

水産防疫対策委託事業「魚病診断機関における検査精度管理体制の確立」実施報告（内部精度管理1）

国立研究開発法人 水産研究・教育機構
増養殖研究所

目的：

本事業は、疾病検査技術の向上及び平準化を図るため、魚病診断機関（都道府県の水産試験場等）の検査の精度管理の業務管理要領等の作成及び魚病診断機関の検査結果について、外部評価機関による評価等を通じた外部精度管理のための体制を構築することを目的とする。

概要：

精度管理の対象疾病としてコイヘルペスウイルス（KHV）病及びコイ春ウイルス血症（SVC）を選定し、検査を決定した。また、精度管理の概要を定めた「検査等の業務管理要領（案）」を作成し、それに基づき標準手順書等の内部精度管理の具体的方法を示した文書の雛形及び外部精度管理実施要領案を作成した。これらを基に、水産安全室において参画機関を募り、新潟県、広島県、日本水産資源保護協会の3機関が試行に参加することとなった。2017年12月末までにそれぞれの機関が雛形をもとに精度管理のための標準手順書等各書類を作成した。それぞれの機関で作製した書類は枝葉の部分では異なっているところもあるが、いずれも基本的にはひな型と大きく変わっていない。1月下旬に外部精度管理用のサンプルを各機関に配布し、各機関の検査結果を得るとともに、精度管理の手順などに関する意見や質問等を受けたため、これら意見等について、標準作業手順書、業務管理要領及び外部精度管理調査実施要領の改善を行った。事業の具体的な実施内容は、以下のとおり。

（1）検査精度管理を実施すべき疾病及び検査法の決定

優先的に検査精度を実施すべき疾病（2疾病以上）としてコイヘルペスウイルス（KHV）病およびコイ春ウイルス血症（SVC）を選定し、その検査法を決定した。

(2) 標準手順書の雛形等の作成

上記(1)で決定した疾病及びその検査法について、魚病診断機関における疾病検査の内部精度管理の業務管理要領案、検査を実施するに当たって必要な標準手順書の雛型等、下記文書類を作成した。

① 検査等の業務管理要領(案)

② 標準手順書の雛形(案) Word

- 図1(例) 検査区域見取り図
- 別紙1(例) 依頼書(様式)
- 別紙2(例) 調書(様式)
- 別紙3(例) KHV 検査マニュアル(案)
- 別紙4(例) SVC 検査マニュアル(案)
- 別紙5(例) KHV 検査状況記録票(様式)
- 別紙6-1(例) SVCV 検査状況記録票(ウイルス分離用、様式)
- 別紙6-2(例) SVCV 検査状況記録票(RT-PCR 用、様式)
- 別紙6-3(例) SVCV 検査状況記録票(nested-PCR 用、様式)
- 別紙7(例) 検査報告書(様式)
- 別表1(例) 試薬管理リスト(様式)
- 別表2(例) 機器校正記録表(様式)
- 別表3(例) 温度記録表(様式)
- 別表4(例) 問題点管理表(様式)

これらの文書は別添として示す。

③ 外部精度管理実施要領については別途掲載する。

① 都道府県水産試験研究機関等における魚病検査等の業務管理要領（案）赤字はコメント

1 目的

この要領は、都道府県水産試験研究機関等におけるコイヘルペスウイルス病検査、コイ春ウイルス血症検査（以下「検査」という）の精度を維持向上させ、検査結果の信頼性を確保するために、必要な業務管理について具体的事項を定める。

2 組織と要員

検査を行う組織は検査の精度管理規定である、標準手順書を作成し、要員として品質管理者および技術管理者をおく。必要に応じて技術管理者の下に検査要員をおく。

（１）品質管理者は検査の信頼性を確保するための手順が常に遵守され、実施されるための業務を行う。

- ① 品質管理者は技術管理者および必要に応じて技術管理者の下で検査を行う検査要員を任命する。
- ② 品質管理者は検査等の業務について、標準作業書に基づき定期的に内部監査を行う。
- ③ 品質管理者は技術管理者と協力して定期的に外部精度管理を受けるための事務を行う。
- ④ 品質管理者は標準手順書やそれに基づく文書の承認と発行を行う。
- ⑤ 品質管理者は標準手順書やそれに基づく文書を保管する。
- ⑥ 品質管理者は標準手順書からの逸脱が生じた場合には、是正措置を講じ、または指揮する。必要であれば標準作業書の改訂等、文書の変更を行う。
- ⑦ 品質管理者は各要員に関する任命、教育、研修、解任等の記録を作成し、保管する。

（２）技術管理者は検査の実施と結果の評価を行い、あるいは指揮する。

- ① 技術管理者は検査要員を兼ねることができる。
- ② 技術管理者は検査が定められた実施手順を逸脱することなく検査が行われていることを確認する。
- ③ 技術管理者は検査に係る施設設備、機械器具および試薬等の管理を行う。
- ④ 技術管理者は検体の保管、管理を行う。
- ⑤ 技術管理者は標準手順書からの逸脱が生じた場合には、是正措置を講じる。

3 教育・研修等

（１）品質管理者は機会に応じて技術管理者や検査要員に検査技術向上のための研修を受講させる。

（２）技術管理者は検査要員に対して必要な技術水準を確保するための教育訓練を行う。（技術管理者以外に検査要員が設定されている場合。また、検体処理の一部を臨時職員等に行わせる場合は、「補助者」等として任命し、作業範囲を限定して教育訓練を行う。）

4 検査室等の管理

- （１）検査のための検査室あるいは区画を設定し、それ以外の場所では検査は行わない。
- （２）技術管理者は（１）項のために十分な広さの検査室ないし区画を設ける。
- （３）技術管理者は検査室の適切な温度、湿度、換気、照明等を確保し、必要に応じて検査区画の目的外使用を制限する。

5 機械器具の管理

- (1) 技術管理者は、操作、保守点検、滅菌、消毒、洗浄、清掃等が容易に行われるよう機械器具を適切に配置する。
- (2) 標準手順書に次の手順を記載する。
 - ① 検査に用いる機械器具のリスト作成。
 - ② 取扱説明書の管理、可能であれば校正方法、日常の保守の方法。
 - ③ 外部校正、保守、修理の記録。

6 検査に係る連絡の記録および検査結果の報告

- (1) 病性鑑定の依頼を受けた場合は、日時、対応者、相手の所属・氏名、内容、対応等を記録する。
- (2) 標準手順書に検査状況を記録する方法について記載し、検査を行った要員は当該手順にしたがって検査状況を記録する。
- (3) 検査結果通知書を作成し、品質管理者の承認を受けた後、通知・報告等を行う。

7 検査材料（検体）について

検査材料の受け取りに際しては次の事項を記録した後、検査あるいは保管する。

- ① 採材日
- ② 輸送状況（室温、冷蔵、宅急便等）
- ③ 受領日時
- ④ 受領者名
- ⑤ 検体の確認（本数、内容、保冷状、バイオセーフティ上の問題点況等）
- ⑥ 検体番号

8 試薬等の入手および管理

- (1) 検査に必要な試薬等の購入は組織規定に従って行う。
- (2) プライマー、PCR 関連酵素（キット）、核酸抽出キット、細胞培養用血清、陽性対照等、検査精度に関与すると考えられる試薬は記録を作成し、保管する。記録する項目は、名称、メーカー名、入手年月日、使用開始日、使用終了日、使用期限、ロット番号（製造番号）、保管場所 等である。
- (3) プライマーおよび PCR 酵素類、血清等は購入後、品質を確認する。

9 検査等の手順

- (1) 検査等の手順は、当該検査対象疾病に関する病性鑑定指針等で定められた方法を基にして作成された標準手順書に従って実施する。
- (2) 病性鑑定指針等で定められた方法以外の試験法によって検査を行う場合には、当該試験法の妥当性を評価・記録し、保管すること。

10 内部精度管理

- (1) 技術管理者は自身及び他の検査要員に対して 1 年に 1 回以上の技能評価を実施する。
- (2) 技術管理者は技能評価を不良と判断した場合には、該当検査要員の技能の向上を図る。技能が所

定の水準に達しないと判断された検査要員は検査を行わないこととする。

- (3) 技能評価の結果は記録し、品質管理者の確認を受けたのち、保管する。

1 1 外部精度管理

- (1) 検査組織は1年に1回以上の外部精度管理調査を受ける。
- (2) 結果が不良の場合、技術管理者はその原因を突き止め、対策を講じる。
- (3) 技術管理者は不良の原因と対策についてとりまとめた報告書を作成し、品質管理者の確認後保管するとともに外部精度管理調査実施機関に映しを送る。

1 2 内部監査

- (1) 品質管理者が指定した職員は、標準手順書をチェックリストに用いて、標準手順書からの逸脱の有無を1年に1回以上、内部監査を実施し、結果を品質管理者に報告する。また、品質管理者は、自らこれを実施することができる。改善措置が必要な場合には、技術管理者に報告する。
- (2) 技術管理者は問題点について改善措置を講じ、記録する。記録は品質管理者が保管する。
- (3) 上記の定期的な内部監査時以外で問題点が発見された場合も、技術管理者は改善措置を講じ、記録する。記録は品質管理者が保管する。
- (4) 改善措置を講じた問題点に関しては必要に応じて再度監査を行い、同様に記録、保管する。

1 3 文書

上記項目を実行するために、これらを規定した標準作業書および付属文書類を作製し、それに従って検査を行う。

② ○○○水産試験研究機関等における魚病検査のための標準手順書（雛形）

目次

1. 目的
2. 組織と要員
3. 検査区域
4. 検査依頼とサンプル
5. 検査手順
6. 結果報告
7. 物品の購入と管理
8. 機器の保守管理と環境維持
9. 内部精度管理
10. 外部精度管理
11. 内部監査
12. 文書管理

なお、文書内の赤字はコメント。付属文書の引用部分は、わかりやすく太字と赤字で示してある。また、別表などの様式はないが記録すべき内容を示したところには下線を引いてある。

1. 目的

本手順書は、コイヘルペスウイルス（KHV）病およびコイ春ウイルス血症（SVC）の検査による病性鑑定業務を実施するにあたり、これら検査の精度や信頼性を確保するために実行すべき手順を定める。

2. 要員と組織

ここでは実質的な検査者が1ないし2人しかいない場合を想定しているが、人員に余裕があれば、技術管理者の下に検査要員として複数名をおくことができる。

2.1. 病性鑑定に関連する要員として品質管理者と技術管理者を置く。技術管理者の下には検査要員を置くことができる。要員の任命および解任については、任命/解任の日付、要員の氏名、解任理由（異動のため等）を記録、保管する（様式無し）。（注：様式無しで記録する規定部分には下線を引いてある）

2.2. 品質管理者は検査の信頼性を確保するための手順が常に遵守され、実施されるようにするため、次の業務を行う。

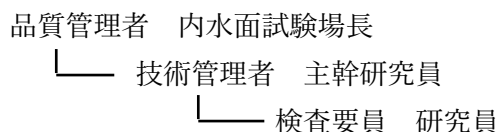
- ⑥ 品質管理者は技術管理者および必要に応じて技術管理者の下で検査を行う検査要員を任命する。
- ⑦ 品質管理者は検査等の業務について、標準作業書に基づき定期的に内部監査を行う。
- ⑧ 品質管理者は技術管理者と協力して定期的に外部精度管理を受けるための事務を行う。
- ⑨ 品質管理者は標準手順書やそれに基づく文書の承認と発行を行う。
- ⑩ 品質管理者は標準手順書やそれに基づく文書を保管する。
- ⑪ 品質管理者は標準手順書からの逸脱が生じた場合には、是正措置を講じ、または指揮する。必要であれば標準作業書の改訂等、文書の変更を行う。
- ⑫ 品質管理者は各要員に関する教育、研修等の記録を作成し（様式無し）、保管する。

2.3. 技術管理者は検査の実施と結果の評価を行い、あるいは指揮する。

- ① 技術管理者は検査要員を兼ねることができる。
- ② 技術管理者は検査が定められた実施手順を逸脱することなく検査が行われていることを確認する。
- ③ 技術管理者は検査に係る施設設備、機械器具および試薬等の管理を行う。
- ④ 技術管理者は検体の保管、管理を行う。
- ⑤ 技術管理者は標準手順書からの逸脱が生じた場合には、是正措置を講じる。

2.4. 組織

病性鑑定を行う組織図案を下図に示す。各場所における組織構造に即して作成する。



3. 検査区域

検査を実施する実験室内の区域、試薬および検体等の保管場所、検査に使用する各機器の場所を図 1 に示す。

4. 検査依頼と検体

- 4.1. 検査依頼は、依頼者から必要事項を記入した別紙 1 に示す検査依頼書および別紙 2 に示す調書を受け取ることにより受理する。
- 4.2. 依頼者とのやりとりはすべて記録する。依頼に関する依頼者からの追加情報は、調書に書き込むか、別紙（様式無し）に記載して調書とともに保管する。
- 4.3. 検体は受領ないし採取後、識別可能となるよう標識し、直ちに処理しない場合は図 1 に示す検体保管庫（冷凍庫）に保管するか、エタノール固定サンプル(KHV のみ)であれば、同図中の専用エリア内に保管する。
- 4.4. 検査終了後も検体は同様に最低 3 年間保管する。保管開始後 3 年を過ぎた検体はオートクレーブで滅菌した後廃棄する。
- 4.5. 受領した検体が正常な状態でない場合には速やかに依頼元にその旨を連絡し、対応索を講じるとともに依頼元とのやりとりを記録し、診断調書とともに保管する。
- 4.6. 保管時には検体に次のように識別記号を付するとともに受領者の氏名を記載する。

