

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¹⁾。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²⁾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 日間分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重測定の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¹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¹。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³。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³。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³。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。

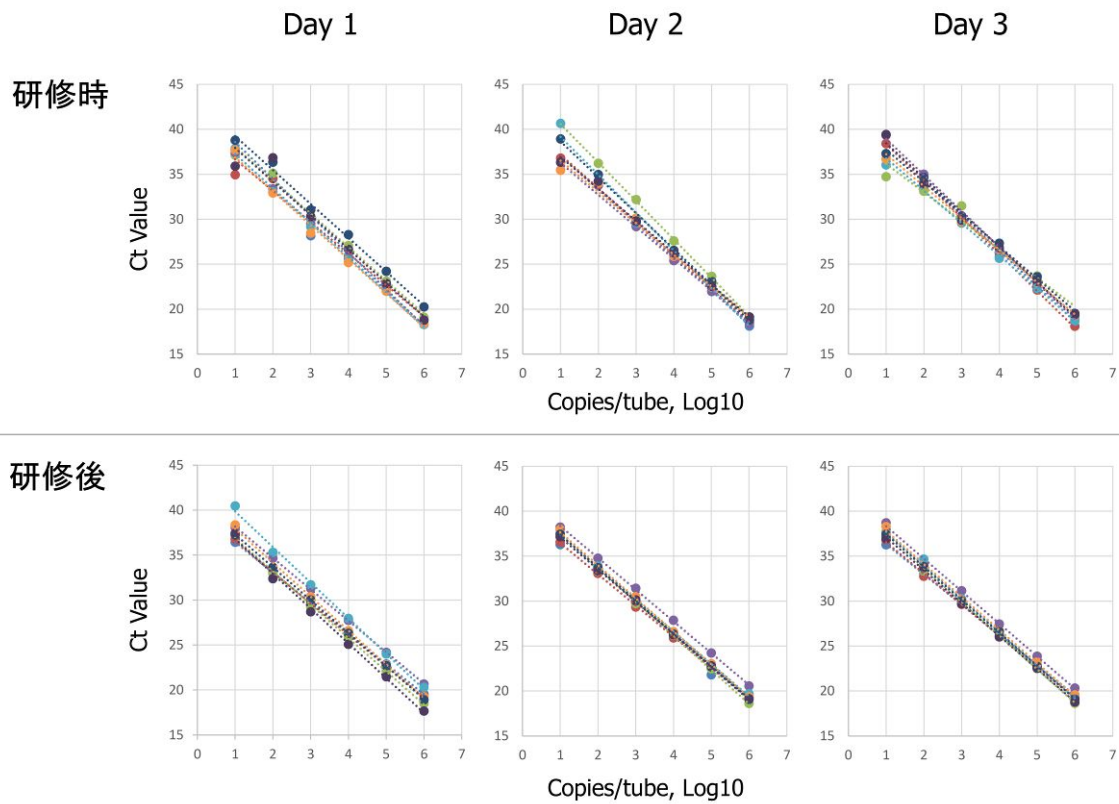


図 1. 研修時と研修後の検量線の比較

個人毎の3日間の平均値をPaired t-testで比較

