

6 病性鑑定における検査の精度管理体制の構築と課題

○寺崎 敏明 竹内 美穂

要約

家畜保健衛生所法施行令の改正に伴い、家畜保健衛生所（家保）で実施される試験及び検査の信頼性を確保するための取り組みが必須となり、検査の精度向上を目的とした取り組みを実施した。平成30年7月に家保の各担当から選出された計6名で構成する検討委員会（委員会）を立ち上げ、平成30年8月から平成31年3月までの間、計5回の委員会を開催し、標準作業書の作成を目的として、組織体制、執筆分担、検査マニュアルの検討を行った。精度管理の対象である牛ヨーネ病遺伝子検査、鳥インフルエンザ遺伝子検査、鳥インフルエンザ血清抗体検査ならびに追加で精度管理の対象検査となったCSF血清抗体検査の4項目について、各検査を実施している担当者が標準作業書および検査に必要な手順書の作成を担当することとし、毎回の委員会で、進捗状況や手順書の記述内容について検討し、持ち帰って修正し更に検討を加えるという作業を行った。委員会と並行し、各職務分掌責任者及び検査員は必要な研修を受講するとともに、職員全体が認識を共有する目的で所内カンファレンスにおいて計2回、精度管理に関する講習会を行った。平成31年3月、「東京都家畜保健衛生所における病性鑑定の業務管理要領」が作成され4月1日から精度管理が開始された。一連の取り組みから、記録作成、機械のメンテナンス、備品の更新等が徹底され、責任の明確化、内部研修による技術レベルの平準化が図られるなどのメリットが見られた反面、不測の事態が生じた場合に検査できる人員が確保出来ないなどの事態が生じ、平成31年11月に一部改訂を行うなど、検査に際し予期せぬインシデントが発覚した場合の対処法についての検討が必要となった。

今般、検査における精度管理は、食品・公衆衛生分野を始め多くの分野でGLP (Good Laboratory Practice)による業務管理が導入されており^{1) 2)}、家畜衛生分野においても、国際獣疫機構による獣医組織能力評価において、家保を含む関連研究施設の精度管理プログラムが整備され、認証されるべきとの指摘をうけている。こうした情勢を踏まえ、平成31年に家畜保健衛生所法施行令が一部改正され、家保における試験及び検査の信頼確保のための措置として、①標準作業書の作成、②内部精度管理の実施、③外部精度管理調査の受験が必要となった。

精度管理の仕組みを図1に示した。精度管理において重要な点は、決められたルールでおこなわれること。

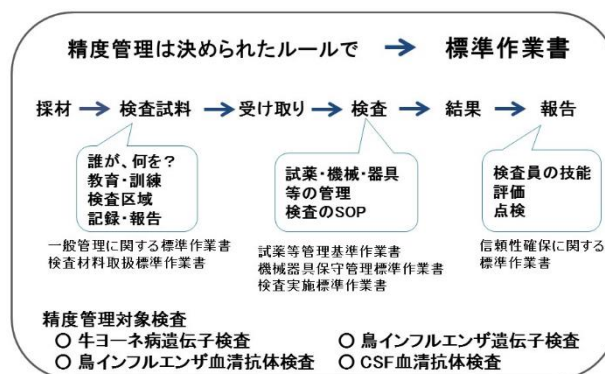


図1 精度管理のしくみ

そのためには標準作業書を整備することが基本となる。検査に当たり、採材、検査試料、受け取り、検査、結果、報告に至るすべての行程において、それぞれに必要な標準作業書を整備し、それに従って検査を行い記録に残すことが

検査の信頼性を確保することとなる。今回、精度管理の対象となる検査は、牛ヨーネ病遺伝子検査、鳥インフルエンザ遺伝子検査、鳥インフルエンザ血清抗体検査、CSF 血清抗体検査の4検査とした。

