協議し、是正措置を取る。

付属文書

当該 SOP の手順の実施にあたって使用する

- 真菌検査依頼書 (共同研究用)
 - 真菌検査依頼書 別紙
 - 送付検体解析報告書様式
 - 報告書カバーレター様式
 - 真菌検査結果記録書
 - 送付検体解析結果報告書様式
 - 報告書カバーレター様式
 - 見取り図
 - 別紙
- 別紙 1 遺伝子検査
別紙 2 感受性検査
別紙 3 抗原抗体検査

改訂履歴一覧

等	SOP No
SOP	臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査
題	真菌検査の実施手順

0.01D 版 β版として 2013 年 9 月 4 日作成、2013 年 10 月 1 日より仮実施

0.01E 版 β版として 2014 年 3 月 17 日改訂、2014 年 4 月 1 日より実施

0.01F 版 β版として 2014 年 3 月 17 日改訂、2014 年 4 月 1 日より実施

0.01G 版 β版として 2021 年 4 月 1 日改訂、2021 年 4 月 1 日より実施

内容：SOP 名称の改定、“臨床検体からの真菌分離、真菌同定および薬剤感受性検査”から“真菌検査の実施手順”に変更

版	第 1 版		
作成者	真菌部 第 4 室	星野泰隆	2021 年 月 日
監査者	部 第 室		年 月 日
承認者	真菌部 部		年 月 日
改訂内容理由	遺伝子検査の実験室エリア変更のため		

版	第 2 版		
作成者	部 第 室		年 月 日
監査者	部 第 室		年 月 日
承認者	部		年 月 日
改訂内容理由			

版	第 3 版		
作成者	部 第 室		年 月 日

監査者	部 第 室	年 月 日
承認者	部	年 月 日
改訂内容理由		