

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班
分担研究報告書
エンテロウイルスのレファレンスに関する研究

研究分担者 吉田弘 国立感染症研究所 ウイルス第二部

研究協力者 松岡由美子 熊本市環境総合センター
濱崎光宏 福岡県保健環境研究所
エンテロウイルスレファレンスセンター：
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
地方衛生研究所全国協議会九州支部
福岡市保健環境研究所、北九州市保健環境研究所、
佐賀県衛生薬業センター、大分県衛生環境研究センター、
長崎市保健環境試験所、熊本県保健環境科学研究所、
長崎県環境保健研究センター、宮崎県衛生環境研究所、
鹿児島県環境保健センター、沖縄県衛生環境研究所

研究要旨 感染症検査における検査プロセスの改善を目的とした技術管理手法の導入には、研修メソッド等の開発が課題である。今般、病原体検査で汎用する塩基配列解析の質確保を目的とした評価指標の検討を行い、技術管理研修法の実証的検討を行った。塩基配列解析装置の validation に用いる評価指標(標準品で測定したメーカー推奨値)は、多施設間における装置の稼働状況のを把握するために有用であった。また内部精度管理用の評価項目として利用可能なことを示した。そして評価指標の知識をブラッシュアップするためグループワークによる技術管理研修は有用であった。持続性の観点から、汎用性の有る基盤技術に関する技術管理研修は、比較的小規模な支部単位で取り組むことが望ましいと考えられるが、具体的な運営方法について今後とも検討していく必要がある。

A. 研究目的

改正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(以下改正感染症法)は平成 28 年4月1日に完全施行された。改正感染症法では病原体検査に法的な根拠が付与されるとともに、検査結果に一定の信頼性が求められる。

具体的な内容に関しては、厚生労働省健康局結核感染症課長通知「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」(平成 27 年 11 月 17 日付、健感発 1117 第2号)の中で、各検査施設の実情に併せた標準作業書(SOP)、

質マネジメントシステム(quality management system: QMS)関連文書等の各種技術管理文書の作成が規定されている。しかし地方衛生研究所(地衛研)には、これまで技術管理のノウハウは十分に蓄積されていない実情がある。

他方、全国の地衛研と国立感染症研究所の間には4半世紀以上にわたる検査技術に関する各病原体検査のレファレンスネットワーク活動が存在する。このように既存のインフラストラクチャーを活用し、検査の質を確保すべく、実技研修、内部精度管理(internal quality control: IQC)手法、外部精度評価(external

quality assessment: EQA)、といった管理技術の検討、情報共有を促進し、地衛研間で検査技術の均てん化を図ることが適当と考えられる。

本研究では1年目はエンテロウイルスレファレンスセンターのコアキャパシティとして、レファレンス標準品の分与法、2類感染症であるポリオウイルス検査の信頼性確保のための実技研修、エンテロウイルスレファレンスセンターを活用し、ポリオにも応用可能な手足口病検査のEQA導入の検討を行った。

2年目はエンテロウイルスレファレンスセンター6カ所を含む12カ所の地衛研の協力を得てEQAの実施(エンテロウイルスPCR検査法の検出感度と同定に用いる塩基配列解析結果の施設間比較調査)、技術管理研修ツールとして活用する目的で検査のトラブルシューティングを取りまとめた事例集の作成を行った。

手足口病検査にかかわるEQAの結果より、標準品を用いて塩基配列解析装置(DNAシーケンサー)の稼働状況をベースラインとして把握した上で施設間の塩基配列データを比較する必要性があること、かつ配列データの評価のために客観的な指標が必要なこと、そして配列解析時のヒューマンエラー等を予防するために技術管理研修の必要性が認められた。

感染症検査における従来の研修は実技研修を主体としているが、ヒューマンエラーの低減等、検査プロセスの改善を目的とした技術管理手法の導入には、研修メソッド、資料等ツール、講師の確保等、新たに開発・検討していくことが課題である。

3年目の研究では病原体検査における共通の基盤技術として、DNAシーケンサーを用いる塩基配列解析について技術管理研修のメソッド開発を最終目標とした。メソッド開発にあたり地方衛生研究所全国協議会(地全協)九