例・検体の識別例；KHV170721○○-20

・個別検体の識別例；KHV170721○○-9/20

(1) KHV170721；検査病名と検体受領日（KHV 検査用サンプル 2017 年 7 月 21 日）

(2) ○○；魚の採捕地（養殖場）名略称等

(3) 20；検体数

(4) 9/20；検体番号（この場合 20 検体のうちの 9 番目であることを示す）

- 4.7. 依頼によらない検査の場合、別紙 1（検査依頼書）は用いずに、別紙 2（調書）にその旨を記載する。**この項はサーベイ等で水産試験研究機関から検査を要請する場合を想定。**
- 4.8. SVC サンプルの受け取り方法は別紙 4「SVC 検査マニュアル」の 4－1「輸送方法」及び 4－2「臓器の種類」に記載。

5. 検査手順

- 5.1. コイヘルペスウイルス（KHV）病およびコイ春ウイルス血症（SVC）の検査方法は農林水産省の特定疾病対策ガイドラインに記載されたコイヘルペスウイルス病の病性鑑定指針に沿って行う。具体的検査手順は別紙 3「KHV 検査マニュアル」および別紙 4「SVC 検査マニュアル」に示す。
- 5.2. 検査者は別紙 5「KHV 検査状況記録票」ないし別紙 6-1、2、3「SVC 検査状況記録票」に必要事項を記録する。検査状況記録票を修正する場合には、修正箇所に線を引いて見え消しにして修正し、修正箇所に修正者がサインする。

6. 結果報告

- 6.1. 検査結果は結果報告書様式（別紙 7）に従って作成、pdf 化するとともに依頼元に送付する。

6. 2. pdf 化した結果報告書は pdf 化した依頼書（別紙 1）、調書（別紙 2）、検査状況記録票（別紙 5 および 6）とともに依頼ごとにまとめて品質管理者が記録フォルダに保管する。原本は技術管理者が保管する。
6. 3. 試験方法からの逸脱、追加又は除外、特別な環境条件などが合った場合は結果報告書に記載する。

7. 物品の購入と管理

7. 1. 検査に必要な物品の購入は組織規定に従って行う。検査の精度に直接影響を与える物品、すなわち、プライマー、PCR 酵素（キット）、核酸抽出キット等は、表 1 に示す商品を購入する。表 1 の試薬類は購入後別表 1「試薬管理リスト」に記録する。

別表 1 は印刷して保管し、リストに追加・変更があればその場で加筆する。毎年 3 月にリストを pdf 化し、品質管理者が記録フォルダ中に保管する。本記録は最低 5 年間記録フォルダ中に保存する。

表 1 購入管理記録を残す試薬類

品名	種類	メーカー	製品番号
Sph 1-5 F	プライマー		
Sph 1-5 R	プライマー		
TK F	プライマー		
TK R	プライマー		
exSVCV F	プライマー		
exSVCV R	プライマー		
SVCVF1	プライマー		
SVCVR2	プライマー		
SVCVR4	プライマー		
SVCV nest F	プライマー		
SVCV nest R	プライマー		
QiaAmp DNN mini kit	DNA 抽出キット		
TRIzol	組織用 RNA 抽出キット		
TRIzol LS	培養上清用 RNA 抽出キット		
Takara Ex Taq Hot Start Varsion	PCR 酵素		
SuperScript III One-Step RT-	RT-PCR 酵素		

PCR with Platinum Taq			
MEM	細胞培養用培地		
牛胎児血清 (FBS)	細胞培養用培地		
抗生・抗菌剤	細胞培養用培地		
EDTA バッファ	細胞分散液		
トリプシン EDTA	細胞分散液		
EPC 細胞または FHM 細胞			

バッファー等を自作するときは基になる試薬を記載する。

7. 2. プライマーおよび PCR 酵素類は購入後実際に検査を行う前に陽性対照を用いて PCR を行い、所定の位置に明瞭なバンドが得られることを確認し、**別表 1**「試薬管理リスト」に記録する。
7. 3. 血清は新たなロットを購入する場合、それを用いて細胞を 3 回継代して問題なく増殖することを観察する。その後 IHN ウイルスを接種して CPE の出現を観察する。使用中の血清があればそれを使用した試験も同時に行って性能を比較する。結果は**別表 1**「試薬管理リスト」に記録する。 **購入量にもよると思われるが、新たなロットの血清を購入する場合、代理店を通して購入したいロットの血清少量を試供品として分与してもらうことが可能である。その場合、試供品を用いて上記のように品質をチェックし、問題なければそのロットをまとめて購入し、冷凍保存する。これは、培養細胞は使用する血清のロットによってしばしば状態が変化するためである。**

8. 機器の保守管理と環境維持

検査に影響を与える可能性がある機器や検査環境について精度の維持や環境の維持のために以下の措置を行う。

8. 1. ピペットは検査用であることを示すラベルを貼り、年に 1 度外部に校正を依頼し、校正証書を保管する。外部校正を行わない場合には、年に 1 度電子天秤を用いてそれぞれ所定量の蒸留水を 10 回ずつ秤量し、100 $\times$ L 以上を測定する場合には 1mL を 1g として誤差 1%以内であること、100 $\times$ L 未満を測定する場合は誤差 1mg 以内であることを確認する。測定データは記録、保管し（様式無し）、結果は**別表 2**「機器校正記録表」に記録、保管する。また、全てのピペットについて、毎回の検査時に各チップに示された目盛りを目安に吸った液量を目視で確認する。
8. 2. 試薬・サンプル保管庫（冷蔵庫・冷凍庫等）は 1 日 1 回、表示温度（あるいは庫内に入れた温度計の温度）をチェックし、備え付けの**別表 3**「温度記録表」に記入する。表は 1 枚が埋まれば pdf 化して、記録フォルダに保管する。
8. 3. 電子天秤は年に一度、分銅を用いて 10 回秤量する。分銅は防湿庫内で保存する。秤量時には手袋を着用し、付属のピンセットにより分銅を取り出し、未使用のプラスチックシャーレに載せて重量測定を行う。詳細は記録フォルダに記録を保管し（様式無し）、結果を**別表 2**「機器校正記録表」に記録、保管する。

- 8.4. PCR 機器に関しては検査毎に PCR 開始時のサーマルサイクラーの 1 サイクル分の温度を検査状況記録票（別紙 5 ないし 6）に記録し、プログラムと一致していることを確認する。
- 8.5. 電気泳動ならびに撮影装置：検査毎に分子量マーカーの泳動バンドの分離状況や明るさを確認し、検査状況記録票に記載し、また泳動写真を検査状況記録票に貼る（中間チェック）。年に一度、1 年分の各検査での分子量マーカー泳動像を比較し、経日変化が無いことを確認し、校正記録とし、結果は機器校正記録表（別表 2）に記録する。電気泳動に用いるアガロースは作製日を記入し、作製後 2 週間以内に使用する。泳動槽の TAE バッファーは使用後に瓶に入れて保存し、使用回数は 10 回以内とする。
- ・上記校正・チェックにおいて、疑わしい結果を生じる機器であると判断された場合には、業務使用を停止し、その旨を示すラベルをその機器に貼る。また、修理後には上記校正を実施し、正しい結果を得る機器であることを確認するとともに修理記録（様式無し）を保管する。
- 8.6. 安全キャビネット：紫外線灯、ガズバーナー、送風量メーターの確認（毎回使用前）
- 8.9. 環境の維持
- ・検査を行う部屋は定期的に清掃を行う。
 - ・検査を行う部屋には温度計を設置し、室温はエアコンにより 15～30℃（機器の動作保証温度範囲）に維持する。
 - ・試験開始前に机上のほこりを拭き取る。また、試験時の机上には試験に必要な器具・薬品・試料以外は置かない（恒久的に置かれている一部の器具・機材を除く）。
 - ・汚染防止のため、DNA 抽出、PCR 反応液の作製・PCR、電気泳動の各行程に用いる機器はそれぞれの作業室に設置する。また、ピペット、小型遠心機、ボルテックス等も設置場所を指定し、そこからの持ち出しを制限する。
 - ・ハサミ・ピンセットの洗浄ならびに保管方法については、検査手順書に従う。
 - ・その他、汚染回避については、検査手順書に示す。

9. 内部精度管理

検査に従事する検査要員の技能評価（内部精度管理）を行う。

- 9.1. 頻度：技術管理者は、検査要員に対して 1 年に 1 回以上の技能評価を実施する。
- 9.2. 手順：技術管理者は SVC に関しては培養細胞によるウイルスの検出および PCR、KHV に関しては PCR について、少なくとも陰性サンプルと陽性サンプルの 2 種類を用意して検査を行う。技術管理者以外の検査要員はブラインドで検査を行う。
- 9.3. 代替ウイルス：SVCV の培養細胞による検出は伝染性造血器壊死症（IHN）ウイルスあるいはウイルス性出血性敗血症（VHS）ウイルス IVa 型によって代えることができる。
- 9.4. 評価：陰性サンプルは陰性、陽性サンプルは陽性と判定されれば合格とする。
- 9.5. 不合格への対処：技能評価が不合格となった場合は原因を明らかにし、必要に応じて当該検査要員の再教育を行い、再度技能評価を行う。
- 9.6. 技術管理者は技能評価、再教育、および再技能評価等の方法・結果を記録し、品質管理者の確認を受けたのちに、保管する（様式なし）。

10. 外部精度管理

検査に関する客観的技能評価を行うために外部機関による精度管理調査に参加する。

10.1. 品質管理者は増養殖研究所等が行う外部精度管理調査を受けるための事務手続きを行う。

10.3. 外部精度管理の結果は保管する。

10.2. 正しい判定ができなかった場合、品質管理者は技術管理者にその原因を究明させ、対策を講じさせるとともに、必要に応じて外部研修を受けさせる。

10.3. 不合格の場合の対処については記録し保管する（様式なし）。

11. 内部点検

11.1. いかなる時でも問題点（本手順書からの逸脱）が発見された場合は、問題点管理表（別表 4）に従って問題点の処置を確定し、実施する。別表 4 は記録し、保管する。問題点は以下の過程で発見される。

1. 物品購入
2. 様々な記録
3. 内部監査
4. 教育訓練
5. 環境あるいは施設管理
6. 設備機器の問題点
7. 試料の保管
8. 内部または外部精度管理
9. 検査手順（からの逸脱）
10. その他

11.2. 内部監査：1 年に 1 度品質管理者は要員を指名し、本手順書の記載事項が遵守されているか否か内部監査を行う。

11.3. 内部監査においては本手順書のコピーをチェックリストとして用い、各項目について点検し、項目ごとに点検結果を書き込み、サインをする。（注：本手順書とは別にチェックリストを作成してもよい。）

11.4. 手順書からの逸脱が発見された場合は問題点管理表（別表 4）に従って処置を確定し、実施する。

12. 文書管理

12.1. 文書とは本手順書および本手順書 12.3. によって指定される下述文書、別紙、別表、記録の全てを指す。

12.2. 原則として文書原本は検査管理者が保管し、電子化したものは品質管理者が保管する。

12.3. 保管するフォルダーは、少なくとも手順書や各種様式を保管する原本フォルダーと記録を保管する記録フォルダーを設け、保管する。各フォルダに保管する文書は以下のとおり。（注：適当にサブフォルダを設けてもよい。）

(1) 原本フォルダに保管

標準手順書（本文書） Word

図 1：検査区域（設置機器、試薬・サンプル等保管場所）等の図示

別紙 1：依頼書（様式） Word

別紙 2：調書（様式） Word

別紙 3：KHV 検査マニュアル Word

別紙 4：SVC 検査マニュアル Word

別紙 5：KHV 検査状況記録票（様式） Word

別紙 6：SVC 検査状況記録票（様式） Word

別紙 7：検査結果報告書（様式） Word

別表 1：試薬管理リスト（様式） Excel

別表 2：機器校正記録表（様式） Excel

別表 3：温度記録表（様式） Excel

別表 4：問題点管理表 Excel

(2) 記録フォルダに保管

別紙 1：依頼書 pdf

別紙 2：調書 pdf

別紙 5：KHV 検査状況記録表 pdf

別紙 6：SVC 検査状況記録票 pdf

別紙 7：検査結果報告書 pdf

別表 1：試薬管理リスト Excel

印刷して保管し、リストに追加・変更があればその場で加筆する。毎年 3 月にリストを pdf 化し、品質管理者が記録フォルダ中に保管する。本記録は最低 5 年間記録フォルダ中に保存する。

