

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

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(H28-健危-一般-002)

平成28年度～29年度 総合研究報告書

研究代表者 皆川 洋子

平成30(2017)年4月

平成28 - 29年度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）
「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（H28-健危-一般-002）」班員名簿

氏名	所属	職名	
皆川 洋子	愛知県衛生研究所	所長	平成28-29年度
調 恒明	山口県環境保健センター	所長	平成28-29年度
滝澤 剛則	富山県衛生研究所	所長	平成28-29年度
四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所	所長	平成28-29年度
佐野 一雄	名古屋市衛生研究所	所長	平成28-29年度
岸本 壽男	岡山県環境保健センター	所長	平成28-29年度
脇田 隆字	国立感染症研究所	副所長	平成28-29年度
宮崎 義継	国立感染症研究所・真菌部	部長	平成28-29年度
大石 和徳	国立感染症研究所・感染症疫学センター	センター長	平成28-29年度
吉田 弘	国立感染症研究所・ウイルス第二部	主任研究官	平成28-29年度
木村 博一	国立感染症研究所・感染症疫学センター (現群馬パース大学)	室長	平成28-29年度
村上 光一	国立感染症研究所・感染症疫学センター	室長	平成28-29年度
山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所	所長	平成28年度
松本 昌門	愛知県衛生研究所・生物学部	部長	平成29年度

研究協力者

猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所（地全協精度管理部会員）
大井 洋	東京都健康安全研究センター（地全協精度管理部会員）
香月 進	福岡県保健環境研究所（地全協精度管理部会員）
青木美耶子	愛知県衛生研究所
猪飼 薫	愛知県一宮保健所
泉谷 秀昌	国立感染症研究所
磯部 順子	富山県衛生研究所
板持 雅恵	富山県衛生研究所
伊藤 雅	愛知県衛生研究所
梅山 隆	国立感染症研究所
大西 真	国立感染症研究所
緒方喜久代	国立感染症研究所
奥田 健司	愛知県一宮保健所
小澤 広規	横浜市衛生研究所
小淵 正次	富山県衛生研究所
垣添 寛和	愛知県衛生研究所
岸本 剛	埼玉県衛生研究所
北川 和寛	福島県衛生研究所
河村 真保	東京都健康安全研究センター
木田 浩司	岡山県環境保健センター
小西 典子	東京都健康安全研究センター
近藤眞規子	神奈川県衛生研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
佐野 貴子	神奈川県衛生研究所
清水 英明	川崎市健康安全研究所
新開 敬行	東京都健康安全研究センター
末吉 利幸	山口県環境保健センター
鈴木 裕子	愛知県衛生研究所
鈴木 匡弘	愛知県衛生研究所
勢戸 和子	大阪健康安全基盤研究所(28年度は大阪府立公衆衛生研究所)
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
千葉 隆司	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
中田 恵子	大阪健康安全基盤研究所(28年度は大阪府立公衆衛生研究所)
長澤 耕男	千葉大学大学院医学研究院小児病態学、国立感染症研究所
西澤 香織	熊本市環境総合センター
長谷川道弥	東京都健康安全研究センター
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
平井 昭彦	東京都健康安全研究センター
広瀬かおる	愛知県衛生研究所
松本 昌門	愛知県衛生研究所(28年度)
水越 文徳	栃木県保健環境センター
峯岸 俊貴	埼玉県衛生研究所
山下 照夫	修文大学健康栄養学部
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
山田 和弘	愛知県衛生研究所
吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所

アンケート調査に協力いただいた全国地方衛生研究所の担当者
ウイルス研修時の調査等に協力いただいた全国地方衛生研究所の受講者

班会議出席者（オブザーバー） 厚生労働省結核感染症課

小班別担当者リスト

項目小班

調 恒明	山口県環境保健センター
四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
滝澤 剛則	富山県衛生研究所
佐野 一雄	名古屋市衛生研究所
山本 容正	大阪府立公衆衛生研究所
岸本 壽男	岡山県環境保健センター
脇田 隆字	国立感染症研究所
大石 和徳	国立感染症研究所
宮崎 義継	国立感染症研究所
梅山 隆	国立感染症研究所
猿木 信裕	群馬県衛生環境研究所
岸本 剛	埼玉県衛生研究所
大井 洋	東京都健康安全研究センター
末吉 利幸	山口県環境保健センター
香月 進	福岡県保健環境研究所
山下 照夫	修文大学健康栄養学部
猪飼 薫	愛知県一宮保健所
奥田 健司	愛知県一宮保健所
皆川 洋子	愛知県衛生研究所
広瀬かおる	愛知県衛生研究所
鈴木 裕子	愛知県衛生研究所
垣添 寛和	愛知県衛生研究所

ウイルス小班

吉田 弘	国立感染症研究所
木村 博一	国立感染症研究所
長澤 耕男	千葉大学大学院医学研究院 小児病態学、国立感染症研究所
高橋 雅輝	岩手県環境保健研究センター
北川 和寛	福島県衛生研究所
水越 文徳	栃木県保健環境センター
峯岸 俊貴	埼玉県衛生研究所
千葉 隆司	東京都健康安全研究センター
新開 敬行	東京都健康安全研究センター
長谷川道弥	東京都健康安全研究センター
近藤眞規子	神奈川県衛生研究所
佐野 貴子	神奈川県衛生研究所
小澤 広規	横浜市衛生研究所
清水 英明	川崎市健康安全研究所
小淵 正次	富山県衛生研究所
板持 雅恵	富山県衛生研究所
中田 恵子	大阪健康安全基盤研究所
木田 浩司	岡山県環境保健センター
山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
豊嶋 千俊	愛媛県立衛生環境研究所
濱崎 光宏	福岡県保健環境研究所
吉富 秀亮	福岡県保健環境研究所
西澤 香織	熊本市環境総合センター
山下 照夫	修文大学健康栄養学部
皆川 洋子	愛知県衛生研究所
伊藤 雅	愛知県衛生研究所

細菌小班

滝澤 剛則	富山県衛生研究所
四宮 博人	愛媛県立衛生環境研究所
大石 和徳	国立感染症研究所
村上 光一	国立感染症研究所
松本 昌門	愛知県衛生研究所
大西 真	国立感染症研究所
泉谷 秀昌	国立感染症研究所
緒方喜久代	国立感染症研究所
貞升 健志	東京都健康安全研究センター
平井 昭彦	東京都健康安全研究センター
河村 真保	東京都健康安全研究センター
小西 典子	東京都健康安全研究センター
磯部 順子	富山県衛生研究所
勢戸 和子	大阪健康安全基盤研究所
世良 暢之	福岡県保健環境研究所
鈴木 匡弘	愛知県衛生研究所
山田 和弘	愛知県衛生研究所
青木美耶子	愛知県衛生研究所

下線は小班長 重複あり・順不同

目 次

I . 総合研究報告	
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	----- 1
皆川 洋子 (愛知県衛生研究所)	
II . 分担研究総合報告	
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	----- 21
吉田 弘 (国立感染症研究所)	
III . 研究成果の刊行に関する一覧表	----- 47
IV . 資料	----- 49
1) 論文発表	
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	
皆川洋子 パネルディスカッションI 地衛研におけるポリオ検査。 衛生微生物技術協議会第38回研究会 (2017.6.21 東京)	
松本 昌門 地方衛生研究所に対する外部精度管理調査の試行について。 第54回 日本細菌学会中部支部総会 (2017.10.13名古屋市)	

別添 3

. 総合研究報告書

平成28年度～29年度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）
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（H28-健危-一般-002）
総合研究報告書

研究代表者 皆川 洋子 愛知県衛生研究所 所長

研究要旨 平成28～29年度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）
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（H28-健危-一般-002）
総括研究報告書

研究代表者：皆川 洋子 愛知県衛生研究所 所長

研究要旨 改正感染症法に基づいて自治体を実施する病原体検査に特化した、食品GLP及び水質GLP等とは一線を画す外部精度管理システムの構築を目的として、地方衛生研究所（地衛研）と国立感染症研究所（感染研）を主体とする三つの小班を編成して各々(1)ウイルス及び(2)細菌精度調査に必要な配布試料（核酸・感染性病原体等）調製・病原体等を含む試料の授受・回答の回収及び評価まで網羅するプロトコルひな形案を作成のうえ、研究協力地衛研を対象として試行を実施した。さらに(3)全国地衛研における「病原体検査の質確保」体制構築状況及び他機関への精度管理用検体配付実績等に関するアンケート調査を実施・解析を行い、さらに保健所・大学関係者とWG会議を開催し、地域における地衛研の役割について検討した。(1)ウイルス小班では市販核酸を活用したエンテロウイルス遺伝子検査の標準化に取り組み、ワークショップを経て外部精度調査システムを構築のうえ試行し、他のウイルス遺伝子検査にも応用可能な外部精度調査プロトコル案が完成した。また、国立保健医療科学院が計画し感染研が実施する地衛研担当者を対象とするウイルス研修受講者を対象に、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をフォローアップを含めて2年間にわたり実施し、成果を解析した。(2)細菌小班は、平成28年度に赤痢菌保存菌株から精度調査用検体として適切な株選定及び検体調整法を検討のうえ、29年度に精度調査用赤痢菌菌株を全国27地衛研に配布して、外部精度調査を試行し、一連の流れから細菌外部精度調査プロトコルひな形案を得た。また地域における技術的中核機関として位置づけられている地衛研が、一部の自治体で自治体内の衛生検査機関を対象とした精度管理調査用検体提供等を担当している状況について、東京都に関する調査研究を実施した。(3)項目小班を中心に実施したアンケート調査には、ほぼ全ての地衛研の協力が得られ、感染症法改正に対応する体制の現状と地衛研の病原体検査担当部署が抱える課題を把握し、課題の抽出を試みた。さらに地域における検体配付実績等に関する追加調査や保健所・大学とのWG会議を通じて、自治体における病原体検査担当者育成や、地域における病原体検査体制の維持強化に向けて地衛研の果たすべき役割についての検討結果をまとめた。

研究分担者

調 恒明 山口県環境保健センター 所長
滝澤 剛則 富山県衛生研究所 所長
四宮 博人 愛媛県立衛生環境研究所 所長
佐野 一雄 名古屋市衛生研究所 所長
岸本 壽男 岡山県環境保健センター 所長
脇田 隆字 国立感染症研究所 副所長
宮崎 義継 国立感染症研究所・真菌部 部長
大石 和徳 国立感染症研究所
・感染症疫学センター センター長
吉田 弘 国立感染症研究所
・ウイルス第二部 主任研究官
木村 博一 国立感染症研究所・感染症疫学
センター 室長（現群馬パース大学 教授）
村上 光一 国立感染症研究所
・感染症疫学センター 室長

山本 容正 大阪府立公衆衛生研究所 所長

松本 昌門 愛知県衛生研究所・生物学部 部長

研究分担者の参画年度及び研究協力者については、**班員名簿**を参照されたい。

A. 研究目的

地方衛生研究所（以下地衛研）は、自治体の（感染性食中毒を含む）感染症健康危機対応における重要な科学的根拠となる病原体検査を担当しており、平成28年4月の改正感染症法施行により地方自治体（知事等）の事務として法的根拠が付与された病原体情報の収集では、国立感染症研究所（以下感染研）との密接な連携のもとに、中心的役割を担っている。地衛研が実施する病原体検査の質を確保するためには内部精度管理実施とともに、新たに病原体外部精度管理システムが必要である。

本研究においては、地衛研が実施する病原体検査の質の維持・確保に必須となる外部精度調査の実施を可能とするシステムの構築を開始した。具体的には ウイルス及び細菌について、各々地衛研の検査対応が感染症対策上重要な病原体の精度管理システム構築（試料調製に加えて危険物とされる病原体等の授受に必要な文書ひな形案の作成等を含む）及び試行を通じて、全国の地衛研・感染研の連携による外部精度管理システムの基盤形成をめざし、病原体検査機能の維持向上を通じて感染症や微生物を原因とする食中毒による健康危機管理を支える地衛研職員の人材育成を図る。以前から一部地衛研が自治体内（都道府県における保健所設置市を含む）の民間衛生検査所や保健所試験検査課等に精度管理用検体を提供している実態について研究報告する。28年度に全地衛研を対象に予備調査を行い、29年度には自治体内（都道府県における保健所設置市を含む）の民間衛生検査所や保健所等に精度管理用検体提供実績のあった地衛研に対して追加調査を実施して現状を把握するとともに、地域の病原体検査体制維持強化において地衛研が果たせる役割について検討する。

法改正初年度にあたる平成28年度に全国地衛研を対象にアンケート調査を実施し、「病原体検査の質確保」への取り組み状況及び地衛研が抱える課題等の把握を試みる。

B. 研究方法

1. 3小班編成による研究分担

平成26-27年度に実施された先行研究（佐多班）の成果(1)を参考に、班全体及び「ウイルス小班」「細菌小班」「項目小班」の3小班に分かれて研究を実施した。

「ウイルス小班」は、感染研感染症疫学センター 木村室長（現群馬パース大教授）を中心に精度保証手法をとりこんだウイルス遺伝子検査法の研修を28年度に実施し29年度にはフォローアップ及び研修成果解析を実施、感染研ウイルス第二部吉田主任研究官をブレンとしてワーキンググループ(WG)地衛研のウイルス担当者が協力し、28年度には感染研にて病原ウイルス検査の精度管理実施システム構築及び試行準備を、29年度にはエンテロウイルス71遺伝子検体を用いた精度調査

試行及び他のウイルスに応用可能な精度調査プロトコルひな形を作成した（分担研究総合報告書参照）

「細菌小班」は、感染研感染症疫学センター 村上室長、富山県衛生研究所 滝澤所長、愛知県衛生研究所 松本部長を中心に、コアWG地衛研の細菌担当者が協力して、28年度に三類感染症「赤痢」の病原体である赤痢菌検査を対象とした病原細菌検査の精度管理実施システムを構築した。29年度には上記分担研究者にコアWG地衛研の細菌担当者及び感染研細菌第一部泉谷室長らが協力して、赤痢菌検査の精度管理を試行し、精度調査実施に必要な事務手続きを含むひな形書類のセットを作成した。さらに28年度には自治体における感染症・食中毒対応等の科学的技術的中核機関として一部の地衛研が以前から担当している精度管理用検体提供等の実態について検討し、東京都について調査研究報告をまとめた。

「項目小班」では、28年度に全国地衛研を対象にアンケート調査を実施し、「病原体検査の質確保」への取り組み状況及び地衛研が抱える課題等の把握を試みた。同アンケートにおいては多くの地衛研で病原体検査が実施されている疾患を中心に二類～五類感染症の一部を対象に標準作業書作成状況・標準品の要望・外部精度調査のニーズについても調査した。自治体における地域の保健所・大学等との連携に関するニーズや地衛研の在り方について検討するとともに、28年度のアンケート調査結果に基づき追加調査を実施し、地域におけるニーズ等を検討した。

2. 全体班会議等による小班間の相互連携

項目小班による検討にはウイルス・細菌の専門家の関与が不可欠であるとともに、ウイルス小班及び細菌小班活動は、地衛研の所長や企画調整担当者が主な構成員となっている項目小班の視点からも評価する必要がある。旅費はじめ限られた予算の効率的活用も念頭に、ウイルスと細菌の外部精度調査試行準備は小班内に設置したWGを中心に進めるとともに、検討班会議はウイルスと細菌担当者が一堂に会する形で活発な意見交換を図った。さらに全体班会議には、研究班員に加えて感染研

及び厚生労働省結核感染症課も臨席されるなか、活発な議論が行われた。大学・保健所等に属する研究協力者は、日程の都合で28年度は班会議出席がかなわなかったため、29年度はWG会議を設定して意見していただく機会を設けた。

なお本研究実施にあたっては自治体における病原体検査担当者確保上の課題把握を特に重視した。(倫理面への配慮)検体提供者の個人情報には取り扱わない。研修に参加した地衛研職員に対しては、成績の取扱いについて個人が特定されないこと等を分担研究者より事前に説明が行われたのち、個別にインフォームドコンセントが得られた。動物実験は実施しない。

C. 研究結果

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(木村ら)

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シーケンス・分子系統樹解析)に関する研修を地衛研職員23名を対象に行った。地衛研在籍歴は7か月~10年7か月であった。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(polymerase chain reaction)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。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採点対象として受講者の個別評価も行った。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通じて本研修内容における技術的な助言・指導も行った。29年度には初回研修後のフォローアップとして、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名中解析に十分な研修時と研修後のデータが得られた8名について、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(R²)、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コピー/well)も研修後は安定して検出することができた。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。

28年度の研修ではPCR産物のシーケンスおよび系統樹解析をとって塩基配列の正確度や系統樹の精密度に関する研修も実施し、PCRの精確度、シーケンスの精確度ならびに系統樹の精確度を採点対象として受講者の個別評価(A~D評価)を行った。

2. 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(吉田ら)

感染症発生動向調査における五類定点把握対象かつ病原体検索対象となっている手足口病検査を対象とした外部精度管理調査システム構築を目的に、28年度には調査用試料調製の条件検討を行った。起因ウイルスであるエンテロウイルスを感度の高いCODEHOP-snPCR法で同定する場合、同定結果の信頼性確保にはウイルス感染価とPCRによるウイルスゲノム検出下限値、遺伝子配列解析による同定可能なウイルスゲノム下限値を把握した上で、目的とする検出感度、正確性を設定し、試料調製を行う必要性が認められた。

本法による信頼性の評価は既知の標準RNAを用いたエンドポイント測定により施設間の比較調査が可能であると考えられる。このためRNAを安定に保管する条件を検討した。自家調整RNA及び市販RNAコントロールをRNA保管用製品(RNAstable)を用い、安定化させる条件について一定の結果を得た。遺伝子検査による同定目的の定性試験には、比較的価格の安いFTA Eluteカードに高力価ウイルス、高濃度RNAを固定することでCODEHOP法により検出可能なRNAを回収可能であることを確認でき、外部精度管理調査を目的とした試料輸送に適用可能と考えられた。

29年度には地衛研ごとに検査体制が異なる実情を踏まえつつ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、EQA の結果は地衛研間で共有し、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、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、病原体サーベイランス全体の質を改善する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。(分担研究総合報告書参照)

3. 地方衛生研究所を対象にした赤痢菌検査の外部精度管理調査(村上、滝澤、松本ら)

地衛研で実施する細菌検査の信頼性確保のため、「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」を実施項目とする外部精度管理調査システム構築と試行を行った。28 年度は外部精度管理調査の実施に必要な手順や問題点を検証した。保存により抗原性が変化しやすい赤痢菌に対して、抗原性を維持するための継代培養法を検討し、適切な培養方法を確立した。さらに配布する菌株を選択するため、候補菌株を実際に WG 内の機関に輸送し、到着後の抗原性の変異や生化学性状の妥当性を検査し、その結果をもとに菌株候補を選択した。本研究を通じて「三類感染症検査に係る『赤痢菌』の同定」を実施項目とする外部精度管理の実施には、送付菌株の適切な継代等、綿密な準備が必要であることが明らかとなった。

平成 29 年度には、27 施設の参加を得て試行した。本試行を通じて、四種病原体の送付等諸手続きに必要な書式等を一式準備でき、今後他の病原体の外部精度調査にも応用可能なひな形等が得られた。3 検体の結果報告をみると赤痢菌か否かについては全 27 施設が誤りなく回答していたが、施設により検査の進め方が異なること等を回答書式に十分に反映できていなかった等の問題点も明らかになった。

4. 東京都における衛生検査機関を対象とした精度管理調査事業について(平井ら)

自治体における地衛研の役割として、保健所や民間衛生検査所等の検査精度確保に精度管理用検体を提供する等をとおして協力することも考えら

れる。長年保健所等に検体配布等の実績のある機関を代表して、昭和 53 年より東京都・特別区衛生検査機関(都区内保健所および衛生研究所)における精度管理調査を実施している東京都について、平成 27 年度に実施した精度管理調査を中心に精度管理の概要について調査研究報告をまとめた。都区内保健所の技術維持・更新に大きな役割を果たしていた。

5. 地方衛生研究所における病原微生物検査体制と「検査の質の確保」に関する研究(皆川ら)

全国地衛研における検査の質確保の現状把握及び課題の抽出を目的に、アンケート調査を実施し、81 機関中 80 機関から回答を得た。

今年度全面施行された感染症法改正に基づき、新たに病原体検査における信頼性確保部門管理者、検査部門管理者、検査区分責任者はほとんどの地衛研で配置されていたが、信頼性確保部門は本庁・保健所等他機関に置いた地衛研も多かった。検査員の人数や、結核を除く二種感染症(ウイルス遺伝子検出主体)及び三類感染症(細菌)検査人員体制も調査した。法改正初年度の検査機器設備・点検等への予算確保状況について、現場の実感を調査した。二類～五類感染症の一部について、標準作業書作成状況・標準品の要望・外部精度調査のニーズについても調査した。現在実施中の病原体検査に関する標準作業書等の文書作成は、多くの機関が対応済、若しくは調査時点(平成 28 年 11 月)で近い将来対応予定、となっていた。

