

感染症のウイルス病原体検査における精度管理検査の実施状況

(2016-2018年度)

内田和江 篠原美千代 富岡恭子 鈴木典子 峯岸俊貴*
小川泰卓 青沼えり 宮下広大 倉園貴至

Internal and external quality control for laboratory diagnosis of virus infectious diseases
(2016-2018)

Kazue Uchida, Michiyo Shinohara, Kyoko Tomioka, Noriko Suzuki, Toshitaka Minegishi,
Yasutaka Ogawa, Eri Aonuma, Kodai Miyashita and Takayuki Kurazono

はじめに

平成26年度に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（以下感染症法という）が改正され¹⁾、平成27年度に同法施行規則の改正²⁾、感染症発生動向調査実施要綱の一部改正³⁾、「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」⁴⁾の発出がなされた。これら一連の法、省令、要綱、要領の改正により病原体等検査の信頼性確保の実施体制等が規定され、その一環として精度管理の定期的実施及び外部精度管理調査への参加が義務付けられた。

それらの規定を受けて当所では埼玉県病原体等検査業務管理要領が策定され、ウイルス検査部門においても病原体検査業務管理要領、検査の信頼性確保試験標準作業書を策定した^{5,6)}。これら、法、要領、標準作業書に基づき平成28年度から各種ウイルス検査における内部精度管理検査を実施し、国（厚生労働省）の実施する外部精度管理調査に参加している。今回、平成28年度-30年度に実施した感染症のウイルス検査における内部精度管理検査及び外部精度管理調査の参加実施状況についてまとめ、成績を報告するとともに3年間の実施経験から見えてきた課題について検討した。

実施状況

1 内部精度管理検査の実施状況

平成28年度からの改正法の施行に合わせ、信頼性確保試験標準作業書を作成し、内部精度管理検査の項目を4種類の試験（ウイルス遺伝子検査に用いる試薬の有効性の確認試験、培養細胞のマイコプラズマ汚染否定試験、MDCK細胞のインフルエンザウイルス感受性確認試験、遺伝子検査技能の確認試験）とした。

平成28年度-30年度のそれぞれの検査の概要は以下の

とおりであり、実施した全ての検査項目で信頼性確保部門管理者による是正処置の必要性は指摘されなかった。

1) PCRによるウイルス遺伝子検出確認試験 (平成28-30年度の各年度実施)

二類感染症の中東呼吸器症候群(MERS)、鳥インフルエンザウイルス他、四類感染症及び五類感染症の原因ウイルスの遺伝子検出(PCR及びリアルタイムPCR検査)のため、当所で使用している試薬及び対照(陽性及び陰性)を用い、検査が有効であることを確認した。

2) 培養細胞のマイコプラズマ汚染否定試験 (平成28年度及び平成30年度実施)

ポリオウイルス、インフルエンザウイルス分離検査に使用している細胞(RD-A, MDCK, AX-4)について、ウイルス分離成績に影響を与える可能性があるマイコプラズマの感染がないことを確認する試験である。市販のマイコプラズマ遺伝子検出用キット(CycleavePCR Mycoplasma Detection Kit, タカラバイオ株式会社)を使用し、キット説明書に従い検査した。各細胞ともマイコプラズマの汚染がないことが確認された。

3) MDCK細胞のインフルエンザウイルス感受性確認試験 (平成28-30年度の各年度実施)

インフルエンザウイルス分離検査に使用している細胞(MDCK)について、各型/亜型(AH1pdm09, AH3, B型山形系統, B型ビクトリア系統)のインフルエンザウイルスに対する感受性が維持されているかどうかを確認する試験である。分離陽性が過去に確認されている検体を再度接種し、ウイルス分離陽性を示す細胞変性効果が出現する継代数に変化がないことを確認した。

4) 遺伝子検査技能の確認試験 (平成28-30年度の各年度実施)

検査担当者の遺伝子検査の技能を評価するための試験である。検査担当者が各自ノロウイルス陽性対照(感染症研究所配付標準品でノロウイルス遺伝子を挿入したプラスミ

* 現 本庄保健所

ド DNA) の 10^7 copies/ μ l- 10^0 copies/ μ l の希釈列を作成し、リアルタイム PCR 検査により検量線を作成する。 10^1 copies/ μ l 陽性対照の検出ができること、Ct 値により得られた検量線の R2 が 0.95 以上であること、増幅曲線が正常であること、陰性対照に増幅曲線の上昇がないことの 4 点が合格水準とした。検査担当者全員が合格水準に達していることを確認した。