別表 2：機器校正記録表 Excel

別表 3：温度記録表 pdf

別表 4：問題点管理表 Excel

特に本手順書において様式を定めない文書（注：各場所で様式を定めてもよい）

- ・検査要員任命の記録

任命/解任の日付、要員の氏名、解任理由（異動のため等）を記録、保管する。

- ・教育・訓練の記録

- ・ピペット検定データ

- ・電子天秤検定データ

- ・機器の修理記録

- ・内部精度管理（技能評価、再教育等）記録

- ・外部精度管理結果 pdf

- ・外部精度管理不合格の場合の対処記録

12.4. 文書（原本フォルダに保管するもの）の終わり（ないしフッター等）には、下記のように版番号と発行日を記載する。

「初版 2017 年 12 月 4 日」、「第 2 版 2018 年 5 月 26 日」など

12.5. 標準手順書（本文書）、別紙 3（KHV 検査マニュアル）、および別紙 4（SVC 検査マニュアル）を改訂した場合、改訂記録を残す。改訂記録は、改訂内容およびその理由と背景を表にして原本ファイルの最後に付加する。

初版 2017 年 12 月 4 日

第 2 版 2018 年 5 月 26 日 （注：このように改訂するごとに末尾に日付を記載し、下記のように内容と理由などを記録する。）

改訂記録 第 2 版

改訂内容	理由と背景
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

標準手順書附属文書 図1 検査区域見取り図 (例)

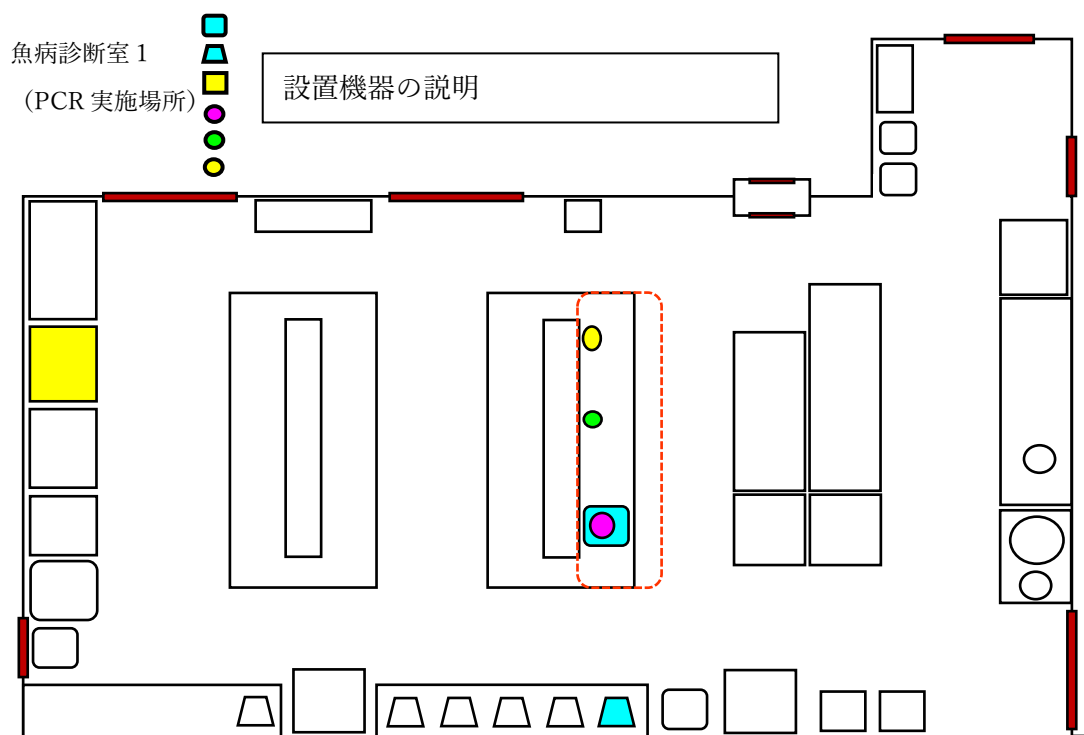


図 1-1

魚病診断室 2
(DNA 抽出)

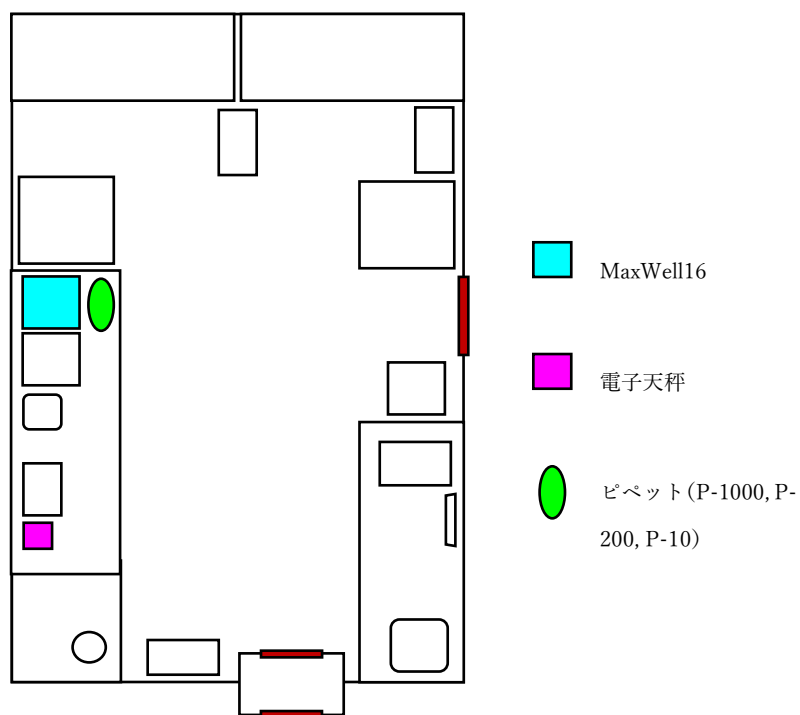


図 1-2

遺伝子実験室

(PCR 産物電気泳動)

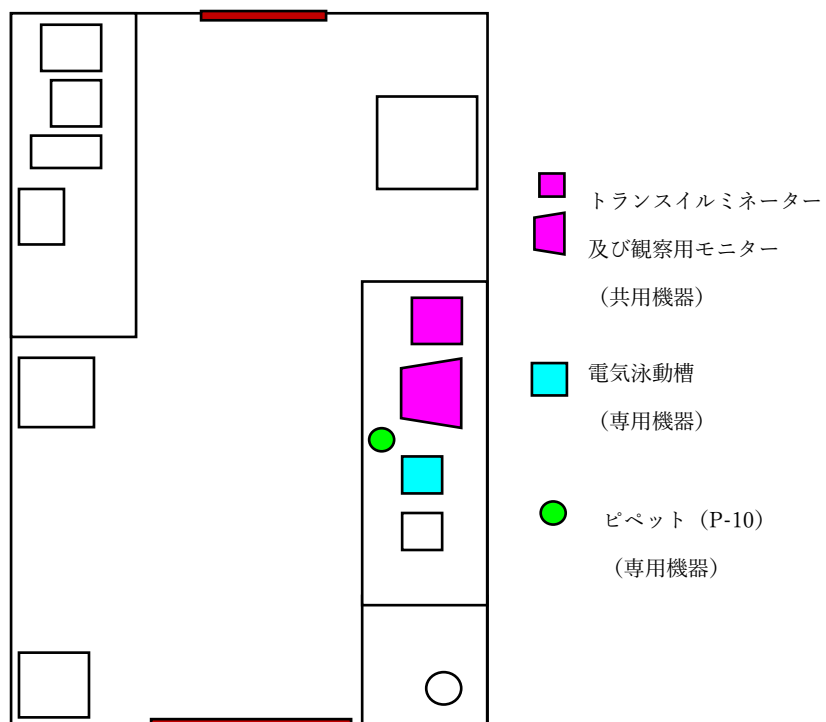


図 1-3

標準手順書付属文書 別紙1 依頼書（様式） （例）

各場所で以前から使用している様式があればそれを用いればよい。

検査依頼書

〇〇水産試験場

XXXXXX 殿

下記の検査を依頼したく、調書（様式2）を添えて申し込みます。

平成 x x 年 x x 月 x x 日

依頼者 所属：

氏名：

連絡先：TEL:

FAX:

E-mail:

記

検査カテゴリー： コイヘルペスウイルス病・コイ春ウイルス血症
その他（ ）

備考：

受付日： 平成 年 月 日

受付者名： _____

標準手順書付属文書 別紙2 調書（様式） （例）

同様の内容を記録する様式が以前からあればそれでよい

依頼者または検査対象魚の管理者		依頼日	平成 年 月 日
所 属		連絡先	TEL:
氏 名			FAX:
			E-mail:
試料内容 採材年月日： ☐ 病魚等生鮮試料（冷蔵・冷凍・活魚） 尾分 ☐ その他：			

【魚の情報】

魚種名		飼育目的	養殖・種苗生産（種苗・親魚）・ペット その他（ ）
平均サイズ	全長： mm（体長 mm）	体重： g	日齢（年齢）： 日
飼育（生息）場所	水槽・池・河川・湖沼・個人池 その他：	水温： °C	飼育（生息）尾数： 尾
魚の由来			

【異常や死亡等の状況】

異常の種類	死亡・遊泳異常・体調不良・奇形・産卵異常（不調） その他（ ）
<異常（死亡等）の発生状況> 発生時期： 月 日頃から 現在まで ・ 月 日頃まで 累積死亡率： % 異常の経過状況（特徴など具体的に）： 魚体の肉眼的異常：	
その他（気が付いた点や魚の放流などの状況）：	

以下検査機関記載欄

輸送状況：室温・冷蔵・冷凍・宅配便・持ち込み 等

受領日時：

受領者氏名：

検体の内容：どのような検体が何個あったかを記載。凍結鰓3個体分，活魚4尾，等。

検体番号：検査機関で付ける。

赤字はコメントないし、各検査機関で判断して記載する部分を示す。

1. 目的

本マニュアルは、コイヘルペスウイルス (KHV) 病に関する改良 sph 法による一次診断の手順を定める。

2. KHV 病の診断法全般における注意事項

1) 診断にあたっての注意

(1) 生の検体を扱う場合には、ウイルスの感染性を考慮し、使用した器具は全てオートクレーブ滅菌処理を行う。

(2) 試料のクロスコンタミネーションを防ぐため、検体ごとにチップ、ピペットを換える。

(3) エチジウムブロミドは発ガン物質なので、取り扱い時には手袋を着用する。粉末と溶液が市販されているが、吸引などの危険性から溶液を購入するのがよい。使用後のエチジウムブロミドを含むアガーは燃えるゴミとして廃棄する。

(4) PCR 検査の精度を高めるためには、コンタミを防ぐことが必須であり、本手順書最後の「DNA 抽出に用いるハサミおよびピンセットの洗浄方法」(添付2)の記載内容を順守する。

(5) 送付検体の形態は生鮮・冷凍・エタノール固定(70%以上)の何れでも構わないが、生鮮・冷凍の場合で検体を検査後長期間保存する場合には、エタノールで固定するか、-80℃で保存する。

(6) DNA 抽出に用いる1検体当たりのサンプル量は15mg(米粒大)とする。サンプル量が多いとDNAの純度が低下し、PCRに影響を及ぼす可能性がある。

2) コンタミ防止のための措置

サンプルへの不要なゲノムや増幅産物混入(コンタミ)の防止のために以下の措置をとる。

(1) 各作業場所の区別: PCR 検査の作業工程は抽出、PCR、泳動に分かれるが、各工程は異なる場所(異なる実験室あるいは机上)で行う。また、使用器具・薬品も区別して使用する。

(2) 各作業工程の順序の厳守: ‘抽出→PCR→泳動’の作業順序は厳守する。検査担当者が2名いる場合には、抽出とPCRを分担するとコンタミの可能性が低下する。1名の場合には、抽出終了後に使用した器具・薬品を片付け、机上のほこり等をふき取る。そして、手洗い後、改めてPCR反応液の調整に入る。泳動を行った者が直後にPCRを行うことは、絶対に避ける。また、陽性対照テンプレートの添加はPCR作業の中で最後に行う。

(3) PCR 反応液調整場所および使用器具のDNA除去: 特にPCR反応液を調整する場所でのDNA(コンタミ)除去に心掛ける。できればクリーンベンチ(ファンを作動させない状態で)あるいは専用のフード内で行う。使用前には、PCR反応液調整の際に用いる全ての器具について、紫外線照射によりDNAの除去を行う。

(4) 使用ピペットチップ: 使用ピペットチップは、全工程において、フィルター付のものをを使う。

(5) スピンドアウンの実施・チューブ蓋の開け閉め: 抽出の全ての作業工程においてスピンドアウン(遠心機を用いてチューブ内の液を完全に底に落とすこと)を行う。また、チューブ蓋の開け閉めには、内蓋に指先が触れないよう十分に注意する。オープナー(チューブの蓋を開けるための器具)を用いるの

もひとつの方法である。

（６）使用済みピペットチップの処理：使用済みピペットチップは工程毎にビニール袋（チャック付が便利）に捨て、作業終了毎に廃棄する。

（７）試薬の小分け保存：検査工程で用いる各試薬は少量ずつ小分けして使用する（容器に分注したものを使用する。）コンタミの恐れがある場合には、ただちに使用中のチューブを破棄する。