6. 地域の病原微生物検査の質の維持向上に資する地方衛生研究所の役割に関する研究(松本ら)

自治体における地衛研の役割のなかで地域の保健所等との連携は重要である。保健所・大学職員を招聘して、衛生研究所の連携について検討する会議を開催した。事前アンケートを実施し、衛生研究所に期待する具体的な項目が明らかになるとともに、人材育成等における問題点が共有された。地衛研は管内人口等の条件が大きく異なる自治体に各 1 施設設置されることから、期待される役割も一様ではないが、病原微生物検査体制の維持向上を継続するためには、関係機関も巻き込む形で、現状の問題点(専門家の不足・研修機会の不足等)と期待される役割(人材育成・最新最適な検査法の情報提供・精度管理用検体提供等)を把握し、常に優先順位を考慮しながら対応を立案する必要がある。

7. 地方衛生研究所における病原微生物検査体制と「検査の質の確保」に関する研究(皆川ら)

28年度に本研究で実施した「病原体検査の質確保」体制構築状況の調査に際して各自治体の保健所、衛生検査所等の外部精度管理実施への協力実績ありと回答された17機関に対して追加調査を実施した。配付実績のある検体等には、感染症法に基づく検査対象病原体のみならず食中毒原因菌や内部精度管理用病原体等が含まれていた。今後検体提供継続を縮小～中止する予定と思われる2機関を除く15機関は地全協の地域別に置かれている6支部全てに分散しており、将来支部単位若しくは支部相互に検体提供を実施する可能性についても、一定の素地はあると考えられた。

D. 考察

1. ウイルス遺伝子及び細菌菌株検体を検体とする外部精度管理システムの構築

改正感染症法施行に伴い病原体情報の収集に法的根拠が付与され、地衛研等検査機関は内部精度管理実施とともに外部精度(管理)調査を定期的に受ける義務を負うが、平成28年4月の時点では細菌・ウイルス検査において食品以外の地研全体の外部精度管理の仕組みはなかったため、新たに病原体外部精度管理システムを構築する必要が生じ、平成26-27年度佐多班の研究成果(1)もふまえて28年度に厚生労働省により、国立感染症研究所に「外部精度管理事業企画検討委員会」が設置された。本研究で得られたエンテロウイルス71遺伝子(分担研究総合報告書参照)及び赤痢菌菌株の外部精度調査システムのひな形は、いずれもエンテロウイルス71や赤痢菌以外のウイルス・細菌検査用検体配付に応用可能なものとなっており、今後国により(感染研が担当して)実施される外部精度管理に加えて、地衛研が地域や支部等で精度調査用検体配付を計画する際にも活用が期待される。

2. 今回とりあげなかった検体等に対する外部精度調査への備え

今回ウイルス小班では、季節性インフルエンザの分離等を念頭に、感染性を保持した検体を配付するシステムの必要性についても繰り返し議論し

たが、感染力を保持した状態で全国各地に同時に発送するシステム構築を遺伝子発送と並行して実施することは、本研究ではマンパワー等を考慮して困難と判断し、着手していない。ウイルス分離検査用検体配付システムについても、今後構築が必要である。

3. 感染症検査の外部精度調査対象となる検査の「質」(検査感度・再現性・施設間差等)に関する考察:「質」確保 食品検査におけるGLP

地衛研が担当する病原体検査の信頼性確保は、定常状態の把握に資する感染症発生動向調査における診断精度並びに病原体サーベイランス精度の確保や、食中毒や集団発生等健康危機事例発生時の積極的疫学調査等健康危機事例や輸入感染症疑い検査等の検査の「質」確保が目的である。したがって、多くの地衛研において導入から既に20年以上経過している食品や水質の規格基準検査におけるGLP(Good Laboratory Practice)、特に理化学分析検査とは検査に求める「質」の内容に若干の異同がある。感染症法に基づく病原体あるいは血清学検査は、しばしば定性判定結果(陽性が陰性か)が決定的に重要であり、異なる施設(地衛研)間で判定が大きくばらつくことは望ましくない。言い換えると、個々の施設が設定する検出限界が一定の範囲に収まること(均てん化・平準化)や、検査結果に基づいて下される行政的判断に重大な影響をもたらす定性的結果(陽性・陰性・判定保留)に十分な再現性が担保され、ブレ(検査室間並びに室内-検査員間-誤差)が生じ難い検査体制を構築する必要がある。木村らによる分担研究(平成28年度分担研究報告書1及び平成29年度分担研究報告書1参照)担当職員の技能研修で目標とした検査感度(検査プロトコルに左右される)が定性結果判定に用いられる閾値より1~2段階希釈高感度になっていることは、検査感度と結果再現性のバランスをとる観点からも適切と考えられる。因みに現在食中毒検査で実施されるノロウイルス検出では、2つのウェルにおいて実測値10コピー以上を陽性と判定している(2)。

4. 地衛研による病原体検査体制の現状及び人材

確保に伴う課題の把握

28年度に全国地衛研を対象にアンケート調査を実施し、「病原体検査の質確保」への取り組み状況及び地衛研が抱える様々な課題が明らかになった。予算人員不足など地衛研だけの努力で解決するのは難しい課題も多数あるが、地衛研のみならず自治体内外の関係機関にも調査結果に基づく理解や協力を得る努力を重ねて、少しずつ状況を好転させ向上をめざす方策を考えたい。また、信頼性確保部門管理者や検査部門管理者が新たに配置されたことに伴い、検査担当者の文書事務負担が過大とならないよう留意する必要がある。

5. 輸入感染症対策強化における地衛研検査機能強化の必要性

国際保健機関(WHO)による国際保健規則(IHR)(3)及びWHO西太平洋支部(WPRO)等によるAsia Pacific Strategy for emerging diseases (APSED)(4)に示された感染症の検査は、日本においては感染研が一義的には対応することとなるが、近隣諸国でのアウトブレイク等に際して検査依頼が急増した場合に、しばしば地衛研の検査がスクリーニングに活用される。IHR Appendix 2に疾患名が記されている痘瘡、野生型ポリオ、新型インフルエンザ、SARS、コレラ、肺ペスト、黄熱、ウイルス性出血熱(エボラ・ラッサ・マールブルグ)、ウェストナイル熱、デング熱、リフトバレー熱、髄膜炎菌感染症のうち2009年の新型インフルエンザ発生に際しては、感染研インフルエンザウイルス研究センターが国内発生前にリアルタイムRT-PCR法による診断プロトコルを開発し、厚生労働省から配布された陽性対照品・プライマー・プローブ等を用いて全国の地衛研でスクリーニング検査(その後地衛研の検査結果をもって確定扱いに変更)が実施された。Event of potential international public health concern (PHEIC)とされた2016年のジカウイルス感染症においても、同様の対応がとられている。地衛研における病原体検査精度の確保は、輸入感染症対応体制の維持強化にもつながる。なお今回ウイルス小班で対象とした「手足口病」の病原体エンテロウイルス71は、それ自身アジアで毎年のように死亡を来す(5)

ばかりでなく、ポリオウイルスと同じエンテロウイルスに属しており、「手足口病」検査精度の向上は、二類感染症「急性灰白髄炎」への備えの強化につながる。

6. 地域における中核機関としての地衛研による病原体検査体制維持強化に向けた取り組み

地衛研は各地域(都道府県内の保健所設置市を含む)における科学技術的中核機関としての役割も期待されており、28年度に実施したアンケートに回答した79機関中17機関が民間衛生検査所や保健所試験検査課等に精度管理用検体を提供していることが判明した。また最も先進的な東京都における実践について、研究報告をまとめた。

全国に加えて支部レベルでの外部精度管理実施が可能になれば、運送費・フィードバック研修旅費等の節約になるばかりでなく、近隣地衛研間の連携強化も期待できる。

7. 地衛研における病原体検査担当者人材育成の現状及び課題の把握

近年ベテラン職員が定年を迎えた後、採用が少なかった「就職氷河期」世代への専門的技術の継承あるいは職員補充に苦労している地方自治体は、少なくない。地衛研に感染症や病原体を専門とする職員の存在が不可欠であることは自明と思われるが、一部の自治体人事担当部署においては専門性への理解は必ずしも十分ではなく、数年程度のサイクルで異動が繰り返されている結果、病原体検査担当者の専門性確保が困難になっている。

外部精度調査への参加(及び個々の検査施設に対する検査精度や検査体制等の問題点指摘等のフィードバック)を通じて、国など外部から病原体検査精度の確保の必要性を指摘される機会が増えると、各自治体における感染症や全数把握感染症検査精度維持向上ならびに担当自治体職員教育訓練の必要性認識につながることを期待される。地衛研における長期的展望にたった専門家の育成がなされれば、結果として自治体の感染症による健康危機対応体制の維持強化が期待できる。検査精度維持向上ならびに担当自治体職員への専門研修等教育訓練機会確保の必要性が理解されやすくな

るかもしれない。本研究成果の活用が、自治体における感染症健康危機対応力の維持強化につながる事が望ましい。

8. 研究活動の総括

2年間にわたる本研究事業において、各年度の総括研究報告書に記載したとおり、ウイルス及び細菌検査について、各々他の病原体への応用も視野にいた精度管理実施システム構築並びに試行を実施できた。感染研における病原体専門家に研究分担あるいは研究協力者として本研究に参画のうえ綿密な計画を立案していただき、試行錯誤の段階では地衛研の研究協力者が現場の代表として積極的に参加した。さらに試行を通じて、地衛研の病原体検査部署が抱える課題も共有された。感染研における病原体専門家に研究分担あるいは研究協力者として本研究に参画のうえ綿密に計画・実行していただいた。地衛研の研究分担者・研究協力者は現場の代表として積極的に参加するとともに、書式の整備や報告書準備等に尽力した。

地衛研の課題や地域における在り方について分担研究報告書4及び5のとおり、調査及び会議を開催のうえ、考察した。

外部精度調査の結果をふまえた効果的な(地衛研の担当者育成や体制強化に結びつく)フィードバックや関連研修については、30年度新たに立ち上がる研究班において検討を予定している。

E. 結論

今般の感染症法改正に伴い、法に基づく検査を担当する地方自治体の施設は外部精度管理を定期的に受ける必要が生じた。ウイルス及び細菌について、感染研に所属する各病原体の専門家と検体検査の現場を熟知した地衛研ベテラン職員が協力する形で、各々ウイルス(手足口病の病原ウイルス)及び細菌(赤痢菌)について外部精度管理システムを構築のうえ試行を実施した。今回構築したシステムは、各々他のウイルス遺伝子及び病原菌株配布を伴う外部精度調査に応用可能なものであるが、季節性インフルエンザ等指定提出機関より提出された検体について実施されるウイルス分離検査(感染性を保持したウイルスが必要)等については、別途システム構築を図る必要がある。

地衛研病原体検査担当者の育成に関して、法改正前には一部自治体人事担当者等の理解が得がたく、現場で専門家を育てることが難しかった状況が、今般の法改正を契機に自治体行政関係者のなかにも地衛研が主な担い手となっている病原体検査(二類・三類及び四類・五類全数把握感染症、季節性インフルエンザ等)精度維持向上の必要性が、認知されるようになった。今後、研修の内容等についてもさらに検討する必要がある。検査精度の維持には地衛研病原体担当職員の資質向上が不可欠であり、自治体の病原体の関わる健康危機対応力にも関係する。

本研究で実施したアンケート調査結果からは人員(数及び経験年数等の質)・機器設備・予算等の厳しい状況も明らかになった。外部精度調査と関連研修を受けることに加えて、担当者が経験を重ねることや各機関でOJTができる体制の維持を含む教育訓練・研修・学会参加等の必要性について自治体内での理解が得られるよう、引き続き努力する必要がある。

F. 研究発表

1) 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. 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, 2016.
3. 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.
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 病原微生物検出情報(IASR) 38(10):199-200, 2017
6. 皆川洋子: 地方衛生研究所の役割 臨床とウイルス(印刷中)

2) 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(2016.6.19. 郡山市)
2. 皆川洋子：パネルディスカッション 改正感染症法施行に伴う課題：地衛研の立場から。衛生微生物技術協議会第 37 回研究会(2016.7.21 広島市)
3. 皆川洋子、伊藤雅、吉田弘：パネルディスカッションⅠ 地衛研におけるポリオ検査。衛生微生物技術協議会第 38 回研究会(2017.6.21 東京)
4. 松本昌門、皆川洋子：地方衛生研究所に対する外部精度管理調査の試行について。第 54 回日本細菌学会中部支部総会(2017.10.13 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 (2017.10.31-11.2 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 (2017.10.31-11.2 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(2017.10.31-11.2 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 (2017.11.24-26 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

参考文献

1. 佐多徹太郎ら. 2016. 地方衛生研究所における病原微生物検査の外部精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. 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)平成 26-27 年度総合研究報告書.
2. 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長. 2007. ノロウイルスの検出方法について. 最終改正 平成 19 年 5 月 14 日食安監発第 0514004 号.
3. World Health Organization. 2016. International health regulations (2005) - 3rd ed.
4. World Health Organization Regional Office for the Western Pacific (WPRO) and World Health Organization. Regional Office for South-East Asia (SEARO). 2011. Asia Pacific Strategy for emerging diseases : 2010.
5. World Health Organization Regional Office for the Western Pacific (WPRO). 2011. A Guide to clinical management and public health response for hand, foot and mouth disease (HFMD).

外部精度調査実施に活用できるプロトコル、書式等については、平成 29 年度総括研究報告書を参照のこと。

2 年間の研究を総括するにあたり、班員名簿に記載した研究協力者に加え、全ての地衛研を対象に実施したアンケート調査・追加アンケート調査、外部精度管理調査試行に協力いただいた地衛研・感染研関係者の皆様に、改めて感謝申し上げます。

平成28年度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)
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
 (H28-健危-一般-002)

1. 研究代表者: 皆川 洋子(愛知県衛生研究所)
 2. 研究分担者: (地全協精度管理部会、感染研レファレンス委員会等)

背景

- ・平成28年4月改正感染症法施行に伴い知事等の事務となった病原体情報の収集を担当する地方衛生研究所等において「病原体検査の質」を確保する必要
- ・地衛研の検査水準確保、健康危機管理体制の維持、人材育成効果も期待(感染症発生動向調査、地衛研-感染研のネットワークの維持にも役立つ)

研究目的

- 地衛研全国協議会が主体となって、
- ・外部精度管理体制の導入にあたり、継続的实施に必要な条件を提言
 - ・具体的な外部精度管理項目の洗い出し・検査体制構築状況の把握
 - ・ウイルス・細菌に関する外部精度管理の試行

求められる成果(公募要領)

- ・包括的な外部精度管理調査のひな形 →細菌小班・ウイルス小班
- ・地方衛生研究所に求められる役割と機能強化のための他機関との連携の在り方についての検討結果

感染症に関する情報の収集体制の強化(概要)

(第14条の2、第15条、第16条の3、第26条の3、第26条の4、第44条の7、第50条関係)

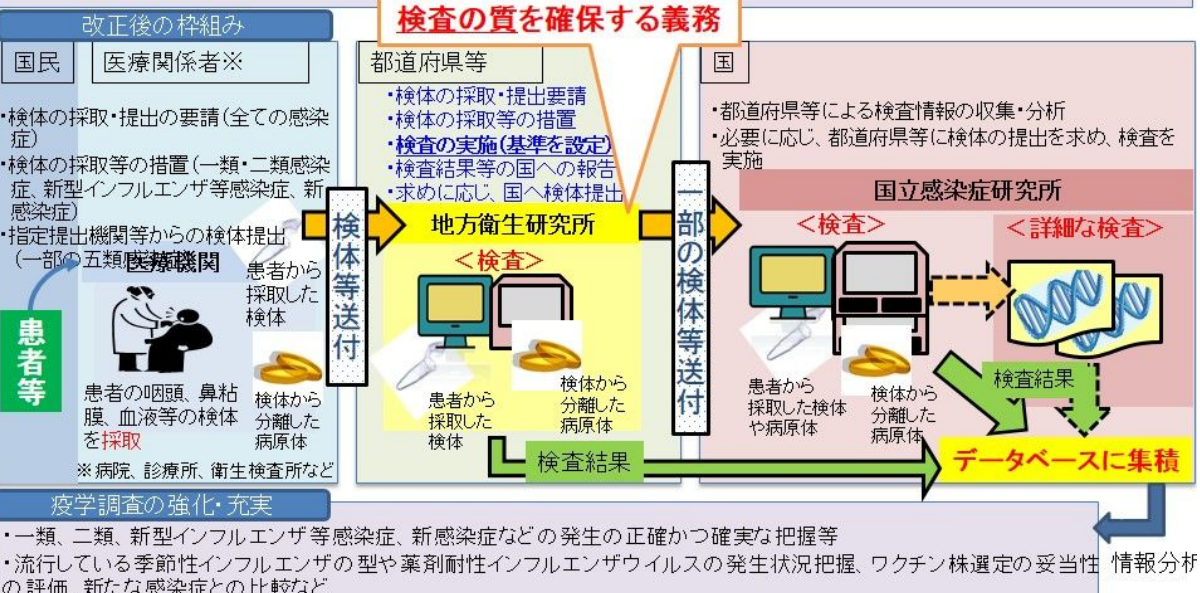
【現行制度の課題】 厚生労働省結核感染症課資料

- 近年、病原体の遺伝子解析技術等の飛躍的な進歩に伴い、感染症対策を立案するに当たって、遺伝子情報、薬剤耐性等の収集・解析が必要不可欠となっている。
- 現行の積極的疫学調査の一環である検体等の提出の求めについては、①感染症法に明確に定めがなく、②医療機関等の関係者の協力が努力義務にとどまる。

→ 関係者からの協力を得る際に障害となり得る。

【改正の概要】

- 検体等の採取・提出の協力要請、それに応じない場合の措置について、法に規定するとともに、入手した検体等の検査、検査結果の報告等に関する規定を整備する。これにより、感染症に関する情報収集体制を強化。



H28年度に地衛研が直面している課題

1. 検査の質の確保に資する外部精度調査項目(具体的な病原体・検査法)の検討。
→包括的な外部精度調査法の確立
2. 病原体名を限定しない、感染症疾患名(例:手足口病、感染性胃腸炎)毎の
精度管理調査の必要性、必要な場合の地衛研にとって適切な手法の検討。
3. 検査の質確保の目的が食品GLP、水質GLPとは異なることの認識不足。
・健康危機対応←迅速・定性(若しくは半定量)検査が主体
・新たな知見の追加に伴い検査手法・感度や陽性の定義も随時変更がありうる
検査の基準を予め厳密に決める(食品GLP,水質GLP)ことも大事だが、
どのプロトコルで実施し、どのような結果が得られたか記録に残す、
分離株が得られたら、感染研等と共有のうえ性状を確認する ことが大事
4. 手順書・記録・報告書の管理等、事務量が增大している。
感染症対策に有用な項目に絞り、付随的な事務の簡素化したいが・・
5. 効果的な研修手法の工夫。マンパワーの確保。
・長期的視野に立った人材の計画的育成・確保(専門家のリクルート?)
6. 自治体内衛生検査所・保健所等の精度管理への協力(検体配布等)。
・実績調査から着手。

3

輸入感染症・新興再興感染症対応 vs 定点サーベイランス 求められる「検査の質」のポイントは異なる

	輸入感染症・新興再興感染症	定点サーベイランス
感染症の例	二類(鳥インフルH7N9, MERS) 三類(腸チフス, EHEC) 四類(デング熱, チクングニア熱) 五類(麻しん, 風しん)	五類(季節性インフルエンザ, 手足 口病, 無菌性髄膜炎・・・)
検査手法	核酸検出(二類・五類)・病原体分離 同定(三類・五類)	病原体分離同定・核酸検出 性状解析(抗原性・薬剤耐性等.)
標準作業書・ 精度管理	共通化・標準化しやすい 標的となる病原体が限定される 検査感度の許容範囲設定・標準化	基本(標準)＋地域の特徴 全国的に検出すべき病原体に加え、 地域流行株の把握が可能なほうが よい
特記事項	検査結果が行動制限等行政対応に 直結 民間衛生検査所が未対応 (二類・五類)	SOP遵守の記録等に伴う事務量の 負荷が増加 病原体性状に係わる記録に特化し た事務量軽減?

