

分担研究報告書

感染症発生動向調査におけるエンテロウイルス病原体検査に関わる外部精度調査（EQA）導入の研究

研究分担者	吉田弘	国立感染症研究所
研究協力者	板持雅恵	富山県衛生研究所
	伊藤雅 皆川洋子	愛知県衛生研究所（レファレンスセンター）
	小澤広規	横浜市衛生研究所
	木田浩司	岡山県環境保健センター
	北川和寛	福島県衛生研究所（レファレンスセンター）
	佐野貴子 近藤真規子	神奈川県衛生研究所（レファレンスセンター）
	長谷川道弥 新開敬行	東京都健康安全研究センター
	豊嶋千俊	愛媛県立衛生環境研究所（レファレンスセンター）
	中田恵子	大阪健康安全基盤研究所（レファレンスセンター）
	西澤香織	熊本市環境総合センター
	峯岸俊貴	埼玉県衛生研究所
	吉富秀亮	福岡県保健環境研究所（レファレンスセンター）

研究要旨 5類小児科定点把握疾患の手足口病は臨床診断による報告を基本にしている。今般、改正感染症法施行に伴い、積極的疫学調査で実施する手足口病検査に関しても一定の検査の質を担保することが求められている。このことから地方衛生研究所では検査体制が異なる実情を踏まえた検査の質を評価する外部精度管理調査（EQA）の在り方について研究を行った。2年目は手足口病のウイルス検出感度と遺伝子検査の質について、12施設の協力を得て試行的に調査を行った。その結果、検査試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、ウイルス検出感度のばらつきと反応諸条件の情報、施設間塩基配列の差異の情報、を改善に向け活用すべく施設内で機材保守、内部精度管理の実施などPlan・Do・Check・Act（PDCA）を動かすためのメカニズム構築が必要であること、EQAの結果は地方衛生研究所間で共有し、2類ポリオ対応のため国内のサーベイランス体制の向上に向け活用すべきであること、2年間の研究の結果、少数の参加施設ならば比較的容易に市販の非感染性試料を用いて他の疾患に対してもEQAをパッケージ化可能であること、病原体サーベイランス全体の質を改善するためには検体採取から検査結果までのフローを評価、把握する指標開発が必要であることが認められた。

A. 研究目的

感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（以下感染症法）における5類定点把握疾患のうち手足口病、ヘルパンギーナは主に

エンテロウイルスA群（EV-A）による感染が原因である。これらエンテロウイルス感染症は夏 - 秋季を中心に比較的大きな流行が見られる。1981年より開始した感染症発生動向調査事業では、手

足口病、ヘルパンギーナは臨床鑑別診断による報告が感染症法 12 条に規定され、全国の発生状況が速やかに還元されている。これらエンテロウイルス感染の多くの場合予後は良好であるが、手足口病の原因の一つであるエンテロウイルス 71 (EV71) 感染ではまれに重篤例が報告されており、またコクサッキーウイルス A 6 (CA6) 感染では、強い発疹像や爪甲脱落症を伴うケースも報告されている。このため積極的疫学調査の一環として、地方衛生研究所等では小児科定点の一部より検体を収集し、流行の原因を詳細に解析するため、血清型、遺伝子型等の解析を行ってきた。またウイルス同定結果の情報を全国共有することで、我が国の感染症対策に貢献している。

ウイルス分離による株収集は、詳細なウイルスゲノム解析に重要な技術であり、型特異的な抗血清を用いた中和反応による同定法は抗原性解析に必須な手法である。しかしこれらのウイルス分離・同定による検査は、結果を得るのに数週間必要なことから、近年では、遺伝子検査によるエンテロウイルス同定が普及している。

遺伝子検査によるエンテロウイルス同定は主要な抗原決定部位を含む VP1 領域のウイルス RNA を増幅し、塩基配列を調べ、標準株(参照株)との比較により 75% 以上一致するものを、当該血清型とすることと定義されている。

エンテロウイルスは感染成立後、咽頭より糞便中に長期間排泄されるため、検査材料としては糞便を用いる方が検出率が高い。しかし採取面から、近年では咽頭拭い液を検体として用いる傾向にある。後者の場合、ウイルス量が少ない場合が多く、高感度な検出方法が求められてきた。またエンテロウイルス検査は広範囲な血清型を検出する必要があり、両目的を満たす手法

(CODEHOP-semi nested PCR 法) が米国 CDC の Nix らによって開発され、国内外で本法を導入している検査室は増加している (WHO-CDC マニュアル http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0020/272810/EnterovirusSurveillanceGuidelines.pdf)。なお本法でポリオウイルスも検出可能である。

el lines.pdf)。なお本法でポリオウイルスも検出可能である。

H28 年 4 月に施行された改正感染症法では 5 類定点把握疾患の病原体検査についても一定の信頼性を担保することが求められている。しかし各地方衛生研究所の検査体制は異なっており、検査の質を統一した基準で評価することは困難である。

しかしながら、先行研究班(佐多班)で実施した地方衛生研究所向けのアンケート結果では手足口病を対象とした EQA 実施について要望が多かったことを報告している。

そこで本研究では、地方衛生研究所における手足口病の病原体検査では検査実施体制が異なる現状を踏まえつつ、国内で普及している CODEHOP-snpPCR 法を対象とした外部精度管理調査 (EQA) の導入方法を検討することとした。

初年度は CODEHOP-snpPCR 法による検査プロセスを評価するための EQA 用試料(エンテロウイルス RNA) の調製条件と保管輸送方法の検討、手足口病病原体検査の信頼性の基準、について検討をした。初年度の結果を踏まえ、最終年度の 2 年目は以下の研究を行った。

ア. CODEHOP-snpPCR 法によるウイルス検出感度の比較

原著では CODEHOP 法は数ゲノムコピー (GC) まで検出可能となっている。国内の検査施設では様々な酵素系を用いているが、これまで反応系の違いによる検出感度について、横断的な調査はなされたことがないため、同一陽性コントロールを用いたエンドポイントの比較調査を行う。

イ. 塩基配列による同定法の比較

病原体サーベイランスでは手足口病についてエンテロウイルスの血清型を報告している。PCR ダイレクトシーケンス法により、標準株の塩基配列と比較する同定法が普及しているが、同定に用いる塩基配列の比較調査もこれまでなされたことはないため比較を行い評価の在り方を検討する。

今般、手足口病検査に関わる EQA 試行調査を踏まえ、コスト面を含め EQA の実施可能性や評価方法の考察を行い、CODEHOP 法以外の遺伝子検査法への応用できるかどうか検討したので報告する。