3. 必要な実験装置と試薬類

1) 実験装置

- ・紫外線殺菌ボックス：STERIRIZER MD-5 (NAVIS)
- ・電子天秤（組織量計測用）：メトラー・トレッド (PG403-S)
- ・PCR ボックス：SCIE-PLAS（フナコシ）
- ・サーマルサイクラー：C1000 Touch サーマルサイクラー（BIO-RAD）
- ・オートクレーブ：SX-500（トミー）
- ・ミニゲル電気泳動装置（アドバンス社）：Mupid R-exu（アドバンス）
- ・CCD カメラ撮影装置：FAS-IV（NIPPON Genetics）
- ・冷却遠心機
- ・冷凍庫(-20～-30℃)

2) 実験器具

（１）サンプル処理・抽出用

- ・解剖用ハサミ・ピンセット
- ・ハサミ・ピンセット収容用ボックス
- ・解剖皿
- ・ピペットマン P1000、P200、P10（ギルソン）
- ・フィルター付きチップ(1000 μ L、1-200 μ L、10 μ L 用)
- ・1.5mL マイクロチューブ
- ・チューブ立て
- ・組織ホモジナイザー：例）バイオマッシャー II（ニッピ株式会社）
- ・キムワイプ
- ・サランラップ
- ・チャック付きビニール袋とプラスチックカップ
- ・マジックペン
- ・滅菌缶

（２）PCR 反応液作製

- ・ピペットマン P1000、P200、P100、P20、P10、P2（ギルソン）
- ・フィルター付きチップ(1000 μ L、1-200 μ L、10 μ L 用)
- ・マイクロチューブ立て
- ・PCR チューブ立て
- ・1.5 mL マイクロチューブ

- ・ 8 連 PCR チューブ
- ・ 小型遠心機
- ・マジックマーカー
- ・ ディスポ手袋

(3) 抽出 DNA テンプレートの添加

- ・ ピペットマン P2 (ギルソン)

(4) 電気泳動

- ・ ピペットマン P200、P10
- ・ フィルター付きチップ(1-200μL、10μL 用)
- ・ 小型遠心機
- ・ PCR チューブ立て

3) 試薬

- ・ QIAamp DNA Mini Kit (抽出のための全ての薬品が含まれている)
- ・ Takara Ex Taq Hot Start Version (Takara) (10 倍緩衝液、dNTP が付属)、**XX**室の冷凍庫 (図 1) に保管
- ・ プライマー

Sph プライマーセット (KHV 検査用)

上流プライマー配列：5'-GACACCACATCTGCAAGGAG-3'

下流プライマー配列：5'-GACACATGTTACAATGGTCGC-3'

各プライマーは開封時に 0.6μL マイクロチューブに 30μL ずつ分注し、凍結保存する。プライマー原液濃度は 50μM に調整する (購入時のプライマー濃度は 100μM)。**XX**室の冷凍庫 (図 1) に保管する。

- ・ 遺伝子用精製水：必ず小容器に小分けして使用する。
- ・ 電気泳動用アガロース HS (ニッポンジーン)
- ・ 電気泳動用 TAE バッファー

4. 手技

- ・ 手技ごとに室温が 15~30°C の範囲であることを確認し、検査状況記録票へ記録する。
- ・ PCR 反応液の調整では試薬・サンプル保管庫が -20~-30°C の範囲であることを確認し、検査状況記録票へ記録する。
- ・ 1 検体あたりに用いるサンプル数は原則 1 サンプルとするが、1 次診断結果において、弱陽性または擬陽性であった検体については、確定診断では 3 サンプル (3 重検定) とする。

4-1) サンプル処理：**XX**室で実施

- (1) サンプルチューブ、DW、紫外線照射済解剖ハサミ・ピンセット、滅菌缶を用意する。解剖道具はサランラップをひいた解剖皿の上に置く。
- (2) オイゲノール等の麻酔薬で処理した魚 (検体) を解剖皿におき、外部症状を観察する。
- (3) 開腹し、腎臓肥大、内部臓器の癒着等の有無を確認する。必要に応じて、腎臓・脾臓・肝臓・脳についても採材し、冷凍または 70%エタノール固定により保存する。
- (4) 鰓ぶたを切り取り、鰓弁の退色、びらん、巣状壊死、鰓基部のうっ血および出血等の有無を観察する。

(5) 鰓弁を切り取り、検査用試料とする。また、余った鰓弁の一部を冷凍または 70%エタノール固定により保存する。

4-2) DNA 抽出：XX室で実施

(1) 組織片 10~25 mg を 1.5ml チューブにとり、ハサミで細かく切る（ホモジナイザーを使用すると組織融解時間が短縮できる）。

(2) Buffer ATL 180 μ L と Proteinase K 20 μ L を添加し、56°C・30 分以上反応させる。

(3) Buffer AL 200 μ L を添加し、70°C・10 分反応させる。

(4) エタノール(96-100%) 200 μ L を添加し、15 秒間攪拌、沈殿物を含む液体を回収し、QIAamp Spin Column へ入れ、10,000rpm・1 分遠心する。

(5) 廃液を含むコレクションチューブを廃棄し、新たなコレクションチューブを付ける。Buffer AW1・500 μ L をカラム内に入れ、10,000rpm・1 分遠心する。

(6) コレクションチューブを廃棄し、1.5ml チューブに付け替え、Buffer AE・100 μ L をカラム内に入れ、1 分間放置後、10,000rpm・1 分遠心し、DNA 溶解液を回収する。

(7) 1.5mL チューブの蓋にサンプル名を記載する。記載内容は抽出した年月日、県名（アルファベット略名）－検体番号/総検体数とする。（例）151026：TK-2/52015 年 10 月 26 日抽出、東京都 5 検体中 2 番

4-3) PCR 反応液調整：魚病診断室 1 の PCR ボックス内（またはグリーンベンチ内）で実施

(1) 手洗い後にディスポの手袋をつける。以後はできるだけ、PCR 反応液作製関連器具以外に触れないようにする。

(2) PCR 反応液作製に必要な器具、チューブ類は全て PCR ボックス内に入れておく。

(3) PCR キット（Takara Ex Taq Hot Start Version）に含まれる 10xPCR Buffer、dNTP およびプライマーを冷凍庫から取り出し、PCR ボックス内のチューブ立てにおき、解凍する。また、PCR8 連チューブを PCR ボックスチューブ立てに置く。

(4) 解凍後の 10xPCR Buffer、dNTP およびプライマーをタッピングにより攪拌し、小型遠心機でスピンドウンする。

(5) 反応液作製用 1.5mL チューブの蓋に反応液名を記入する。

(6) 下表に示す 1 サンプルあたりの量から必要量を計算し、10xPCR Buffer、dNTP、上下プライマーの順にピペットマンを用いて 1.5mL チューブに入れていく。準備する反応液量はサンプル数（陽性・陰性対照を含む）+ 1 に必要な量とする。

10xPCR Buffer （キット）	2.0 μ L
dNTP （キット）	1.6 μ L
Sph-F primer (50pmol/ μ L)	0.2 μ L
Sph-R primer (50pmol/ μ L)	0.2 μ L
Taq （キット）	0.1 μ L
DW（滅菌超純水）	14.9 μ L

検体	1.0 μ L
合 計	20 μ L

(7) 10xPCR Buffer、dNTP およびプライマーを冷凍庫に戻し、Taq を冷凍庫から取り出す (Taq には凍結防止用グリセリンが含まれるため、解凍せず使用できる)。

(8) 必要量の Taq をピペットマンで取り、チップ先端に適量が入っていることを目で確認した後、チップの先端をチューブ内の反応液に入れた状態でチップ内の溶液を出し、2、3 回ピペッティングする。チップ内に溶液が残っていないことを確認し、チップを捨てる。Taq を冷凍庫に戻す。

(9) DW を必要量とり、反応液混合チューブに加えた後、数回ピペッティングして、各溶液を混和する。

(10) PCR 反応液を $19\mu\text{L}$ ずつ、PCR チューブに分注する。この際のピペット操作は、シングルプッシュで連続して行う。また、チップの先端が PCR チューブの壁に接触した状態で溶液を出す。

(11) PCR チューブの蓋を半閉めし、蓋に反応液名とサンプル名を記入する。テンプレート添加まで、冷蔵庫（4℃）で保存する。

4-4) 抽出テンプレートの添加：XX室で実施

(1) PCR チューブを 8 連チューブ用小型遠心機でスピンドウンし、チューブ立てに置く。

(2) 抽出 DNA のチューブもスピンドウンして、チューブ立てに置く。

(3) PCR チューブ立て、抽出 DNA チューブ立て、10 μ L チップ、廃チップ用チャック付ビニール袋 (計量カップ等に装着) を配置する。

(4) チップをピペットマン P2 に装着し、抽出液チューブの蓋を両手で開け、抽出液 $1\mu\text{L}$ をピペットマン P2 で取り、ピペットに適量の抽出液が入ったことを目で確認する。

(5) 抽出液チューブをチューブ立てに戻し、PCR チューブの蓋を開ける。この際、PCR の中蓋に触れないように気をつける。

(6) チップの先を PCR チューブの底に付け、チップ内の溶液をはき出し、チップに溶液が残っていないことを確認する。チップを廃棄する。

(7) PCR チューブの蓋を完全に閉める。

(8) 全検体の抽出液を添加した後、内部標準物質 $1\mu\text{L}$ を PCR チューブ 1 本に添加する。この際も、標準物質のチューブを開ける前にスピンドウンすることを忘れない。陰性対照用チューブには何も入れず、蓋をする。

(9) 最後に PCR チューブ をスピンドアウンする。

4-5) PCR: **XX室**で実施

下記のプロトコルで PCR 反応を行う。

初期変性 94°C 30sec.

以下、変性、アニーリング、伸長を 40 サイクル。

変性	94°C	30sec.	} 40 サイクル
アニーリング	63°C	30sec.	
伸長	72°C	30sec.	
最後の伸長	72°C	7min.	

4-6) 電気泳動：XX室で実施

- (1) 回収した PCR チューブをスピンドウンした後、PCR の蓋を開ける。
- (2) ローディングバッファを 3 μ L ずつ連続分注器を用いて全チューブに入れる。この際、PCR チューブの壁に付ける。
- (3) 蓋を閉めてボルテックスする。増幅産物とローディングバッファが混合されたことを確認する。その後、スピンドウンして蓋を開ける。
- (4) 電気泳動槽に TAE 緩衝液を入れ、作製したアガロースゲル (添付 1) をセットする。
- (5) ピペットマン P10 を用いて、5-10 μ L ずつ、アガールのコームに添加する。添加する場所は左レーンから、分子量マーカー、PCR 陽性対照、PCR 陰性対照、各検体、DNA 抽出陽性対照、DNA 抽出陰性対照とする。ピペットチップは検体毎に交換する。
- (6) 蓋を閉じ、電圧 135V、泳動時間 10-12 分にセットし、泳動スイッチをオンにし、泳動を開始する。
- (7) 電気泳動が終了したら泳動槽からゲルを取り出し、ゲル版に載せ、トランスイルミネーターにセットする。トランスイルミネーターの電源を入れる (紫外線波長は 312 nm)。
- (8) 泳動像をポラロイドカメラで記録する。ウイルス遺伝子由来の増幅産物 (292 bp) に相当する位置に増副産物が認められたものを陽性と判定する。また、電気泳動像は電子ファイルとして保存する。

添付 1. 電気泳動用アガロースゲルの作製

- (1) TAE 緩衝液に 2% のアガロース HS (日本ジーン) を入れ、電子レンジで完全に溶解させる。溶解中は突沸に注意する。
- ① (2) アガロース溶液が 60°C 程度になるまで水で冷却する。冷却後、20 倍希釈臭化エチジウム溶液 (冷蔵保存) をアガロース 120mL に対し 40 μ L 加え混合する。
- (3) 上記のアガロースをゲルメーカーに流し込む。その際に、気泡がコーム周辺に残らないように注意する。
- (4) 放置し十分に冷却させた後、ゲルメーカーのコームを抜く。

添付 2. DNA 抽出に用いるハサミおよびピンセットの洗浄方法

- (1) オートクレーブにより滅菌処理をしたハサミ・ピンセットの入った滅菌缶を取り出す。
- (2) スポンジに希釈洗剤をしみこませる。
- (3) 洗剤を含んだスポンジでよく擦る (20 回程度)。
- (4) 解剖皿にハサミ・ピンセットを置き (最大で 10 本程度)、上から水道水をかけ流しながら、1 分間ゆすぐ。
- (5) 蒸留水をかけて、ゆすぐ。
- (6) 乾燥機で乾燥する。

- (7) 紫外線殺菌ボックスで 30 分間、紫外線照射する。
- (8) ボックスに保存する。

初版 2017 年 12 月 4 日

第 2 版 2018 年 5 月 26 日 このように改訂するごとに末尾に日付を記載し、下記のように内容と理由
などを記録する。

改訂記録 第 2 版

改訂内容	理由と背景
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

標準手順書付属文書 別紙4 (例) SVC 検査マニュアル(案)