H28精度管理班発足・活動状況

佐多班(H26, H27年度)を引き継ぐ形で、平成28, 29年度の2年計画

- 7月6日(水) 第1回 WG会議 (ウイルス・細菌)
- 7月21-22日(第27回衛生微生物技術協議会研究会会期中)
 - ・パネルディスカッションにおいて情報提供
 - ・細菌小班打合せ **WG内に赤痢菌候補株を送付・試行を開始**
- 10月25日 ・地全協精度管理部会(項目小班会議を兼ねる)
- 10月26-28日・ウイルスコアワークショップ **遺伝子検出試行**
- 11月15日(火) ・細菌小班コアWG会議
- 11月下旬~12月 項目小班 **検査の質に関するアンケート実施(全国地衛研)**
- 2017年1月11日(水) 全体会議 **検討事項等**

ウイルス小班:

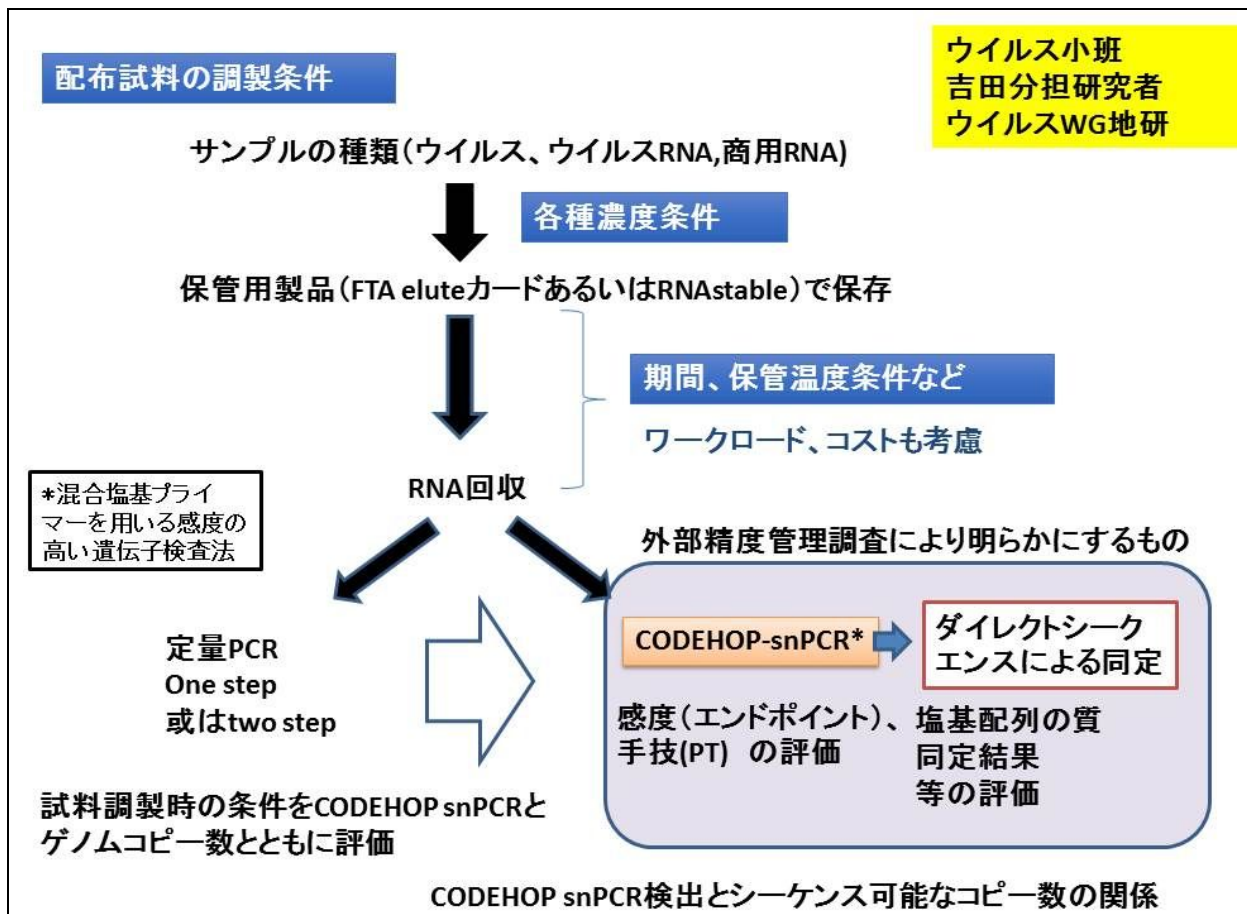
- ・29年度は一部地衛研にエンテロウイルス遺伝子検体を配布し外部精度調査を試行
- ・ウイルス核酸検出に関する包括的精度保証プロトコル案作成に向けて検討

細菌小班:

- ・29年度に赤痢菌について、一部地衛研に検体を配布し、外部精度調査を試行
- ・保存菌株を精度管理に適した性状に戻す等、包括的精度保証プロトコル案作成に向けて検討

項目小班:

- ・アンケート結果を検討
- ・29年度には関連研修、他機関への検体配布等についてさらに検討予定



1年目の研究結果

ウイルス小班
吉田分担研究者

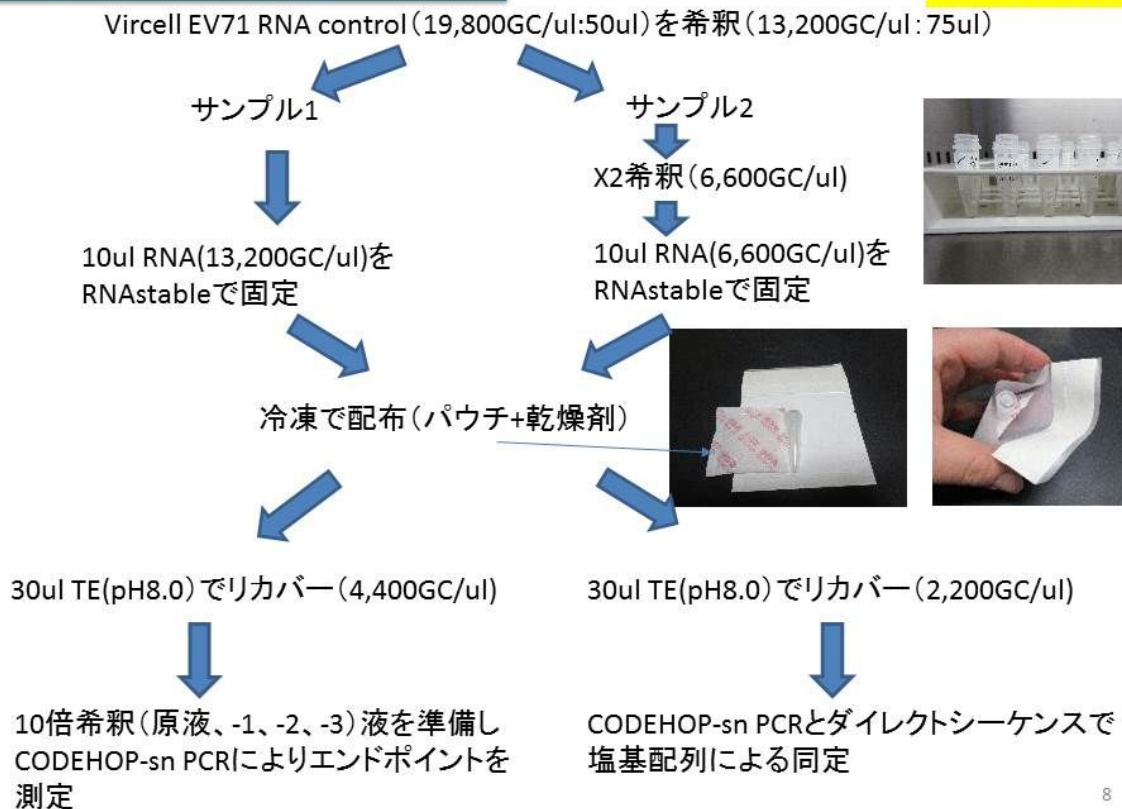
検体保管・輸送に用いる各種製品の評価のサマリー

	RNA 固定	RNA回収	回収率	価格	温度安定性
FTA elute card (40ul)	容易 3hrs	容易 (数十分)	ばらつく (高濃度にする こと)	450円 (40ulx4サークル:1サークル)	数日なら室温OK
FTA カード (125ul)	容易 1hrs	抽出キット 要。煩雑	Not done	555円/枚 (125ulx1サークル)	Not done
RNAstable (10-20ul)	容易 Over night	容易 (15分)	安定	1560円 (チューブ)	市販RNAは乾燥状態なら凍結すれば非常に安定 (短い領域を用いるqPCR用なら室温でも1週間以上安定)

7

手足口病EQA試料の作成

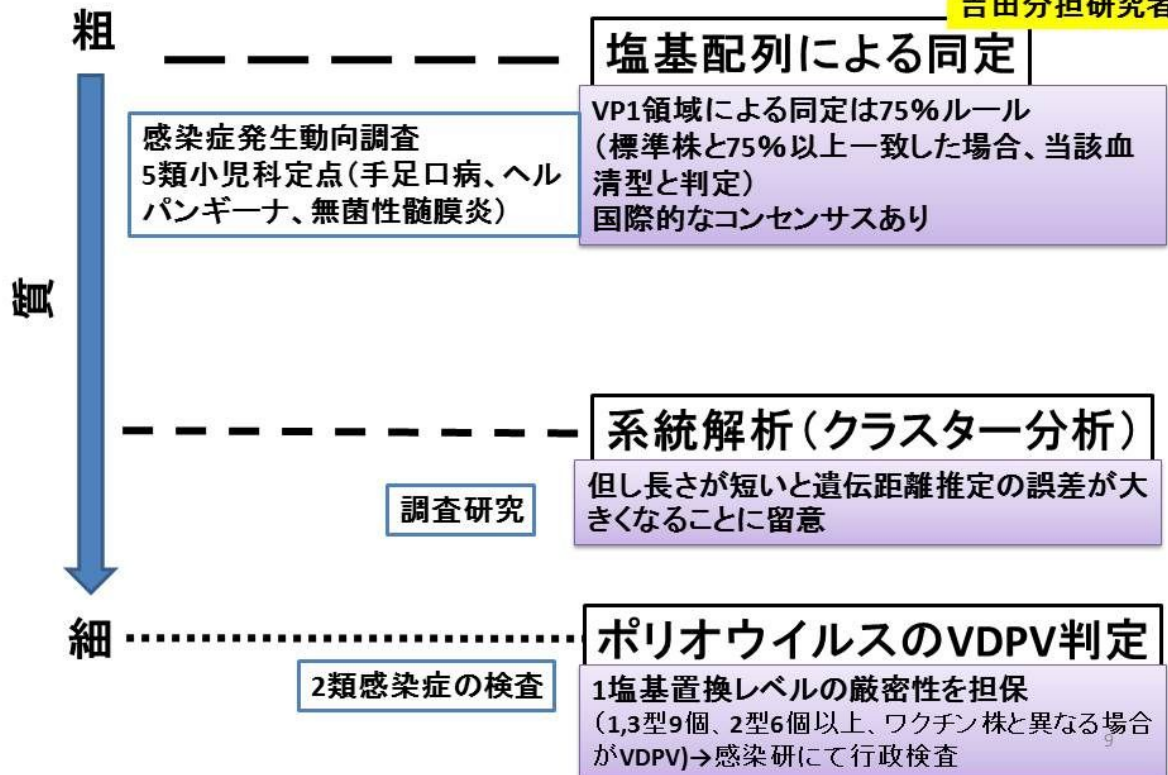
ウイルス小班
吉田分担研究者



8

エンテロウイルス塩基配列に求められる質について

ウイルス小班
吉田分担研究者



2年目の結果

ウイルス小班
吉田分担研究者

手足口病検査に関わる外部精度管理調査試行

概要

エンテロウイルス検査で普及しているCODEHOP-snPcr法の①感度比較と②遺伝子による同定に用いる塩基配列の比較調査

1. CODEHOP-snPcrによるRNA検出エンドポイント比較

原著ではCODEHOP法は数GCコピーまで検出可能。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。

2. 遺伝子による同定に用いる塩基配列の比較調査

病原体サーベイランスの手足口病は血清型を報告。遺伝子による同定が普及しているが、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。検査室ごとに反応に用いる酵素系も異なっているため、塩基配列の比較を行う。

10

H28年度厚生労働科学研究(健康安全・危機管理対策総合) ウイルス小班
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計画の作成 木村分担研究者

継続的实施に必要な事業体制の構築に関する研究

(H28-健危-一般-002) 研究代表者 皆川洋子

研究分担課題:

ウイルス外部精度管理計画の作成・検証

研究分担者

木村博一 (群馬パース大学・国立感染症研究所)

村上光一、宮崎義継、大石和徳 (国立感染症研究所)

調恒明 (山口県環境保健センター)

四宮博人 (愛媛県立衛生環境研究所)

研究協力者

小淵正次 (富山県衛生研究所)

千葉隆司、貞升健志 (東京都健康安全研究所)

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)

○水越文徳 (栃木県保健環境センター)

Summary

ウイルス小班
木村分担研究者

* 研修後の追試験で、殆どの項目で改善が認められた。

- ・検量線のバラツキがなくなっていた。
- ・検量線の R^2 は、統計学的に有意に改善されていた。
- ・低濃度のCV(%)も、研修時より有意に改善が認められた。
- ・最小測定感度(10copies)についても、安定して検出できた。

研修受講者の手技の向上



* 精度保証の手法を取り入れた研修の効果が立証された。

* 地研における検査精度の確保・改善に有益な情報となる。

平成28年度細菌小班・細菌WG活動

細菌小班
村上分担研究者
細菌WG 4地研

7月6日 細菌WG会議

赤痢菌を対象に
20地衛研程度を対象に

7月21日 細菌WG会議(衛微協にて)

赤痢菌2株、類似菌1株を別々に 送付
候補株を WG内に送付し、性状等を試験

菌株の抗原変異や、
プラスミドの脱落が問題

10月14日 菌株送付(細菌WG内) 5株

候補株の評価等

11月15日 細菌WG会議

問題点の洗い出し

12月9日 菌株送付(細菌WG内)

問題のあった候補株の再送付

赤痢菌候補株 性状等まとめ

細菌小班
村上分担研究者

No.	菌種	非発育	非検出		非特異的 血清凝集反応
			<i>invE</i>	<i>ipa</i> H	
T9	<i>S. flexneri</i> 2a	0	0	0	0
T16-52	<i>S. flexneri</i> 2a	0	0	0	0
T12	<i>S. sonnei</i>	4	4	4	4
B	<i>S. sonnei</i>	2	2	2	2
T10	非赤痢菌	0	5	5	5

T12, BについてWG地研に再送し、
培地に発育することを確認済み

平成29年 実施内容

細菌小班
滝澤小班長

実施日	内容
1月11日	平成29年度実施計画
2月	<u>参加機関募集(愛知衛研)</u>
2/27	参加希望案内
3/13	選考(抽選)
4/17	内定案内(21参加希望施設+6小班施設)
4/28	搬送容器手配
5/15	実施案内
4月	<u>実施要領作成、検体準備(感染研、愛知衛研)</u>
	病原体発送手続き
	参加機関への書類発送
	輸送容器の受け取り
5月	<u>検体配布(感染研)</u>
5/19	検体発送
5/22	検体配布
6/22	結果回収
6月	<u>結果まとめ・検討(愛知衛研)</u>
6/19	結果まとめ・結果の解析
8/30~10/14	メール会議
10月24日	<u>細菌コア小班会議</u>
11月2日	<u>正解の案内</u>

15

平成29年度 地域別参加機関

細菌小班
滝澤小班長

番号	ブロック	施設名	番号	ブロック	施設名
1	北海道・東北・新潟地区	札幌市衛生研究所	16	中国・四国地区	岡山県環境保健センター
2	北海道・東北・新潟地区	函館市衛生試験所	17	中国・四国地区	広島県立総合技術研究所保健環境センター
3	北海道・東北・新潟地区	秋田県健康環境センター	18	中国・四国地区	香川県環境保健研究センター
4	関東・甲・信・静地区	茨城県衛生研究所	19	九州地区	熊本県保健環境科学研究所
5	関東・甲・信・静地区	さいたま市健康科学研究センター	20	九州地区	熊本市環境総合センター
6	関東・甲・信・静地区	千葉県衛生研究所	21	九州地区	鹿児島県環境保健センター
7	関東・甲・信・静地区	足立区衛生試験所	22	細菌小班	東京都健康安全研究センター
8	関東・甲・信・静地区	静岡県環境衛生科学研究所	23	細菌小班	富山県衛生研究所
9	東海・北陸地区	福井県衛生環境研究センター	24	細菌小班	愛知県衛生研究所
10	東海・北陸地区	名古屋市衛生研究所	25	細菌小班	大阪健康安全基盤研究所
11	東海・北陸地区	岐阜県保健環境研究所	26	細菌小班	愛媛県立衛生環境研究所
12	近畿地区	滋賀県衛生科学センター	27	細菌小班	福岡県保健環境研究所
13	近畿地区	京都市衛生環境研究所			
14	近畿地区	尼崎市立衛生研究所			
15	近畿地区	和歌山県環境衛生研究センター			

16

精度管理調査の結果解析

- 1 解答様式(解答例含む)が適切ではなかった。
 - ①菌種を記載する指示が明確でなかった
(前回の解答様式では記入内容が不明瞭となった)
 - ②血清凝集試験の結果の記入内容が不明瞭
凝集試験の結果を記入するのか、赤痢菌同定結果(根拠)を記入するか不明瞭(凝集陽性でも、最終判定を陰性とした施設あり)
 - ③追加試験を行っても回答欄がない
 - ④陽性解答しか記入できない解答様式であったため、陰性となった試験結果を記入できなかった
- 2 記載ミス(試験結果と異なる結果)が認められた
- 3 赤痢菌に対する知識不足と思われる解答があった
- 4 同定試験に1コロニーしか釣菌していない施設があった。
プラスミドが脱落したコロニーを検査する可能性を指摘する

→ 誤解答した施設について経緯の詳細を聞き取りしたうえで、解析結果を小班会議で討議し、報告書を作成する

H28項目小班アンケートのまとめ(2017年2月)

1. 人員体制・点検費用・機器更新増設等予算
信頼性確保及び検査部門区分管理体制はほぼ全ての機関で設置済
但しマンパワーの確保(質・量とも)に多くの自治体が苦慮
2. 手順書(SOP): 主な二類、三類感染症については7割以上が準備済
五類定点感染症については、病原体名か感染症疾患名(例:手足口病、感染性胃腸炎)毎か、は機関により分かれている。
3. 標準品についても、病原体(核酸のみ、菌株)以外に疾患名に基づく物品の配布希望が一部機関から寄せられた。
4. 外部精度管理調査の参加希望は、二類、三類についてはおおむね高率。
5. 他機関(保健所・管内衛生検査所等)への精度管理用検体提供等は、17機関が実施(主に細菌検査と思われる)。⇒29年度に詳細な調査
国立感染症研究所に加えて、一部の地衛研(支部で数か所)も検体提供を担当する素地はあると考えられる。

アンケート調査票・結果の詳細は平成28年度分担研究報告書5 に記載

H29項目小班追加アンケート(他機関への検体提供)

項目小班

28年度に他機関への精度管理用検体提供あり、と回答した17機関に対して、2017年12月に実施 すべての機関より回答

配付先	衛研数 (H28)	衛研数 (H29)		衛研数 (H29)	病原体名等
保健所	14	13	病原菌株 (食中毒原因菌含む)	16	赤痢菌、EHEC、百日咳菌、肺炎桿菌、サルモネラ、黄色ブドウ球菌、ビブリオ属菌、ウエルシュ菌、リステリア、カンピロバクター、エルシニア、プロテウス、サイトロバクターなど
衛生検査所	9	7			
その他※	3	7	不活化検体	1	赤痢菌、コレラ菌、ノロウイルス
※食肉衛生試験所等			その他 (食品検査用等)	4	ノロウイルス、非病原性大腸菌、枯草菌

H29年度精度管理班(3小班)の研究活動概要

2017年2月20日 28年度成果発表会(中間評価)

2017年3月31日付 29年度交付基準額等通知

- 5月9日(火) 地全協理事会後 一部関係者と打合せ
- 5月 赤痢菌外部精度調査試行(27機関へ送付)
- 5月24日(水) 第1回 WG会議(ウイルス・細菌) (感染研共用第二会議室)
 - ・29年度研究方針について検討、タイムテーブルの確認
 - ・追加アンケートの要否について検討
 - ・ウイルス外部精度調査試行について検討
- 9月7日(木) 保健所・大学連携WG会議(項目・細菌) (愛知衛研共同研究室)
 - ・保健所・大学ー地衛研の連携のあり方について検討
- 10月24日(火) 細菌コアWG会議 (感染研第一会議室)
 - ・試行結果評価・フィードバック法について検討
- 10月30日(月) 項目小班会議/地全協精度管理部会 (鹿児島市 城山観光ホテル)
- 12月 エンテロウイルス外部精度調査試行(12機関へ送付)
- 12月 自治体内他機関への検体提供に関する追加調査実施(17機関へ送付)