精度管理体制構築に向けた 取り組みの概要

精度管理体制構築に向けた取り組みを表1に示した。

表1 精度管理体制構築に向けた取り組み

- 標準作業書の作成 ⇒ 検討委員会の設置
- 職員の理解・意識の醸成 ⇒ 研修会の受講・カンファレンス
- 備品の整備及び点検 ⇒ 必要な予算措置・点検・校正
- 検査の信頼性の確保 ⇒ 外部精度管理・内部精度管理

標準作業書の作成として検討委員会の設置、職員の理解・意識の醸成として研修会の受講・カンファレンス、備品の整備及び点検として必要な予算措置・点検・校正、検査の信頼性の確保として外部精度管理・内部精度管理、これらについて並行して実施した。検討委員会の概要は表2に示す通りで、平成30年7月から平成31年3月の間、計5回開催した。

表2 検討委員会の概要

- 平成30年7月～平成31年3月の間、計5回開催
- 主な検討内容
 - 第1回： 組織体制、執筆分担及びスケジュール
 - 第2回： 進捗状況の確認、内容の検討方法、タイムスケジュール
 - 第3回： 標準作業書の修正、SOPの検討、CSF血清抗体検査の追加機械類の点検の範囲、各書式の統一性
 - 第4回： 標準作業書の紙ベースによる点検、精度管理施行に向けた作業の確認
 - 第5回： 総合的な点検及び修正、標準作業書の完成

毎回の主な検討内容は、組織体制、執筆分担の決定、進捗状況の確認、標準作業書の修正、標準作業書の検討、機械類の点検範囲の検討、各書式の統一性の検討、精度管理施行に向けた作業の確認、総合的な点検及び修正を行った後、平成31年4月1日から施行された。

研修会の受講及び所内カンファレンス による体制の整備

検査員及び検査部門責任者、信頼性確保部門責任者を対象とした研修会に職員を参加させるとともに、平成31年1月と4月の2回、所内カンファレンスにおいて、精度管理に関する考え方や実際にやるべきことについて講習会を行った。第2回目のカンファレンスでは、実際の運用に当たって職員がなすべき具体的事項について説明した(表3)。

表3 研修会の受講と所内カンファレンスの実施

平成30年11月	精度管理研修会 (全職務分掌対象)	4名参加
平成31年 1月	所内カンファレンス (精度管理に関する基本的な考え方)	全職員
平成31年 4月	所内カンファレンス (精度管理の概要並びに実施に際しての注意点)	全職員
令和元年 8月	ISO/IEC17025内部監査員研修 (検査部門責任者、信頼性確保部門責任者対象)	1名参加
令和元年 9月	精度管理研修会 (信頼性確保部門責任者対象)	1名参加
令和元年10月	精度管理研修会 (全職務分掌対象)	2名参加

カンファレンスを通じた職員への要請事項を表4に示した。

表4 カンファレンスにおける職員への要請事項

- 1 業務管理実施要領を読み込み、標準作業書に沿って検査を実施する
- 2 検査区分責任者は検査室に立ち入り禁止看板を設置する
- 3 検査試薬等担当者は試薬専用棚、容器、表示を準備し、様式に従い記録を作成する
- 4 機械器具管理担当者は管理担当者の氏名を記入したシールを管理担当機器に貼付する
- 5 機械器具管理担当者は次年度中に定期点検等が必要な機械器具のリスト及び内容を記載した文書を作成し、検査部門責任者に提出する
- 6 検査部門責任者は、それらを取りまとめ、次年度における機械器具の定期点検等計画書を作成し必要な予算措置を図る

業務管理実施要領を読み込み、標準作業書に沿って検査を実施すること、立ち入り禁止看板の設置、試薬専用棚、容器、表示の準備、管理担当者の氏名を記入したシールの添付、および必要な予算措置を図ることについて要請するとともに職員全体で認識を共有した。カンファレンスを通じた要請事項に基づき実行された具体例を示した。図2に検査室の立ち入り禁止区域