B . 研究方法

1 . 手足口病検査に関わる EQA 試行調査参加施設数

エンテロウイルスレファレンスセンター 6 か所（福島県衛生研究所、神奈川県衛生研究所、愛知県衛生研究所、大阪健康安全基盤研究所、愛媛県立衛生環境研究所、福岡県保健環境研究所）と研究協力者の所属機関 6 か所（富山県衛生研究所、横浜市衛生研究所、岡山県環境保健センター、東京都健康安全研究センター、熊本市環境総合センター、埼玉県衛生研究所）の計 12 か所（A-L 施設）に参加を依頼した。


2 . 調査実施時期

EQA 試料は 2017 年 12 月 4 日に発送した。結果報告の締め切りは 12 月 25 日とした（3 週間）。調査要領は別添資料 1 のとおり。

3 . 調査に用いた試料

Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot16MBC019001, 19800GC/ul : メーカー表示) を EQA 用 RNA 試料とした。本試料は EV71 BrCr 株（標準株）を RD 細胞で増殖後、ウイルスを不活化し、精製 RNA を乾燥した製品である。本 RNA 試料を保管、送付するため、RNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001) を用いた。RNAstable に固定した試料のリカバーには TE buffer (pH8.0) を用いた。

CODEHOP-snpPCR 法によるウイルス検出感度の比較（エンドポイント比較）のため、RNA 試料を TE でリカバー後、メーカー表示換算 4,400GC/ul（Sample1）となるよう、また塩基配列による同定用試料として同じくリカバー後にメーカー表示換算 2,200GC/ul（Sample2）になるよう 1.8ml チューブに分注、乾燥固定し、リカバー用 TE buffer (pH=8.0) 1 本とともに計 3 チューブを宅

配便（冷凍）にて参加機関に送付した（ 図 1）。即ち Sample 1 と 2 の違いは濃度のみである。

4 . エンドポイント用試料の再現性試験と感染性否定試験

エンドポイント測定用試料の再現性を確認するため、事前に 2 施設（ア、イ）で検討を行った。Sample 1 として準備する同一ロットの RNA コントロールを 4,400GC/ul になるよう調製し、2 施設で各 3 本ずつエンドポイントを比較し再現性を確認した。

また送付時の安全性を確認するため、Sample 1 として調整する前の試料 10ul（メーカー表示換算 13,200GC/ul）を RD-A 細胞に接種し、2 代継代し、感染性の有無を確認した。

5 . エンドポイント測定

1) 方法と報告内容

- Sample 1 を 30ul TE buffer にてリカバー
- 10 倍希釈列（ $10^{-1} \sim 10^{-3}$ まで）を作成
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いて CODEHOP-snpPCR を実施し、エンドポイントを確認（原液、-1、-2、-3）。
- エンドポイント判定は電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイント判定結果とともに報告

することとした。なお測定回数は参加施設の任意とした。

2) 比較に必要な情報

PCR 使用機器名、反応系（逆転写, 1 stPCR, semi nested PCR）の用いた酵素の種類、反応に用いたテンプレートの容量、電気泳動の条件（ゲル濃度、アプライ量など）についてエンドポイントとともに報告を求めた。

6 . 塩基配列による同定法の比較

1) 方法と報告内容

- Sample 2 を 30ul TE で、Sample 1 と同様リカバー

- CODEHOP-snpPCR 法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法で PCR 産物を精製し、塩基配列解析を行い、同定し結果報告することとした。

2) 比較に必要な情報

塩基配列による同定法、同定に用いた編集済み塩基配列データ、ABI ファイルのデータを同定結果とともに報告を求めた。

7. EQA のパッケージ化検討

EQA 試料準備、送付に必要な費用、他の利用可能な EQA プロバイダとの比較を行った。

8. 倫理面の配慮

本研究では個人情報を取り扱わないため、個人情報保護に関する問題は生じない。

C. 研究結果

1. エンドポイント用試料の再現性試験と感染性否定試験

2 施設で同一ロット試料を各 3 本に対してエンドポイント測定した結果、A 施設では 3 試料とも 10^{-1} まで増幅を確認、I 施設では 3 試料中、2 試料が 10^{-2} 、1 試料が 10^{-1} まで増幅を確認できた。即ち、440GC/uI まで 2 施設で CODEHOP-snpPCR 法で再現可能であると判断された。

なお A 施設では RNA2.5uI を用いて、Superscript II (ライフテクノロジー) により逆転写反応を 5uI で実施した。I 施設は PrimeScript RT(Takara) により RNA10uI を用いて反応を 20uI で行った。1stPCR, semi nestedPCR とも総容量 25uI で測定している。

高濃度の RNA 試料 (13,200GC/uI) を RD-A 細胞に接種し、2 代継代 (全 14 日間) したところ製品説明書記載通り、不活化されていることを確認した。

2. エンドポイント測定結果

1) 結果報告期間

2 施設で実施した、再現性試験を踏まえ、

Sample 1 を同様に調製し、2017 年 12 月 4 日に一斉に送付。3 週間の期限内に原則として全 12 か所より結果の回答があった。

2) エンドポイントの比較結果

あらかじめ 4,400GC/uI に調製した RNA コントロールを各施設において 10^{-1} から 10^{-3} まで希釈列を作成しエンドポイントを測定した。測定回数は任意 (1 回 ~ 4 回) とした。結果の概要は以下の通りで、詳細は図 2 に示す。なお、縦軸は希釈条件を、横軸は報告機関数と、該当する 12 施設のアアルファベット表記を示した (図 2)。

- 12 か所の施設間で原液 (4,400GC/uI) のみ検出の施設があった一方、100 倍希釈 (44GC/uI 相当) まで検出された施設もあり、施設間で検出感度に差が見られた。1000 倍希釈 (4.4GC/uI) が検出された施設はなかった。
- 10 倍希釈 (440GC/uI 相当) まで検出可能であった施設が最も多く、12 施設中 5 施設であった。

3) CODEHOP-snpPCR 法の反応条件

(図 3) に A-L 施設の反応条件の情報を示す。逆転写反応、1stPCR, semi nestedPCR に用いられている酵素系について、米国 CDC が報告している試薬類を「手足口病検査マニュアル」で示しているが、同一であるのは I、J 施設のみであり、残り 10 施設は各々異なっていた。

また反応条件は同一であるが I、J 間では検出感度の差が見られた。

施設 A, B は 100 倍まで検出可能であったが酵素の種類は原法とは異なっていた。なお A, B では逆転写反応は同じ種類を用い、1stPCR と semi nested PCR には異なる DNA polymerase (3' 5' exonuclease 活性の有無) を用いていた。

CODEHOP-snpPCR 法に用いるプライマーにはイノシンが用いられているため 3' 5' exonuclease 活性のある酵素系 (ExTaq) の増幅効率の低下が懸念されたが、検出感度の最も高かった A, B 施設間には本比較調査 (1 回測定) では差が認められなかった。