- 2018年1月5日(金) 国立保健医療科学院へ研究成果報告書を提出
- 本日 全体班会議 (感染研共用第二会議室)

- 報告書原稿締切 平成30年1月12日(金)
- 総括研究報告書・総合研究報告書(最終年度):年度内とりまとめ・フィードバック

20

2年間の総括

- 全体班会議、小班WG会議等は予定通り開催済
- ウイルス小班
 - ・エンテロウイルスRNA検体配付(12機関)試行済、実施プロトコルひな形作成
- 細菌小班
 - ・赤痢菌等検体配付(27機関)試行済、実施プロトコルひな形作成
- 項目小班
 - ・アンケート調査
 - ・地域における地衛研の役割(他機関への精度管理用検体提供等)について追加調査済
 - ・保健所との連携に関してWG会議開催済
 - ・地衛研の役割、保健所・他機関との連携のあり方について報告
- pendingとなった地衛研病原体検査体制における課題
 - ・28年度調査で目立った研修ニーズへの対応(とくに支部レベル研修)
 - ・地衛研間の多様性(研究所の規模・守備範囲・管内人口)を考慮した体制の検討
 - ・28年度調査で目立った外部精度管理・標準品ニーズへの対応
 - ・国際保健規則(IHR)に関わること⇒ **感染研との連携・地衛研間の均てん化標準化**
 - ・地域の健康危機対応力強化(維持)につながる事項
保健所・民間衛生検査所・病院検査室を対象とした、
地衛研による研修受け入れ・精度管理用検体の供与等のあり方

21

平成 28-29 年度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）
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（H29-健危-一般-002）
分担研究総合報告書

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）
	高橋雅輝	岩手県環境保健研究センター
	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、山下育孝	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、濱崎光宏	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。平成28年4月より施行された改正感染症法では、積極的疫学調査により地方衛生研究所にて実施する手足口病検査にも、一定の検査の質を担保することが求められることとなった。このため検査体制が異なる実情を踏まえ、検査の質を担保する外部精度管理調査（EQA）の導入方法について研究を行った。本研究では国内外で普及している CODEHOP-snpPCR 法を題材としてその調査方法、内容を検討した。初年度は EQA 用試料の送付、保管条件の検討を行い、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 EQA を行い、調査内容、導入可能性について検討を行った。

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、EQA は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、を収集し検査系の改善を目的として参加者へ還元する調査内容であること、施設内で機材保守、内部精度管理の実施など PDCA を動かすためのメカニズム構築が必要であること、EQA 参加施設のみならず、地方衛生研究所間で情報共有し、2類感染症である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年間の研究により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主に小児科定点で報告される手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎患者に対する病原体検査では多様な血清型のエンテロウイルスが検出されることが知られている。

そして手足口病、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感染ではまれに重篤例が報告されており、また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。なお一部をのぞき、エンテロウイルス感染症には有効なワクチン、抗ウイルス薬は存在しない。

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。

従来エンテロウイルス検査は感受性のある培養細胞を用いたウイルス分離と型特異的な抗血清による中和試験を用いて同定が行われてきた。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。しかしエンテロウイルスの血清型は100種類以上が知られ、各血清型内のVP1領域も遺伝的に多型なことから、これまで多くの種類のプライマーが提唱され、各検査室で適宜組み合わせ用いられてきた（参考文献1）。

一方、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は高い。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る。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（参考文献2）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。

平成28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様々であり、検査の質を統一した基準で評価することは困難である。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。本研究では、地方衛生研究所における検査実施体制が異なる現状を踏まえ、手足口病の病原体検査に、国内外で普及しているCODEHOP-snPCR法を題材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-snPCR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指標、について検討をした。初年度の結果を踏まえ、2 年次は 12 施設の協力を得て、CODEHOP-snpCR 法によるウイルス検出感度の比較、塩基配列による同定法の比較、を行った。

今般、コスト面を含め EQA 実施の可能性、調査結果の考察を行い、CODEHOP-snpCR 法以外の遺伝子検査法への応用可能性について検討したので報告する。

B . 研究方法

初年度

CODEHOP-snpCR の EQA に用いる市販ウイルス RNA (コントロール用試薬) の保管条件とゲノムコピー (GC) 数の関係について検討を行った。

1 . 市販 RNA コントロールとウイルス力価の比較

1) ウイルス: RD-A 細胞に EV71 BrCr 株を接種し CPE が +4 になった時点で回収した。凍結融解 (1 回) 後、3000rpm で遠心し、上清を回収した。1ml に分注し、-30 度保管した。巻き込み法 (細胞数は 1.0×10^5 /ml) により、力価を測定した。

2) RNA 抽出: 力価を測定した EV71 BrCr 株を用いて QIAGEN QIAamp Viral RNA Mini Kit にてウイルス RNA を精製した。

3) 市販 RNA: 市販の RNA コントロールの評価のために VirceII 社の EV71 BrCr 株陽性コントロール RNA を用いた。添付マニュアルに従い 19,800 GC/uI (50uI) を調製した。

2. ウイルス RNA の検出法

1) CODEHOP-snpCR

Nix 等の方法 (参照文献 2) に基づいた。なお反応系は 1/2 容量 (25uI) とし、RNA は 2.5uI 用いている。電気泳動は 2% アガロースゲルで行い、5uI をアプライし、増幅産物をバンドの濃さで +1 から +4 を目視で判定した。なお本法はエンテロウイルスゲノムの VP1 から VP3 領域の約 900bp につ

いて逆転写反応を行い、1st PCR で約 760bp、2ndPCR で約 350bp を増幅する検出系である。

2) ウイルスゲノムコピー (以下 GC) 数の測定
ウイルス保管、回収条件を定量的に評価するために、Nijhuis らの方法を若干変更 (参照文献 3) し、one step RT-qPCR にて 5' 非翻訳領域 155bp の増幅を行った。コントロールプラスミドには人工遺伝子合成サービスを利用した。容量は 25uI とし、RNA は 3uI 使用。反応試薬は Quantitech Multiplex RT-PCR (QIAGEN) を用いた。反応系は 2 穴ずつ用いた。

3 . ウイルス RNA の保管条件

FTA Elute (Whatman) , RNAstable (Biomatrix) の 2 種類を用いて、異なる濃度の RNA ウイルスを固定し、温度 (室温、4 度、-30 度) を変え保管した。一定の期間の後、回収したのち、CODEHOP-snpCR で増幅の確認。そして RT-qPCR で GC 数の変動を測定した (図 1)。

1) FTA Elute カードを用いたウイルス、ウイルス RNA 回収試験

FTA Elute カード (サークル径 11mm) に希釈ウイルス、ウイルス RNA、各々 40uI をしみこませ、3 時間風乾後、専用パウチに入れ保管した。

RNA 回収には 4mm パンチを用いて、2 枚打ち抜き、先行研究で用いた方法で RNA を回収した (参照文献 4)。

2) RNAstable を用いたウイルス RNA 回収試験
自家調整ウイルス RNA、あるいは市販 RNA コントロール 10uI を RNAstable にアプライし、一晩キャビネット内で乾燥後、異なる条件下 (温度、濃度) で保管した。RNA をリカバーした後 CODEHOP-snpCR で増幅の確認、そして RT-qPCR で GC 数を測定した。

2 年次

初年度検討した、CODEHOP-snpCR の EQA 用試料を用いて試行的に 12 施設の協力を得て調査を行った。

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）に参加依頼を行った。

2 . 調査実施時期

EQA 試料は2017年12月4日発送。結果報告締め切りは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 (Lot 16MBC019001, 19,800 GC/uI)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、ウイルスを不活化後、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に固定した試料をリカバーするために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4,400 GC/uI（Sample1）、塩基配列による同定用試料としてメーカー表示換算2,200 GC/uI（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2）。即ちSample1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。Sample1として準備する同一ロットのRNAコントロールをメーカー表示換算4,400 GC/uI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Sample1として調整する前の試料10uI（13,200GC/uI）をRD-A細胞に接種し、2代継代を行い、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 30uI 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ている。

2) 比較に必要な情報

PCR 使用機器名、反応系（逆転写，1st PCR，semi nested PCR）のに用いた酵素の種類、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 30uI TE で、Sample 1 と同様にリカバー
- 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

個人情報を取り扱わない。

C. 研究結果

初年度

1. ウイルス力価と CODEHOP-snpPCR による検出と GC 数の関係

手足口病検査の信頼性評価を目的とした外部精度管理調査用試料は、ウイルス、ウイルス RNA、市販のウイルス RNA コントロールを用いることが想定される。病原体サーベイランスにおける検査の質管理の基準を検討するために、ウイルス感染価と今般検討を行う CODEHOP 法による検出可能なウイルス GC 数の関係を調べた。

用いた EV71 (Br Cr 株) の力価は RD-A 細胞を用いた場合、マイクロタイター法で $10^{6.5}$ CCID₅₀/50uI であった。ウイルスから RNA を精製後、 10^{-1} から 10^{-8} までの 10 倍希釈列を作製し、2.5uI の RNA を用いて CODEHOP-snpPCR による検出、3 uI の RNA を用いて RT-qPCR による GC 数を測定した (図 1)。同様に市販の RNA ($2.0E+04$ GC/uI) を希釈し CODEHOP 法で検出し、ウイルス力価と GC 数の関係を比較した (図 3)。なお 市販 RNA コントロールのメーカー表示 GC 数と、実測値の間にはおよそ 1:0.7 倍の関係が認められている。その結果 CODEHOP 法では自家調製 vRNA を 10^{-8} まで希釈したとき ($10^{-1.5}$ CCID₅₀/50uI = 0.03 CCID₅₀/50uI 相当) でも目視でバンドが確認、RT-qPCR では RNA を 10^{-7} 希釈 ($10^{-0.5}$ CCID₅₀/50uI = 0.3 CCID₅₀/50uI 相当) したときでも数コピー検出できた。したがっていずれかの方法で検出す

れば理論上、1 CCID₅₀/50uI (数十コピーに相当) 以下の感染価の時でも、ウイルスゲノムが検出できることになる。

他方市販 RNA コントロール (メーカー表示 19,800 GC/uI) は CODEHOP 法により 200 倍希釈即ちメーカー表示換算 99 コピー (実測値 70 コピー) まで再現性をもって検出可能であったが、RT-qPCR では数コピー/uI まで検出可能であった。

このように、検出方法により検出下限が異なる理由は、CODEHOP 法で逆転写する領域 (約 900bp) は RT-qPCR の増幅領域 (155bp) より長いため、安定的に増幅可能な鋳型の含有量が異なっていること、RT-qPCR は 5' 非翻訳領域、CODEHOP 法は VP1 領域であり、増幅効率が異なる可能性があること、が原因と考えられた。このため外部精度管理調査用に用いる RNA 調製には CODEHOP 法による検出下限値と対応する GC 数の関係を事前に測定しておく必要がある。

更に、感染価 1 CCID₅₀ 以下に相当する数 ~ 数十コピーの鋳型 RNA は CODEHOP-snpPCR で検出できても、シーケンス反応による遺伝子配列による同定には困難なことが多い。そのため、精度管理用試料調整時には、CODEHOP 法による検出できる鋳型の GC 数と感染価の関係を把握したうえで、目的に応じ RNA の濃度を調製する必要があると考えられる。(図 3)

2. 外部精度管理用試料の送付方法の比較

外部精度管理用 RNA を配布する場合、輸送、保管中に安定性が担保されることで、調査に参加する施設間の結果の評価が可能である。このため、RNA を安定的に送付する方法の検討を 2 種類検討した。

本研究では非感染性が担保された市販 RNA コントロールの配布を想定しているが、比較のためウイルス、そしてウイルスから精製した自家調製 RNA の結果も検討した。まず外部精度管理調査用試料送付に FTA Elute カードの適応可能性を検討した。

1) FTA Elute カードを用いたウイルス、自家調製ウイルス、市販ウイルス RNA 回収試験

FTA Elute カードにウイルスを固定すると、精製キットを使わず、比較的容易にカードから RNA が回収できることを先行研究 (参照文献 4) にて示している。

施設内変動を観察するため 10^{-1} と 10^{-2} に希釈したウイルス、精製したウイルス RNA について各々 40ul を FTA Elute カードに固定し、1 日後 (4 度保管) に 4 名の術者で回収を行った結果を図 4 に示す。

10^{-1} 希釈 ($10^{5.5}$ CCID₅₀/50ul)、 10^{-2} 希釈のウイルスは抽出後何れも比較的安定して検出でき、先行研究と同様の数%の回収率であった。次に精製ウイルス RNA の場合、 10^{-1} 希釈 (実測値 $2.3E + 06$ GC/ul) で 4 名とも同様の数%の回収率であったが、 10^{-2} 希釈では大きなばらつきが見られた (図 4)。

市販 RNA コントロールの検出感度は CODEHOP 法でも数十コピーが検出可能である。市販 RNA コントロールを FTA elute カードから回収後 100 コピーと 10 コピーになるよう希釈、調製した試料を FTA elute カードにアプライし、回収後 CODEHOP-snPCR を行い、4 名の術者で 3 回繰り返したがすべて陰性であった (データ示さず)。

先行研究で FTA Elute カードはウイルス力価が高いときは回収率に変動が少なく、低いと大きくなる傾向を示している。このように FTA Elute カードは、回収率は約 1/100 程度であるが、ウイルス力価が高い場合は比較的安定であり定性試験には簡便な保管方法である。今般検討したウイルス RNA 単独の場合でも回収率にばらつきがみられるものの、高濃度であれば EQA の定性試験には適応可能と考えられる。しかしながら低濃度 RNA の保管には適さないことが確認された。

2) RNAstable を用いたウイルス RNA、市販 RNA コントロールの回収試験

CODEHOP 法は高感度にウイルスゲノム検出可能な方法である。本法を導入する検査室間の信頼性

評価する方法のひとつは、同じ濃度の標準 RNA を配布し、各検査室でエンドポイントを測定することで検出感度の比較が考えられる。この目的には RNA の回収率のばらつきを小さくする必要がある。

非感染性で、かつ品質管理された多くの種類の市販の PCR 陽性コントロール用 RNA/DNA が入手できる。しかし市販品は高価なため、これを適宜希釈し、回収率が高い方法で保管できれば、EQA への応用は広がるものと考えられる。今般、さらに RNA を安定的に保存する製品、RNAstable を用いて保管し、自家調整 RNA を用いて保存した場合について比較した。

市販 RNA の RNAstable を用いた際の保管温度と回収率

市販 RNA (100 倍希釈液: メーカー表示換算 198 GC/ul 相当) 10ul を RNAstable チューブへアプライし乾燥させた。室温、4 度、-30 度にて 5 日保管後、DW (10ul) にて回収。CODEHOP-snPCR 法、RT-qPCR にて RNA を検出した。その結果、CODEHOP 法では 5 日後-30 度保管のみ RNA が検出できた。なお RT-qPCR による回収率は RNAstable 使用前の 1/3 程度に減少していた。また室温、4 度、-30 度とも回収できた GC 数はほぼ同じであり、温度環境が CODEHOP 法で増幅可能な鋳型 RNA の安定性に影響したと考えられた (図 5)。このため、155bp を増幅する RT-qPCR の場合は、室温保管でも問題ないと考えられたが、より長い配列を増幅する CODEHOP 用鋳型 RNA を RNAstable で調製する場合には、回収率と RNA の安定性を考慮し、さらに高い濃度 (数千 GC 数) で EQA 用に調製する必要が認められた。

RNAstable で保管した市販 RNA のエンドポイント測定

市販 RNA (10 倍希釈液: メーカー表示換算 1,980 GC/ul 相当) を -30 度にて 5 日保管後回収、希釈し CODEHOP 法にて検出したところ、200 倍希釈 (メーカー表示換算 99 GC/ul、実測値 70 GC/ul 相当) まで検出可能であった。

以上により RNastable は FTA Elute カードに比べ回収率が安定しており、高濃度(数千 GC 程度)、短期間、冷凍条件であれば市販 RNA を安定的に保管でき、CODEHOP 法の施設間の検出感度の比較調査のために応用可能であることが確認された。

施設内変動

つぎに施設内変動を調べるため市販 RNA (100 倍希釈液: メーカー表示換算 198 GC/uI 相当)10uI を 3 名の術者が、10 uI でリカバーしエンドポイントを測定したところ、1 名のみ原液のみ可能であった。このため RNastable からの回収方法を改善する必要性が認められた。そこで 2 年目の研究では、高濃度 (13,200GC/uI) の RNA 10uI を 30uI の TE buffer (pH 8.0) でリカバーし回収することとした。

RNastable による自家調整 RNA の保管温度と回収率

高濃度 RNA の安定性を確認するため自家調整ウイルス RNA を用いた実験を行った。ウイルス RNA 10uI を 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} に希釈し、室温、4 度、-30 度で保管後、TE (pH8.0) 20uI で回収し CODEHOP-snpPCR 法、RT-qPCR にて検出した。

いずれの希釈倍率、温度環境ともウイルス RNA は安定的に検出された。このことは比較的高濃度な RNA の場合、RNastable で安定して保管できることを示す (図 6)。

2 年次

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 各 3 本に対してエンドポイント測定した結果、ア施設では 3 試料とも 10^{-1} まで増幅を確認、イ施設では 3 試料中、2 試料が 10^{-2} 、1 試料は 10^{-1} まで増幅を確認できた。即ち、メーカー表示換算 440 GC/uI まで 2 施設で CODEHOP-snpPCR 法で再現可能であると判断された。

なおア施設では RNA 2.5uI 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。イ施設は PrimeScript

RT(Takara)により RNA10uI を用いて反応を 20uI で行った。1stPCR, semi nested PCR とともに総容量 25uI で測定している。

また高濃度の RNA 試料 (メーカー表示換算 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のとおり、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。原則として 3 週間の期限内に全 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

あらかじめ約 4,400GC/uI (メーカー表示換算) 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 (1 回 ~ 4 回) とした。結果は以下の通り。なお図 7 では縦軸は希釈条件、横軸は報告機関数と、該当する 12 施設をアルファベットで表記した。

- 12 施設間で測定した結果、原液 (約 4,400 GC/uI) から 100 倍希釈 (44 GC/uI : メーカー表示換算) まで検出され、施設間に感度に差が見られた。1000 倍希釈 (4.4 GC/uI ; メーカー表示換算) が検出された施設はなかった。
- 12 施設中 5 施設は 10 倍希釈 (440 GC/uI : メーカー表示換算) まで検出可能であった。

3) CODEHOP-snpPCR 法の反応条件

図 8 に A-L 施設の反応条件の情報を示す。逆転写反応、1stPCR, semi nested PCR 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、同一なのは I、J 施設のみであり、残り 10 施設は各々異なっていた。また同一反応条件ではあるが I、J 間で検出感度に差が見られた。

施設 A,B は 100 倍 (44 GC/ul : メーカー表示換算) 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、1st PCR 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-snPCR 法に用いるプライマーにはイノシンを含むため 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 施設の結果から本比較調査 (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 2,200 GC/ul (メーカー表示換算) 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の同定を行った。その結果、全施設からエンテロウイルス 71 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く。

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 (表 1)。

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 9) 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 9 は 301bp に揃えたアライメント結果を示している。

G 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。1 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 9 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 10)。いずれも標準株 BrCr 株と 75% 以上一致し、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る。

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、少数の調査なら比較的簡便に EQA を実施可能であることが示された。

今般実施した 12 か所であれば、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 人で対応可能である。また宅配便による冷凍輸送利用で費用は 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示された (図 11)。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、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 による検出感度の確認は意義がある。

初年度

ウイルスゲノムを数コピーまで高感度に検出可能な CODEHOP-snpCR 法を用いて手足口病検査を行う場合を想定し、本手法を用いた場合の検査結果について施設間のばらつきを評価する目的で EQA 用試料を検討した。EQA 試料は不活化済み市販 RNA コントロールを想定したが、比較のためウイルス、ウイルス RNA、の条件も検討している。CODEHOP-snpCR 法は定性的にウイルスゲノムを検出する方法であるが、送付方法、濃度、温度環境の諸条件を検討するにあたり、RT-qPCR を併用して、GC 量の変化をモニターしつつ、検討を行うこととした。

市販 RNA を用いた CODEHOP-snpCR 法による検出下限値を調べたところ、メーカー表示換算 99 GC (実測値 70GC) が検出下限値 (感染価にして logCCID50 が 1.5 未満程度) であった。

CODEHOP-snpCR 法で検査を実施する場合、病原体サーベイランスの結果としては血清型の報告を行う。この場合、直接塩基配列決定法によりシーケンス配列を得て、標準株の配列と比較を行い 75% 以上一致した場合、当該血清型とする。