の表示、図3に試薬専用棚、容器、表示の表示を示した。



図2 立ち入り禁止区域の表示

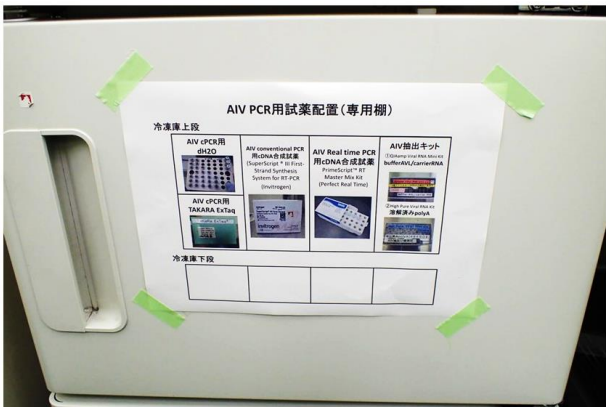


図3 試薬管理の一例

また、冷凍冷蔵庫や恒温機の温度管理については、標準作業書に従い1日1回以上温度を目視で確認し、保守点検記録に記入するとともに、データロガーを用いて経時的な温度変化を記録し、年1回を目安とするデータロガーの校正を行い、結果をデータロガー校正記録に記録し保管することとした(図4)。



図4 冷凍冷蔵庫・恒温機温度管理の事例

また、管理担当者の名前が入った保守管理対象器具へのシールの添付を図5に示した。



図5 保守管理対象器具へのシールの添付事例

図6に遺伝子合成機の「機械使用記録」を示した。

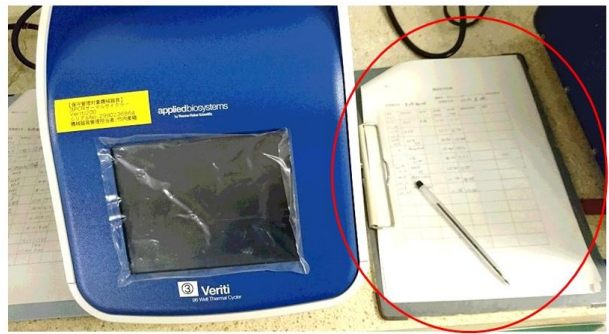


図6 遺伝子合成機の使用記録簿の一例

機械器具保守管理に係る一般事項として保守管理対象器具全てに対し同様に適用した。図7に血清抗体検査の各種記録簿を示した。

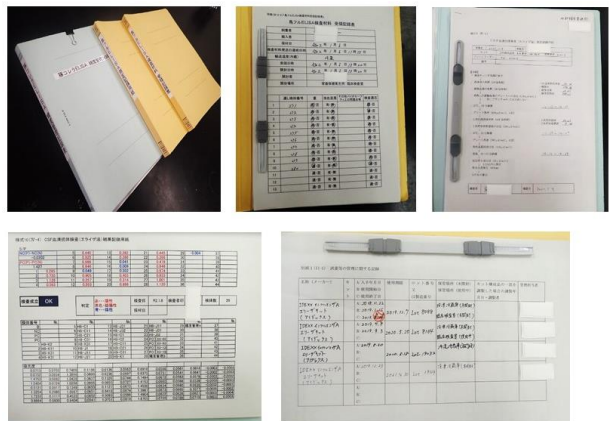


図7 血清抗体検査に係る各種記録簿の事例
検査材料受領記録、測定記録用紙、検査結果記録用紙、試薬等の管理に関する記録類について、すべて標準作業書で定めた様式により作成した。

備品の整備

業務管理実施要領の中では、機械器具の管理に関する標準作業書が定められており、検査精度を担保するための機械の性能、メンテナンスが求められる。平成31年4月からの精度管理施行に先んじて、平成29年以降、既存備品の見直しと整備を進めた。特に温度管理に重要である冷蔵庫類は、相当年数が経っていても故障がなければそのまま使用されており、すでに耐用年数を過ぎたものが大半を占めていたため、古いものから順次予算要求を行い更新した。また、今後整備予定の機器を表5に示した。