赤字はコメントないし、各検査機関で判断して記載する部分を示す。

1. 目的

本マニュアルは、コイ春ウイルス血症 (SVC) の診断法に関する標準的な手順を定める。

2. コイ春ウイルス血症の診断法全般における注意事項

(1) 使用培地の確認：細胞の増殖は培地の種類に依存するので、適切な種類を選択し、それを継続的に使用する。また、培地に添加する血清の質はロットにより異なることから、細胞増殖およびウイルス感受性に悪影響を及ぼさないロットを選択し購入する。細胞のウイルス感受性は SVC ウイルスに対する TCID₅₀ 値により判定する。

(2) 使用器具 (特にフラスコ関連)：メーカー等の違いにより、細胞の付着性や増殖性が異なる場合があるので、所有する細胞の継代・培養に適した器具を選択・使用する。

(3) ウイルス分離に用いる細胞の感受性を維持するため、細胞は無菌状態を維持し、定期的な継代により、増殖の良好な状態を維持する。

(4) 生の魚体組織試料を取り扱い際の注意点→検査前後に机上のピペット等の殺菌・消毒、ハサミ・ピンセット等の滅菌を行う。

(5) 試料のクロスコンタミネーションを防ぐために、検体ごとにチップ、ピペット類を換える。

(6) 細胞継代や保存の際の作業では、一般的な無菌操作を行う。すなわち、全操作はクリーンベンチ内で行い、クリーンベンチに持ち込む全ての物品は 70%エタノール噴霧により表面の消毒を行い、容器の蓋の脱着の際には、蓋および容器口を軽く火炎する。

(7) 容器の蓋の開閉はクリーンベンチ内のみで行い、細胞分散途中で細胞観察のためにクリーンベンチ外に出す際には必ず蓋を閉める。

(8) 注射器を使用する際には、注射針の取り扱いに十分に注意する。

(9) 病魚を検査する場合、試料は症状を示す個体、瀕死個体あるいは死亡直後の個体とし、腐敗した個体は使用しない。臨床症状を呈さない魚のモニタリングやサーベイランスの場合は SVC の発症しやすい温度帯 (7-14℃とされる) で数週間飼育された魚を検査するのが望ましい。

(10) 試料到着後、速やかに検査を行うか、後日検査する場合には、-80℃で凍結保存する。また、一次検査後の試料は、以後の確定診断のために-80℃で保存する。

(11) RNA 抽出および RT-PCR の作業中は RNase の混入を避けるため、使い捨て手袋を着用する。

(12) その他の RT-PCR 法における一般注意事項は、別紙 3. 「KHV 検査マニュアル」の「2. KHV 病の診断法全般における注意事項」に従う。なお、RT-PCR に引き続き 2nd PCR を行う場合には、RT-PCR の電気泳動を行った直後は避け、可能な限り翌日以降に実施する。また、2nd PCR におけるテンプレート (RT-PCR の増幅産物) の添加は電気泳動を行う部屋・場所で実施する (増幅産物の取り扱いを、電気泳動を行う部屋・場所に隔離して行うため)。

3. 細胞培養・ウイルス分離に必要な実験装置と試薬類 (PCR 関連については別紙 3 「KHV 検査マニュアル」を参照)

- ・クリーンベンチ（安全キャビネット）
- ・インキュベーター
- ・倒立顕微鏡
- ・超低温冷凍庫(-80℃)
- ・冷凍庫（-20℃）
- ・冷蔵庫（4℃）

2) 実験器具

- ・滅菌ピペット
- ・25cm²細胞培養フラスコ
- ・24 ウェル細胞培養プレート
- ・フィルター付チップ(200uL)
- ・マイクロピペット(200uL)
- ・2mL クライオチューブ（滅菌済み）
- ・ガラスホモジナイザー（オートクレーブにより滅菌して使用）
- ・電子天秤

3) 試薬

- ・MEM（Gibco、11575）
- ・抗生物質-抗真菌剤（Gibco、15240-062）
- ・FBS（Gibco）
- ・PBS(-)-EDTA（Gibco、15040066）
- ・0.05%トリプシン-EDTA（Gibco、253000540）

4) 細胞

- ・EPC 細胞

4. 手技

- ・手技ごとに室温が 15～30℃の範囲であることを確認し、検査状況記録票へ記録する。
- ・RT-PCR 反応液の調整では試薬・サンプル保管庫が-20～-30℃の範囲であることを確認し、検査状況記録票へ記録する。

4－1. 細胞の培養・保存： **XX室**で実施

4－1－1. 細胞培養のための細胞・培養液・薬品

（1）SVC ウイルスの分離に用いる細胞は EPC 細胞とし、細胞分散前の前培養は 20～25℃で 1 週間程度とする。

（2）細胞の分散・維持に用いる培地は 10%牛胎児血清(FBS)を添加したイーグル最小必須培地(MEM)とし、細菌・真菌増殖抑制のための抗菌剤を予め添加しても構わない。例えば、MEM（Gibco）445mL + FBS 50mL + 抗生物質－抗真菌剤 x100（Gibco）5mL。抗生剤や FBS は小分けし、-20℃以下で冷凍

保存する。

(3) 細胞分散に用いる薬品は PBS(-)-EDTA (例えば、およびトリプシン-EDTA (例えば) とする。使用するトリプシン濃度は細胞の特性により決める。EPC 細胞の場合、比較的分散が容易であることから、0.05%が適当である。トリプシン-EDTA は小分けし-20℃以下冷凍保存する。

(4) 細胞の凍結保存に用いる溶液はセルバンカー (無血清タイプ) が推奨される。

4-1-2. 細胞の分散・維持: **XX室**で実施

(1) 25cm²培養フラスコ内の細胞が底面に密集して張り付いていることを倒立顕微鏡で確認する。

(2) 培養フラスコの蓋を開け、滅菌ピペットまたはスポイトを用いて全培養液を抜き取る。

(3) PBS(-)-EDTA 数 mL (細胞全体が浸る程度) をフラスコ内に適下し、細胞を PBS(-)-EDTA に浸した状態で 1~数分間放置する。倒立顕微鏡で細胞の底面への接着状態を観察し、接着状態が弱くなった後、PBS(-)-EDTA を上記同様に抜き取る。

(4) トリプシン-EDTA を数滴適下し、培養容器を傾けることで細胞表面全体にいきわたらせ、1~2 分間反応させる。

(5) 細胞の一部が剥がれ始めたら、フラスコ側面を手でたたき、細胞を底面から剥がす。

(6) 培地を 2mL 加え、トリプシン反応を停止される。数回のピペッティングにより底面の細胞を洗い流し、さらに数回のピペッティングにより細胞を完全に分散させる。

(7) 13mL の培地を加え、数回のピペッティングを行う。

(8) 新たな培養フラスコ 2 個を加えた計 3 個に細胞浮遊液 5mL ずつを分注する。

(9) 各フラスコを傾きの無い机に置き、約 2 時間静置する。

(10) 細胞がフラスコ底面に付着したことを倒立顕微鏡で確認した後、細胞名、継代数、培地名、日付を記入したラベルを貼り、供試細胞・使用目的に応じた温度のインキュベーターに移して培養する。

(11) 培養温度は目的に応じて選択し、細胞増殖を目的とする場合には 20~25℃、保存の際には 15℃、ウイルス分離の際には 20℃とする。

4-1-3. 凍結保存: **XX室**で実施

(1) 細胞を長期間保存する場合、または継代培養のバックアップを目的として、細胞の凍結保存を行う。その方法は以下の通りである。

(2) 25cm²培養フラスコ内の細胞を分散し、細胞浮遊液を作製する (4-1-2 の (1) ~ (6) と同様)。

(3) 細胞浮遊液を 15mL 遠沈管に入れ、1200rpm・3 分間遠心する。

(4) 細胞の沈殿を確認し、上清を除去した後、セルバンカー 1mL を加え、ピペッティングにより細胞を懸濁させ、細胞浮遊液を作製する。

(5) 細胞浮遊液 1mL をクライオチューブに移す。

(6) 4℃に予冷したバイセル(細胞凍結用容器)に入れ、そのまま-80℃超定温冷凍庫で凍結する。バイセルが無い場合にはクライオチューブの周りにペーパータオルを巻く等して、細胞浮遊液内温度の急激な下降を防ぐ。

4-1-4. 凍結細胞の融解：XX室で実施

(1) 継代培養細胞に汚染が見つかった場合、細胞の形態・感受性に変化が認められた場合、あるいは継代数が細胞を入手した時点から 100 継代を超えた場合には、凍結細胞を用いて新たな継代培養細胞とする。その方法は以下の通りである。

(2) 超定温冷凍庫から細胞浮遊液の入ったクライオチューブを取り出し、迅速に融解する。以後はクリーンベンチ内で作業を行う。

(3) クライオバイアル内の細胞浮遊液を、予め 15mL 遠沈管内に用意した培養液 9mL と混合する（解凍後、ここまでを迅速に行う）。

(4) 細胞浮遊液の入った 15mL 遠沈管を 1200rpm・3 分間遠心する。

(5) 細胞の沈殿を確認し、上清を除去した後、培養液 5mL を加え、穏やかなピペッティングにより細胞を懸濁させる。

(6) 25cm² 培養フラスコに細胞懸濁液を移す（以後は 4-1-2 の (9)、(10) に従う）。

4-2. 試料採取

4-2-1. 披検魚の収集：XX室で実施

(1) 健康診断を除き、瀕死魚または当該疾病の外観症状を示す生残魚を採取する。採取尾数は可能であれば 5~10 尾とする。

(2) 検査機関への披検魚の輸送は、魚の状態により異なる。健康診断等で症状が見られない魚は酸素バッグングにより生存させて輸送する。症状を示す生残魚は冷蔵状態で 48 時間以内に搬送する。48 時間以内の搬送が不可能な場合、または死亡魚の輸送は冷凍で行う。検体は検査対象区域毎に分けてビニール袋に入れる。

(3) 死魚しか入手できない場合には、なるべく新鮮なものを採取する。

(4) 披検魚の入ったビニール袋には採取場所・月日を明記したラベルを添付する。

4-2-2. 外観症状および剖検所見の記載、腎臓の摘出、試料の保存：魚病診断室 xx で実施

(1) オイゲノールなどの麻酔剤で麻酔する。

(2) 外観症状を記載する。

(3) 魚体表面を 70%エタノール綿（よく絞って余分なエタノールが垂れてこない状態）でふき取り、魚体表上を消毒する。

(4) オートクレーブ滅菌した解剖道具（ハサミ、ピンセット等）を用いて開腹し、腹腔内臓器を観察し、剖検所見を記載する。

(5) なるべく無菌的に腎臓(後腎)を摘出し、無菌シャーレ等に入れ、ホモジネート作製（4-3-3）に用いるか、

(6) 組織試料を用いた RT-PCR（4-4-1）に用いる。複数の組織試料をプールする際は、各試料から均等に組織を切り取り、総量が 25~50mg（抽出キットにより異なる）とする。

(7) 余った試料はチャック付きビニール袋等に入れ、-80℃で冷凍保存するか、必要に応じて他機関へ冷凍輸送する。

4-3. ウイルス分離：XX室で実施

4-3-1. 細胞培養のための培養液・薬品

(1) 抗生物質法 (抗生物質により細菌を除去する方法) では、組織ホモジネート液作製用培地としてイーグル最小必須培地 (MEM) に抗生物質-抗真菌剤 x100 (Giboco) を 10:1 で混合した溶液を用いる。一方、フィルター法 (0.45 ミリポアフィルターにより細菌を除去する方法) では、通常の濃度の抗生物質-抗真菌剤 (100:1) を MEM に混合する。

(2) 使用する培養液 MEM に含まれる FBS の量は 5~10% とし、抗生剤の量は通常の濃度とする (細胞継代に用いる濃度と同様)。

4-3-2. ホモジネート接種用細胞の準備: XX室で実施

(1) 4-1-2 の (1) ~ (7) に従って細胞を分散する。細胞数が多い場合には総量が 20~25mL となるよう添加する MEM の量を調整する。

(2) (1) で作製した細胞浮遊液を 1 mL ずつ、24 ウェル細胞培養プレートに分注する。用意するウェル数は検体数 x2 (2 濃度のホモジネートを接種) + 1 (陰性対照) とする。

(3) 20°C で 24 時間培養し、ウイルス接種用細胞とする。この時点でプレートの 80% 程度に細胞が張り付いている状態が適正な細胞量である。

4-3-3. 組織ホモジネートの準備、接種および細胞変性効果 (CPE) の観察

1) 組織試料の調整

(1) 検査試料は 4-2-1 および 4-2-2 に従って収集し、最大 5 尾をプールして 1 検体とする。

(2) 試料はガラスホモジナイザーに入れ、組織湿重量に対して 10 倍量の 10X 抗生物質添加培地を加え、組織が乳化するまで冷却しながら磨砕し、ホモジネート液を作製する。ガラスホモジナイザーが用意できない場合、または試料が少量 (0.5g 以下) の場合にはマイクロチューブ型ホモジナイザー (バイオマッシャー II/ニュッピ社等) を用いても良い。