塩基配列解析可能な GC 数は CODEHOP-snpCR 法で検出できる下限値より大きな方が良好な結果を得ることが多く、増幅したバンドが薄い場合、

配列が読めない場合が多いことが知られている。このため検出下限値以下の GC 数では、増幅と配列解析上、再現性にばらつきがあるため、同定目的のルーチン検査では精度管理の対象とするのは現実的ではなく、シーケンス反応が可能な RNA 量、加えて 1 CCID50 以上の感染価相当の GC 数を設定した上で、CODEHOP-snpCR 法によりウイルスゲノムを検出できるかどうか(検出感度)、適切に同定できるか(同定の正確性)、について検討すべきである。

なお塩基配列解析により同定可能な GC 数以下の場合、シーケンス反応が成功しなければ、エンテロウイルス同定不能と報告されるが、疫学的な背景など総合的な評価によりポリオを否定することが感染症法上は重要である。

EQA 用 RNA 試料配布にあたり、施設内変動を把握するため FTA Elute カード、RNAstable、の 2 種類を用いて RNA の安定性について温度、濃度など保管条件を検討した。

FTA Elute カードは先行研究で示したように、高濃度でさえ変動が見られ数%の回収率であるが、ウイルス RNA の場合も同様に数%の回収率であり高濃度なら、RNA 試料輸送用に適用可能と考えられる。これに対し、RNAstable の回収率は 1/3 以上であることが分かり、qPCR 用の 100bp 程度の短いフラグメントならば室温でも数日安定であったが、CODEHOP-snpCR 法用には -30 度保管の方が適切と考えられた。

FTA Elute、RNAstable の操作性、回収率などは図 12 に取りまとめた。CODEHOP-snpCR 法用 EQA に市販品 RNA を用いる場合の保管条件について数日の輸送期間ならであれば、-30 度で安定な結果が得られている。

2 年次

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性がある。

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 (44 GC/uI : メーカー表示換算) まで検出可能であり、10 倍希釈 (440 GC/uI : メーカー表示換算) した試料を検出できた施設が最も多かった。なお 440 GC/uI (メーカー表示換算) 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 $\log_{10} \text{CCID}_{50} < 1.5$ 未満に相当する (図 3)。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 ではゲノム RNA の増幅が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 (440 GC/uI : メーカー表示換算) 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-snPCR 法の反応条件

図 7 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 (440 GC/uI : メーカー表示換算) 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 により得られた情報は、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ため

に還元し、検査の質を改善するために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 (表 1)。方法は異なっても、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 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る。

小児科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 13)。

このためエンテロウイルス同定において、報告上の問題がなくとも、同定に用いる塩基配列の波形データは、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し、必要に応じて機材の保守管理など、2 類感染症である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) を用いた波形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 を 100 倍希釈で検出可能だった A、B 施設は、増幅産物を用いてシーケンスを行ったところ、10 倍希釈 (440 GC/ul : メーカー表示換算) と 100 倍希釈では多型サイトの違いが認められている (図 14)。

今般の EQA により回答を得た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は得難いこと、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、商用カタログ上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す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、国内外の EQA プロバイダが提供する参加費用と原価は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 ならば、外部委託などで実施することも可能かもしれない。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に基づき、検査の質の確保を求めている。類型に基づき、整備すべき検査標準作業書 (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 類など感染症検査と国民に情報提供を行う 5 類定点把握疾患では、求め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としても、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の検出感度、同定に必要な遺伝子解析の精度は、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判断することになる。

ポリオ検査に対応した検出感度、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管理、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、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。 また調査結果を地方衛生研究所間で共有すべきである。

3 . EQA による遺伝子検査結果の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は得難いこと、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還元すること、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べきかもしれない。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。

G. 研究発表

1. 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) 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, 2016.

3) 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.

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.

2. 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 平成 28 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 平成 29 年 10 月 11 日 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 平成 29 年 10 月 24 日 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 平成 29 年 11 月 8 日 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 平成 29 年 11 月 10 日 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

本公衆衛生学会平成 29 年 10 月 31-11 月 2 日 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 平成 29 年 10 月 31-11 月 2 日 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平成 29 年 10 月 31 日-11 月 2 日 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 2017 平成 29 年 11 月 24-26 日 東京

H. 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

(参照文献)

- 1) 平成 25 年度厚生労働科学研究「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」(宮崎班) 分担報告書
- 2) Nix WA. et.al: J Clin Microbiol 44(8): 2698-2704 .2006.
- 3) Nijhuis M. et.al: J Clin Microbiol 40: 3666-3670 .2002.
- 4) Li Y. et.al. :J Virol Methods 186:62-67,2012.

図1 配布試料の調製条件

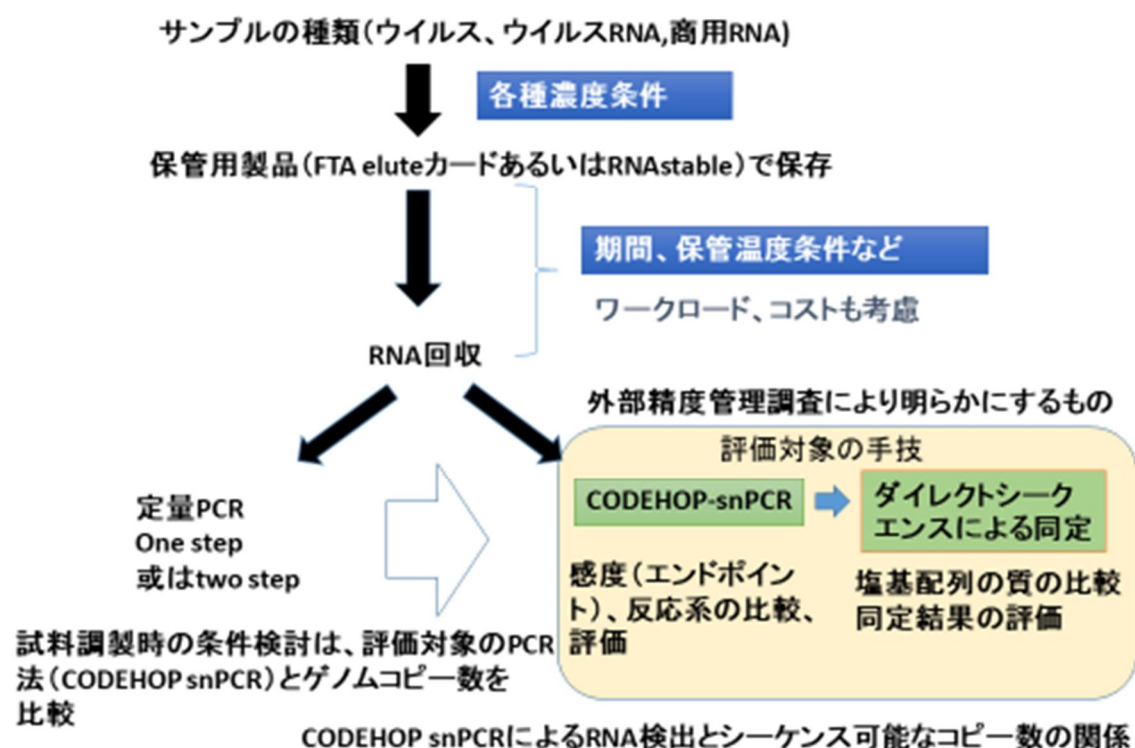


図2 手足口病EQA試料の作成

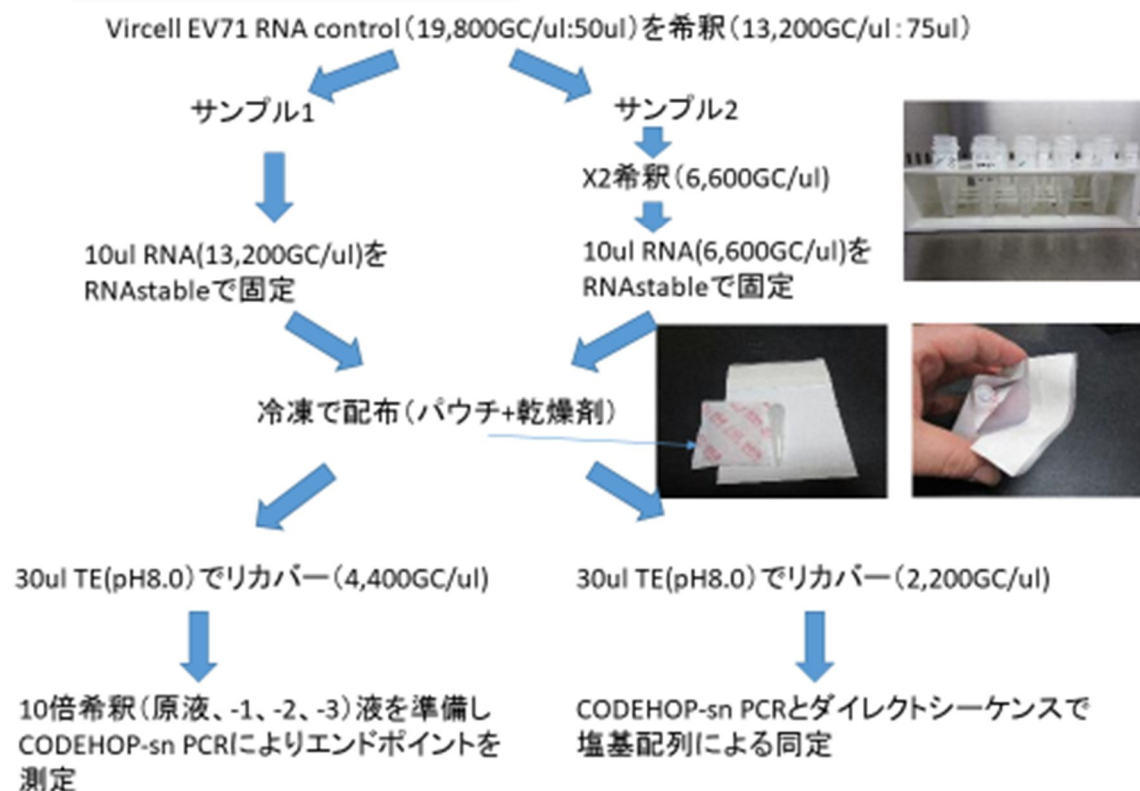


図3

ウイルス力価と検出系について

ウイルス希釈	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵	10 ⁻⁶	10 ⁻⁷	10 ⁻⁸	
Virus titer (-logCCID50 /50ul)	6.5	(5.5) 相当	(4.5)	(3.5)	(2.5)	(1.5)	(0.5)	(-0.5)	(-1.5)
vRNA (GC/ul)	ND	ND	6.8E +05	6.4E +04	5.6E +03	6.4E +02	6.0E +01	6.8E +00	不検出
CODEHOP- snPCR	ND	ND	++++	++++	++++	++++	+++	++	+

	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Vircell RNA希釈液(理論値 2.0E+04/ul)	ND	1.4E (7.0E +02 +01)	(3.5E +01)	4.4E 1.5E +00 +00)
CODEHOP-snPCR	++++	+++ +	+/-	-

シーケンス反応の下限10²~10³ GC/ul

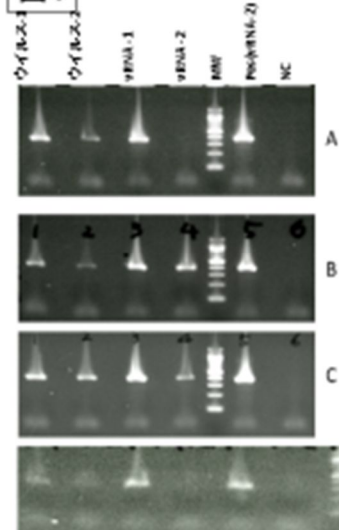
CODEHOP-snPCRの検出限界

CODEHOPの評価なら
数千以上のGCが検出できること
を目安としてはどうか

ウイルスゲノムは検出できても
シーケンスは不可→遺伝子による同定
は不可(エンテロNTとして報告)

エンテロNTは感染価を含めポリオ否定が重要
(個票を含め総合的な判断が必要)

図4



FTALeute 回収結果(4人で実施)

FTALeuteカードから回収したRNAのCODEHOP PCRの結果
(固定1日後、4度保管の条件)

	Virus (6.5CCID50)		vRNA		Pos vRNA	NC
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻²	
A	++++	++	++++	-	++++	-
B	++++	++	++++	++++	++++	-
C	++++	++++	++++	++	++++	-
D	++++	++	++++	-	++++	-

ウイルスの方が比較的安定。-2のvRNAを回収時、不安定

回収したウイルス、ウイルスゲノムのコピー数(GC/ul)

コントロール のGC/ul	Virus		vRNA		Recovery (%)	Recovery (%)
	-1	-2	-1	-2		
vRNA						
copy/ ul	2.3E +06	1.8E +05	4.0E+02	undetect	0.0	NA
Ct	18.4	22.1	6.3E+04	6.3E+03	2.7	3.5
			1.2E+05	undetect	5.3	NA

*CODEHOPによる検出では強いバンド

図5

RNA stableを用いたRNA安定性の確認

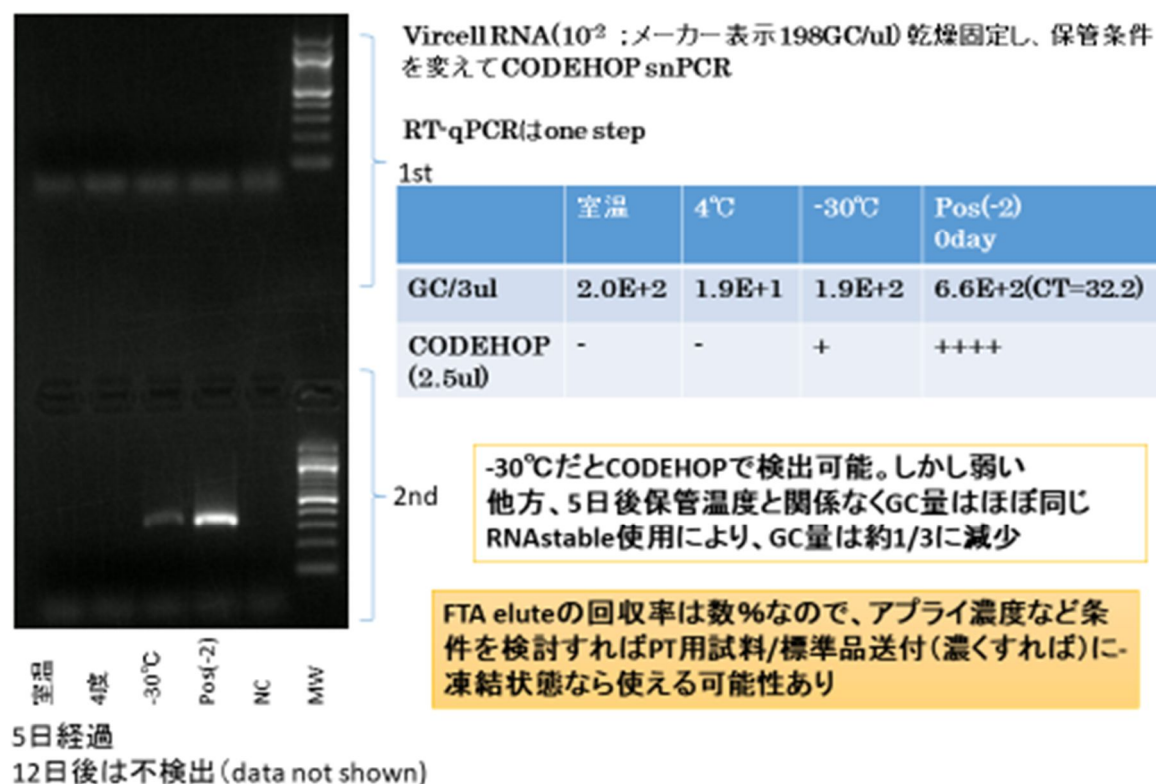
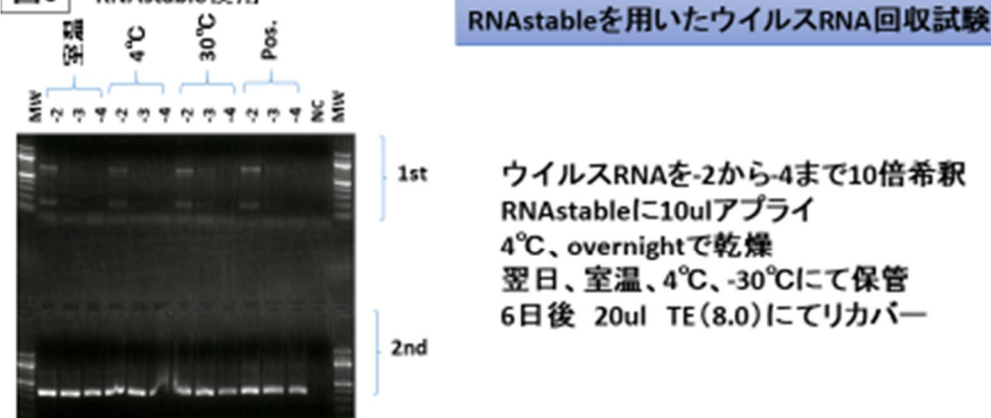


図6

RNAstable使用



希釈したウイルスRNAと保管温度の関係 (GC/ul)

Virus dilution(x10)	control			RNA stable (6days)		
	vRNA	Ct	1/2vRNA	RT	4°C	-30°C
-2	3.0E+05	21.0	1.5E+05	1.4E+05	1.5E+05	1.3E+05
-3	1.6E+04	25.3	0.8E+04	1.4E+04	1.5E+04	1.3E+04
-4	2.8E+03	27.7	1.4E+03	1.3E+03	1.4E+03	1.4E+03

10ulアプライし、20ulでリカバーするといずれの温度環境下でも6日後は、非常に安定していた (CODEHOPの結果、コピー数とも)

GC量が 10^3 以上なら安定する模様

図7

CODEHOP-snPCRによるRNA検出エンドポイント比較

- あらかじめ約4,400GC/ul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

- 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。

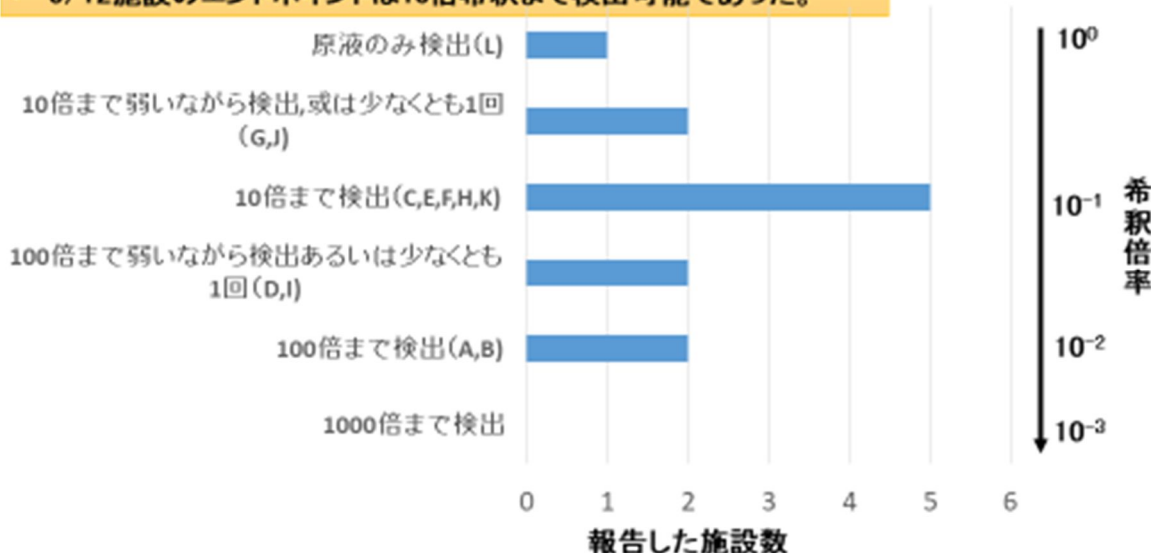


図8 反応系の違い(同じ酵素は同一の色で示す) オリジナルの系(I,J)