2 法令に基づき参加した外部精度管理調査

事業主体は厚生労働省である。ウイルス部門に関してはこの 3 年間は、各年 1 課題ずつ計 3 課題が課された。方法は、事業主体が提示したその年度の外部精度管理調査事業実施要項、実施手順書⁷⁻⁹⁾及び国立感染症研究所病原体検出マニュアル¹⁰⁻¹²⁾に基づき作成した当所の検査標準作業書に従い検査を実施し、検査結果及び測定値(リアルタイム PCR 検査の場合の Ct 値等)の他、検査方法、検査に使用した機器及び試薬等に関するアンケートに回答するものである。後日、検査結果に対する自所の成績報告書及び参加機関全体の正解率及びアンケート集計結果、解説書及び問題が検出された場合のトラブルシューティング等を受領した。

当所の信頼性確保部門管理者への報告したところ、各年とも是正処置の必要性はないと評価された。

1)平成 28 年度及び平成 29 年度

改正法施行開始の初年度及び次年度に法令に基づき実施された外部精度管理調査の課題は、インフルエンザウイルスの核酸検出検査であった。当事業主体が全国の参加機関に送付したパネル検体(各年 6 検体)について、リアルタイム RT-PCR 法によりインフルエンザウイルスの型/亜型(AH1pdm09, AH3, AH5, AH7 及びインフルエンザウイルス陰性)を同定し、その結果及び M 遺伝子及び H 亜型遺伝子の検出時の測定値(Ct 値)を回答した。

2)平成 30 年度

課題は、麻しん、風しんウイルスの核酸検出検査であった。事業主体から送付の 5 検体について各参加機関で実施している麻しん及び風しんウイルスの核酸検出検査を実施し、検査方法、検体に含まれるウイルスの同定結果、リアルタイム PCR により実施した場合は Ct 値を回答した。

3 研究班等により実施された外部精度管理調査

上述の感染症法に規定された外部精度管理調査以外に国立感染症研究所及び各地方衛生研究所やレファレンスセンターにより様々な調査、研究事業の一環として実施された。その中で当所が参加したものについて概要を記載した。調査実施主体は()内に記載した。検査は 2 と同様、事業主体が提示したその年度の外部精度管理事業実施要項、実施手順書⁷⁻⁹⁾及び国立感染症研究所病原体検出マニュアル¹⁰⁻¹²⁾に基づき作成した当所の検査標準作業書に従い実施した。

全ての調査で当所の信頼性確保部門管理者により是正処置の必要性有と評価されたものはなかった。

1) インフルエンザウイルス分離培養、亜型同定技術に関

する実態調査(国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター)平成 29 及び 30 年度参加

配付検体について、培養細胞を用いたインフルエンザウイルスの分離と分離されたウイルスの亜型、系統を同定し、その結果と検査方法に関する調査アンケートに回答した。ウイルス分離は平成 29 年度は MDCK 細胞、平成 30 年度は AX-4 細胞を加え実施した。分離ウイルスの同定は各年度ともリアルタイム RT-PCR 法で実施した。

2) 風疹ウイルス遺伝子検査に関する外部精度管理(日本医療研究開発機構(AMED)「麻疹ならびに風疹排除およびその維持を科学的にサポートするための実験診断および国内ネットワークに資する研究」研究班)¹³⁾。平成 29 年度及び 30 年度参加。

配付検体について風しんウイルスのリアルタイム RT-PCR 検査、cRT-PCR 検査による E1 遺伝子の検出及び検出遺伝子の塩基配列解析、系統樹作成、風しんウイルス遺伝子型解析を実施した。

3) 手足口病検査(厚生労働科学研究「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実施に必要な事業体制の構築に関する研究」研究班)¹⁴⁾平成 29 年度参加。

手足口病の病原ウイルスであるエンテロウイルスの検査の外部精度管理調査をする際の配付検体の調整法、配付方法、検査実施方法等の条件検討として施行された調査である。配付検体を添付手順書に従い、CODEHOP-snPCR によるエンドポイントアッセイ、塩基配列解析を実施した。本調査は条件設定のための協力参加のため、精度管理部門管理者への報告、評価の対象外で実施した。

4) 抗インフルエンザ薬耐性検査の実態調査(国立感染症研究所インフルエンザウイルス研究センター)平成 30 年度参加。

インフルエンザウイルス NA 阻害薬への耐性変異(N 遺伝子 H275Y)を検出するリアルタイム RT-PCR 及び Allelic Discrimination 解析¹⁰⁾の外部精度管理調査であり、実態調査として実施された。配付された①H275 陽性対照及び②Y275 陽性対照の 2×10^{-1} 、 2×10^{-2} 、 2×10^{-3} 希釈列について、各陽性対照が濃度依存的に増幅することを確認した。

