

. 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

研究分担者	木村 博一	国立感染症研究所感染症疫学センター第 6 室長
	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
	小淵 正次	富山県衛生研究所
	貞升 健志、千葉 隆司	東京都健康安全研究センター
	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

研究要旨

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 法および NoV シークエンス・分子系統樹解析)に関する研修を行った。研修受講者は 23 名で、地方衛生研究所在籍歴は、7 か月～10 年 7 か月であった(平均±標準偏差: 3 年 2 か月±2 年 3 か月)。研修受講者は、同一試薬・同一機器を用い、3 日間連続で、リアルタイム PCR 法による標準曲線作成および試料中の NoV 遺伝子コピー数の定量を行った。また、GII.4 の PCR 産物を用い、シークエンスおよび系統樹解析も行い、塩基配列の正確度や系統樹の精密度に関する研修も行った。本研究において、リアルタイム PCR 法では、最小測定感度の確保、標準曲線の精確度、試料定量の精確度ならびに陰性対照の精確度を各々 1 点とし、シークエンス・系統樹解析においては、PCR の精確度、シークエンスの精確度ならびに系統樹の精確度を各々 1 点とし、合計 8 点で受講者の個別評価(A～D 評価)も行った。さらに、実習終了後、実習レポート提出および受講者の個別面談を行い、本研修内容における技術的な助言および指導も行った。本研修における受講者の評価は A 判定(7 点以上)が 3 名、B 判定(5～6 点)が 17 名ならびに C 判定(4～5 点)が 3 名であった。今後、さらに本研究を進展させ、地研におけるウイルス検査精度の確保・改善に資する詳細な検討と研修を行う必要があると思われる。

A. 研究目的

地方衛生研究所(地研)は、各自治体における科学的・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動向調査病原体検査においても検査結果の精度保証がな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、特にリアルタイム PCR 法とシークエンス・分子系統樹解析は、種々のウイルス遺伝子の精密な検出および定量や検出された遺伝子の詳細な遺伝学的特性を把握する上で重要な検査法と位置付けられている。実際、これらの方法は、ノロウ

イルス、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。今回、このような背景から、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。

B. 研究方法

1) 対象

国立保健医療科学院・国立感染症研究所共同主催・短期研修ウイルス研修受講者 23 名を本研究の対象とした。対象の地研在籍歴は、7 か月～10 年 7 か月であった(平均±標準偏差: 3 年 2 か月

±2年3か月)。23名中、都道府県から17名、政令指定都市から4名、中核市から2名参加しており、そのうち18名は、NoVの行政検査の経験を有していた。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。

1) 研修事前試験

まず、研修3週間前に同一ロット由来の試薬および試料の調整および分注をおこない、凍結保存をした。さらに研修2週間前に実務経験5年7か月の衛生研究所常勤職員が、研修用テキストに従い、3日間連続で事前試験を実施した。なお、本試験は研修用に分注した試薬および研修で使用する機器を使用し、同一測定位置で試験を行った。また、本研修に用いる実習書の作成も新たに行った。

2) 精度保証に関する知識および解析法の習得

本研究においては、検査診断実習に先立ち、法令に基づく、精度保証に関する必要かつ重要な知識の習得や検査データの統計学的解析に関する基礎知識に関する講義を行った(実質3時間)。また、この講義を基に、実習期間中、実習手技や知識に関する補足の講義を実習前あるいは実習終了後に連日行った。

3) NoV リアルタイム PCR 法

公定法を基にした研修用テキストおよび同一分注試薬・試料および同一機器を用いて、研修生ごとに3重測定を行った。事前試験と同様に、同一機器の同一測定位置で、3日間連続測定した。連日、検量線を作成し、相関係数(R^2)、変動係数(CV)、試料定量の精確度について評価を行った。