3. 塩基配列による同定法の比較

あらかじめ 2,200GC/uI に調製した RNA 試料 (Sample 2) を用いて 12 施設で CODEHOP-snPCR と塩基配列によるエンテロウイルス同定を行った。全施設ともエンテロウイルス 71 との回答を得た。

なお、1 施設のみ増幅できなかつたため Sample 1 の増幅産物を用いて塩基配列を解析し、正答を得ている。

1) 塩基配列による同定法

エンテロウイルス VP1 領域を用いた同定法は標準株配列と 75% 以上一致する配列を当該血清株とし、オランダ RIVM が Web 上で提供するタイピングツールも本原則に基づいている。

塩基配列による同定法は 11 施設が RIVM タイピングツール、標準株配列との比較による同定を、単独あるいは複数組み合わせにより同定を行っていた (図 4)。

2) 塩基配列の比較

12 施設の塩基配列と送付試料 BrCr 株の配列を (図 5) に示す。

送付試料 EV71 BrCr 株の RNA を CODEHOP-snPCR による増幅した場合の増幅サイズは 354bp であり、プライマー領域を除くと 301bp である。図 5 は 301bp にそろえてアライメント結果を示している。6 施設を除き 11 施設より回答のあった配列長は 301bp 以上であった。一施設の配列長は 301bp より短い、標準株 BrCr 株と 75% 以上一致し、同定には問題がないと判断された。

12 施設のアライメント配列上で多型サイトが 2 か所で見られた。(図 5) では赤丸で示す。

波形ファイルでは、多型として報告しているケース、シグナルが重なっているがピークの高いほうを選択したケース、バックグラウンドが高く判定困難、多型が見られないケース、が認められた (図 6)。

いずれも標準株 BrCr 株と 75% 以上一致したことから、塩基配列によるエンテロウイルス同定には問題がないと判断された。

4. EQA パッケージ化の検討

前年度に実施した、RNA 試料の安定化条件、輸

送・保管法の比較検討を踏まえ、市販品のエンテロウイルス RNA コントロールと、輸送に用いる RNA stable の組合せにより、少数の施設間比較調査であれば比較的簡便に EQA が実施可能であることを示した。

今般実施した 12 か所程度の施設なら、エンドポイント比較とシーケンス比較、準備から送付まで 1 人で可能であった。また宅配便による冷凍輸送利用。費用は 1 か所輸送費込み 2 万円以下であり、民間が実施する EQA と費用の面でも大きな差が出ないことが確認された (図 8)。ひな形を別添資料 2 に示している。

D. 考察

本研究では、感染症発生動向調査による 5 類小児科定点把握疾患の一つである手足口病検査について、EQA 導入の検討を行った。手足口病は主に EV-A 群が起因ウイルスである。かつては乳のみマウスを用いた CF 試験や培養細胞と特異的中和抗血清を用いたウイルス分離・同定試験、が主な検査法であり、分離株を得るためには今も有用な手法である。しかし施設維持、手技習得期間、細胞への感受性、検査時間などの要因もあり、臨床材料から直接ウイルスゲノムを増幅後、塩基配列解析により同定を行う遺伝子検査法が普及している。

積極的疫学調査の一環で実施するエンテロウイルス検査は、検体採取、検査方法の選択など地方衛生研究所の裁量で選択する部分は大きいものの、全国調査により、血清型の検出状況を還元する病原体サーベイランスの目的からは、一定の検出感度、精度が担保されることが求められる。本研究では、手足口病検査に提供される検体は咽頭ぬぐい液が多いこと、少ないウイルス量で同定可能な CODEHOP - snPCR 法と直接塩基配列決定法による検査の信頼性を評価するための EQA 手法について検討した。なお本法でポリオウイルスも検出できることから、EQA による検出感度の比較は意義がある。

1. エンドポイント用試料の再現性試験と感染性

否定試験

初年度研究により、EQA 試料調製、送付・保管条件を比較検討した結果、市販の RNA コントロールを使用する場合、低濃度に希釈すると再現性がばらつく傾向にあったため、リカバー時に数千 GC/uI になるよう調製することで、エンドポイント用試料として利用可能であった。

2 施設で事前に 3 回繰り返し再現性を確認したが、EQA によりエンドポイント比較のような定量的な試験を実施する場合は、事前に配布用ウイルス RNA の濃度、増幅領域の安定性、再現性について担保する必要がある。

2. エンドポイント測定

1) エンドポイントの設定について

事前に調製した EQA 用 RNA 試料を用いて、12 施設が測定したエンドポイントは、原液から 100 倍希釈 (44GC/uI 相当) まで検出可能であり、10 倍希釈 (440GC/uI 相当) した試料まで検出できた施設が最も多かった。なお 440GC/uI 相当の濃度は初年度検討したウイルス感染価 (RD-A 細胞使用) と GC 数の関係で $\log_{10} CCID_{50} < 1.5$ 未満に相当する。経験上、PCR 産物から直接塩基配列を決定する場合、数～数十 GC であるとゲノム RNA の増幅は可能でもシーケンスが読めない場合があるため、再現性の観点から 10 倍希釈 (440GC/uI 相当) が増幅できることが、塩基配列による同定を行う場合に望ましい条件であると考えられる。

このように望ましいエンドポイントの濃度に関しては、感染価、ウイルス GC 数、コントロール RNA の希釈倍率の相互関係を事前に検討しておく必要がある。

2) CODEHOP-snpPCR 法の反応条件

図に示すように 12 施設の反応条件は異なっているにもかかわらず、おおむね 10 倍希釈 (440GC/uI 相当) が検出可能であった。各施設では、酵素などの試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、EQA を、ウイルス RNA 検出感度のばらつきと反応諸条件の情報を各施設が情報共有する場として活用することが有用であると考えられる。

3. 塩基配列による同定法の比較

1) 塩基配列による同定法

VP1 領域を用いた同定の場合、1 施設を除き、標準株の塩基配列との比較、あるいは・並びに RIVM タイピングツール等により、同定を行っていた。方法は異なっているが、今回の EQA ではすべて正答を得ている。しかし、ウイルスゲノム塩基配列を用いた相同性検索 (BLAST など) による同定の問題点は病原体検出マニュアルにも記載されているように、同定結果を間違える場合もある。このため、方法論の継続的な周知の必要性が認められた。

2) 塩基配列の比較

アライメント配列上で多型サイトが 2 か所で見られ、波形データの確認より 多型として報告しているケース、シグナルが重なっているがピークの高いほうを選択したケース、バックグラウンドが高く判定困難、多型が見られないケース、が認められた。