課題及び検討

3 年間の内部精度管理検査、外部精度管理調査への参加を振り返り、内部及び外部精度管理の方法の中に様々な改善すべき点があることを認識した。

まず、遺伝子検査の内部精度管理検査では適切な陽性対照が入手できないため、当初の計画どおりに実施出来ない検査項目があった。昨今、インフルエンザをはじめ、多くの五類定点把握感染症の検査においても国立感染症研究所が発行した病原体検査マニュアルを基に、全国的に検査法が標準化されつつあるが、陽性対照に関しては二類及び四

類感染症や麻疹、風しん等の検査用を除き、各地方衛生研究所で過去の陽性検体や分離株から自家調製しているものを使用するケースが多いのが現状である。法に基づく検査であるので、全国的に統一された陽性対照を入手し使用したいという要望は当所のみならず多くの地方衛生研究所に潜在していると考えられる。

細胞培養に関する内部精度管理検査は、マイコプラズマの汚染否定を確認する検査とインフルエンザウイルス分離に用いる細胞の感受性試験のみにとどまっている。これらの検査のみならず、使用細胞の継代数確認、ロット毎の凍結保存細胞の再起能確認等の検査も今後、実施計画の中に含めていきたいと考える。

外部精度管理調査の参加は法的に定められたものに関しては、この3年間でインフルエンザウイルス、麻疹ウイルス及び風しんウイルスの核酸検出検査に限定されている。当所での検査結果は、各年とも同定検査に誤りはなかったが、成績書と共に送付された解説書に基づき、細かな検証をした結果、見直すべき点もあった。例えばリアルタイムPCR検査のCt値が、陰性、陽性の判定に影響しない範囲で、望ましい値から若干の乖離が認められたことがあった。

厚生労働省による法に定められた外部精度管理調査以外に、各種研究班により実施された調査にも積極的に参加した。将来の永続的外部精度管理調査の導入に向けて試行的に実施された調査や、事前に採点項目が明らかにされない調査、塩基配列解析によるウイルス型別検査において配列データのクオリティがどの程度であれば型別判定に有効とするかなど全国的な統一基準がない項目についても評価対象になっている調査などがあった。また、検査結果の提示データ様式に規定がなかったにも関わらず記載方法について問題点が指摘されたものがあった。外部にデータを出す際は、より分かりやすく丁寧な記載をすべきであると認識した。

内部精度管理検査、外部精度管理調査共に感染症法に規定され、実施されるようになって3年が経過したが、制度的な面でも実施頻度や内容の面でもより充実が望まれる。参加機関もより前向きに取り組むこと、成績や提出データへの指摘事項は改善に努め、また問題点が指摘されない場合も安堵することなく定期的に振り返り整理することが検査の質の向上のためにも人材育成のためにも大切であると考える。本稿が将来の精度管理方法の改善に少しでも参考となれば幸いである。

文献

- 1) 平成26年11月21日、平成26年法律第115号、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。
- 2) 平成27年9月28日、平成27年厚生労働省令第147号、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施行規則の一部を改正する省令。
- 3) 平成27年11月9日、健発1109第3号、感染症発生動向調査実施要綱の一部改正について。
- 4) 平成27年11月17日、健感発1117第2号、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。
- 5) 江原勇登 井上裕子 只木晋一：感染症法改正への埼玉県衛生研究所の対応～信頼性確保部門の確立に向けた取り組み～。 埼衛研所報 第50号 2016年
- 6) 篠原美千代：感染症法改正への埼玉県衛生研究所の対応～病原体サーベイランス～。 埼衛研所報 第50号 2016年
- 7) 厚生労働省外部精度管理事業 平成28年度
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/research/2381-diagnosis/ega/6628-eqa-h28.html>
(参照 2019年7月1日)
- 8) 厚生労働省外部精度管理事業 平成29年度
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/allarticles/research/2381-diagnosis/ega/7254-eqa-h29-01.html>
(参照 2019年7月1日)
- 9) 厚生労働省外部精度管理事業 平成30年度
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/refernce/eqa/7984-eqa-h30-01.html> (参照 2019年7月1日)
- 10) 国立感染症研究所病原体検出マニュアル「インフルエンザ」<http://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/influenza20190116.pdf> (参照 2019年7月1日)
- 11) 国立感染症研究所病原体検出マニュアル「麻疹」(3.4版) 平成29年4月 <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/measles.v3-4.2017Mar.pdf> (参照 2019年7月1日)
- 12) 国立感染症研究所病原体検出マニュアル「風疹」(4.0版) <https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Rubella20190703.pdf> (参照 2019年7月1日)
- 13) 調 恒明：麻疹風疹実験室診断の地方衛生研究所における精度に関する研究 平成28年度医療研究開発推進事業費補助金新興再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業 麻疹ならびに風疹の排除およびその維持を科学的にサポートするための実験室診断および国内ネットワーク構築に資する研究成果報告書
- 14) 吉田弘：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。平成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の実施に必要な事業体制の構築に関する研究(H29-健危-一般-002)分担研究報告書, p19-44