州支部の協力を得て、DNAシーケンサーの稼働状況についてベースライン調査を実施し、塩基配列の質評価指標を検討した。そして、配列解析時に起こりうるヒューマンエラーを予防するための技術管理研修について実証的検討を行った。

B. 研究方法

1. DNAシーケンサーの適正利用を目的とした技術管理研修の企画

地方衛生研究所全国協議会九州支部(熊本市環境総合センター)からの協力により、平成30年度地域保健総合推進事業(地域レファレンスセンター連絡会議)との連携のもと、DNAシーケンサーに係る技術管理研修を企画した。

2. ベースライン調査を踏まえた塩基配列の質評価指標の検討

- 九州支部内の地衛研にDNAシーケンサー用の動作確認用標準試薬(sequencing standards)、を送付(2018年8月)。10施設の協力を得て、標準品を用いた解析データを収集し稼働状況を分析した。
- 収集した10施設分のデータは機種、キャピラリーの種類、ランモジュール等、解析条件毎に分類し、結果の比較を行った。次に、塩基配列の質に影響を及ぼす要因を抽出、重点的に管理すべき項目を検討した。

3. 技術管理研修メソッドの実証的検討

- 塩基配列の質に影響を及ぼす要因のうち2で明らかにした重点管理項目を用いて、グループワークによる机上演習用課題を作成した。
- グループワークは、ファシリテーターの進行の下、ブレインストーミングにより塩基配列解析時に生じるヒューマンエラーの

予防を目的とした管理用特性要因分析の机上演習とした。

- ファシリテーターはあらかじめ特性要因分析についてToT(講師用研修)を実施した(平成29年度地域保健総合推進事業地域レファレンスセンター連絡会議)。

4.技術管理研修の評価

- 技術管理研修実施後、事後アンケートにより参加者より研修内容の評価を行った。

C.研究結果

1. 技術管理研修、及びベースライン調査への参加

- 技術管理研修には九州支部内の12施設はすべて参加。ただし研修前のベースライン調査への参加数は当初11カ所であったが、最終的に10カ所になった(1カ所が取り下げ)。

2. ベースライン調査を踏まえた塩基配列の質評価指標の検討

- 病原体検査では、塩基配列の質について、波形データ及び配列データの目視確認により担保していることが多い。他方、メーカーによる機器のvalidationは標準品(sequencing standards)を測定し、あらかじめ定められた指標(QV値、CRL、トレーススコア、シグナル値等)により評価を行う。これらの測定結果は技術レポートとして保守を依頼した検査室に報告するが、日常の検査で活用することは稀である。
- 前年度に実施した手足口病検査のEQAでは送付試料の塩基配列(波形データ)を定性的に評価するため、施設間の機器稼働状況あるいは解析技術を客観的に比較評価することが困難であった。上記の評価指標を活用すれば、異なる機種、動作環境でもランモジュール、キャピラリ

ー、ポリマー等の組み合わせにより、評価指標を設定可能である(図1)。

- 本年度研究では、あらかじめ安定性を確認した同一ロット標準品を送付し各施設の測定結果を比較することで、多施設間の機器の稼働状況を客観的に把握することが可能であることを示した。

3. シークエンス解析結果を踏まえた技術管理研修モソッドの実証的検討

1) シークエンス結果に影響を及ぼした主な要因

- 各施設において標準品を用いて解析した塩基配列データ(ab1ファイル:生データ)を分析したところ、同一測定装置を使用の場合でも施設間で解析結果にばらつきが見られた。
- 10施設間で見られたばらつきの主な要因は、測定ログの分析により、消耗品(ポリマー、キャピラリー)の交換時期、方法(ランモジュールの選択)と推察された。そして、これらの要因が単独あるいは複数関連し、波形の蛍光シグナル強度、QV値、CRL等の評価指標に影響を及ぼしており、その結果、キャピラリー間の結果のばらつき、また施設間では同一機種間の測定結果のばらつきに影響を及ぼしていることが推察された(図2)。
- このように多施設間の塩基配列の質評価の結果、複数の要因が関連していることが明らかになった。このため、DNAシークエンスの日常の精度管理にも評価指標を用いることが適当であると考えられた。
- しかしこれらの指標は、検査担当者間で十分に普及していないと考えられ、塩基配列解析の質評価法について研修(講義等)等による継続的なフォローアップの必要性が認められた。