いずれも標準株 EV71 BrCr 株と 75% 以上一致し、塩基配列を用いた同定上は問題がないと判断された。

しかしながら、定点におけるエンテロウイルス病原体サーベイランスはポリオウイルス検査と類似の点が多い。ポリオウイルスの場合、ワクチン由来ポリオウイルス (VDPV) の鑑別時には数個の塩基置換でさえも、波形データと合わせた厳密な確認が必要であり、検査・調査目的に応じた塩基配列の質が求められる (図 9)。

このためエンテロウイルス同定においては、報告上問題がなくとも、同定に用いる塩基配列の波形データを、目視で確認、GAP の確認、アミノ酸置換で確認するなどして質を担保するとともに、適切に機材保守を維持するなど、2 類ポリオ検査時の備えとして質を維持してゆく必要がある。

波形のバックグラウンドの高い原因、乱れの原因を特定するための方法の一つとして、EQA 実施時に施設ごとにコントロール試薬 (sequencing standards) を用いた泳動解析データとの比較が有効と考えられた。

エンドポイント測定に用いた Sample 1 が 100 倍希釈まで検出可能だった A、B 施設においては、増幅産物を用いてシーケンスを行ったところ、10 倍希釈と 100 倍希釈では多型サイトの違いが認められている (図 7)。

今般の EQA では塩基配列のアライメントの結果、施設間で多型サイトの出現の有無に差が認められた。ウイルスは mix population のため、鋳型の量、反応系の違いが反映する。手足口病検査に関わるウイルス遺伝子検査の EQA では、施設間で異なる反応条件で実施する限り、塩基置換数に厳密な正答を得ることは困難であり、むしろ施設間のアライメント結果と多型サイトの解釈結果を示し、改善につながる情報を提供すること、が重要であると考えられる。

4 . EQA のパッケージ化

本研究で行った市販 RNA コントロールはウイルスを不活化したフルゲノムであり、商用カタログでは様々な種類のウイルスコントロールが市販されている。やや高価であるが、不活化されていること、フルゲノムであり様々な領域の増幅が可能であること、から今般比較した CODEHOP-snpPCR 法以外にも当該 PCR 法にて検出可能な RNA 量を設定することで応用可能である。さらに RNastable により乾燥保存で安定化させることで検体輸送が比較的容易になる。

また費用面ではコントロールを適宜希釈することで、原価は国内外の EQA プロバイダが提供する参加費用と同等以下になることが明らかになった。

このため比較的小規模 (十数か所) を対象とした EQA であれば、外部委託などで実施することも可能と考えられる。この場合、配布試料の品質管理手法 (安定性の条件、確認方法) の開発も考慮しなければならない。

E . 結論

1 . 改正感染症法では施設の実情を踏まえた上での検査の質の確保を求めているが、類型に基づき、整備すべき検査 SOP などの技術文書の種類は異な

る。

信頼性確保の在り方についても、蔓延防止の観点から危機管理対応が必要な 2 類などの疾患に係る検査と国民に情報提供を行うことが目的の 5 類定点把握疾患の検査とでは、求められる精度管理の目的は異なると考えられる。

即ち 2 類感染症であるポリオの確定診断、あるいは退院時の感染の有無の検査には高感度かつ正確性が求められるが、流行状況について情報提供を目的とする手足口病、ヘルパンギーナなどのウイルス検査に関しては、地方衛生研究所・地方自治体が積極的疫学調査で実施する目的により必要とする検出感度、同定に必要な遺伝子解析の精度を判断することになる。

これらを踏まえた上で、機器管理上必要なポリオ検査に対応しうる検出感度、正確性を維持するためにはルーチンの病原体サーベイランスを通じて一定の精度を確保することが望まれる。

このため EQA による比較調査の結果は、施設間で情報共有を行い、施設内では機材保守、内部精度管理によるルーチン検査の質の維持、そして改善に向けた PDCA を動かすメカニズム (技術マネジメント研修等) を構築することが重要である。2 . EQA で評価するウイルス検出感度の差については、各施設では、酵素などの試薬を他の病原体検査と共有している実情を踏まえると、EQA を通じて、ウイルス検出感度のばらつきと反応諸条件の情報を各施設が改善に向けて活用することが望まれる。また調査結果を各施設間で共有すべきである。

3 . EQA による遺伝子検査結果評価は施設間で異なる反応条件で実施する限り、塩基置換数に厳密な正答を得ることは困難であり、むしろ施設間塩基配列のアライメント結果と多型サイトの解釈結果を示し、改善につながる情報を提供すること、が重要である。

4 . 本研究では市販の非感染性試料を用いて EQA をパッケージ化し、他の疾患にも応用可能であることを示した。5 類定点把握疾患の病原体サーベイランスに関しては、積極的疫学調査で行っていることを踏まえ、EQA の実施主体は予算の担保を

前提に民間委託、レファレンスセンターの活用も検討する余地があると考えられる。この場合は配布試料の品質管理手法(安定性の条件、確認方法)の開発も十分考慮すべきである。

5. 手足口病、ヘルパンギーナの検査は咽頭ぬぐい液の検体提出が多い実情を踏まえ、医療機関による採取時期等、保管条件など検査以外の要因もサーベイランス実施上考慮する必要がある。即ち病原体サーベイランス全体の質を改善するためには検体採取から検査結果までのフローを評価、把握する指標開発が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉田弘,環境水サーベイランスの意義並びに実態から見えてくる予防医学に関わる知見 東京小児科医会報 36(1):26-30, 2017
- 2) 吉田弘,高橋雅輝,濱崎光宏,山下育孝,四宮博人,山下照夫,皆川洋子,岸本剛,調恒明 エンテロウイルス検査の信頼性確保について 病原微生物検出情報(IASR) 38(10):199-200, 2017

2. 学会発表

- 1) 吉田弘「改正感染症法における検査標準作業書と精度管理のあり方について」平成29年度 地域保健総合推進事業 地全協関東甲信静支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年10月11日千葉市
- 2) 吉田弘「改正感染症法における標準作業書と検査の信頼性確保について」平成29年度 地域保健総合推進事業 地全協九州支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年10月24日熊本市
- 3) 吉田弘「改正感染症法における検査標準作業書の精度管理の在り方について」平成29年度 地

域保健総合推進事業 地全協中国四国支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年11月8日岡山市

4) 吉田弘「改正感染症法における病原体検査の信頼性確保について」平成29年度 地域保健総合推進事業 地全協東海北陸支部レファレンスセンター連絡会議 平成29年11月10日名古屋市

5) 帖佐徹、吉田弘、滝澤剛則:環境水サーベイランス手法の中国への導入について、第76回日本公衆衛生学会平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

6) 吉田弘、筒井理華、堀田千恵美、小澤広規、滝澤剛則、中田恵子、世良暢之、濱崎光宏:環境水サーベイランスによるポリオウイルス検出時の課題 第76回日本公衆衛生学会平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

