

平成28-30年度  
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 榎岡由美子 熊本市環境総合センター  
金成篤子 福島県衛生研究所  
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、東海北陸支部、  
関東甲信静支部、中国四国支部他、地方衛生研究所各位

研究要旨 改正感染症法施行後、病原体検査には一定の信頼性が求められることが規定された。本研究ではエンテロウイルスレファレンスネットワークのみならず、既存の各種ネットワーク活動を cross-cutting に活用することにより、利用可能な各種リソース(人、物、金、情報)を集約することで、病原体検査の信頼性確保の取り組みに投入していくことが有用であることを示した。汎用性の有る基盤技術に関する技術管理研修は、持続性の観点から、比較的小規模な地域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。

#### 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ている。

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

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 シークエンサー）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 シークエ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 シークエ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。

この様に、ヒューマンエラー予防のため検査プロセスの改善し、信頼性を確保するために、エンテロウイルスレファレンスネットワークなど既存の各種活動を活用した信頼性確保の介入法を検討した結果を報告する。

## B. 研究方法

### 1 年目

#### 1. エンテロウイルスレファレンス標準品の分与、及び実技研修の検討

- 平成 28 年度衛生微生物技術協議会エンテロウイルスレファレンスセンター会議、ウイルスコース(保健医療科学院)等で、エンテロウイルス抗血清、ポリオウイルスへの感受性を確認済みの分離用細胞 (RD-A と L20B) の配布を周知した。
- 平成 28 年度短期研修ウイルスコース(国立保健医療科学院主催)において、ポリオウイルス検査の中和試験の信頼性確認法の実技研修を行った。
- ポリオ環境水サーベイランス(感染症流行予測調査事業感染源調査)研修のため 2 か所の地衛研担当者を対象に岩手県環境保健センターの協力を得て採水からウイルス分離までの実技研修を行った。

#### 2. 外部精度評価試料の送付・保管条件検討

- 平成 28 年度厚労科研費「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」との連携のもと、手足口病 EQA 用の RNA 試料送付のため、エンテロウイルスレファレンスセンターを中心とした担当者の協力を得てワークショップ(2回)を通じて、温度保管条件など安定性の検討を行った。

### 2 年目

#### 1. レファレンスセンターを活用したエンテロウイルス EQA 実施

- 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地衛所に手足口病検査用EQA試料(RNA)を配布し、PCR法によるEQA試料の検出感度と同定に用いる塩基配列の施設間比較を行った

## 2. 技術管理研修用教材の作成

- 検査の質管理のためのワークショップを平成28年6月に開催し、教材作成のために課題を整理することとした。

## 3. 病原体検査の信頼性確保に向けた技術文書の整備支援

- 平成29年度地域保健総合推進事業との連携の下、関東甲信静、東海北陸、中国四国、九州支部の協力により、改正感染症法施行後の標準作業書の整備状況をアンケートで把握することとした。

## 3年目

### 1. 塩基配列解析について質評価指標の検討

- 平成30年度地域保健総合推進事業との連携の下、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質評価指標の検討を行うこととした。

### 2. 技術管理研修の実証的検討

- 塩基配列の質に与える要因を分析し、重点的に管理項目を明らかにするとともに、必要な技術管理研修のメソッド開発を行った。

## C. 研究結果

### 1年目

#### 1. エンテロウイルスレファレンス標準品の分与、及び実技研修の検討

- エンテロウイルス、ポリオウイルス検査では患者由来病原体サーベイランス及びポリオ環境水サーベイランスとも共通の検査技術を含むことから、標準品の分与、研修の活動は横断的な対応が適当と考えら

れた。また世界的なポリオウイルス封じ込め強化を踏まえ、ウイルスを保有する感染研等の施設で技能試験を兼ねた実習を行うことが有用であると考えられた。

#### 2. 外部精度評価試料の送付・保管条件検討

- ポリオを含むエンテロウイルス検査の質評価を目的とした外部精度評価用試料の保管条件を設定することができた(詳細は平成28年度「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」分担研究報告書を参照)

### 2年目

#### 1. レファレンスセンターを活用したエンテロウイルスEQA実施

- EQA実施にあたり、送付条件検討等行うため、エンテロウイルスレファレンスセンターに関わるネットワーク維持が重要であることを確認された。(詳細は平成29年度「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」分担研究報告書を参照)