2) 技術管理研修メソッドの実証的検討

- 今年度研究で実施した多施設間のデータ解析結果より、予防すべき主な要因として、消耗品の質、方法の選択が重点的に管理すべき事項として明らかになった。これらの共通因子を含む演習用課題を作成し、グループワークによる研修に用いた。
- 研修では作成した課題について、3-4 名を 1 グループとし、ファシリテーター進行の下グループワークを 75 分間実施した。各班の発表は 10 分とした。
- ブレインストーミングにより課題の特性(結果)を方法、機器、試薬・消耗品、人、環境、検体、の大要因に分類。各要因に含まれる事項を中分類、中分類した要因について解決法、実施のための手段、検証法について結果を取りまとめる机上演習を実施した。特性要因分析は、予防を目的とし網羅的に要因を推定するため管理用特性要因分析を行うこととした。ブレインストーミングにより得られた要因を方法、機器、試薬・消耗品、人、環境、検体、の要因に分類し、各要因について解決法、実施のための手段、検証法について結果を取りまとめて、グループ発表を行った(図 3)。

4. 技術管理研修の評価

- 事後アンケートにより、DNA シークエンサーの操作方法は施設内 OJT による習得していることが多数であることを示したが、ベースライン調査の結果は、機器の操作方法のみならず、データ評価の方法、解決法など技術管理の知識、手法を更にブラッシュアップする必要性が認められた。
- グループワークを通じ標準品、標準試薬を用いた解析装置の日常点検による動作

確認の必要性は参加者間で共通認識が得られたと考えられた。

- 少人数のブレインストーミングは参加者間で多様な意見交換できるため、検査担当者間の人的ネットワーク維持に一定の効果が期待される回答を得た。

D. 考察

- エンテロウイルス検査に限らず共通の基盤技術として、DNA シークエンサーを用いた病原体検査が普及しているが、結果の質については定性的な確認であることが多い。このため、客観的な指標に基づき塩基配列の質評価を行う必要がある。
- ただし、病原体の検査結果は感染症法の類型に基づいた行政対応をとることが想定されており、検査の質のレベルは地衛研の検査体制に合わせた柔軟性をもって設定することが有用である。
- 一方、検査の質を確保するため 4 半世紀以上前より各病原体検査のレファレンスネットワーク活動が存在する。このように既存のインフラストラクチャーを活用し、加えて検査の質を確保すべく、QMS の導入、施設間の情報共有を促進し、検査技術の均てん化を図ることが適当と考えられる。
- 今般、疾患横断的な基盤技術として塩基配列解析に焦点を当てた。そして質評価手法の検討、塩基配列解析時に起こりうるヒューマンエラー等予防に対して技術管理研修メソッドの検討、実施、評価を行い一定の効果を認めた。一方、経験豊富な職員の退職、異動などの事由により施設内 OJT の実施は、施設間で状況は大きく異なる。九州支部の事例で示したように、共通の基盤技術(塩基配列解析、PCR 手法等)に関しては、地域支部単位で様々な機会を活用しつつ、ヒューマン

エラー等予防に向けた技術管理研修等の取り組みを行うことが望まれる。

E. 結論

感染症検査における検査プロセスの改善を目的とした技術管理手法の導入には、研修メソッド等の開発が課題である。今般、病原体検査で汎用する塩基配列解析の質確保を目的とした評価指標の検討を行い、技術管理研修法の実証的検討を行った。DNA シークエンサーの validation に用いる評価指標(標準品で測定したメーカー推奨値)は、多施設間における装置の稼働状況を把握するために有用であった。また内部精度管理用の評価項目として利用可能なこと示した。そして評価指標の知識をブラッシュアップするためグループワークによる技術管理研修は有用であった。持続性の観点から、汎用性の有る基盤技術に関する技術管理研修は、比較的小規模な支部単位で取り組むことが望ましいと考えられるが、具体的な運営方法について今後とも検討していく必要性がある。