7) 濱崎光宏、世良暢之、吉田弘:環境水中の腸管系ウイルス量と感染症発生動向調査事業の患者数との関連について 第76回日本公衆衛生学会平成29年10月31-11月2日 鹿児島市

8) 帖佐徹、吉田弘、板持雅恵、滝澤剛則、Zhang Yong, Xiaohui Hou、Zheng Huanying、、Wang Haiyang、Tao Zexin :Collaboration study of environmental surveillance for polio since 2005 between Japan and China グローバルヘルス合同大会 2017 平成29年11月24-26日 東京

G. 知的所有権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

図 1

手足口病EQA試料の作成

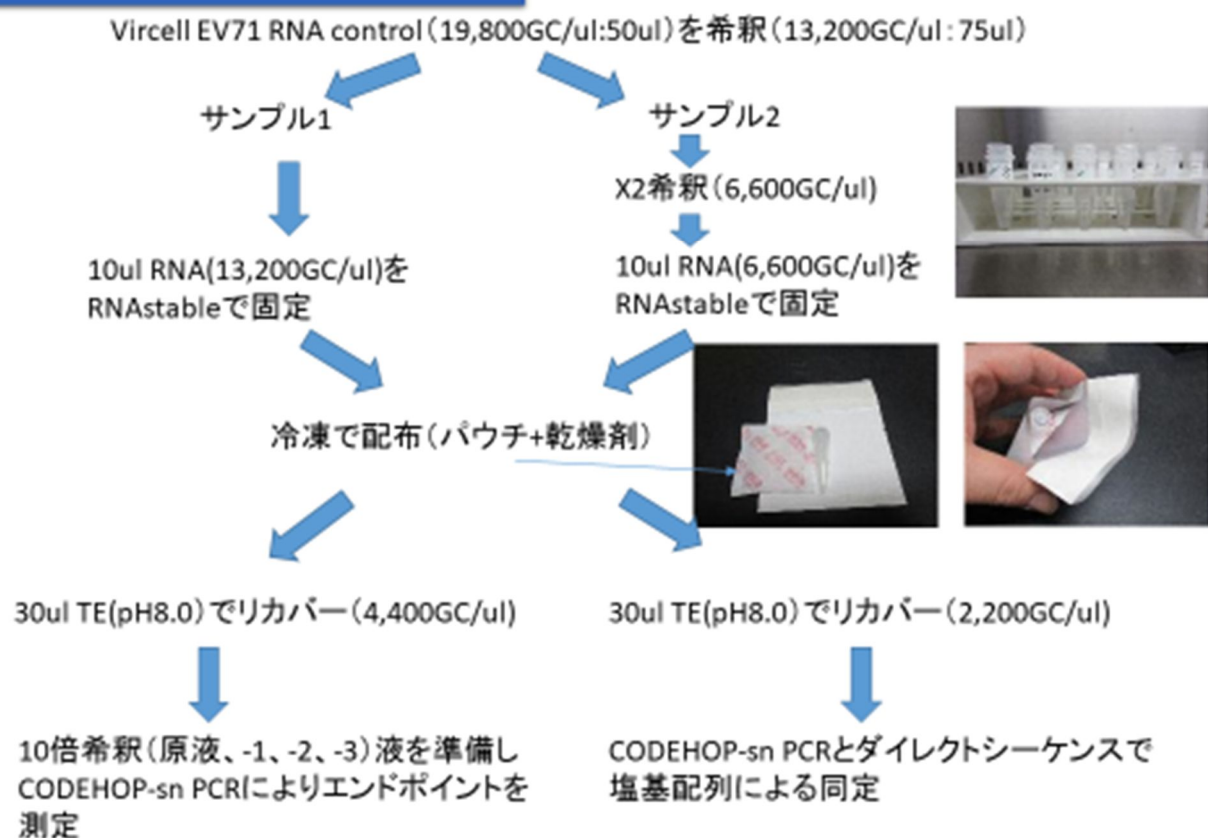


図 2

CODEHOP-snpPCRによるエンドポイント測定

- あらかじめ約4,400GC/uIに調製したRNAコントロールを10⁻¹から10⁻³まで希釈列を作成しエンドポイントを測定。
- 測定回数は任意結果

結果

- 測定は1回~4回(1か所は4回、2か所は3回、9か所は1回測定)
- 12か所の施設間で下記のような検出感度に差が見られた。
- 5/12施設のエンドポイントは10倍希釈まで検出可能であった。