4) NoV シークエンス・分子系統樹解析

リアルタイムPCRと同様に、同一分注試薬・試料、同一機器を用いて試験を行った。COG2FおよびG2-SKRをプライマーとして用い、常法によるPCR増幅をおこない、ダイレクトシークエンス法により塩基配列を決定した。得られた塩基配列に、あらかじめ配布した参照株の塩基配列を加え、最尤法による系統樹作成を行った。解析した塩基配列および系統樹の精確度を評価した。

5) 解析データの個別評価

得られたデータを以下の6項目、i)標準曲線の精確度(CV<5%、 R^2 >0.99、10copies/assay)(各1点合計3点)、ii)試料定量の精確度(CV<5%以下)(1点)、iii)陰性対照の精確度(1点)、iv)シークエンスPCRの精確度(1点)、v)シークエンスの精確度(1点)、vi)系統樹の精確度(1点)、合計8点として判定を行った。7点以上をA評価、5~6点をB評価、4~5点をC評価、4点未満をD評価とした。さらに、実習終了後には、個別面談を行い、技術的な助言および指導も行った。また、

本研修のレポート提出ならびにアンケート調査も行った。

C. 研究結果

1) 事前試験結果

結果を図2に示す。被験者による事前試験において、3日ともNoVリアルタイムPCR法における標準曲線の相関係数(R^2)は0.99以上であった。また、検量線の各コピー数におけるCVはすべて5%以下であった。試料定量値の日差変動も5%未満であり、研修に使用する検査試薬・機器には問題がないと判断した。

2) NoV リアルタイム PCR 法における標準曲線および試料解析結果

各受講者の検量線の結果を図3に示す。受講者23名のうち、初日に2名、2日目に1名に、標準物質や試料をプロトコルと異なったwellに添加したため、検量線を作成することができなかったため、データ解析から除外した。また、初日8名、2日目あるいは3日目に5名が作成した標準曲線において、 R^2 が0.99未満であった。図3に示すように、作成した標準曲線において、低濃度ほど研修者間のCt値のばらつきを認めていた。 10^3 コピー/well以上ではすべての研修生で蛍光シグナルを認めていたが、 10^2 コピー/wellでは2名の研修生が1wellで蛍光シグナルを認めなかった。さらに 10^1 コピー/wellで、多くの研修生が蛍光シグナルを検出できなかった(図4)。なお、試料の定量に関してはすべての研修生でCV<5%であった。陰性対照において、実験室内コンタミネーションは、図5のように3日目に多くみられた。

3) NoV シークエンス・分子系統樹解析

全23名中、20名ではシークエンス解析による塩基配列に問題は認められなかった。3名中、2名ではプライマー配列のトリミングをしておらず、1名にリードミスがみられた。系統樹の作成は、すべての受講者で問題はみられなかった。

4) 解析データの個別評価

全23名中、A判定(7点以上)が3名、B判定(5~6点)が17名ならびにC判定(4~5点)が3名であった。提出された実習レポートを基に、全ての研修者に、個別面談を行い、本実習において、細部にわたる問題点の列挙と問題点の技術的解決に関する助言および指導を行った。さらに、各受講者の同意を得て、研修終了後、各施設にて、本研修と同じ手法でNoVリアルタイムPCR法の再実験・解析を行うとともにデータの還元により、研修後の成果を再評価することとした。

5) アンケート調査結果

多くの研修者から、研修前後における技術ならびに知識水準の向上とともに、本研修により、今まで行っていた手技を見直すことができたとい

う回答が得られた。

D．考察

本研究においては、精度保証の手法を取り入れたノロウイルス遺伝子検査法に関する研修を行った。その結果、本研修により、ほとんどの受講者において、NoV 検査法の精度保証に関する知識の理解や実験手技の水準が向上したと思われる。

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であり¹⁾、ほとんどすべての地研において、行政検査のみならず、ノロ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。よって、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であれば、今回の解析項目においては適切なデータが得られると思われる。本研修においては、NoV リアルタイム PCR 法における標準曲線作成および試料測定値において、おおむね良好な結果が得られた。また、シーケンス解析・系統樹作成に関してもほとんどの受講者の技術水準に問題がないこともわかった。