表5 備品の整備

平成29～31年整備品	整備予定品
薬用冷凍冷蔵庫(3台)	遺伝子合成機
ふ卵器	高速冷却遠心機
蒸留水製造装置(2台)	マイクロプレートリーダー
遺伝子合成機	小型超低温槽
光学顕微鏡及び顕微鏡用撮影装置	薬用冷凍冷蔵庫
マイクロプレートウォッシャー	CO ₂ インキュベーター
超低温槽	ヒートブロック
低温恒温槽	オートクレーブ
乾熱滅菌機	クリオスタット
	ビーズ式細胞破砕機

標準作業書では、機械器具ごとに保守点検や日常点検、校正について定められており、それぞれ決められた点検が実施される。精度管理の検査に使用するマイクロピペットの校正は、外部委託により実施した(図8)。



図8 ピペットの精度管理

外部精度管理及び内部精度管理品

外部精度管理は本施行以前の平成29年から表6に示す事業として試験的に実施された。

表6 外部精度管理及び内部精度管理の概要

- 外部精度管理は本施行以前の平成29年から家畜疾病診断精度管理向上事業として試験的に実施
- 検査項目:
 - ・ 牛ヨーネ病遺伝子検査
 - ・ 鳥インフルエンザ遺伝子検査
 - ・ 鳥インフルエンザ血清抗体検査
- 平成30年11月よりCSF血清抗体検査が新たに追加
- 内部精度管理は既知試料又は外部精度管理用試料を管理用試料とし、少なくとも陽性、陰性の2試料を繰り返し3回検査

検査項目は、牛ヨーネ病遺伝子検査、鳥インフルエンザ遺伝子検査、鳥インフルエンザ血清抗体検査で、平成30年11月からはCSF血清抗体検査が新たに追加された。内部精度管理は既知試料又は外部精度管理用試料を管理用試料とし、少なくとも陽性、陰性の2試料を用いて繰り返し3回検査をおこなった。外部精度管理による検査の改善事例として、平成29年度ヨーネ病遺伝子検査を表7に示した。

表7 ヨーネ病遺伝子検査外部精度管理における検査の改善事例

- 検査の結果、試験結果が「不良」と判定
- 検査結果の記録から、DNA抽出の段階に問題ありと判明
- 試料からのDNA抽出に際しF社DNA抽出キット + Y社ビーズ式破砕装置の組合せにおける当初の破砕条件は4,000rpm × 5分
- DNA抽出に際し、同一機械、同一条件で実施した全国の7施設において試験結果が「不良」と判明
- 動物衛生研究所による検証の結果、破砕時間が2分に短縮される回転数およびその他の条件は同一
- 条件変更後の再試験にて良好な結果を得る

検査の結果、判定が「不良」と判定され、検査結果の記録から、試料からのDNA抽出の段階に問題があることが判明した。当初の手順書では、試料からのDNA抽出に際しF社DNA抽出キット + Y社ビーズ式破砕装置の組合せにおける破砕条件は4,000rpm × 5分とされていたが、DNA抽出に際し、同一機械、同一条件で実施した全国の7施設において試験結果が「不良」と判明し、動物衛生研究所による検証の結果、破砕時間が2分に短縮された。条件変更後の再試験では良好な結果を得ることができた。

標準作業書の改訂

標準作業書の一部改訂に至った経緯を表8に示した。

表8 標準作業書の一部改訂に至る経緯

平成30年9月	国内における飼養豚のCSF発生 野生いのししのCSF陽性事例
平成31年4月	家保の精度管理開始
令和元年10月	捕獲野生いのししCSF検査開始 CSF陽性いのししからのコンタミネーションの懸念 いのししの検査室をその他の検査から分離・独立 飼養豚CSF発生時の防疫対応に伴う検査員の不足
11月	精度管理委員会 一般管理に関する標準作業書業の一部改訂 (職務分掌・検査区域)