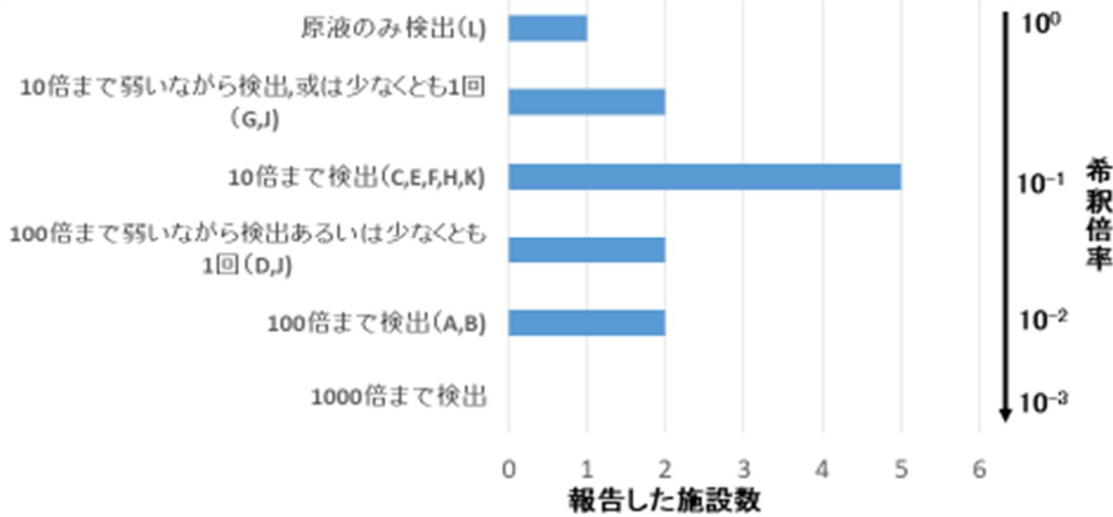


図 3

施設	RT			1st PCR			2nd		
	縮宮量 (uI)	RNA量 (uI)	酵素	縮宮量 (uI)	cDNA量 (uI)	酵素	縮宮量 (uI)	1st PCR量 (uI)	酵素
A	20	100	42-355-15 m	25	5	98-188-142-3 m	25	1	98-188-142-3 m
B	20	100	37-355-15 m	25	5	95-595-342-388-45 m	40	1	95-595-342-388-45 m
C	10	50	22-45495-5 m	25	5	95-594-342-388-45 m	40	2	95-594-342-388-45 m
D	10	50	22-42695-5 m	25	5	94-195-342-388-45 m	40	0.5	94-195-342-388-45 m
E	25	12.50	22-42695-5 m	25	2.5	94-294-342-372-45 m	40	2.5	94-294-342-372-45 m
F	15	50	55478-1 m	25	5	95-595-342-372-45 m	35	1	95-595-342-372-45 m
G	15	50	55-41895-5 m	50	10	94-342-372-45 m	40	3	94-342-372-45 m
H	20	100	37-355-15 m	25	5	95-342-388-45 m	40	1	95-595-342-372-45 m
I	10	50	22-42695-5 m	50	10	95-342-388-45 m	40	1	95-595-342-372-45 m
J	10	50	22-42695-5 m	50	10	95-342-388-45 m	35	1	95-595-342-372-45 m
K	5	2.50	22-42695-5 m	25	5	95-595-342-372-45 m	40	1	95-595-342-372-45 m
L	15	50	55478-1 m	24	4	95-595-342-372-45 m	35	4	95-595-342-372-45 m

① PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (RR037A)
 ② SuperScript III (200 U/L)
 ③ SuperScript III (200 U/L) 0
 ④ AMV Reverse Transcriptase XL (200 U/L) (1本) (TOYOBO)

⑤ Takara Taq Hot Start Version (5 U/L) (Takara, RR037A)
 ⑥ Takara Ex Taq Hot Start Version (5 U/L) (RR036A)
 ⑦ Taq DNA Polymerase, 5 U/L (シグマ)
 ⑧ General Amp PCR Master Mix (Takara)
 ⑨ DreamAmp MAX PCR Master Mix

⑩ Premix Ex Taq Hot Start version (5 U/L) (Takara)
 ⑪ FastStart Taq DNA Polymerase, 5 U/L (シグマ)

塩基配列によるエンテロウイルス同定法の回答(12施設)

同定法	施設数
標準株との比較	1
EV タイピングツール(RIVM)	7
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較	1
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較、系統樹作成	1
EV タイピングツール(RIVM)と標準株との比較、系統樹作成、BLAST検索	1
BLAST検索で相同性が高い株で判断	1