(3) ホモジネートを 4°C で 2,000g、15 分間遠心分離し、上清を回収する。

(4) 生存魚の腎臓および脳を検査試料とした場合、20°C で 2 時間、または 4°C で一晩放置して接種用試料とする (抗生物質法)。

(5) 死亡魚の全臓器および生存魚の鰓を検査試料とした場合、(3) の上清を 0.45 μ m ミリポアフィルターでろ過し、そのろ液を接種用試料とする (フィルター法)。

2) 培養細胞への接種

(1) 各試料について、4-3-2 で作製した細胞の張り付いた 24 ウェルプレートの 2 ウェルに、4-3-3 の 1) で作製したホモジネートを 50uL および 10uL 接種する (組織の終濃度は 1/200 または 1/1000 となる)。

3) 培養および観察

(1) 20°C・7 日間培養し、倒立顕微鏡 40~200 倍で、毎日細胞の形態変化を観察する。

(2) 培養細胞に細胞変性効果 (CPE) が現れたら、その上清 250uL を回収し、4-4-2 の RT-PCR および 4-4-3 の 2nd PCR (RT-PCR 陰性時) によりウイルスの同定を行う。その RT-PCR と 2nd PCR の両結果が陰性であった場合には、培養細胞に認められた変性は細胞毒性によるものである可能性があることからウイルス分離は陰性と判定し、4) 継代培養 (盲継代) を行う。CPE が観察されなかつ

た場合にも、4) 継代培養を行う。

4) 継代培養 (盲継代)

(1) 新たに 24 ウェルプレートに EPC 細胞を用意する (4-3-2)。

(2) 3) の (2) の上清 (50uL および 10uL 接種ウェル) について、各 50uL ずつ採取し、新たに用意した上記プレートの 1 ウェルに計 100uL を接種する。

(3) 20°C・7 日間培養し、倒立顕微鏡 40~200 倍で、毎日細胞の形態変化を観察する。

(4) 培養細胞に細胞変性効果 (CPE) が現れたら、その上清 250uL を回収し、4-4-2 の RT-PCR によりウイルスの同定を行う。CPE が観察されなかった場合には、ウイルス分離陰性と判定する。

4-4. RT-PCR

ここでは RT-PCR 法の要点を示す。詳細な流れについては、別紙 3「KHV 検査マニュアル」の項目 4. 手技を参照する。

4-4-1. 組織試料を用いた 1 次診断 RT-PCR (逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)

1) RNA の抽出

市販の RNA 抽出キットを使用し、キットのマニュアルに従って抽出を行う。

(例) TRIzol (Qiagen 社) による抽出法

(1) 4-2-2 の (6) で準備した組織試料をマイクロチューブに入れ、解剖ハサミで細断する。更にホモジネート作製用ペッスルを用いて摩砕すると、後の組織融解が容易になる。

(2) TRIzol を 1mL 加え、組織が溶解するまでボルテックス等により強く攪拌し、その後 5 分間室温で放置する。

(3) クロロホルム 200uL を加え、15 秒間攪拌し、室温で 5 分間放置後、4°C・12000g・10 分間遠心分離する。

(4) 透明上清 (水相) を別のマイクロチューブに移し、500uL の 2-プロパノールを入れて軽く混合し、室温で 10 分間放置後、4°C・12000g・10 分間遠心分離する。

(5) 上清をピペットで吸い取って除去した後、75%エタノール 1000uL を入れて転倒混和し、4°C・7500g・5 分間遠心分離後、上清を除去して乾燥させる。

(6) 乾燥後、dDW (DNase・RNase free) 60uL を加え、タッピングによりよく溶かす。

(7) RT-PCR に供するまで、4°Cまたは氷冷下で保存する。長期保存の場合、-80°Cで行う。

2) RT-PCR (Koutna ら(2003)の方法)

(1) Invitrogen™ 社の RT-PCR キット SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum® Taq および以下に示す合成したプライマー exSVCV F および exSVCV R を使用する。

組織診断用プライマーの配列 (Koutna et. al. 2003)

exSVCV F : 5'-GGA TAA TAT CGG CTT GGA AAG C-3'

exSVCV R : 5'-GCC TAA ATG TGT TGA TGG AAC G-3'

増幅産物サイズ ; 470bp

(2) 以下に示した組成で RT-PCR 反応液を調製し (1 検体あたり $45\mu\text{L}$ を PCR チューブに入れる)、4-4-1 で作製した RNA 抽出液 $5\mu\text{L}$ (検体) を反応液に添加する。

RT-PCR 反応液の調製

2× Reaction Mix (キット)	$25\mu\text{L}$
dDW (滅菌超純水)	$14\mu\text{L}$
exSVCV F primer ($10\text{pmol}/\mu\text{L}$)	$2\mu\text{L}$
exSVCV R primer ($10\text{pmol}/\mu\text{L}$)	$2\mu\text{L}$
RT Platinum® Taq Mix (キット)	$2\mu\text{L}$
検体	$5\mu\text{L}$
合 計	$50\mu\text{L}$

(3) 以下のプログラムで RT-PCR を行う。

逆転写	50°C	30min.
初期の変性	94°C	2min.
以下、変成～伸長を 34 サイクル		
変性	94°C	15sec.
アニーリング	50°C	30sec.
伸長	68°C	60sec.
最後の伸長	68°C	7min.

(4) RT-PCR 終了後、増幅産物を適当な DNA 分子量マーカーとともに 2% のアガロースゲルで電気泳動を行う。

(5) 臭化エチジウム存在下、トランスイルミネーターにより分子量 470bp のバンドの有無を観察する。RT-PCR 増幅産物が確認されたものを陽性と判定する。電気泳動像は電子ファイルとして保存する。

4-4-2. ウイルス上清を用いた RT-PCR

1) RNA の抽出

市販の RNA 抽出キットを使用し、キットのマニュアルに従って抽出を行う。

(例) TRIzol LS (Qiagen 社) による抽出法

(1) 4-3-3 の (2) で得られたウイルス上清 $250\mu\text{L}$ と TRIzol LS $750\mu\text{L}$ をマイクロチューブ内で 30 秒間ボルテックスを使用して攪拌する。以降は 4-4-1.1) の (3) ~ (7) に従って、抽出・保存する。

2) RT-PCR (OIE マニュアル(2016))

(1) Invitrogen™ 社の RT-PCR キット SuperScript™ III One-Step RT-PCR with Platinum® *Taq* および以下に示す合成したプライマー F1 および R2 を使用する。

分離ウイルス診断用プライマーの配列

SVCV F1 : 5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3'

SVCV R2 : 5'-AGA TGG TAT GGA CCC CAA TAC ATH* ACN* CAY*-3'

増幅産物サイズ ; 714bp

* R: A または G、H: A または C または T、N: A または C または G または T、Y: C または T

(2) 以下に示した組成で RT-PCR 反応液を調製し (1 検体あたり 45 μ L を PCR チューブに入れる)、4-4-2 で作製した RNA 抽出液 5 μ L を反応液に添加する。

RT-PCR 反応液の調製

2× Reaction Mix (キット)	25 μ L
dDW (滅菌超純水)	8 μ L
SVCV F1 primer (10pmol/ μ L)	5 μ L
SVCV R2 primer (10pmol/ μ L)	5 μ L
RT Platinum® <i>Taq</i> Mix (キット)	2 μ L
検体	5 μ L
合 計	50 μ L

(3) 以下のプログラムで RT-PCR を行う。

逆転写	50°C	30min.
初期の変性	94°C	2min.
以下、変成～伸長を 35 サイクル		
変性	94°C	15sec.
アニーリング	55°C	30sec.
伸長	68°C	60sec.
最後の伸長	68°C	7min.

(4) 2.0%のアガロースゲルによる電気泳動で 714bp に相当する位置に増幅産物が確認されたものを陽性と判定する。

4-4-3. RT-PCR (4-4-2) の増幅産物をテンプレートとした 2nd (Semi-Nested) PCR
 この方法は OIE マニュアル(2016)に示された方法で、2nd-PCR を行うことにより、SVCV の検出感度を上げることができる。従って上記 "i)RT-PCR 検査"で陽性バンドが得られなかった時のみ実施する。
 なお、この方法では PFRV との区別はできない。

(1) 2nd-PCR に使用するプライマーの配列は以下の通りである。

SVCV F1 : 5'-TCT TGG AGC CAA ATA GCT CAR* R*TC-3'
 SVCV R4 : 5'-CTG GGG TTT CCN* CCT CAA AGY* TGY*-3'
 増幅産物サイズ ; 606bp

* R: A または G、H: A または C または T、N: A または C または G または T、Y: C または T

(2) 2nd-PCR は市販の PCR キットを用いる。例として Takara EX *Taq*[®] HS を用いた場合は、以下に示した組成で PCR 反応液を調製し(1 検体あたり 47.5 μ L を PCR チューブに入れる)、RT-PCR (4-4-2) の増幅産物 2.5 μ L を反応液に添加する。

2nd-PCR 反応液の調製 (Takara EX *Taq* HS の場合)

10x EX <i>Taq</i> buffer	5.0 μ L
2.5mM dNTP mixture	4.0 μ L
dDW (滅菌超純水)	28.25 μ L
SVCV F1 primer (10pmol/ μ L)	5.0 μ L
SVCV R4 primer (10pmol/ μ L)	5.0 μ L
Takara EX <i>Taq</i> [®] HS	0.25 μ L
検体 (RT-PCR 増幅産物の 100 倍希釈液)	2.5 μ L
合 計	50 μ L

(3) サーマルサイクラーが 94°C に達したところで一時停止し、チューブをセットして再スタートさせる。

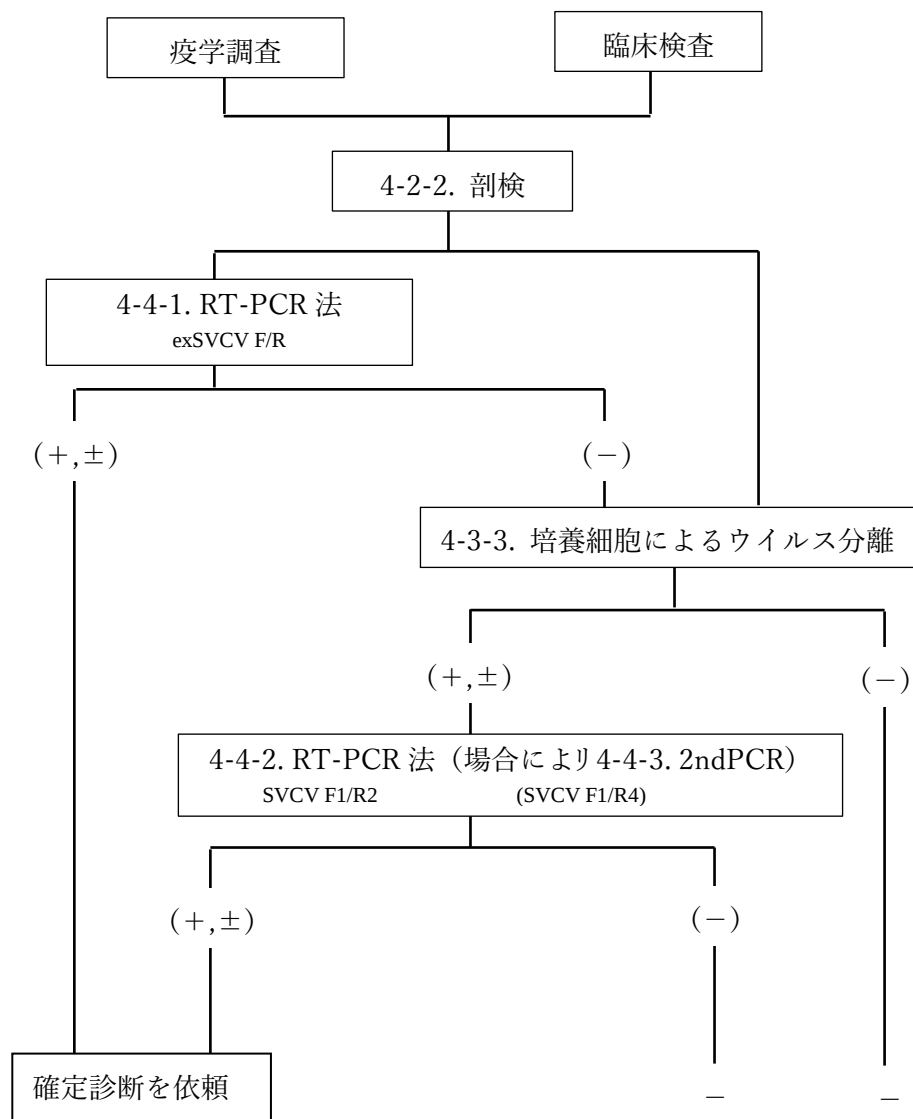
(4) PCR のプログラムは以下の通りである。

初期の変性	94°C	30sec.
以下、変成～伸長を 35 サイクル		
変性	94°C	30sec.
アニーリング	55°C	30sec.
伸長	72°C	60sec.
最後の伸長	72°C	7min.