F. 健康危険情報
該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. 吉田弘 ポリオ根絶計画の最終段階と環境水サーベイランスの意義 日本小児科医学会会報.55:124-127、2018
2. 後藤明子、筒井理華、高橋雅輝、北川和寛、堀田千恵美、小澤広規、板持雅恵、大沼正行、西澤佳奈子、葛口剛、伊藤雅、中田恵子、三好龍也、中野守、濱島洋介、磯田美穂子、吉富秀亮、諸石早苗、吉田弘。平成 28 年度ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業および調査研究)にて検出されたエンテロウイル

スについて.病原体検出情報. 39:67-69、2018

3. 吉田弘. 海外における無菌性髄膜炎等を対象とした病原体サーベイランスの動向. 病原体検出情報.39:101-102、2018

学会発表

1. 吉田弘. 手足口病に関する外部精度管理調査結果について. 平成 30 年度地域保健総合推進事業 地全協九州支部地域レファレンスセンター連絡会議.10 月 2-3 日、2018 年、熊本市
2. 吉田弘、後藤明子、筒井理華、堀田千恵美、小澤広規、西澤佳奈子、濱島洋介. わが国の環境水サーベイランスにて検出されたエンテロウイルス(2013-16 年). 第 77 回日本公衆衛生学会総会. 10 月 24-26 日、2018 年、郡山
3. 後藤明子、吉田弘. 北海道における抗ポリオウイルス中和抗体保有状況調査(2011 年~2017 年)第 77 回日本公衆衛生学会総会. 10 月 24-26 日、2018 年、郡山
4. 小澤広規、吉田弘. 横浜市における環境サーベイランスで分離されたエンテロウイルスの動向. 第 77 回日本公衆衛生学会総会. 10 月 24-26 日、2018 年、郡山
5. 西澤佳奈子、吉田弘. 長野県における環境水のエンテロウイルスサーベイランス. 第 77 回日本公衆衛生学会総会. 10 月 24-26 日、2018 年、郡山
6. 濱島洋介、寺杉文男、吉田弘. 和歌山県における環境水サーベイランスで 検出された腸管系ウイルスについて. 第 77 回日本公衆衛生学会総会. 10 月 24-26 日、2018 年、郡山
7. 堀田千恵美、吉田弘. 環境水サーベイランスと感染症発生動向調査事業におけるエンテロウイルス属の検出状況. 第 77 回

- 日本公衆衛生学会総会. 10月24-26日、2018年、郡山
8. 松岡由美子、吉田弘. 熊本市環境総合センターにおける検査の質確保について. 第77回日本公衆衛生学会総会. 10月24-26日、2018年、郡山
9. 吉田弘. 手足口病に関する外部精度管理調査結果について. 平成30年度地域保健総合推進事業地全協中国四国支部地域レファレンスセンター連絡会議. 11月15日、2018年、岡山市
10. 松岡由美子、岩永貴代、杉谷和加奈、小畑裕子、西澤香織、近藤芳樹、芦塚由紀、濱崎光宏、丸山浩幸、橘実里、堤陽子、林徹、島崎裕子、松本一俊、八尋俊輔、酒井崇、深澤未来、松本文昭、松浦裕、濱田結花、御供田睦代、久場由真仁、大友麗、吉田弘. 地方衛生研究所全国協議会九州ブロック内における遺伝子解析装置に関する技術管理研修について. 第32回公衆衛生情報研究協議会研究会、1月24-25日、2019年、岡山市
11. 大友麗、吉田弘. 地方衛生研究所全国協議会地方衛生研究所全国協議会中国四国ブロック内における信頼性確保に関する取組について 第32回公衆衛生情報研究協議会研究会、1月24-25日、2019年、岡山市
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)
1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
技術管理研修用資料作成
1. 金成篤子、濱崎光宏、松岡由美子、吉田弘 「病原体等検査における信頼性確保の事例集」(平成30年6月)
分担研究報告書
2. 調恒明、江原勇登、大友麗、貞升健志、高橋雅輝、竹内道子、筒井理華、豊嶋千俊、濱崎光宏、松岡由美子、横井一、吉田弘 「感染症法に基づく病原体等検査に関わる信頼性確保部門担当者向け研修ガイドラインの検討」(平成31年3月)