図 5

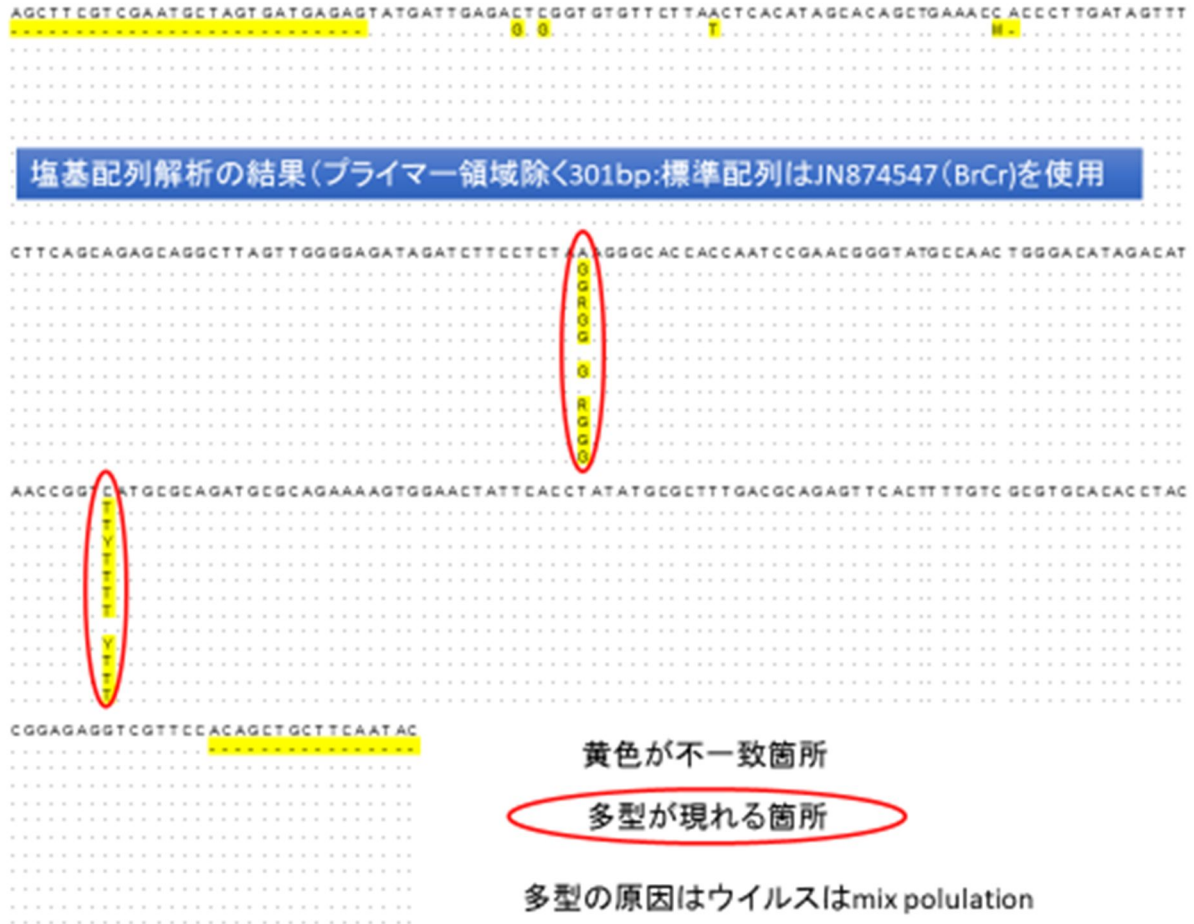


図 6

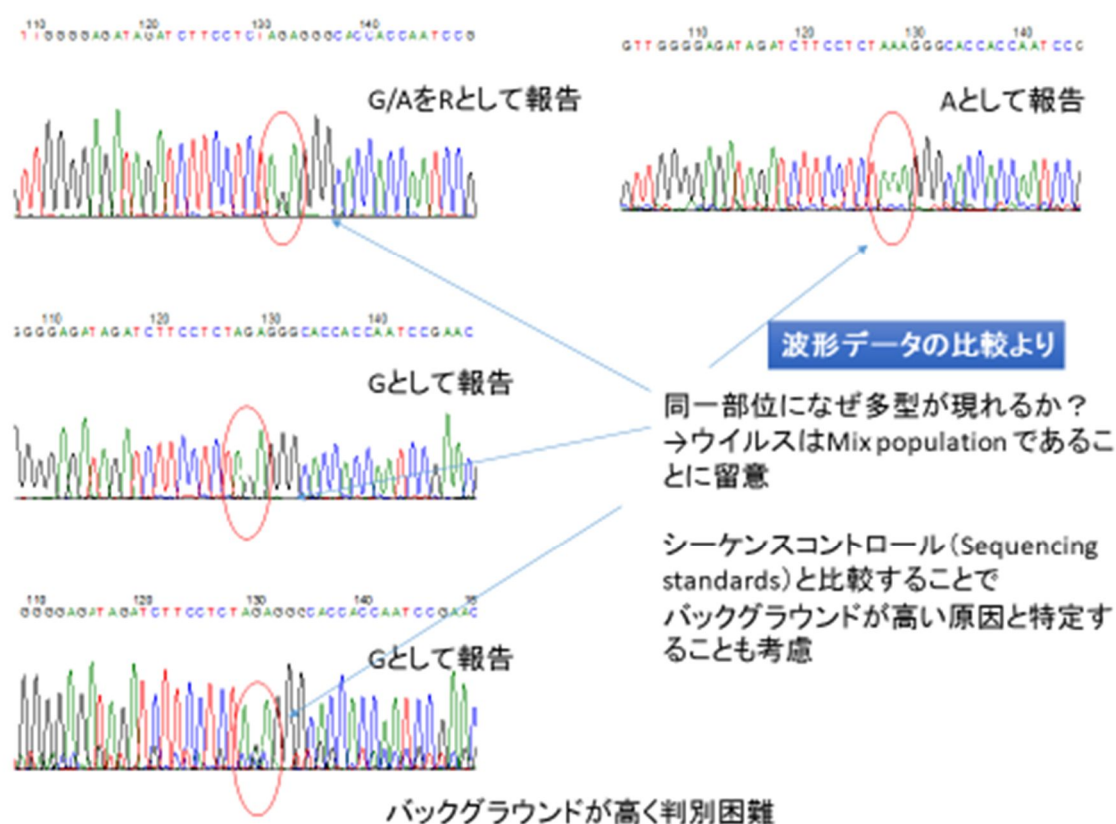


図 7

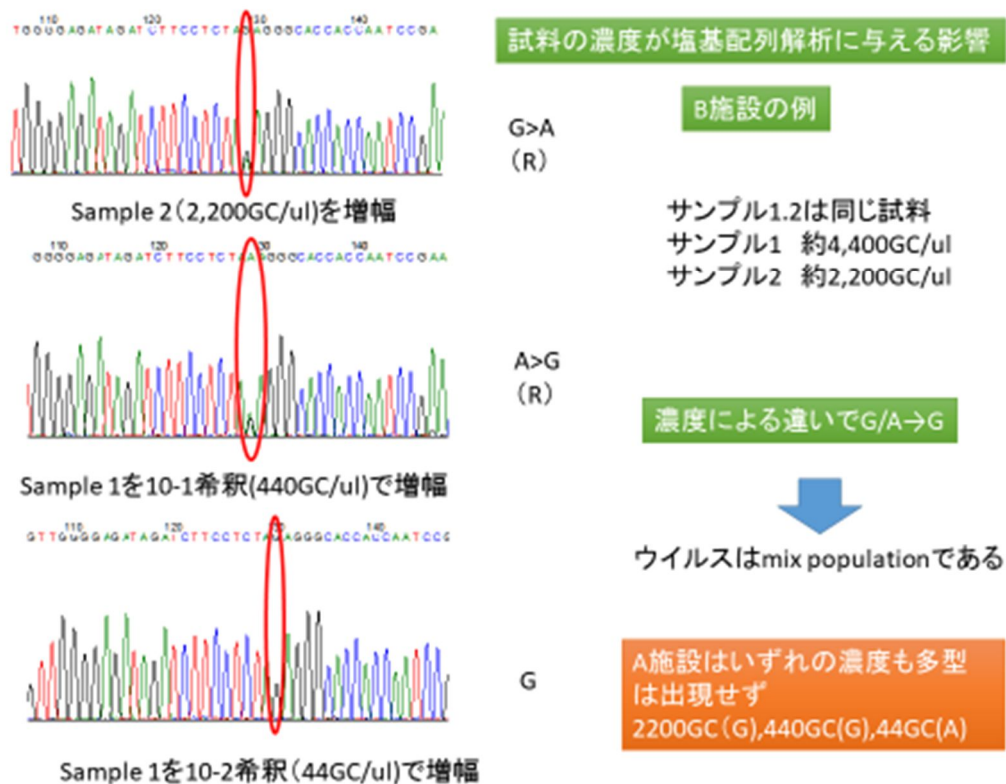


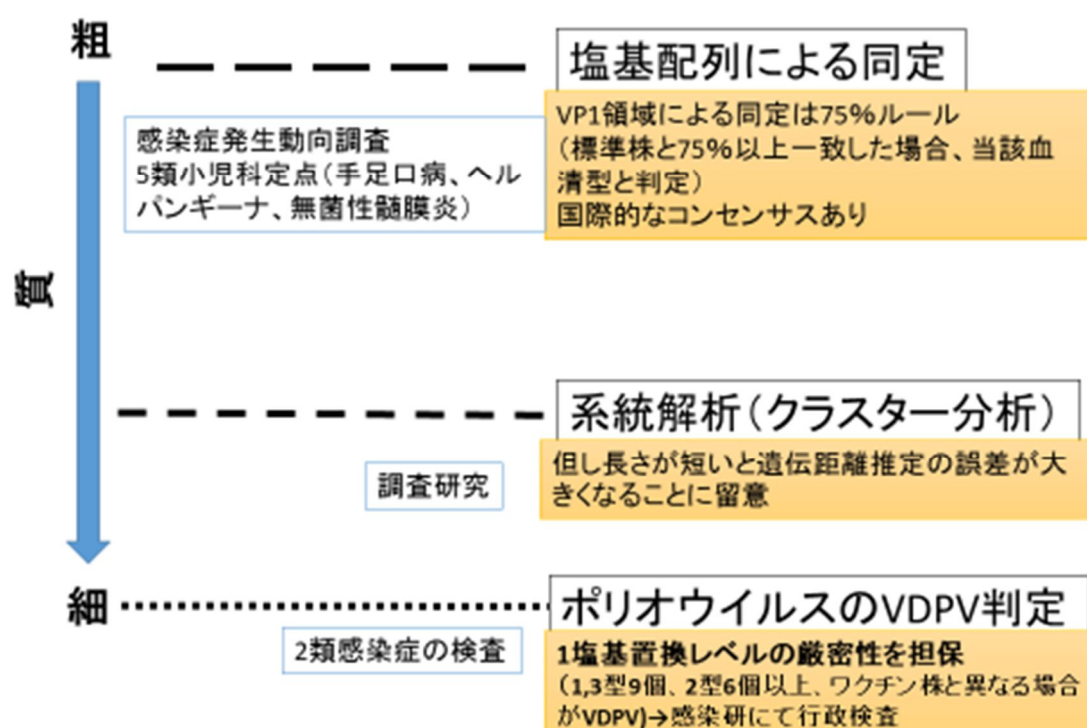
図 8

12か所(予備2セット)のEQAコスト(エンドポイント測定+塩基配列による同定)			
RNAstable			
Biomatrica社製			
(25チューブ入り @39,000円)	1560円/本x2種類=3120		3,120
RNA陽性コントロール			
Vircell社製(19800GC/ul:50ul @78,000円)		234000/14	
3本使用(78,000x3=234,000)し、2種類14セット作成可能		=16714	
エンドポイント測定用 10ulx14=140ul			
シーケンス用(x2希釈) 5ulx14=70ul (+70ul DW)			16,714
輸送費(冷凍)			
	12か所=17472	1か所平均	1,456
	2種類送付(1か所あたりのコスト)*		21,290