RT	反応条件			1st PCR			反応条件			Ramp 64°C以上は Ramp 0.4°C/sec	cycle 数	2nd PCR			反応条件			cycle 数
	総量 (ul)	RNA量 (ul)	酵素	総量 (ul)	DNA量 (ul)	酵素	pre	d	a			e	総量 (ul)	1st PO 量(ul)	R(ul)	酵素	pre	
A	20	100	42: 355 18: 15 x 00	25	5	95: 168-142:3 72:5 18: m 0x 0x 0x 00				40	25	1	95: 168-168-372:1 72:5 18: m 0x 0x 0x 00				40	
B	20	100	37: 355 15 x 00	25	5	95: 595-342-358:45 68:5 m 0x 0x 0x 00				40	50	1	95: 695-268:72-1572:5 m 0x 0x 0x 00				40	
C	10	50	22: 45495:5 15 x 4:00	25	5	95: 284-342-358:45 m 0x 0x 0x 00			4:00 30x	40	25	2	95: 284-258-272:1 0x 0x 0x 00				4:00 40	
D	10	50	22: 42695:5 19 0m m 4:00	25	5	94: 185-342-358:45 m 0x 0x 0x 00			4:00 30x	40	25	0.5	94: 185-268-272:15 m 0x 0x 0x 00				4:00 40	
E	25	12.50	22: 42695:5 19 0m m 4:00	25	2.5	94: 284-342-372:45 72:5 m 0x 0x 0x 00			4:00	40	25	2.5	94: 284-268-372-3872:5 m 0x 0x 0x 00				4:00 40	
F	15	50	55478:1 5m 5m 4:00	25	5	95: 595-342-372:45 72:5 m 0x 0x 0x 00			4:00	35	25	1	95: 595-268-372-3872:5 m 0x 0x 0x 00				4:00 35	
G	10	50	59: 41695:5 1m 0m m 4:00	50	10	94: 342-372:45 m 0x 0x 0x 00			4:00	40	20	10	94: 368-272:15 0x 0x 0x 00				4:00 40	
H	20	100	37: 355 15 x 4:00	25	5	95: 342-358:45 m 0x 0x 0x 00			18: 00	40	25	1	95: 695-268-272:15 m 0x 0x 0x 00				18: 00 40	
I	10	50	22: 42695:5 19 0m m 4:00	50	10	95: 342-358:45 m 0x 0x 0x 00			28: 00 30x	40	50	1	95: 695-268-272:15 m 0x 0x 0x 00				00 40	
J	10	50	22: 42695:5 19 0m m 4:00	50	10	95: 342-358:45 m 0x 0x 0x 00			4:00	35	50	1	95: 695-268-272:15 m 0x 0x 0x 00				4:00 35	
K	5	2.50	22: 42695:5 19 0m m 4:00	25	5	95: 595-342-372:45 72:5 m 0x 0x 0x 00			4:00	40	25	1	95: 695-268-272:15 m 0x 0x 0x 00				4:00 40	
L	15	50	55478:1 5m 5m 4:00	24	4	95: 595-342-372:45 72:5 m 0x 0x 0x 00			4:00	35	24	4	95: 595-268-372-3872:5 m 0x 0x 0x 00				4:00 35	

① PrimeScrip RT reagent Kit (Perfect Real Time) (Takara)
 ② SuperScript III (000 U/ul)
 ③ SuperScript II (200 U/ul)
 ④ ANV Reverse Transcriptase XL (500 U/1.5) (TOYOBO)

⑤ Takara Taq Hot Start Version (SU/a) (Takara, PR007A)
 ⑥ Takara Ex-Taq Hot Start Version (SU/a) (Takara, PR006A)
 ⑦ Taq DNA Polymerase, SU/ul (シグマ)
 ⑧ General Amp PCR Master Mix (Takara)
 ⑨ General Amp MAX PCR Master Mix

⑩ Prime Ex-Taq Hot Start version (SU/a) (Takara)
 ⑪ FastStart Taq DNA Polymerase, SU/a (シグマ)

表1 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

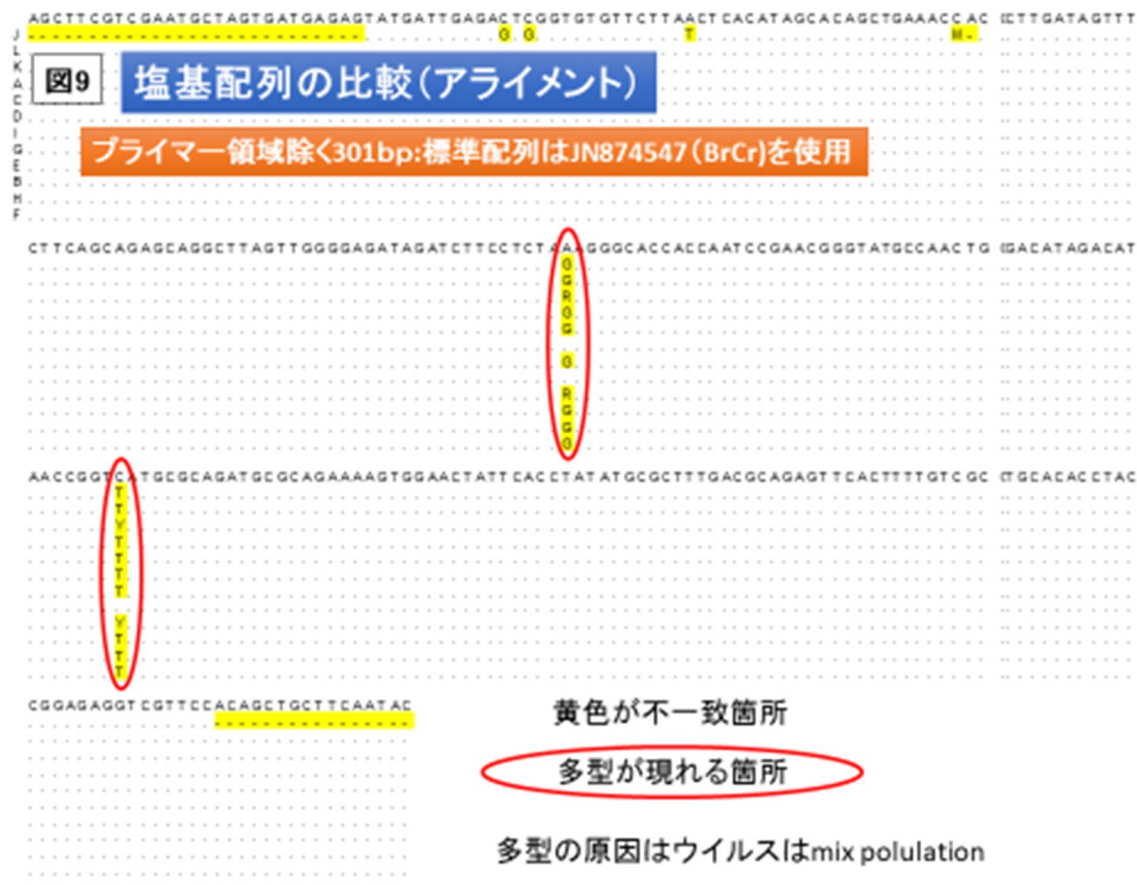


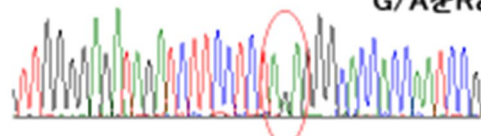
図10 波形データ

多型が見られるサイトの報告例

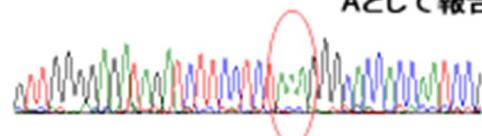
④多型が見られないケース

①多型として報告しているケース

G/AをRとして報告



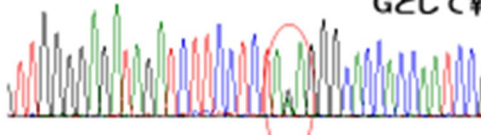
Aとして報告



②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

TTGGGGAGATAGATCTTCTCTTAAGAGGGCCACCAATCCG

Gとして報告



波形データの比較より

同一部位になぜ多型が現れるか？

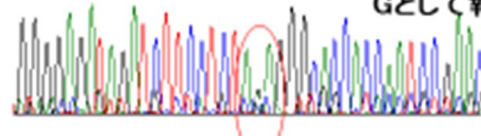
→ウイルスはMix population であることに留意

シーケンスコントロール (Sequencing standards) と比較することでバックグラウンドが高い原因と特定することも考慮

③バックグラウンドが高く判定困難

TTGGGGAGATAGATCTTCTCTTAAGAGGGCCACCAATCCGAAAC

Gとして報告



同定には影響がなくとも、1塩基置換が重大な結果に反映することを留意

反応系、機器のコンディション等、原因の特定と改善を検討する

図11

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

Biomatrix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12

検体保管・輸送に用いる各種製品の評価のサマリー

	RNA固定	RNA回収	回収率	価格	温度安定性
FTA elute card (40ul)	容易 3hrs	容易 (数十分)	ばらつく (高濃度に すること)	450円 (40ulx4サークル:1サークル)	数日なら室温OK
FTA カード (125ul)	容易 1hrs	抽出キット 要。煩雑	Not done	555円/枚 (125ulx1サークル)	Not done
RNAstable (10-20ul)	容易 Over night	容易 (15 分)	安定	1560円 (チューブ)	市販RNAは乾燥状態なら凍結すれば非常に安定 (短い領域を用いるqPCR用なら室温でも1週間以上安定)

図13

エンテロウイルス塩基配列に求められる質について

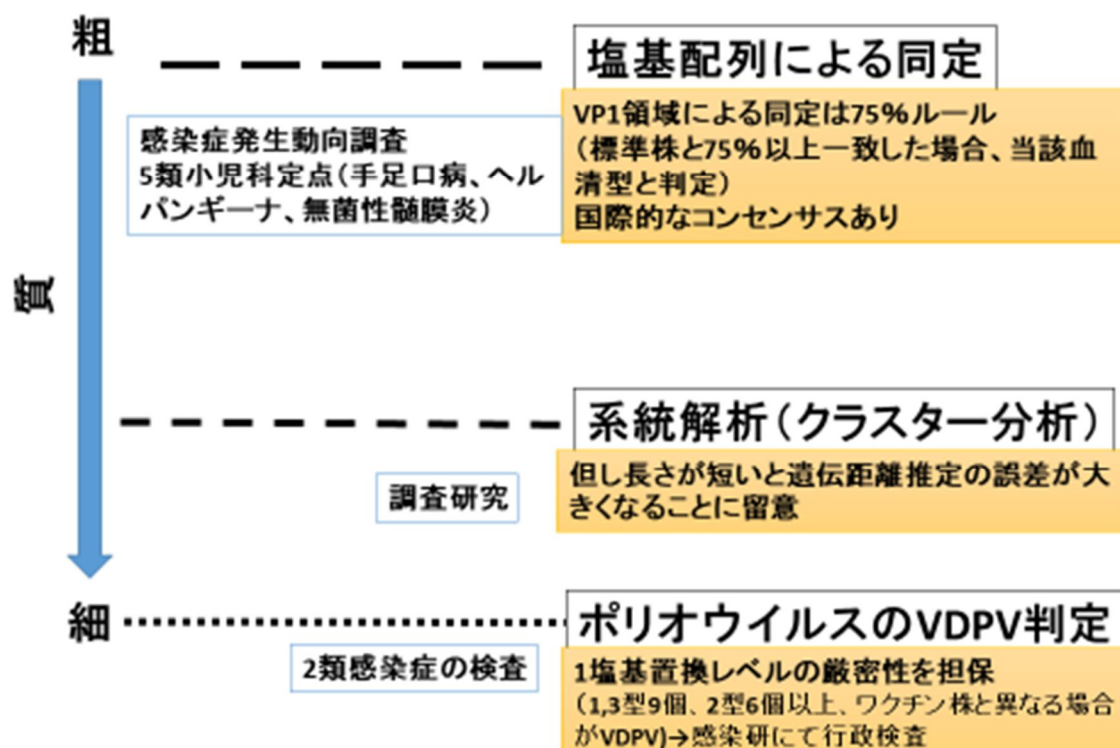
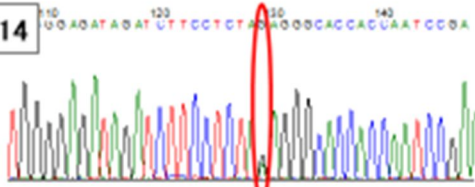
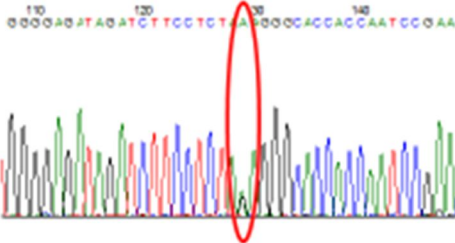


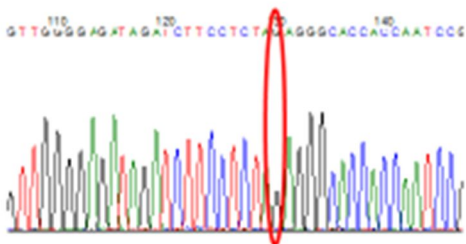
図 14



Sample 2 (2,200GC/u)を増幅



Sample 1を10-1希釈(440GC/u)で増幅



Sample 1を10-2希釈(44GC/u)で増幅

試料の濃度が塩基配列解析に与える影響

B施設の例

サンプル1,2は同じ試料
サンプル1 約4,400GC/u
サンプル2 約2,200GC/u

G>A
(R)

A>G
(R)

濃度による違いでG/A→G



ウイルスはmix populationである

G

A施設はいずれの濃度も多型
は出現せず
2200GC (G), 440GC(G), 44GC(A)

別添資料 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)でお願いします
- 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。

イ. 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 でリカバーすると約 4400GC/ul) 1本

Sample 2: 塩基配列による同定用試料 (TE 30ul でリカバーすると約 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)。

*Buffer 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 <u>2.5 μl</u> + vRNA <u>2.5 μl</u>

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)

別添4 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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
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.	Scientific Reports	6	31474	2016
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(7)	949-956	2016
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る予防医学に関する知見	東京小児科医学会報	36(1)	26-30	2017
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
皆川洋子	地方衛生研究所の役割	臨床とウイルス	印刷中		(2018)

. 資 料

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) Vol. 38 p.199-200: 2017 年 10 月号)

急性灰白髄炎 (ポリオ)、手足口病等のエンテロウイルス感染症の多くは不顕性である。このうちポリオに関しては既にワクチンが開発されており、わが国でも長年にわたり経口生ポリオワクチン (OPV) が使用されてきた。定期接種用ワクチンとして不活化ポリオワクチン (IPV) へ切り替えた 2012 年 9 月以前は、小児科定点把握疾患を対象とした病原体サーベイランス (感染性胃腸炎、手足口病等の検査) によって、OPV 接種時期 (春、秋) に紛れ込みと考えられるポリオウイルスワクチン株が恒常的に検出されていた。

手足口病等のエンテロウイルス感染症の検査はポリオウイルス検査と共通の手技が多く、ルーチン検査を行うことで、ポリオ検査体制の維持にも貢献している。

感染症発生動向調査は 1981 年より国の予算事業として始まり、1999 年の感染症法制定に伴い法定化された。感染症法では疾患を類型で分類し、主にエンテロウイルス感染が起因となる疾患は、2 類感染症として急性灰白髄炎 (ポリオ)、5 類定点把握対象疾患には手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎が含まれている。これらのウイルス検査は、主に自治体が設置した地方衛生研究所 (地衛研) 等が担当している。

5 類定点把握対象疾患は、患者数が多く全数把握が困難なため、定点報告にて発生動向を把握し、各自治体は積極的疫学調査の一環で、病原体定点医療機関を受診した患者の一部より提供を受けた検体に対して検査を行いウイルスの流行状況を監視してきた。しかし、事業開始から 4 半世紀以上経過し、検査体制を取り巻く状況も変化している。その結果、各自治体において病原体サーベイランスの取り組み方に差がみられるようになってきた。

2014 年の感染症法改正では感染症の情報収集強化を目的とし、病原体サーベイランスに法的根拠が付与された。同時に収集した検体には知事による検査義務が生じ、一定の信頼性が求められることとなっている。

改正ではポリオを含む 2 類感染症の検査は、迅速な危機管理対応が必要なことから、知事による検体の提出要請、採取措置などの措置が新たに規定されるとともに、入手した検体に対する検査の質確保の取り組みが省令で定められている。また、「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」¹⁾ では感染症法に基づき検査を行う地衛研等を対象とした業務管理が規定された。

要領には、標準作業書 (SOP) として検査 SOP、検査の信頼性確保試験 SOP の他、試薬等管理、培養細胞管理、機械器具保守管理、検体取り扱いに関わる各 SOP の作成要領とそのひな形が含まれており、これらの技術文書作成の他、組織、研修等の体制を整備し、組織として検査の質を確保するための必要な項目が記載されている。

一方、地衛研の設備、人員配置などの検査体制は設置自治体等により大きく異なるため、各々の状況に合わせた検査体制を整備することが想定されている。

また、感染症法の類型により、整備すべき SOP の種類が異なる旨、省令で規定された。すなわち、ポリオウイルス検査の場合、まん延防止の観点から偽陰性対策を念頭に置きつつ、要領に基づき各種技術文書の整備、検査の信頼性評価、内部監査体制等の検査体制を整備する必要がある (表 1)。

他方、エンテロウイルス血清型等の情報収集を主目的とする手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎の検査には、必要最小限の技術文書 (検査 SOP、検査の信頼性確保試験 SOP) を作成し、自治体の調査目的に合致した検査体制を各地衛研等に整備することとしている。つまり各地衛研で実施するウイルス検査方法は異なることから、各々の検査体制に応じて、結果の妥当性を担保することとなる (表 2)。

今般、感染症発生動向調査実施要綱において定点把握疾患の病原体サーベイランスについても改訂されている²⁾。病原体検査の業務管理要領で検査結果の質を担保し、実施要綱で病原体定点の選定、報告時期など、一定の基準を示すことで、手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎の起因ウイルスの流行像をより適切に把握できるよう内容が変更されている。こうして得られた結果は疫学的な解析により自治体の感染症対策に用いられることが期待されている。

このように一定の採取基準により収集された検体と検査の質が担保された結果は、感染症サーベイランスシステム (NESID) 登録を通じて、全国レベルの起因ウイルスの流行状況に反映されることとなる。

改正感染症法完全施行 (2016 年 4 月) から 1 年半経過したが、エンテロウイルスに限らず、病原体検査法は変化してゆくため、検査の信頼性確保の取り組みについても、衛生微生物技術協議会等の機会を通じ関係者間で情報共有し、検査の質を維持する必要がある。

資料

1) 「検査施設における病原体等検査の業務管理要領の策定について」健感発 1117 第 2 号平成 27 年 11 月 17 日

2) 「感染症発生動向調査事業実施要綱の一部改正について」健発 1109 第 3 号平成 27 年 11 月 9 日

国立感染症研究所 吉田 弘

岩手県環境保健研究センター 高橋雅輝

福岡県保健環境研究所 濱崎光宏

愛媛県立衛生環境研究所 山下育孝* 四宮博人 (*現 愛媛県宇和島保健所)

愛知県衛生研究所 山下照夫** 皆川洋子 (**現 修文大学)

埼玉県衛生研究所 岸本 剛

山口県環境保健センター 調 恒明

表1. 作成が求められる標準作業書(SOP)の種類とエンテロウイルス感染症との関係

	2類感染症 (ポリオ)	5類定点把握疾患 (手足口病、ヘルパンギーナ、無菌性髄膜炎)
検査SOP	○	○
試薬等管理SOP	○	
培養細胞管理SOP	○	
機械器具保守管理SOP	○	
検体取扱SOP	○	
検査の信頼性確保試験SOP	○	○

感染症法第14条の2、15条の4、16条の3、26条の3、26条の4、44条の7に基づき都道府県、保健所を設置する市および特別区が行う検査に適用する。
 病原体の探索等に係る検査については、業務管理要領を適用しないことができる。
 業務管理要領にSOPのひな形を参考資料として添付(施設における必要性や実情等に合わせ、検査施設ごとに作成)



表2. エンテロウイルス検査における信頼性確保(内部精度管理)の取り組みの例

ウイルス分離、同定

- ウイルスカ価測定による培養細胞の感受性確認
- 培養細胞のマイコプラズマ否定試験
- 中和試験におけるバックタイトレーションによる妥当性評価
- その他

遺伝子検査(塩基配列による同定)

- プライマー調整時のコンベンショナルPCRの感度確認
- 検査ごとの陽性、陰性コントロールの設定
- その他



資料 2) 学会発表

皆川洋子、伊藤雅、吉田弘：パネルディスカッション I 地衛研におけるポリオ検査。衛生微生物技術協議会第 38 回研究会（2017.6.21 東京）

(抄録)

地衛研におけるポリオ検査

愛知県衛生研究所
皆川 洋子、伊藤 雅
国立感染症研究所 ウイルス第二部
吉田 弘

2012 年 9 月に定期接種が経口生ポリオワクチン(OPV)から不活化ワクチン(IPV)に切替えられるまで、地衛研に持ち込まれる感染症発生動向調査等の糞便や環境水（主に流入下水）検体からの OPV 検出は珍しくなかった。病原微生物検出情報(IASR)によれば、野生株ポリオウイルスの検出報告もあり、1980 年（長野県）及び 1984 年（愛知県）には 1 型野生株の、1993 年（滋賀県）には 3 型野生株の分離が報告されている。IPV 切替え後環境水からの検出は徐々に減り、2012 年 10 月以降に生ポリオウイルスを扱う機会は、流行予測調査（感受性調査）における中和抗体試験にほぼ限定されている。