(5) RT-PCR と同様の電気泳動により 606bp の位置に増幅産物が得られたものを陽性と判定する。

付録：コイ春ウイルス血症（SVC）検査チャート

この検査チャートは病勢鑑定指針に基づくものであり、各検査の番号以外は変更しない。



初版 2017 年 12 月 4 日

第 2 版 2018 年 5 月 26 日 このように改訂するごとに末尾に日付を記載し、下記のように内容と理由

などを記録する。

改訂記録 第2版

改訂内容	理由と背景
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX
XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX XXXXXXXXXXXXXXXXXXXXX

別紙5 検査状況記録票

KHV検査状況記録票 (PCR検査)

受付番号			
検体番号/数			
検体受領日		受領者	
作業実施日		実施者	
検体の状態	70% EtOH固定 ・ 冷蔵 ・ 凍結		

<作業工程確認リスト> 各工程の実施場所(〇〇室)は規定して様式に印刷しておく。

工程		実施場所	開始時刻	室温
(1)サンプル処理・DNA抽出		〇〇室		
(2)残存サンプルの保存		〇〇室		
(3)PCR反応液調整		〇〇室		
(4)抽出テンプレートの添加		〇〇室		
(5)PCR	プライマー:	〇〇室		
	プログラム:	Lid温度:		
		サンプル温度:各サイクルの表示温度を一回り確認。		
	プライマー:	〇〇室		
	プログラム:	Lid温度:		
		サンプル温度:		
(6)電気泳動	アガー作製日:	〇〇室		
	バッファー使用回数:	泳動条件:		

<結果>

電気泳動写真添付欄	確認項目	
	マーカー	良・不可
	PCR陽性対照	良・不可
	PCR陰性対照	良・不可
	非特異バンド	良・不可

標準手順書付属文書 別紙 6-1 (例) SVCV 検査状況記録票 (ウイルス分離用、様式) -1

別紙6-1 検査状況記録票

SVCV検査状況記録票 (ウイルス分離検査)

受付番号			
検体番号/数			
検体受領日		受領者	
作業実施日		実施者	
検体の状態	組織 (冷蔵 ・ 冷凍) ・ 細胞培養上清 (継代用)		

<作業工程確認リスト> 各工程の実施場所は規定して様式に印刷しておく。

工程	実施場所	作業開始時刻・室温
(1)接種用細胞の調整	〇〇室	
	細胞継代数:	前培養期間: 温度:
(2)サンプル処理/残存サンプルの保存	〇〇室	
	遠心分離機 表示	回転数: rpm 温度:
(3)ウイルス接種	〇〇室	

<観察結果>

接種後日数 (日時、温度*1)	検体接種区	未接種区
1日後 ()		
2日後 ()		
3日後 ()		
4日後 ()		
5日後 ()		
6日後 ()		
7日後*2 ()		

*1:インキュベーターの温度を記録する。

*2:接種7日後の結果で判定する。臓器サンプルでCPEが見られない場合は継代を実施する。

初版 2017年12月10日

標準手順書付属文書 別紙 6-2 (例) SVCV 検査状況記録票 (RT-PCR 用、様式) -1

別紙6-2 検査状況記録票

SVCV検査状況記録票 (RT-PCR検査)

受付番号			
検体番号/数			
検体受領日		受領者	
作業実施日		実施者	
検体の状態	組織 (冷蔵 ・ 冷凍) ・ 細胞培養上清		

＜作業工程確認リスト＞ 各工程の実施場所(〇〇室)は規定して様式に印刷しておく。

工程	実施場所	作業開始時刻・室温
(1) サンプル処理・残存サンプルの保存	〇〇室	
(2) RNA抽出	〇〇室	
(3) RT-PCR反応液調整	〇〇室	
(4) 抽出テンプレートの添加	〇〇室	
(5) RT-PCR	プライマー:	〇〇室
	プログラム:	Lid温度:
		サンプル表示温度: 各サイクルの表示温度を一回り確認
(6) 電気泳動	アガー作製日:	〇〇室
	バッファー使用回数:	泳動条件:

＜結果＞

電気泳動写真添付欄	確認項目	
	マーカー	良・不可
	PCR陽性対照	良・不可
	PCR陰性対照	良・不可
	非特異バンド	良・不可

* 陰性と判断された場合はnested-PCRを実施する。

別紙6-3 検査状況記録票

SVCV検査状況記録票 (nested-PCR検査)

受付番号			
検体番号/数			
検体受領日		受領者	
作業実施日		実施者	
検体の種類	SVCVF1,R2増幅産物 • SVCVF1, R4増幅産物		

<作業工程確認リスト> 各工程の実施場所(〇〇室)は規定して様式に印刷しておく。

工程	実施場所	作業開始時刻・室温
(1)PCR産物の希釈	〇〇室	
(3)PCR反応液調整	〇〇室	
(4)抽出テンプレートの添加	〇〇室	
(5)nested-PCR	プライマー:	〇〇室
	プログラム:	Lid温度:
		サンプル表示温度: 各サイクルの表示温度を一回り確認
(6)電気泳動	アガー作製日:	〇〇室
	バッファー使用回数:	泳動条件:

<結果>

電気泳動写真添付欄	確認項目	
	マーカー	良・不可
	PCR陽性対照	良・不可
	PCR陰性対照	良・不可
	非特異バンド	良・不可

コイヘルペスウイルス病検査結果報告書

あるいは「コイ春ウイルス血症検査結果報告書」

品質管理者： XXXXXXXX 印 2018 年 3 月 21 日

技術管理者： XXXXXXXX 印 2018 年 3 月 21 日

検体到着日： 10 月 24 日

検査開始日： 10 月 24 日

検査終了日： 10 月 25 日

検査報告日： 10 月 25 日

検査依頼元： XXXXXXXX

検査法：農水省の病性鑑定指針（平成 28 年 7 月改正）による。

検査結果

検体識別番号	結果
KHV170924XX-1/4	陽性
KHV170924XX-2/4	陽性
KHV170924XX-3/4	陰性
KHV170924XX-4/4	陽性

陽性判定合計 3/4

検査実施機関：XXXXX 水産試験場

〒XXX-XX XX 県 XX 市 XX ###丁目 ##番

別表1 試薬管理リスト

試薬管理リスト

品名	種類	メーカー	Cat. No.	Lot No.	納品日	品質検査		使用開始日	使用終了日	備考
						検査終了日	結果			
KHV Sph-F	ライイター	グライナー・ジヤハベ		UN15I021301	2015/9/2	2015/9/9	合	湯浅	2015/9/9	
KHV Sph-R	ライイター	グライナー・ジヤハベ		UN15I021302	2015/9/2			湯浅	2015/9/9	
KHV 9/5-F	ライイター	グライナー・ジヤハベ		UN15I021303	2015/9/2	2015/9/9	合	湯浅	2015/9/9	2016/7/26からの省令改正のため廃棄。
KHV 9/5-R	ライイター	グライナー・ジヤハベ		UN15I021304	2015/9/2			湯浅	2015/9/9	2016/7/26からの省令改正のため廃棄。
RSIV 1F	ライイター	グライナー・ジヤハベ		U15K170155	2015/11/17			河東	2015/12/24	
RSIV 1R	ライイター	グライナー・ジヤハベ		U15K170156	2015/11/17	2015/12/21	合		2015/12/24	
Takara Ex Taq [®] Hot Start Version	PCR酵素	Takara	RR006A	AEY1003N	2015/8/19	2015/9/9	合	湯浅	2015/9/9	2016/5/31の使用期限：2016年5月
Maxwell [®] 16 Tissue DNA Purification Kit	DNA抽出キット	プロメガ	AS1030	88072	2015/3/3	2015/9/9	合	湯浅	2015/9/9	使用期限：2017年6月
KHV TK-F	ライイター	グライナー・ジヤハベ		UN15I021303	2015/9/2			湯浅	2016/6/24	
KHV TK-R	ライイター	グライナー・ジヤハベ		UN15I021304	2015/9/2	2016/6/24	合	湯浅	2016/6/24	
Takara Ex Taq [®] Hot Start Version	PCR酵素	Takara	RR006A	AEZ1014N	2015/10/14	2016/5/27	合	湯浅	2016/5/27	使用期限：2016年6月
Takara Ex Taq [®] Hot Start Version	PCR酵素	Takara	RR006A	NA4501BA	2016/1/7	2016/6/24	合	湯浅	2016/6/24	使用期限：2016年12月
Cerium, retan bovme, Heat Inactivated, BSE	牛胎児血清(FBS)	Biowest	S182H		2016/7/15	2016/6/25	合	湯浅	2016/8/10	

標準手順書付属文書 別表1 (例) 試薬管理リスト (様式) 赤字は増養研の例

別表2 機器校正記録票

別表2 機器校正記録表

H29年度

品目	識別番号	実施日	実施者	結果	備考(処置等)
ピペットマン P-2	LL25160	2017/11/27	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-2	LL25158	2017/11/27	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-10	LH24657	2017/11/27	エムエス機器	良・不可	修理不能のため廃棄
ピペットマン P-20	LL22738	2017/11/27	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-20	LL22739	2017/11/27	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-100	LL22514	2017/11/30	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-200	LL21500	2017/11/30	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-200	LL21503	2017/11/30	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-1000	LL26566	2017/11/30	エムエス機器	良・不可	
ピペットマン P-10	DD55356	2018/2/18	XXXXXX	良・不可	
ピペットマン P-1000	AD01160	2018/2/18	XXXXXX	良・不可	
電子天秤	PG403-S	2017/12/21	XXXXXX	良・不可	
分銅 10g	33029814	2017/11/25	ザルトリウス	良・不可	
電気泳動槽	19469	2018/2/15	XXXXXX	良・不可	
				良・不可	
				良・不可	
				良・不可	
				良・不可	
				良・不可	

標準手順書付属文書 別表 3 (例) 温度記録表 (様式)

別表3 温度記録表

温度記録表

[illegible]

標準手順書附属文書 別表 4（例）問題点管理表（様式）

別表4 問題点管理

整理
番号 XXXXXX

A	問題点の内容	
B	発生区分(過程)	標準手順書 11. 1. 項の区分を書く
C	発生年月日	問題点を発見した年月日
D	問題の生じた原因	
E	是正処置	問題点を改善するためにどのような是正措置を行ったかを記載。必要なら文書を変更・改訂する。
F	内部監査年月日	
G	内部監査結果	是正措置後一定期間を経ってから、あるいは定期的な内部監査等で問題点が改善されているか否かを観察し結果を記載する。改善されていないければさらに問題点として新たな表を作成し対処する。

③ 都道府県水産試験研究機関等における外部精度管理調査実施要領（案）

1. はじめに

本要領は、都道府県水産試験研究機関等が実施する病性鑑定の信頼性を確保することを目的として実施する外部精度管理調査の方法を定める。

2. 調査項目

- (1) コイヘルペスウイルス遺伝子検査（PCR）
- (2) コイ春ウイルス血症ウイルス検査（培養細胞によるウイルス分離）；試料として IHN を代わりに使用する。
- (3) コイ春ウイルス血症ウイルス遺伝子検査（RT-PCR；直接組織から行うことを想定）
- (4) コイ春ウイルス血症ウイルス遺伝子検査（RT-PCR、semi nested PCR、nested PCR）

3. 外部精度管理調査用試料

農林水産省消費・安全局畜水産安全管理課水産安全室（以下、水産安全室）が指定する機関（以下、指定機関：水産防疫対策事業（魚病診断機関における検査精度管理体制の確立）実施期間中は、（国研）水産研究・教育機構増養殖研究所とする。）は別紙 1 に定める方法で外部精度管理調査用資料（以下、調査資料）を作製する。

4. 調査方法

- (1) 畜水産安全管理課は、外部精度管理調査の実施スケジュールを計画し、関係機関に通知する（水産防疫対策事業（魚病診断機関における検査精度管理体制の確立）実施期間中は、（国研）水産研究・教育機構増養殖研究所が行う。）。
- (2) 指定機関は調査資料を外部精度管理調査対象機関（以下、被検機関）に送付する。
- (3) 被検機関は、それぞれの機関で定めた業務管理実施要領の検査実施標準作業書にしたがって検査を行う。ただし、指定機関から別途指示がある場合は、それに従う。
- (4) 被検機関は、検査結果を指定機関に報告する。
- (5) 指定機関は、被検機関の検査結果を評価して取りまとめ、その結果を各被検機関と畜水産安全管理課に報告する。

5. 調査頻度

外部精度管理調査は、それぞれの検査について原則年 1 回実施する。

6. 調査資料の送付方法

指定機関から被検機関へ送付する調査資料の梱包方法、輸送温度、送付方法、保管温度は別紙 2 のとおりとする。

7. 結果報告書

被検機関は指定機関が指定する様式により検査結果を指定機関に報告する。

8. 評価法

指定機関は別紙3で定める評価法により被検機関から送られてきた検査結果報告書を評価する。

9. 改善措置

- (1) 結果が不良の場合、被検機関は標準作業書に従い改善措置を講じる。
- (2) 指定機関は結果が不良であった被検機関の求めに応じて、検査法の改善等を指導する。
- (3) 指定機関は結果が不良であった被検機関に対して、改善措置の報告を求める。
- (4) 指定機関は結果が不良であった被検機関の検査法の改善措置について、水産安全室に報告する。

外部精度管理実施要領

別紙1 外部精度管理調査用試料作製手順

1. コイヘルペスウイルス病 (KHV)