*希釈率を変えることによりコスト削減は可能-10か所を想定
 例) 19800GC/ul:50ul→100ulでリカバー(9900GC/ul)
 RNAstable使用(10本)→3300GC/ul(原液)
 エンドポイント測定用試料をシーケンスにも兼用するなら1か所10000円程度

図 9

エンテロウイルス塩基配列に求められる質について



資料 1

手足口病検査に関わる外部精度管理調査試行のための条件検討

1.概要

- エンテロウイルス検査で普及している CODEHOP-snPCR 法の 感度比較、 遺伝子同定に用いる塩基配列の比較調査
- 参加施設は 10カ所程度を予定
- 報告期限は到着後 3 週間以内 (12月25日頃を目安) をお願いします
- 本報告による分析結果は皆川班の報告書に参加衛研名を匿名にして使用します

2.目的

ア.エンドポイント測定

原著では CODEHOP 法は数 GC まで検出可能。国内では様々な酵素系を用いており、これまで反応系の違いによる横断的な調査はなされたことがないため、同一陽性コントロールを用いてエンドポイントの比較調査を行う。

ロ. 塩基配列による同定法の比較

病原体サーベイランスの手足口病はエンテロウイルスの血清型を報告。標準株の塩基配列と比較する同定法が普及しているが、用いる配列の比較調査もこれまでなされたことはない。 のように酵素系も異なっているため、比較を行う。

3.準備

1) 外部精度管理調査用配布品の概要

用いた市販 RNA コントロール

Amplirun Enterovirus 71 RNA control (Lot16MBC019001, 19800GC/ul)

RNA 保管用試薬

RNA stable Tube kit (BIOMATRICA 93221-001)

TE buffer (pH8.0)

以上を吉田が調製し以下配布

配布品は 3 種類

Sample 1:エンドポイント比較用試料 (TE 30ul でリカバーするとメーカー表示換算 4400GC/ul) 1 本

Sample 2: 塩基配列による同定用試料 (TE 30ul でリカバーするとメーカー表示換算 2200GC/ul) 1 本

TE buffer (pH=8.0) 分注品 1 本

配布方法は冷凍 (宅急便、ドライアイスなし)

2) サンプルの準備方法

チューブに添付した TE buffer 30ul を加え試料をリカバー
(受領後、すぐに検査を行わなければリカバーせず-80度保管)

試料はチューブの底に黄色に着色し乾燥状態。

TE buffer 30ul を入れ 15 分放置 (室温)

穏やかに数回ピペティングし溶解*(粘性あり)。

*TEbuffer を入れ、溶解するとピンクに着色する。

4.比較調査の方法

ア. エンドポイント測定

1) 方法と報告内容

- サンプルを上記に従い準備
- 10 倍希釈列 (10⁻¹ ~ 10⁻³ まで) を作成
- 以降、各検査室で実施している方法で原液及び希釈した試料を用いて CODEHOP-snPCR を実施し、エンドポイントを確認 (原液、-1、-2、-3)
- エンドポイントは電気泳動によるバンドを目視で確認
- 写真を撮影し、エンドポイントとともに報告 (以下、例)

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
サンプル	++++	+++	+/-	-	-

写真も添付 (マーカーの濃度とアプライ量も)

2) エンドポイント測定結果

(繰り返した場合は、その結果も示していただくようお願いします。)

	原液	-1	-2	-3	陰性コントロール
Sample 1					

電気泳動写真

マーカーの濃度、サンプルアプライ量

3) 比較に必要な情報(以下は例、貴研究所で実施している内容に適宜変更ください。マニュアルの写し添付でも結構です)

PCR 使用機器名:

例) ABI GeneAmp9700

2) 反応系(cDNA,PCR1,PCR2の酵素、容量など下記の例を参考)

cDNA 作成

以下例

SuperScript II (200 U/ul) (サーモフィッシャー)使用

	反応系 5 μ l
EV VP1 cDNA (RT) kit	1.5
0.1 M DTT	0.5
RNase Inhibitor (40U/ul)	0.25
SuperScript II (200 U/ul)	0.25

Total 2.5 μ l + vRNA 2.5 μ l

22 10min
42 60min
95 5min
4 hold

1st PCR
(以下例)

Taq DNA Polymerase (5U/ul),)(Roche) 使用

反応 25 μ l

*Enterovirus VP1 PCR 1KIT	15
DW + Taq DNA Polymerase (5U/ul)	5

Total 20 μ l + cDNA 5 μ l

95 30sec
42 30sec
60 45sec 35 cycle
4

2nd PCR

反応 25 μ l

*Enterovirus VP1 PCR 2 KIT	19.5
DW+FS Taq (5U/ul)*	5

Total 24.5 μ l + 1st PCR 反応物 0.5 μ l

95 6min

95 30sec
60 20sec
72 15sec 35 cycle
4

* 感染研の CODEHOP PCR によるエンテロウイルス同定のとおり作成

RNA のアプライ量 2.5 μ l

ゲルの濃度 2.0% agarose gel

PCR 産物のアプライ量 5 μ l

マーカーの種類と濃度 100bp DNA Ladder Markers (Genetics) 100 μ g/ml

アプライ量 5 μ l (約 100ng/ μ l)

イ. 塩基配列による同定法の比較

1) 方法と報告内容

- Sample 2 を 30ul TE で、Sample 1 と同様リカバー
- CODEHOP-snPCR 法にてゲノムを増幅。
- 各施設で実施している方法で PCR 産物を精製し、塩基配列解析

2) 結果の報告

	同定結果	同定法 (RIVM の EV タイピングツールの使用、標準株との比較、など)
Sample 2		

- 同定に用いた編集済み塩基配列データ (FASTA 形式で添付かメールにテキストでお願いします)
- ABI ファイル (センスとアンチセンス側をメールに添付し送付ください)