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²⁾。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²⁾。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。

E．研究発表

なし

F．知的財産の出願・登録状況

なし

参考文献

1. ノロウイルスの検出法について，食安監発第 1105001 号.
2. 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 平成 27 年度 総括・分担研究報告書

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。

	1	2	3
1	10 ⁶	10 ⁶	10 ⁶
2	10 ⁵	10 ⁵	10 ⁵
3	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁴
4	10 ³	10 ³	10 ³
5	10 ²	10 ²	10 ²
6	10 ¹	10 ¹	10 ¹
7	sample	sample	sample
8	NTC	NTC	NTC

標準物質

図 1. NoV リアルタイム PCR 反応系

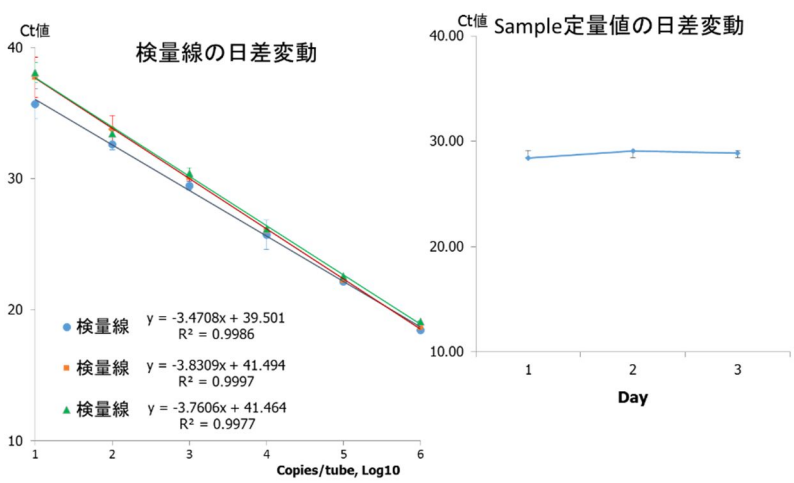


図 2. 事前試験結果

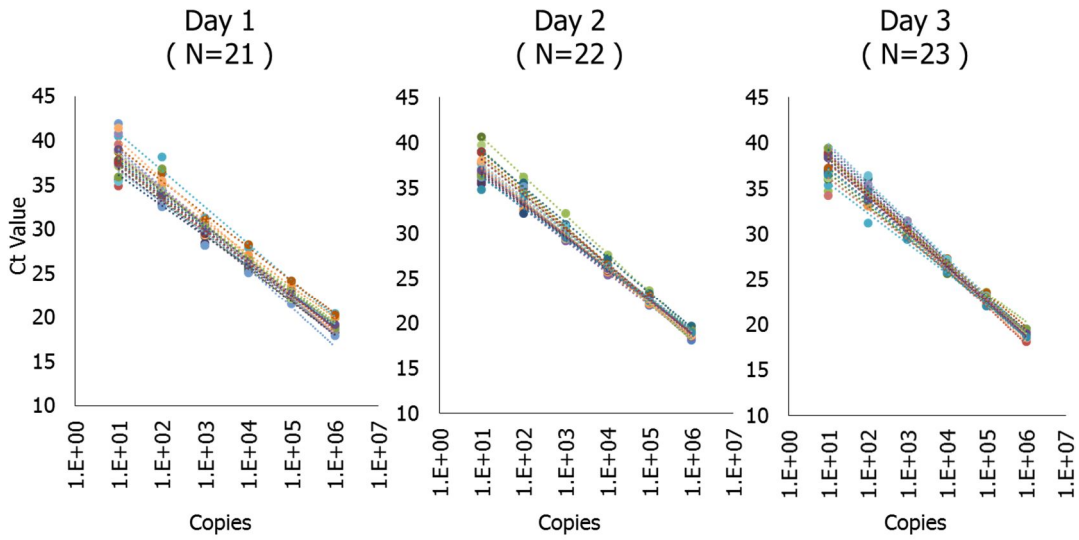


図 3. 本研修で得られた標準曲線

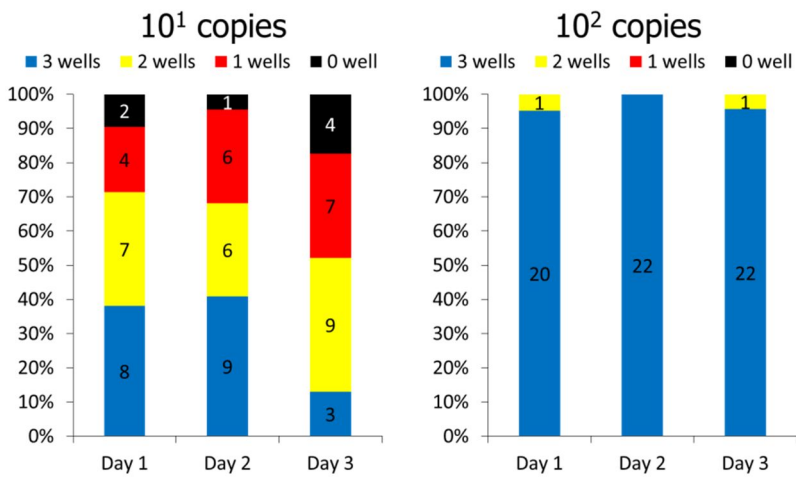


図 4. 低コピー数の標準コントロールで蛍光シグナルが検出された well 数

*69 wells/day (23人×3wells)にNTCのCt値40未満検出

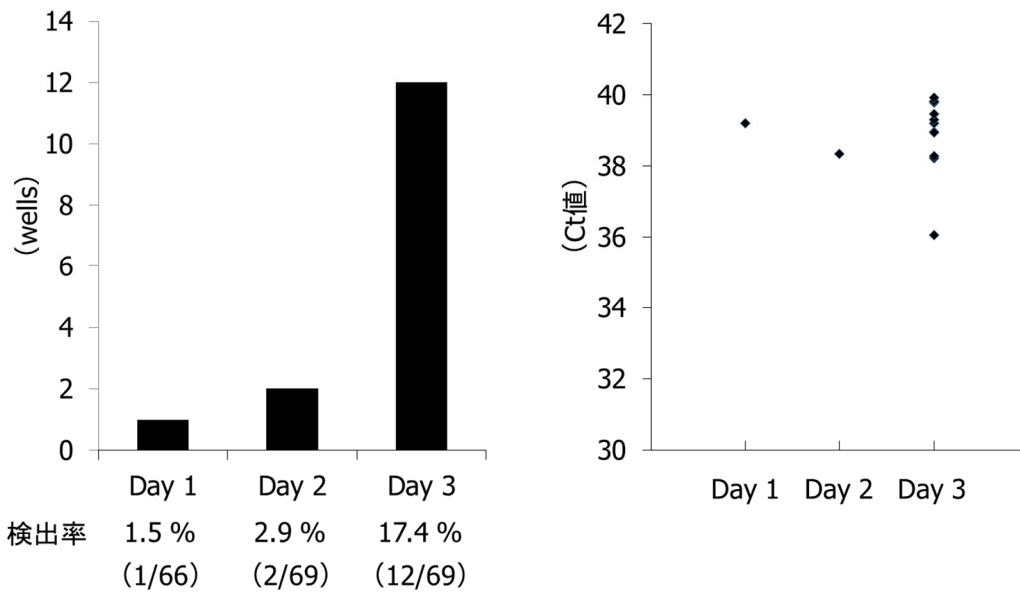


図 5. 実験室内コンタミネーションの頻度