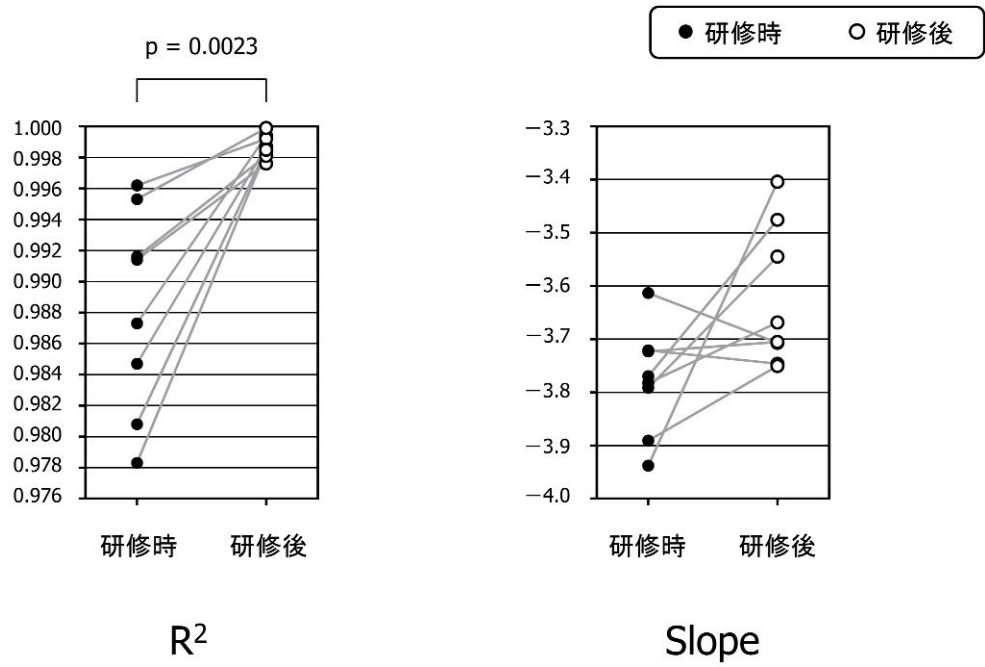


図2. 相関係数(R²)とスロープ値

個人毎の3日間のCV(%)の平均値をPaired t-testで比較

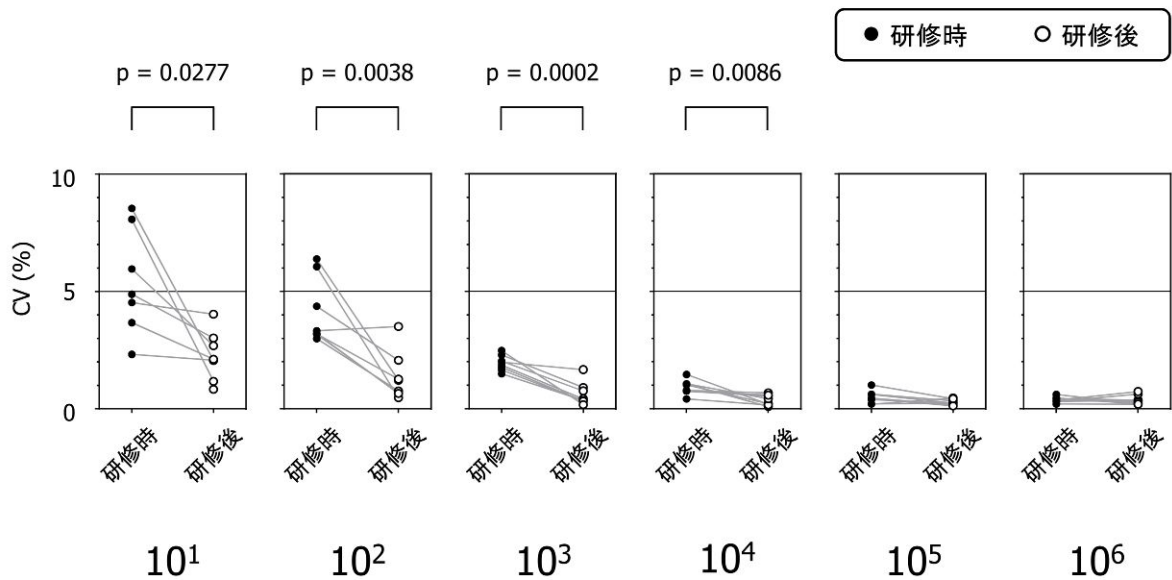


図3. 各濃度のCV値の比較

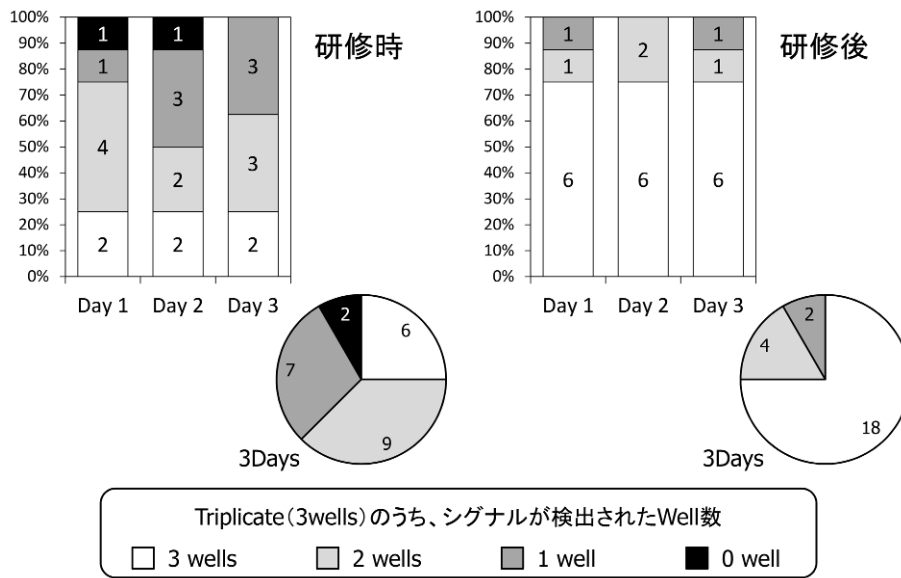


図4. 検出限界値の確保 (10¹copiesの検出)

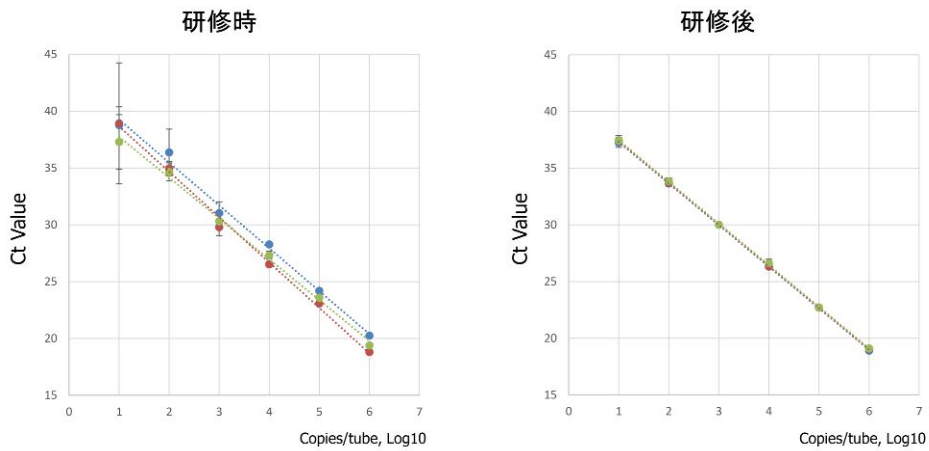


図5-a. 改善例1

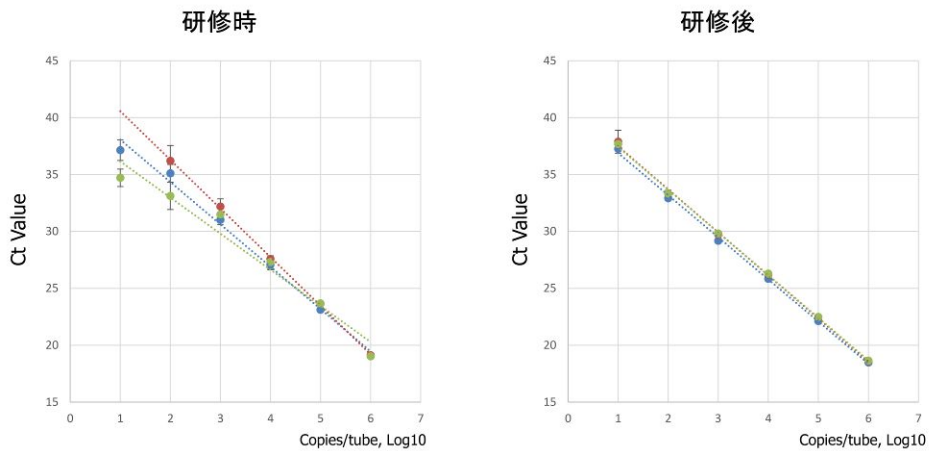


図5-b. 改善例2