#### 2. 技術管理研修用教材の作成

- 病原体検査のプロセス改善のため、ヒューマンエラー予防に焦点を絞り、過去の検査上の事例を管理用特性要因図で分析した教材を研究協力者と作成。また研修はブレインストーミングによる少人数のグループワークが有用であることを確認できた。

#### 3. 病原体検査の信頼性確保に向けた技術文書の整備支援

- 信頼性確保の取り組み状況についてアンケート調査を行ったところ、標準作業書等の技術文書作成支援の必要性が認められたため、各支部で必要とされる文書を

同定し、供覧会の開催を企画し整備促進を図った。(詳細は、平成 29 年度地域保健総合推進事業「地方衛生研究所の連携事業による健康危機管理に求められる感染症・食中毒事例の検査精度の向上及び疫学情報解析機能の強化」報告書を参照)。

3年目:

1. 塩基配列解析について質評価指標の検討

- 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。
- 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)。このため、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可能であることを示した。

2. 技術管理研修メソッドの実証的検討

- 塩基配列データの分析の結果、単独あるいは複数の要因が解析結果の信頼性に影響を与えていることが明らかになった(図 2)。このため DNA シークエンサー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。
- 多施設間のデータ比較の結果、消耗品の質、方法の選択がヒューマンエラー予防のために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実証的検討を行った(図 3)。

- 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。しかし事前のベースライン調査の結果より、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。

D. 考察

- エンテロウイルス感染症には 5 類小児科定点把握疾患として手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎、2 類感染症としてポリオが含まれる。全国レベルの流行状況を把握するための定点把握疾患を対象とした病原体サーベイランスを維持し、一定数の検査を実施することで、ポリオウイルス検査に対応可能である。
- このためにレファレンス活動を通じて、必要な標準品(細胞、抗血清)の配布、実技研修等、検査体制の維持、結果の質を担保するために継続する必要がある。
- ポリオウイルス封じ込め強化に伴い、感染性ウイルス保有施設が限定されることから、検査体制を維持するためには、ポリオウイルスを保有する感染研等の施設で技能試験を兼ねた実習を行うことが効果的である。
- エンテロウイルスレファレンスネットワークのみならず、既存の各種ネットワーク活動を cross-cutting に活用することにより、利用可能な各種リソース(人、物、金、情報)を集約し、信頼性確保の取り組みに投入することが有用である。

- 横断的な基盤技術として塩基配列解析に焦点を当て、解析結果の質評価法の検討、塩基配列解析時に起こりうるヒューマンエラー予防に対する技術管理研修の実証的検討を行い、一定の効果を認めた。地衛研では、経験豊富な職員の退職、異動などの事由により施設内OJTの実施状況、施設毎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)については、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

改正感染症法施行後、病原体検査には一定の信頼性が求められることが規定された。本研究ではエンテロウイルスレファレンスネットワークのみならず、既存の各種ネットワーク活動を cross-cutting に活用することにより、利用可能な各種リソース(人、物、金、情報)を集約することで、病原体検査の信頼性確保の取り組みに投入していくことが有用であることを示した。汎用性の有る基盤技術に関する技術管理研修は、持続性の観点から、比較的小規模な地域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も検討していく必要がある。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 板持雅恵、滝澤剛則、伊東愛梨、三浦美穂、伊藤雅、小澤広規、北川和寛、葛口剛、後藤明子、島あかり、下野尚悦、高橋雅輝、筒井理華、中田恵子、中野守、西澤佳奈子、濱崎光宏、吉富秀亮、堀田千恵美、松岡保博、三好龍也、吉田弘 平成27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. 37(10);208-209; 2016
2. 濱崎光宏, 吉田弘:エンテロウイルスのウイルス学的検査診断 小児科 57, 949-956, 2016.
3. Tao Z., Wang Z., Lin Z., Wang S., Wang H., Yoshida H., Xu A., Song Y. One-year Survey of human enteroviruses from sewage and the factors affecting virus adsorption to the suspended solids. Sci. Rep. 6,31474;doi:10.1038/srep31474. 2016.
4. 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
5. 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 病原体検出情報. 38(10):199-200, 2017.
6. 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 日本小児科医会会報.55:124-127, 2018
7. 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