二類感染症かつ Vaccine Preventable Disease (VPD)の「急性灰白髄炎」病原ウイルスは、ウイルスサーベイランスや健康危機事例対応に従事する多くの者にとって、特に重要な存在になっている。

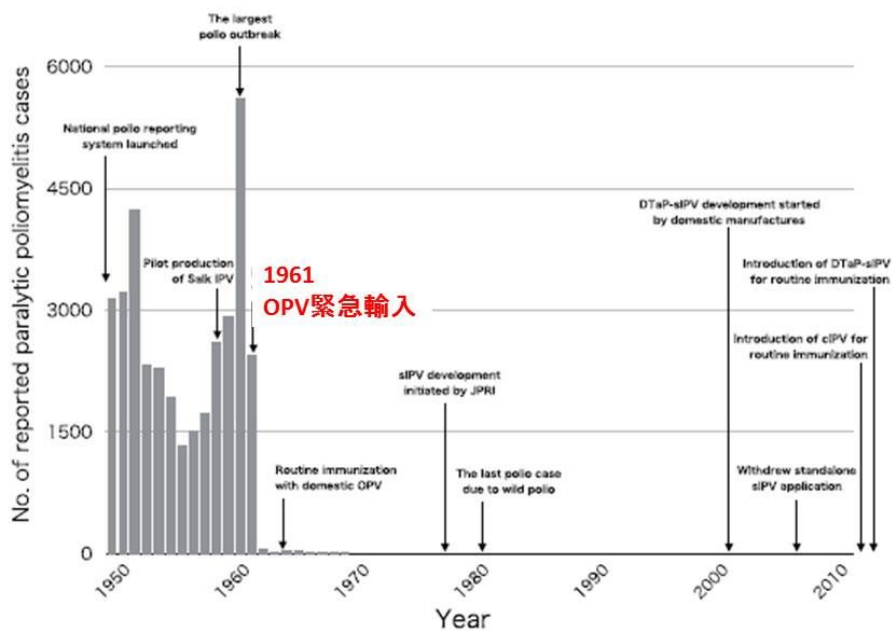
エンテロウイルス D68(EV-D68)流行に伴う急性弛緩性麻痺(AFP)の発生：EV-D68 は呼吸器感染症の病原ウイルスとして 2010 年と 2013 年に 100 例以上の報告があり、2010 年（山形県）と 2014 年（広島県）に AFP 患者もみられている。2015 年秋には EV-D68 による気管支喘息を主体とする呼吸器疾患の発生が増えるとともに AFP 患者が 20 例以上把握された。EV-D68 陽性事例検体搬入は、愛知県衛生研究所にはなかったが、AFP 事例をサーベイランス（感染症発生動向調査）の一環として受け入れる可能性について、県内医大等関係者と議論した。

中国や東南アジアにおけるエンテロウイルス 71(EV-71)流行に伴う麻痺あるいは死亡報告：幸い国内から重症例の報告はほとんどないが、アジアから毎年のように報告があり、病原体サーベイランスにより国内におけるエンテロウイルスの動向を把握する必要性を、再認識する機会となっている。

感染症法に基づき都道府県等が実施する検査について、平成 28 年に国の外部精度管理事業が開始され、外部精度調査の定期的かつ継続的实施が期待される。地衛研が担当するポリオウイルス検査は、感染研との役割分担等を考慮しつつ、輸入事例に対する備えとして今後も精度の維持向上が必要と考えられる。昨年度発足した「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(H28-健危-一般-002)」班ウイルス小班で検討中の、市販品の活用を視野にウイルス核酸検体を用いた外部精度調査システム構築をめざして手足口病の病原体エンテロウイルスを用いた（ポリオウイルス検査精度の維持向上も念頭においた）試行についても紹介したい。

第38回衛生微生物技術協議会研究会
 パネルディスカッションI ポリオ根絶に向けて:
 2 地衛研におけるポリオ検査

- 1 感染症発生動向調査における検出
環境水サーベイランス
- 2 急性弛緩性麻痺(AFP)対応
2015年EV-D68対応をふりかえって
- 3 地衛研におけるポリオウイルス検査の今後
改正感染症法施行に伴う変化 ⇒検査精度の確保
二類感染症 病原体検査
地研の課題



日本における麻痺型ポリオ報告数 (Shimizu 2016)

地衛研におけるポリオ検査

1 野生ポリオウイルス株の検出(～1993年まで)

(地衛研で分離→感染研で最終決定)

1980年 長野県 1型 ←麻痺型からの最後の分離報告

1984年 愛知県 1型

1993年 滋賀県 3型 ←最後の野生株分離報告

2000年 WHO西太平洋地域(WPRO) ポリオ根絶宣言

2012年 国内定期予防接種 OPVからIPVに移行

Vol.6 (1985/1[059])

<国内情報>

“ポリオウイルス1型野生株”愛知県に出現

愛知県で昭和59年6月7日に脳炎症状を伴った7歳女児の咽頭ぬぐい液からポリオウイルス1型が分離され、行政検査の依頼が予研腸内ウイルス部にあった。検査の結果、rctマーカーは(+)、血清学的には非ワクチン様を示し、フィンガープリント法によるRNA解析で、TIRNaseオリゴヌクレオチド・マップはセビン株と完全に異なることが判明した。そこで、われわれはこの分離株を野生株と断定した。野生株が分離されてすでに6ヶ月以上も経過し、その間に周辺でのポリオ患者の発生もみられなかったため、現在は防疫上での問題は無い。しかし、分離された野生株の由来については検討する必要があるため、地研を通じ愛知県衛生部へ患者についての疫学調査を依頼した。

予研 腸内ウイルス部 原 稔

感染症発生動向調査におけるポリオウイルス検出成績 (2006～15年・愛知衛研)

年	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
PV-1	9	12	4	1	2	4	2	0	0	0
PV-2	6	12	6	8	1	4	7	0	0	0
PV-3	13	9	7	1	3	3	5	0	0	0
PV小計	28	33	17	10	6	11	14	0	0	0
参考: 感染性胃腸炎患者からのウイルス検出状況										
患者数	503	430	267	243	338	227	313	277	299	228
RV A	38	54	26	19	14	62	73	75	7	26
NV-GI	3	4	6	1	6	2	2	1	2	31
NV-GII	84	61	30	70	141	71	136	82	100	94
SV		14	3	1	2	9	10	9	4	9
AstV				1	13	9	6	3	1	6
Ad-41	10	8	18	11	20	4	10	13	13	9
HPeV-1	1	3	4	3	1		3		1	1

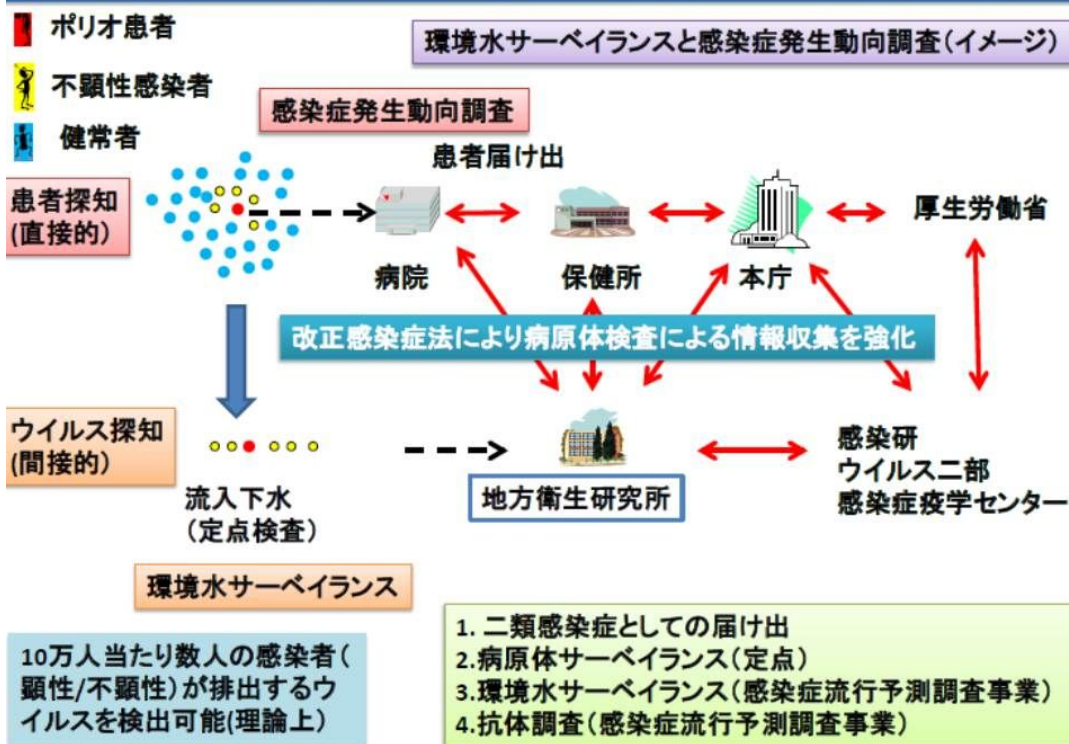
PV:ポリオウイルス、RV A:ロタウイルスA、NV:ノロウイルス、SV:サポウイルス、
AstV:アストロウイルス、Ad:アデノウイルス、HPeV:ヒトパレコウイルス

流入下水からのウイルス分離(2016年・愛知県)

1月	2月	3月	4月	5月	6月	7月	8月	9月	10月	11月	12月
	CB3(4)	CB3(3)		CB3(7)	CB3(9)	CB3(8)		CB3(5)			
CB5(6)					CB5(2)	CB5(9)	CB5(12)	CB5(2)	CB5(4)		CB5(2)
						E3(1)	E3(1)			E3(9)	E3(2)
	E6(1)	E6(1)		E6(3)	E6(8)	E6(9)	E6(3)	E6(4)	E6(8)	E6(1)	E6(10)
							E11(2)				
AD(1)	AD(3)	AD(1)	AD(6)							AD(2)	AD(3)
Reo(5)	Reo(6)	Reo(1)	Reo(2)	Reo(5)	Reo(1)		Reo(1)	Reo(5)	Reo(6)	Reo(9)	Reo(6)

CB:B群コクサッキーウイルス
 E:エコーウイルス
 AD:アデノウイルス、Reo:レオウイルス

4.不活化ワクチン(IPV)切り替え後のポリオのサーベイランス(日本)



2 急性弛緩性麻痺(AFP)対応-2015年 EV-D68流行

・「ポリオ様麻痺」にどのように対応すべきか？

全国地衛研が対応するには、感染症法に基づく検査である必要

急性灰白髄炎(二類)

脳炎(五類全数報告対象)？



エンテロウイルスD68型が検出された、急性弛緩性脊髄炎を含む8症例ーさいたま市

(掲載日 2015/10/15)

エンテロウイルスD68型(EV-D68)は、2014年秋に米国で呼吸器疾患1,153例(2014年8月中旬～2015年1月15日)のアウトブレイクへの関与で注目されているウイルスである¹⁾。米国では同時期に急性弛緩性脊髄炎が120例(2014年8月～2015年7月)と多発し、その一部の呼吸器検体からEV-D68が検出され、関連が疑われている²⁾。2014年秋は欧州でも呼吸器検体からEV-D68を検出した急性弛緩性脊髄炎3例が報告された³⁾。

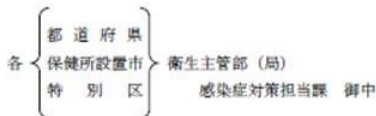
日本では2010年に山形で1例(咽頭ぬぐい液検体)⁴⁾、2014年に広島で1例(気管内吸引液検体)⁵⁾、EV-D68を検出した急性弛緩性脊髄炎の報告があった。急性弛緩性脊髄炎は頻度の少ない合併症だが、発症すると麻痺が残存する。

2015年9月には東京都での4例(気管内分泌物検体2例、鼻咽頭ぬぐい液検体2例)⁶⁾をはじめ、呼吸器症状を伴うEV-D68の流行が全国的に確認された⁷⁾。当院でも8例の咽頭ぬぐい液検体からEV-D68を検出した。うち1例が急性弛緩性脊髄炎のため、呼吸器症状の7例とあわせて報告する。なお、以下の気管支喘息の発作について、大発作とは自らの呼吸努力のみでは呼吸を維持できず入院加療が必要な重篤な状態、小発作とは身体症状が軽度で外来加療で済む状態を指す。

事務連絡

平成27年10月21日

2015年10月 協力依頼
～12月31日まで



厚生労働省健康局結核感染症課

急性弛緩性麻痺 (AFP) を認める症例の実態把握について (協力依頼)

標記について、今年8月以降、小児を中心にポリオ様麻痺に類似した原因不明の急性弛緩性麻痺(AFP: Acute Flaccid Paralysis)の症例が相次いで国立感染症研究所(以下「感染研」という)に報告されており、その一部にエンテロウイルスD68(EV-D68)が咽頭スワブから検出される例が含まれていました。

また、EV-D68については、昨年米国において、EV-D68感染に伴う小児の重症呼吸不全症例が1,000例を超えて報告され、その一部に、急性弛緩性麻痺症状が見られたとの報告がありました。

日本においては、平成17年以降、主に呼吸器症状を呈する患者の検体から、EV-D68が検出された症例が200例以上報告されていますが、急性弛緩性麻痺を呈する症例はほとんど報告されていませんでした。

感染研及び日本小児科学会等の専門家の見解では、標記症例については、届出疾患であるポリオとの鑑別が必要であること、また、米国の事例を踏まえれば、ポリオウイルス以外の感染症の可能性も示唆されること等から、本件に関する原因究明のための実態調査が重要とされており、

以上の状況を踏まえ、当分の間、本件に係る調査を積極的疫学調査の一環として感染研にて行うこととしましたので、貴課におかれましては、以下の対応につき御協力いただくとともに、関係機関に周知いただけますよう、よろしくお願ひします。

EV-D68を想定した検体採取

2015年11月18日
県内4医大小児科に説明

◎厚生労働省結核感染症課からの平成27年10月21日付事務連絡に基づく採取は、保健所による積極的疫学調査の一環

→検査実施の是非について保健所(あるいは行政本庁)が判断

○まずポリオの鑑別(最終判定には時間を要す)、
並行して他病原体の同定

○感染研-地衛研ネットワーク(エンテロウイルスレファレンスセンター)連携があり、感染研から検査法等情報提供あり。

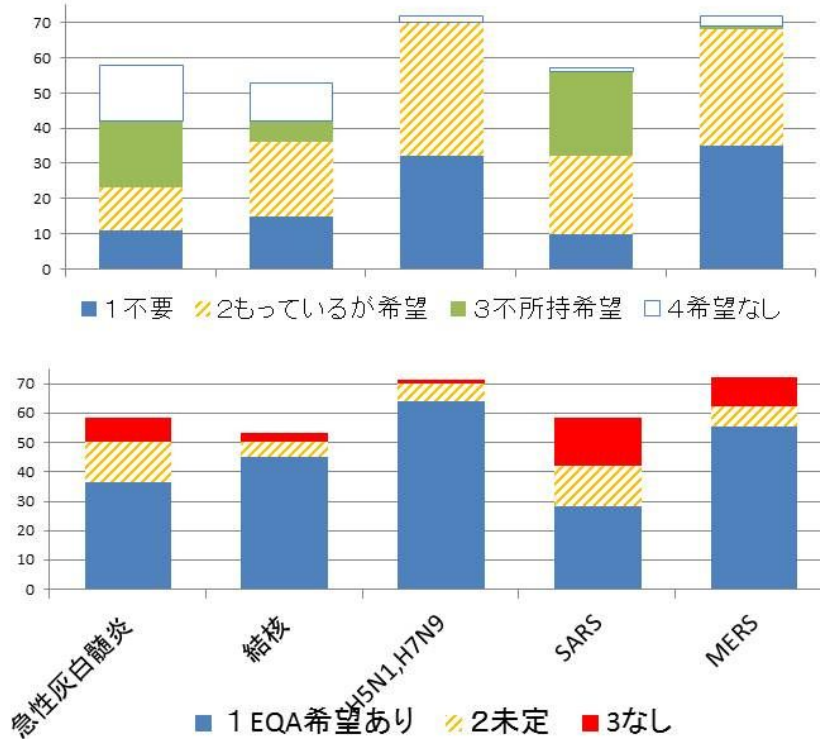
(検体)

- ・局所(気道拭い液等呼吸器由来検体)・糞便
- ・ウイルス血症(EDTA加血、脳脊髄液、尿等)
- ・EV-D68は糞便の陽性率は低いがポリオは高いので検査が必要
- ・ウイルス分離には凍結融解を避けるほうがよい
- ・ペア血清の保存が望ましい

3 地衛研におけるポリオウイルス検査の今後

- ・改正感染症法施行に伴う変化 ⇒検査精度の確保
二類感染症 病原体検査
- ・PV暴露業務(中和抗体価測定・環境水サーベイランスを含む病原体検索)担当職員への予防接種?

H28項目小班アンケート-9A
(3)標準品-EQA参加希望 二類感染症



「手足口病」ウイルス検出の精度調査(私見)

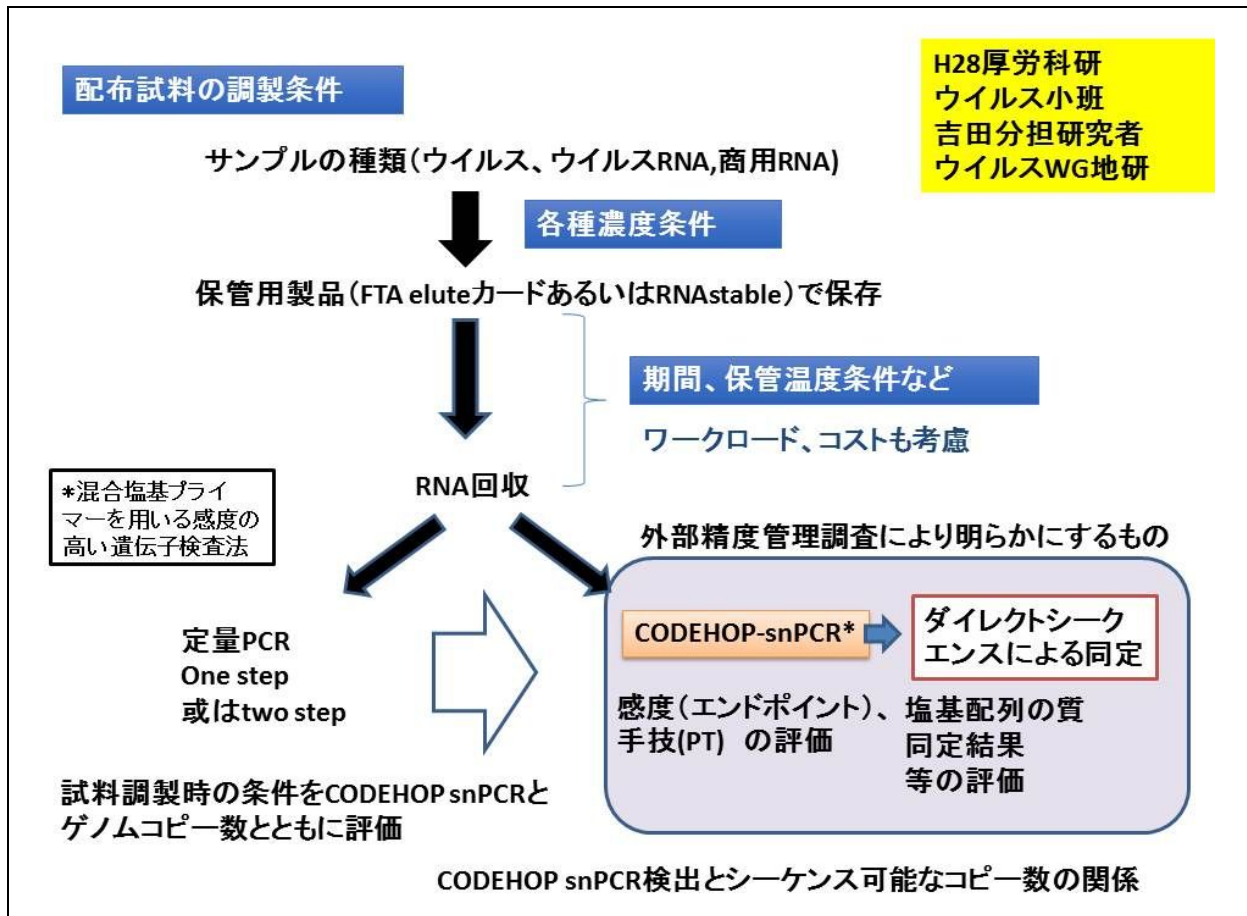
(病原体の選択)

- ・五類感染症発生動向調査に精度管理が必要?
- ・ポリオ(二類感染症)対応への備えとして?
- ・エンテロウイルスのみ? ピコルナウイルス全般? 他のウイルスも視野に?