図 1 塩基配列の質評価の指標

Sequencing standardを各モジュール/装置で測定したときメーカーが推奨する評価の基準

QV20			
参加施設の装置とモジュールの組み合わせ	3500/3500xl (KB 1.4.1.8)	3130/3130xl (KB 1.4.0)	その他 (KB 1.2) (KB 1.4.2.4)
RapidSeq36_POP7_1		600bp	
FastSeq50_POP7_1		700bp	
StdSeq50_POP7	≧ 850bp		
BDxStdSeq50_POP7	≧ 850bp		
LongSeq			800bp
Standard sequencing			600bp

- QV20値が各機種、ランモジュールにより上記を満たすこと
- シグナル強度が推奨強度
- 波形が**単一ピークでかつキャピラリー間でトレイススコア、QV20+、CRLまたはL O Rのばらつきが少ないこと**

図 2 塩基配列解析結果に影響を及ぼした主な要因

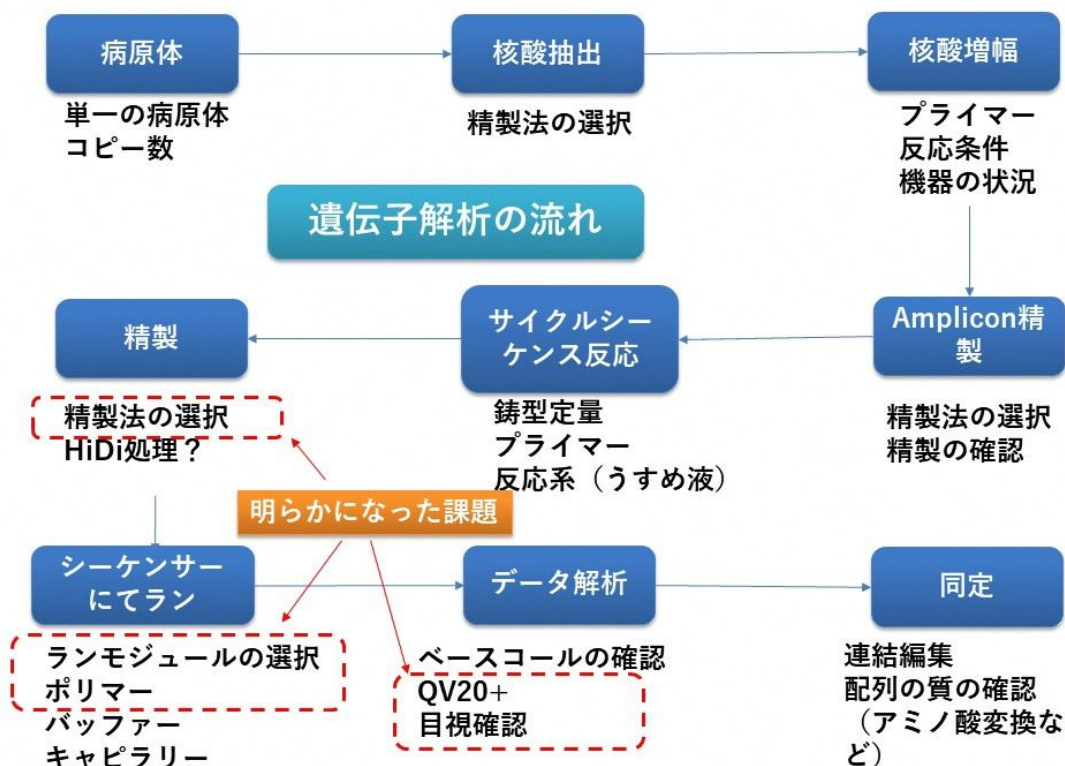


図3 技術管理研修メソッドの検討

技術管理研修メソッドの検討

H29-30年度地域保健総合推進事業と連携
熊本市環境総合センターとの共同研究

DNAシーケンサーの適正利用を目的とした技術管理研修の試行（平成30年10月）



検査上の問題点について特性要因分析（管理用）をグループワークで実施

問題点の洗い出し（粗→細）、解決法、実施方法、検証方法をブレインストーミング
方式で討議

各種SOP、QMS関連文書（施行規則7条の三第8項関連）に含めるべき項目の検討

事後アンケート結果

課題、問題点、解決法を共有する点で一定の効果→業務管理要領との紐づけ

実施上の考慮点

進行役（ファシリテーター）の育成と確保

運営と教材開発

討議用教材の開発（事例集）