スについて.病原体検出情報. 39:67-69、  
2018

8. 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.環境水ウイルスサーベイランスとは」第57回日本臨床ウイルス学会ランチョンセミナー-平成28年6月19日郡山市
2. 吉田弘.感染症法改正にかかわる病原体サーベイランスと信頼性確保について.平成28年度地域保健総合推進事業 地全協九州支部地域専門家会議2016年10月20-21日、佐賀市
3. 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. 10月11日、2017年、千葉市
4. 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. 10月24日、2017年、熊本市
5. 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. 11月8日、2017年、岡山市
6. 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. 11月10日、2017年、名古屋市
7. 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. 10月31-11月2日、2017年、鹿児島市
8. 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. 10月31-11月2日、2017年、鹿児島市
9. 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. 10月31-11月2日、2017年、鹿児島市
10. 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. 11月24-26日、2017年、東京
11. 裕岡由美子、岩永貴代、杉谷和加奈、矢坂多佳子、阿蘇品早苗、西澤香織、吉田弘. 熊本市環境総合センターにおける病原体検査の質管理の取り組み.第31回公衆衛生情報研究協議会1月25-26日.2018年、和光市.
12. 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
13. 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
14. 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
15. 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
  16. 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
  17. 濱島洋介、寺嶋文男、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
  18. 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
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
1. 特許取得  
該当なし
  2. 実用新案登録  
該当なし
  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

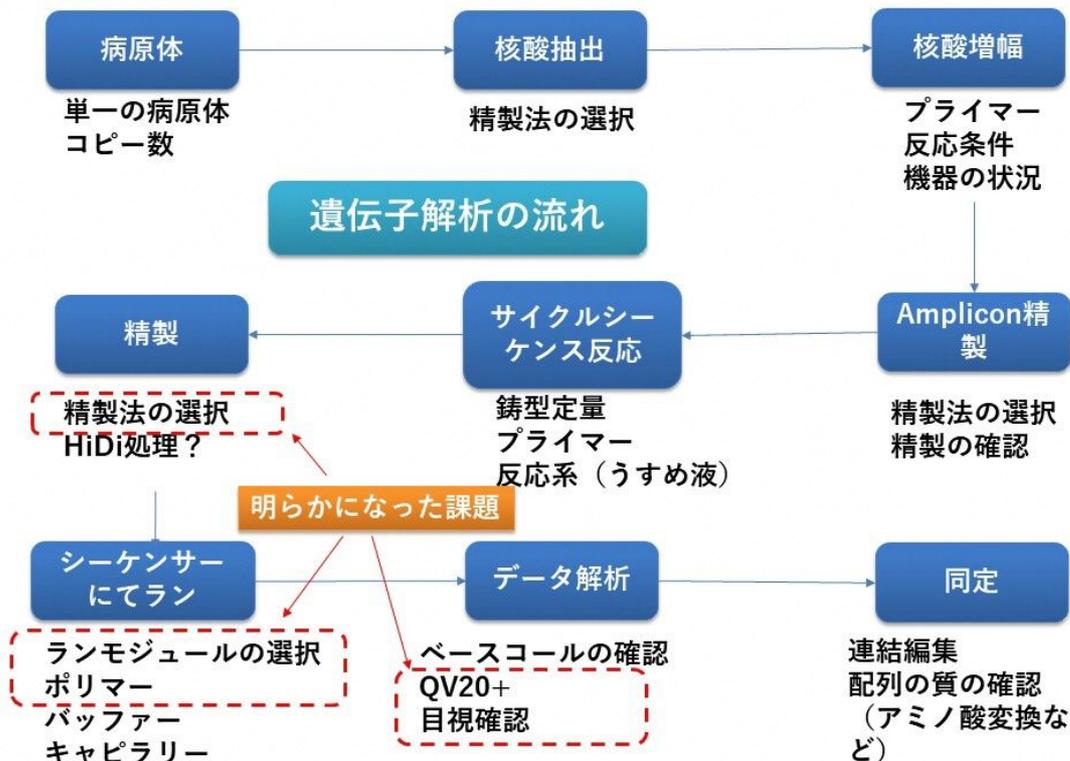


図3 技術管理研修メソッドの検討

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）