(手法)

- ・ウイルス分離
← 検体配付法から要検討
- ・遺伝子検出、型別
← 検出法は各機関が工夫
統一されていない
CODEHOP法
その他の遺伝子検出型別
次世代シーケンサー

発生動向調査対象とするウイルス エンテロウイルス エンテロ以外のピコルナウイルス (各機関の裁量が働く余地)	≠	精度管理対象となりうるウイルス アジアで死亡例のあるEV-71 +ポリオ +近年多数検出された型?
-----------------------------------------------------------------	---	------------------------------------------------------------



地衛研の実績・今後の課題

実績: 疑い例や感染症発生動向調査検体からのPV分離
環境水サーベイランスからの検出
流行予測調査感受性調査(中和抗体価測定担当)
(※IPV移行後についてはPD1-4)

実績: 2015年EV-D68における急性弛緩性麻痺(AFP)対応
2010年頃～一部の地衛研でインフルエンザ以外の
気道感染症患者からのEV-D68等に積極的に対応

課題: 改正感染症法への対応(検査精度の確保)
二類感染症 病原体検査体制の維持向上
外部精度調査体制の確立
OJT体制の維持and/or地研間の連携

課題: 職員の世代交代
→PVに暴露する可能性のある業務担当職員への対応

【目的: Objective】平成 28 年 4 月の改正感染症法施行に伴い、病原体情報の収集を担当する地方衛生研究所（地研）は病原体検査の質を確保する必要性から外部精度管理を定期的に受ける義務が付与された。しかし、細菌、ウイルス検査において食品以外で全国の地研が参加する外部精度管理システムは現在整備されていない。そこで国立感染症研究所（感染研）と地研が連携して、全国の地研に対して病原体検査外部精度管理を実施するシステムを構築するために平成 28 年度から 29 年度までの 2 年間、厚生労働科学研究活動を行っている。全国 27 地研に対して赤痢菌を用いた外部精度管理調査の試行を現在実施中であるのでその概要等について報告する。

【方法: Methods】平成 28 年度：外部精度管理調査試行の赤痢菌検体を選定するため、赤痢菌 4 株、大腸菌 1 株について 3 地研及び感染研で定法に従って生化学的性状、血清型別試験及び遺伝子検査等を実施した。平成 29 年度：参加地研の選定は全国 6 地域の地研数等を考慮して各地域から合計 27 の地研を選んだ。外部精度管理調査試行は、予め、平成 29 年 5 月 8 日に検査結果（赤痢菌陽性または陰性）を記入する検査結果報告書、赤痢菌の生化学的性状等を記入する赤痢菌検査経過記録書等を参加地研にメールで送付した。5 月 19 日、感染研で準備した外部精度管理調査検体 3 件（赤痢菌陽性 2 株、赤痢菌陰性 1 株）をジュラルミン製 4 次容器に入れ、ゆうパックで 5 月 22 日に各地研到着で送付した。各地研で検査を行い、6 月 22 日までに記入された検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書を愛知衛研に送付した。解析・評価は主に愛知衛研等において検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書に基づいて実施した。

【結果: Results】平成 28 年度：赤痢菌 4 株、大腸菌 1 株について生化学的性状、血清型及び遺伝子検査等を実施し、病原性プラスミドの脱落等が原因と思われる性状変異が赤痢菌 2 株に確認された。これらを除いた赤痢菌 2 株（*S. flexneri* 2a 及び *S. sonnei*）、大腸菌 1 株を平成 29 年度に実施する外部精度管理調査試行の検体とした。平成 29 年度：参加地研の選定、検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書等の送付。感染研からの外部精度管理調査試行検体 3 件のゆうパックでの各地研への送付。記入された検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書の送付。何れも大きな問題なく実施された。愛知衛研に送付された検査結果報告書を基に検査結果の解析・評価を行ったところ、27 地研全てで 3 検体は何れも正しく結果報告されていた。また、生化学的性状等は現在解析を行っている。

【考察: Discussion】全国 27 地研に対して赤痢菌を用いた外部精度管理調査試行を実施した。その結果、必要書類の送付、検体送付等に遅延等大きな問題はなくスムーズに行うことが出来た。報告結果も一部解析中ではあるが概ね良好であった。今年度末までに結果のフィードバックとして地研職員が参加する研修会等で報告を行う予定である。今後、大学等研究教育機関との連携、病原体の精度管理における保健所との連携を図りながら、外部精度管理実施体制及び必要な文書ひな形案を提言していきたい。

【謝辞: Acknowledgements】本研究は以下の先生方との共同研究です。村上光一、泉谷秀昌、大西 真（国立感染症研究所）、磯部順子、滝澤剛則（富山県衛生研究所）、河村 真保、小西典子（東京都健康安全研究センター）、勢戸和子（大阪健康安全基盤研究所）、世良暢之（福岡県保健環境研究所）

感染症法とその課題

【感染症法】

従来の「伝染病予防法」等を統合し、1999年に施行された。2007年には「結核予防法」を統合した。人権尊重、感染症の分類、病原体等の分類等が含まれ、これまで改正がなされてきた。

【現行制度の課題】

- ・患者等からの検体提出について、感染症法に明確に定めがなく、医療機関等の努力義務にとどまる。
- ・遺伝子解析技術等の進歩に伴い、感染症対策に遺伝子情報、薬剤耐性等の収集・解析が必要不可欠となっている。

平成28年度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）
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
（H28-健危-一般-002）

1. 研究代表者：皆川 洋子（愛知県衛生研究所）
2. 研究分担者：（地全協精度管理部会、感染研レファレンス委員会等）

背景

- ・平成28年4月改正感染症法施行に伴い知事等の事務となった病原体情報の収集を担当する**地方衛生研究所等において「病原体検査の質」を確保する必要**
- ・地衛研の検査水準確保、健康危機管理体制の維持、人材育成効果も期待（感染症発生動向調査、地衛研-感染研のネットワークの維持にも役立てる）

研究目的

- 地衛研全国協議会が主体となって、
- ・外部精度管理体制の導入にあたり、継続的实施に必要な条件を提言
 - ・具体的な外部精度管理項目の洗い出し・検査体制構築状況の把握
 - ・ウイルス・**細菌に関する外部精度管理の試行**

研究班分担表(平成29年度)

担当小グループ	とりまとめ	担当(研究分担者と協力者)
項目小班 ・法改正への対応状況 ・地域の検査精度維持向上における地研の役割	皆川 (愛知)	脇田・宮崎・大石(感染研) 滝澤(富山) 佐野(屋) 岸本(岡山県) 調(山口) 四宮(愛媛) 猿木馬) 大井(東京) 香月(福岡県) 岸本(埼玉県) 田・宮崎・大石(感染研) 奥田・猪飼(愛知県一健所)
ウイルス小班 「精度管理」試行・評価 実施要領・手順(案)作成	皆川 (愛知)	吉田・木村・宮崎(感染研) 岸本(岡山県) 滝澤(富山) 高橋(岩手) 北川(福島) 近藤(神奈川)(大阪) 伊藤(愛知) 山下(修文大)
細菌小班 「精度管理」試行・評価 実施要領・手順(案)作成	滝澤(富山)	大石・村上・大西・泉谷(感染研) 平井・貞升・村・小西(東京) 磯部(富山) 勢戸(大阪) 世良崎(福岡県) 松本(愛知) 四宮(愛媛)

厚労省: 地域保健室
結核感染症課

赤痢菌検査の重要性

- 三類感染症であり、食品関連業務に従事する人の場合、就業制限がかかり、社会的影響が大きい。



地衛研は医療機関や保健所等から同定を依頼をされ、
最終同定が求められる。

- 地衛研では赤痢菌検査数が減少し、検査経験がない職員が増えている。

■赤痢菌は他の病原菌に比べると誤同定が多い。



病原微生物検出情報
国立感染症研究所
感染症疫学情報センター

IASR Vol.24 No.9 (No.283) September 2003

The **HIV/AIDS 2002年** Topic

特集関連情報

- [エイズ予防教育のエビデンスー長崎プロジェクト](#)
- [保健所における性感染症検査の導入による効果ー岡山市](#)
- [HIV感染症診断の検査手順の見直し](#)

ミニ特集

- [赤痢菌の検査法の問題点と解決策：IASR編集委員会序文](#)
- [赤痢菌の同定に関する問題事例ー沖縄県](#)
- [医療機関で大腸菌が赤痢菌\(*S. boydii*\)と誤同定された事例ー滋賀県](#)
- [下痢症患者から分離された*M. morganii*が赤痢菌と誤同定された事例ー千葉県](#)
- [赤痢菌同定の問題点ー東京都](#)
- [赤痢菌同定における留意点](#)
- [赤痢菌同定検査の問題点と現場からの提案](#)

赤痢菌検査のポイント

共通O抗原を有する大腸菌との鑑別

	試験	ポイント
1	血清型別試験	赤痢菌の血清に凝集する大腸菌があることを知っているか。 多価と因子血清を検査できる免疫抗血清を備えているか。
2	生化学的性状試験	赤痢菌と大腸菌と鑑別する生化学的性状(培地)を知っているか。
3	運動性の確認	運動性がないことが赤痢菌の絶対的な性状であることを認識して、運動性の確認に適した培地を使用しているか。
4	遺伝子検査	<i>invE</i> はプラスミド上に存在し、脱落する可能性を知っているか。 <i>ipaH</i> を検出しているか。
5	類似菌との鑑別	類似菌として <i>E. coli</i> 、 <i>Morganella morganii</i> 、 <i>Plesiomonas shigelloides</i> を認識しているか。

平成28年度 精度管理送付赤痢菌の選定

候補菌株: *S. flexneri* (2), *S. sonnei*(2), *E. coli*(1)



感染研から4地衛研に送付、血清型別、
生化学的性状試験、遺伝子検査実施

配付株: *S. flexneri* (1), *S. sonnei*(1), *E. coli*(1)
各検体1菌種で混合ではない。

S. flexneri 2a T16-52の検討結果

施設	直接/増菌	発育	集落の形態	血清型	非定型 生化学的性状	<i>invE</i>	<i>ipa</i> H	同定結果
A	直接(TSB)	有	SS、DHL: S型コロニー	B多価、II、 (3)4	なし	+	+	<i>S. flexneri</i> 2a
B	直接	有	SS、DHL: S型均一 コロニー	B多価、II、 (3)4	なし	+	+	<i>S. flexneri</i> 2a
C	直接	有	白色コロ ニー	B多価、II、 (3)4	なし	+	+	<i>S. flexneri</i> 2a
D	増菌	有	SS: ほぼ 均一白色 コロニー、 DHL: 白色、 ややピン ク大き目 コロニー	B多価、II、 (3)4	なし	+	+	<i>S. flexneri</i> 2a
E	直接	有	小コロ ニー有	B多価、II、 (3)4		+	+	<i>S. flexneri</i> 2a

S. sonnei T12の検討結果

施設	直接/増菌	発育	集落の形態	血清型	非定型 生化学的性状	invE	ipaH	同定結果
A	直接(TSB)	無						
B	直接/増菌	無						
C	直接/増菌	無						
D	直接(TSB)	有	SS:ピンク コロニー、 密集部で は赤	D多価、 DI	なし	+	+	<i>S. sonnei</i>
				D多価、 DII	なし	-	+	<i>S. sonnei</i>
E	直接/増菌	無						

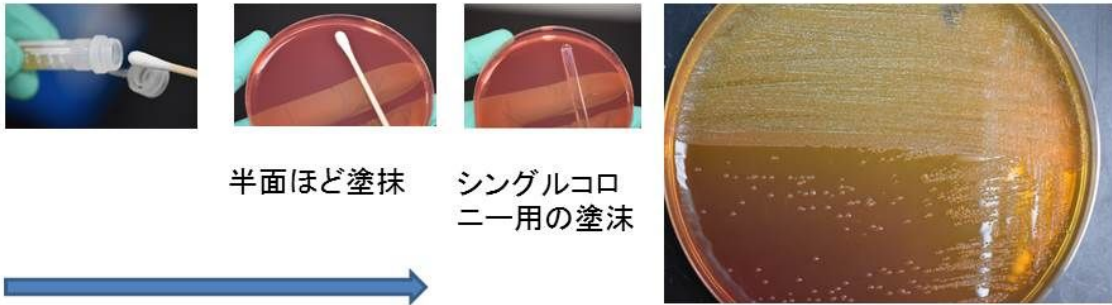
非赤痢菌(大腸菌T10)の検討結果

施設	直接/ 増菌	発育	集落の形態	血清型	非定型 生化学的性状	invE	ipaH	同定結果
A	直接	有	SS、DHL:S型、 R型大コロ ニー	ポイド 9型	酢酸Na(+) 粘液酸(+)	-	-	<i>E. coli</i>
B	直接	有	SS等:S型大、 中コロニー、 DHL等:S型 中コロニー	ポイド 9型	酢酸Na(+) クリステンゼン クエン酸Na(+)	-	-	<i>E. coli</i>
C	直接	有	白色コロ ニー	ポイド 9型	乳糖、白糖遅分解、 ズルシット(+)、サ リシン(+)	-	-	<i>E. coli</i>
D	直接 (TSB)	有	SS:ピンクや や大コロ ニー、DHL: 白色やや大 コロニー	ポイド 9型	GUD(+)	-	-	<i>E. coli</i>
E	直接/ 増菌	有				-	-	<i>E. coli</i>

- 送付赤痢菌2株、大腸菌1株の選定

- 塗沫方法の注意

滅菌綿棒にて、輸送培地表面から菌を十分採材する。寒天培地の半面に、当該綿棒で検体を十分に塗沫する。その後、白金耳等にて単独集落の形成を目的に塗沫する。



半面ほど塗沫

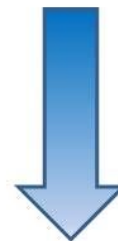
シングルコロニー用の塗沫

平成29年度

参加地方衛生研究所の選出 (H29.3)

地方 (地衛研数)	人口 (万人)	参加機関数
北海道・東北・新潟(11)	1,686	3
関東・甲信・静岡(28)	4,944	5
東海・北陸(8)	1,260	3
近畿(15)	2,276	4
中国・四国(11)	1,170	3
九州・沖縄(12)	1,323	3
計(85)	12,659	21

参加希望64地衛研



細菌小班6地衛研を加え、計27地衛研を決定

参加地衛研から感染研への
BSL2実験室確認書の提出(H29.4)

BSL2(3)実験室確認書(ひな形)
(分与様式5に添付)

2017年4月21日

BSL2(3)実験室確認書
実験室名: 細菌研究室BSL2(P2)実験室

上記実験室はBSL2(3)実験室としての設備および運営の要件を満たしています。

なお、以下に該当する場合、

- (1) 特定病原体等の場合、所持許可(二種)を得ている、又は届出(三種)をしている(或いは受領後届出予定)
- (2) 監視伝染病病原体の場合、所持許可(重点管理、又は要管理)を得ている、又は届出をしている
- (3) 遺伝子組換え生物の場合、実験承認を得ている

ことを確認しています。※今回(1)~(3)には該当しません。

バイオセーフティ管理者: ○○○○(またはそれに該当する方)

所属・役職: ○○県衛生研究所・○○部長

注: WHOコラボレーションセンターを除く、検査研究依頼時に依頼先施設に作成を依頼する。

菌株搬送用容器の感染研
への送付のお願い(H29.5)

平成29年5月1日

細菌感染症外部精度管理調査・参加担当者 様

地方衛生研究所全国協議会精度管理部会
厚生労働科学研究「精度管理研究」班
研究代表者 皆川洋子
(愛知県衛生研究所長)

細菌感染症検査における外部精度管理用菌株搬送用容器の感染研への送付について

地方衛生研究所全国協議会および研究班の活動にご協力ありがとうございます。

さて、平成29年2月27日付けで参加希望の照会を致しましたところ、ご参加の申込をいただきありがとうございました。つきましては、別紙1菌株搬送用容器の準備、別紙2菌株搬送用容器発送チェックシートを参考にして菌株搬送用容器を5月15日(月)に感染研に到着するよう送付をお願いします。なお、ご都合の悪い機関については、ご連絡ください。調整させていただきます。

併せて別紙3参加申込書及び誓約書を受知県衛生研究所まで電子メールでの送付よろしくをお願いします。

記

送付書類

- ①別紙1 菌株搬送用容器の準備
- ②別紙2 菌株搬送用容器発送チェックシート
- ③別紙3 参加申込書及び誓約書

送付及び問い合わせ先: 研究代表者 皆川洋子 (愛知衛研)

eiseiken@pref.aichi.lg.jp

誓約書提出のお願い(H29.5)

誓約書(参加申込書)

地方衛生研究所全国協議会精度管理委員会

厚生労働科学研究「精度管理研究」班

研究代表者 皆川 洋子 様

(検体発送担当: 国立感染症研究所 細菌第一部 大西 真 様)

平成29年度「細菌感染症検査における外部精度管理試行」について、事前調査時に提示された参加条件を了承の上参加を申し込みます。参加にあたっては、特定病原体四種に応じた施設基準、保管、使用、運搬、滅菌等の基準(厚生労働省令)を遵守します。

施設名 愛知県衛生研究所

所属部署名 生物学部 細菌研究室

実施担当者職・氏名

施設住所 〒 462-8576

愛知県名古屋市中区辻町字流7-6

電話番号 052-910-5618

メールアドレス eiseiken@pref.aichi.lg.jp

特定病原体移動責任者職・氏名 部長・松本昌門

申込書送付先: 細菌小班外部精度管理試行事務局(愛知県衛生研究所・松本)

E-mail: eiseiken@pref.aichi.lg.jp

菌株発送

5月19日(金)、感染研で準備した検体3件(赤痢菌陽性2株、赤痢菌陰性1株)をジュラルミン製4次容器に入れ、ゆうパックで5月22日(月)に各地衛研到着で送付した。

6月22日までに検査結果報告書及び赤痢菌検査経過記録書を愛知衛研に送付した。



一次容器



二次容器



三次容器

四次容器



検査結果報告書(赤痢菌の同定結果)

		結果		根拠とした検査結果
赤痢菌の同定結果	検体1	陽性	陰性	O抗原(+)、生化学的性状(-)、赤痢菌遺伝子(-)
	検体2	陽性	陰性	O抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)
	検体3	陽性	陰性	O抗原(+)、生化学的性状(+)、赤痢菌遺伝子(+)

参加27地衛研の検査結果

試料	赤痢菌	
	陽性	陰性
1	0	27
2	27	0
3	27	0

赤痢菌検査のポイントについて

試験	ポイント	結果(地衛研数)	判定
血清型別	赤痢菌の血清に凝集する大腸菌があることを知っているか。 多価と因子血清を検査できる免疫抗血清を備えているか。	ボイド9型(15), -(11), ND(1) 1号セット(26),2号セット(1)	試料1: 赤痢菌陰性
生化学的性状	赤痢菌と大腸菌と鑑別する生化学的性状(培地)を知っているか。	赤痢菌・大腸菌鑑別試験(20)	試料1: 赤痢菌陰性
運動性の確認	運動性の確認に適した培地を使用しているか。	SIM,LIM,半流動培地(27)	試料1-3: 運動性陰性
遺伝子検査	<i>invE</i> はプラスミド上に存在し、脱落する可能性を知っているか。 <i>ipaH</i> を検出しているか。	<i>invE</i> (-), <i>ipaH</i> (+):1 <i>invE</i> のみ実施(3)	試料2,3: 赤痢菌陽性

まとめ

- 参加27地衛研に対して赤痢菌を用いた外部精度管理調査試行を実施した。検体、検査結果の送付等に大きな問題なく行うことが出来た。
- 赤痢菌と大腸菌の鑑別、赤痢菌の同定は全ての施設で正しく行われていた。
- 今年度末までに結果のフィードバックとして地衛研職員が参加する研修会等で報告を行う予定である。
- 大学等研究教育機関との連携、病原体の精度管理における保健所との連携を図りながら、外部精度管理実施体制及び必要な文書ひな形案等を提言していきたい。

謝辞

本研究は以下の先生方との共同研究です。

- 村上光一、泉谷秀昌、大西 真
(国立感染症研究所)
- 磯部順子、滝澤剛則(富山県衛生研究所)
- 河村 真保、小西典子
(東京都健康安全研究センター)
- 勢戸和子(大阪健康安全基盤研究所)
- 世良暢之(福岡県保健環境研究所)