1-1 試料形態：エタノールで固定した KHV 人為感染コイまたは健康コイの鰓弁

1-2 送付検体数および内容：

- ①100～10000 コピー/mg 組織湿重量の KHV ゲノム数を含む新鮮鰓弁を固定したもの
- ②10000 コピー/mg 組織湿重量以上の KHV ゲノム数を含む新鮮鰓弁を固定したもの
- ③10000 コピー/mg 組織湿重量以上の KHV ゲノム数を含む鰓弁を 24 時間室温で放置し、腐敗させた後に固定したもの。
- ④健康鰓弁を固定したもの。

計 4 検体

1-3 作製方法

1) 接種用ウイルスの準備

- (1) 10%FBS 加 MEM を用いて、25cm² 培養フラスコ内で CCB 細胞を 20℃で 1 週間、前培養。
- (2) 5%FBS 加 MEM を用いて、25cm² 培養フラスコ内で前培養 CCB 細胞を 1/3 に分散し、20℃で 24 時間培養。
- (3) -80℃凍結保存ウイルス上清 (NR1A0301 株) を解凍し、その 50uL を (2) で準備した細胞に接種。
- (4) 5～10 日間、CPE を観察し、空胞変性が細胞の 80%以上で確認できた時点で細胞を回収。
- (5) 培養上清を回収し、MEM で 10 倍に希釈した上清を接種用ウイルス液とする。

2) 人為感染魚の作出方法

- (1) 4 つの 10L 水槽に KHV 未感染ニシキゴイ (全長約 20cm) を 1 尾ずつ収容。
- (2) 4 尾の腹腔内に、1) で作製したウイルス液を 100uL ずつ注射。
- (3) 通気・無給餌で 7 日間、空調で水温を 23℃に保って飼育。

3) 配布用試料の作製

- (1) 健康ニシキゴイを麻酔・脱血し、解剖ハサミを用いて 1 尾 8 枚の鰓葉を切り取り、70%エタノールで固定(試料④)。
- (2) ウイルス接種後 2 日および 3 日後に 1 尾ずつサンプリングし、麻酔を施して脱血し、解剖ハサミを用いて 1 尾 8 枚の鰓葉を切り取り 70%エタノールで固定 (試料①)。
- (2) ウイルス接種後 7 日後に残り 2 尾をサンプリングし、麻酔・脱血後に解剖ハサミを用いて 1 尾 8 枚の鰓葉を切り取り、1 尾分の鰓葉をエタノールで固定(試料②)。
- (4) 残り 1 尾分の鰓葉はプラスチックシャーレに入れ、25℃で 24 時間放置し、その後 70%エタノールで固定(試料④)。
- (5) 各ニシキゴイ鰓葉について、3～4 鰓弁ずつ切断し (1 断片辺り 50-100mg 程度)、70%エタノール 1.2mL の入った 1.5mL マイクロチューブ内に 1 断片ずつ入れ、試験用試料とする。

4) 試料の検定

- (1) 各水槽の魚由来の鰓弁および健康魚の鰓弁について、3 試料ずつ無作為に選択し、DNA 抽出・Gilad ら(2004)の定量 PCR により、ウイルスコピー数を定量する。
- (2) 健康魚由来の鰓弁 3 試料全てから KHV が検出されないことを確認する。
- (3) ウイルス接種 7 日後にサンプリングした魚 2 尾由来の試料について、各 3 試料の何れからでも 10、000 コピー/uL 以上のウイルスが検出されることを確認する。
- (4) ウイルス接種 2 および 3 日後にサンプリングした魚由来の試料について、何れかの区において、3 試料全てから検出されるウイルス量が 100~10000 コピー/uL となることを確認する。また、その区の 3 試料間のウイルス量の差が 5 倍以下であることを確認する。

5) 検体番号の付け方

- (1) ①~④の試料の入った 1.5mL チューブ 4 本の側面に 1~4 の検体番号のシールを貼る。
- (2) 配布先により、①~④の試料に付ける検体番号を変える。

2. コイ春ウイルス血症 (SVC)

2-1 ウイルス分離検査用試料

* 培養細胞によるウイルス分離には活性のあるウイルスを用いる必要があるが、わが国に未侵入の SVCV を活性を保ったまま配布することは危険を伴うため、代替ウイルスとして SVCV と性質が似ており、すでに国内に広く存在している、サケ・マス類の病原ラブドウイルスである伝染性造血器壊死症ウイルス (IHNV) を用いる。

- 1) コンフルエント状態の EPC 細胞 (20℃で 7~14 日間培養期) を、MEM 培地 (10%FBS、1×Anti-Anti) を用いて 1/3 希釈で 25cm² フラスコに播種し、20℃で 24 時間培養する。
- 2) -80℃に保存している IHNV の種ウイルスを 50μL、上記のフラスコに接種する。
- 3) 20℃で培養して毎日細胞を観察し、CPE が出現することを確認する。
- 4) 1 週間後に細胞培養上清を 15mL 遠沈管に回収し、遠心分離 (1000×g、10 分間) を実施する。
- 5) 遠心上清を 15mL 遠沈管に回収して、0.45μm フィルターでろ過し、ろ液を得る。。
- 6) 500μL ずつ 1.5mL チューブに分注して陽性試料とする。上述の MEM 培地を 500μL ずつ 1.5mL チューブに分注したものを陰性試料とする。
- 7) 試料は最低、陽性と陰性の 2 個を用意し、各チューブの側面に検体番号のシールを貼る。検体番号は配布先により変える。
- 8) 試料は送付まで-80℃まで保管する。

2-2 ウイルス培養上清からの RT-PCR 検査用試料

- 1) コンフルエント状態の EPC 細胞 (20℃で 7~14 日間培養期) を、MEM 培地 (10%FBS、1×Anti-Anti) を用いて 1/3 希釈で 25cm² フラスコに播種し、20℃で 24 時間培養する。
- 2) -80℃に保存している SVCV の種ウイルスを 50μL、上記のフラスコに接種する。
- 3) 20℃で培養して細胞を毎日観察し、CPE が出現することを確認する。
- 4) 1 週間後に細胞培養上清を回収し、遠心分離 (1000×g、10 分間) を実施する。

- 5) 遠心上清を 15mL 遠沈管に回収する。遠心上清 1mL を 1.5mL チューブに入れ、ブロックインキュベーターを用いて 75°C で 10 分間加熱殺菌する。また、上述の MEM 培地も同様に 75°C で 10 分間加熱処理を行う。

* この試料は下記の「3. 組織からの RT-PCR 検査用試料」にも用いる。

- 6) それぞれ 500 μ L ずつ 1.5mL チューブに分注して陽性試料および陰性試料とする。
- 7) 試料は最低、陽性と陰性の 2 個を用意し、各チューブの側面に検体番号のシールを貼る。検体番号は配布先により変える。
- 8) 試料は送付まで -80°C で保管する。

2-3 組織からの RT-PCR 検査用試料

- 1) コイ（その他、魚類）を解剖し、腎臓を取り出してプールする。
- 2) 腎臓を解剖バサミやカミソリ等で細切する。
- 3) 1.5mL チューブに腎臓を 80 mg ずつ分注する。
- 4) 上述の加熱処理した陽性試料および陰性試料を、それぞれ 20 μ L ずつ腎臓の入った 1.5mL チューブに添加する。
- 5) これを陽性試料および陰性試料とする。
- 6) 試料は最低、陽性と陰性の 2 個を用意し、各チューブの側面に検体番号のシールを貼る。検体番号は配布先により変える。
- 7) 試料は送付まで -80°C で保管する。

外部精度管理実施要領

別紙2 外部精度管理調査用試料（調査試料）の送付法

1. コイヘルペスウイルス病

- (1) 1 から 4 の番号を付けた 4 本の 1.5mL マイクロチューブの蓋の部分にパラフィルムを巻き、エタノールが漏れ出るのを防ぐ。
- (2) 試料 4 チューブをまとめて 1 つのチャック付きビニル袋に入れ、クッション材でくるみ、発泡スチロールの梱包用容器に入れ、冷蔵宅配便で送付する。
- (3) 着払い用送り状に「外部精度管理調査用試料」と記載する。
- (4) 発送まで 4℃で保管する。
- (5) 受領後直ちに開封し、中身を確認する。
- (6) 試験実施まで 4℃で保管する。

2. コイ春ウイルス血症

*2-1～3 の試料の送付方法は全て同じなため、同一の梱包容器で送付する場合もある。その場合は調査試料を検査項目ごとにチャック付クリアパックにまとめて入れ、いずれの検査項目かが分かるように記載する。

2-1 ウイルス分離検査用

- (1) 陽性試料および陰性試料に A から D の番号を任意につける。
陽性試料および陰性試料の数は任意とする。
- (2) 4 本の調査用試料を発泡スチロールの梱包用容器に入れ、保冷剤を入れ、緩衝材等で隙間を埋めた後にふたを閉めガムテープで密閉する。なお、試料数は、年度により変更することもあり得る。
- (3) 送り状に「外部精度管理調査用試料」と記載する。
- (4) 発送まで-20℃で保管し、冷凍便で送付する。
- (5) 受領後直ちに開封し、中身を確認する。
- (6) 試験実施まで-20℃で保管する。

2-2 ウイルス培養上清からの RT-PCR 検査用

- (1) 陽性試料および陰性試料に A から D の番号を任意につける。
*陽性試料および陰性試料の数は任意とする。
- (2) 4 本の調査用試料を発泡スチロールの梱包用容器に入れ、保冷剤を入れ、緩衝材等で隙間を埋めた後にふたを閉めガムテープで密閉する。なお、試料数は、年度により変更することもあり得る。
- (3) 送り状に「外部精度管理調査用試料」と記載する。
- (4) 発送まで-20℃で保管し、冷凍便で送付する。
- (5) 受領後直ちに開封し、中身を確認する。
- (6) 試験実施まで-20℃で保管する。

2-3 組織からの RT-PCR 検査用

(1) 陽性試料および陰性試料に A から D の番号を任意につける。

* 陽性試料および陰性試料の数は任意とする。

(2) 4 本の調査用試料を発泡スチロールの梱包用容器に入れ、保冷剤を入れ、緩衝材等で隙間を埋めた後にふたを閉めガムテープで密閉する。なお、試料数は、年度により変更することもあり得る。

(3) 送り状に「外部精度管理調査用試料」と記載する。

(4) 発送まで-20℃で保管し、冷凍便で送付する。

(5) 受領後直ちに開封し、中身を確認する。

(6) 試験実施まで-20℃で保管する。

別紙3 外部精度管理調査 評価法

1. コイヘルペスウイルス病

以下の結果をもって良とする。

- (1) 改良 Sph 法および TK 法の PCR によって、試料①～③を陽性、④を陰性と判定し、かつ
- (2) 各電気泳動像において、i) 分子量マーカーが明瞭であり、ii) 陽性対照バンドが明瞭であり、iii) 陰性対照でバンドが出現せず、iv) 判定に支障をきたす非特異バンドの出現が無く、かつv) 目的の分子量の位置に明瞭なバンドが検出された場合。

2. コイ春ウイルス血症 (SVC)

2-1 ウイルス分離検査用

以下の3点をすべて満足する結果をもって良とする。

- (1) 陽性試料を陽性と判定し、陰性試料を陰性と判定している。
- (2) 陽性試料では、細菌やカビのコンタミネーションがない状態で、細胞の球形化を伴う細胞変性効果 (CPE) が観察される。
- (3) 陰性試料では、細菌やカビのコンタミネーションがない状態で、接種 1 週間後も CPE が観察されず、さらに培養上清の継代を実施しても CPE が観察されない。

2-2 ウイルス培養上清からの RT-PCR 検査用

以下の4点をすべて満足する結果をもって良とする。

- (1) 陽性試料を陽性と判定し、陰性試料を陰性と判定している。
- (2) 陽性試料では、SVCV F1/R2 プライマーセットによる RT-PCR、SVCV F1/R4 プライマーセットあるいは SVCV nestF/R プライマーセットによる nested-PCR において陽性対照と同じ位置に増幅産物が確認されたものが、下記の2つのパターンのいずれかである。
 - ① SVCV F1/R2, SVCV F1/R4, SVCV nestF/R
 - ② SVCV F1/R4, SVCV nestF/R
- (3) 陰性試料では、SVCV F1/R2 プライマーセットによる RT-PCR、SVCV F1/R4 プライマーセットおよび SVCV nestF/R プライマーセットによる nested-PCR のいずれにおいても陽性対照と同じ位置に増幅産物が確認されない。
- (4) 各電気泳動像において分子量マーカーが明瞭であり、判定に支障をきたす非特異バンドの出現がない。

2-3 組織からの RT-PCR 検査用

以下の4点をすべて満足する結果をもって良とする。

- (1) 陽性試料を陽性と判定し、陰性試料を陰性と判定している。
- (2) 陽性試料では、exSVCV F/R プライマーセットによる RT-PCR において陽性対照と同じ位置に増幅産物が確認される。

- (3) 陰性試料では、exSVCVF/R プライマーセットによる RT-PCR において陽性対照と同じ位置に増幅産物が確認されない。
- (4) 各電気泳動像において分子量マーカーが明瞭であり、判定に支障をきたす非特異バンドの出現がない。