平成30年9月、国内における飼養豚のCSF発生と、野生いのししのCSF陽性事例が報告された。平成31年4月から、予定通り家保の精度管理が開始され、CSF血清抗体検査も標準作業書で定められた検査員が定められた方法に従い検査を開始した。その後、国内におけるCSFの浸潤が進み、10月からは陽性のリスクがある捕獲野生いのししの検査が開始された。いのししのCSF検査にあたり、コンタミネーション防止を余儀なくされ、野生いのししの検査室をその他の検査から分離・独立した。さらに、当初事務分掌で定められた検査員は、飼養豚CSF発生時の防疫対応にあたる職員と重なり、検査員が不足する事態となり、令和元年11月に精度管理委員会を開催し、事務分掌や検査区域に係る一般管理に関する標準作業書業の改訂を行った。

いのししCSF抗体検査に伴う 新たな懸案事項

CSF血清抗体検査については、当初、血清中にウイルスが含まれる材料を想定していなかったが、野生いのししにおけるCSFVのまん延に伴い、捕獲いのししの血清中にウイルスが混在する可能性が高くなった。標準作業書における血清非働化は検査キットの使用説明書どおり、56℃30分と規定されているが、CSFVを完全に不活化するには、65℃で60分の加熱が必要¹⁾

とされており、感染性のあるウイルスが残存しCSFVによるコンタミネーションの危険性が懸念された(表9)。

表9 いのししCSF検査に伴う新たな懸案事項

- 野生いのししにおけるCSFVのまん延に伴い、捕獲いのししの血清中にCSFVが混在する可能性
- 検査材料取扱標準作業書及び検査実施標準作業書において、血清非働化は56℃30分と規定
- CSFVを完全に不活化するには、65℃で60分の加熱必要(豚病学第4版)
- CSFVIによるコンタミネーションの危険性
- 抗体検査に影響を与えずCSFVIによる汚染を防ぐ方法の検討が必要

まとめ

検査の精度管理体制の構築により、記録作成、機械のメンテナンス、備品の更新等が徹底され、責任の明確化、内部研修による技術レベルの平準化が図られるなどのメリットが見られた(表10)。

表10 まとめ

- 記録作成、機械のメンテナンス、備品の更新等が徹底され、責任の明確化、内部研修による技術レベルの平準化が図られるなどのメリットが見られた
- 検査技術の高位平準化による正確な病性鑑定結果に基づいた迅速な防疫対応が期待できる
- 不測の事態が発生した場合の対処法として、事態に相応した対応・標準作業書の改訂が必要

今般、国内CSFの発生に加え、近隣諸国において越境性動物疾病が発生し、我が国への侵入リスクが極めて高い状況のもと、精度管理体制を構築することにより、検査技術の高位平準化による正確な病性鑑定結果に基づいた迅速な防疫対応が期待できると考えられた。一方、標準作業書の内容から逸脱する不測の事態が発生した場合の対処法として、事態に相応した対応、標準作業書の改訂が必要と思われた。平成31年4月から、精度管理が施行され、家保における検査の信頼性確保に向けた取り組みの第一歩を踏み出した。しかし、信頼性確保は時間のかかる取り組みであり、10年経って一人前ともいわれている。今後更なる検査の信頼性確保の向上に向けて標準作業書の内容からの逸脱が生じ

た場合、標準作業書の改訂を行い、PDCA サイクルをまわし、よりよい検査体制を整えていくことが肝要である（図9）。



図9 検査の信頼性確保に向けた取り組み

引用文献

- 1) 田村みず穂ほか:家畜保健衛生所における検査の信頼性確保に向けて、平成26年度家畜保健衛生業績発表会集録 神奈川県 20-25(2014)
- 2) 寺西梨衣:病性鑑定指針と家畜疾病診断の制度管理について、日獣会誌 68 614-615(2015)