

より信頼性の高い検査結果を得るために必要なこと

国立保健医療科学院
三浦 尚之



自己紹介

2010年3月 東北大学 大学院工学研究科土木工学専攻 博士課程後期修了
- 河口・沿岸域におけるノロウイルスの動態



2010年4月 北海道大学 大学院工学研究院環境創成工学部門 博士研究員
- ノロウイルスを特異的に吸着するヒト腸内細菌の分離
- 下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去メカニズム



2012年7月 フランス海洋開発研究所 博士研究員
- ヒトノロウイルスを一斉に定量検出するリアルタイムPCR法の開発
- 下水処理プロセスにおける胃腸炎ウイルスの除去メカニズム

Ifremer

2015年7月 東北大学 未来科学技術共同研究センター 准教授
- 下水中のノロウイルス濃度・遺伝子型の変動
- カキに蓄積したノロウイルスの濃度・遺伝子型の変動



2016年10月 国立保健医療科学院 生活環境研究部 主任研究官
- 水道における病原微生物のリスク評価・管理



参考

下水中ノロウイルス濃度情報発信サイト <https://novinsewage.com/>

The screenshot shows the homepage of the 'Novin Sewage' website. At the top, there are logos for the University of Tsukuba, the site name '下水中ノロウイルス濃度情報発信サイト', and logos for Sendai City and Fukushima Prefecture. A navigation bar includes links for Home, Notice, Norovirus Information, Norovirus Information (Email), Research Introduction, and Contact. The main content area is titled 'お知らせ' (Notice) and features two graphs showing Norovirus concentration fluctuations in Sendai City's wastewater treatment plant. The first graph is dated February 13, 2019, and the second is dated February 5, 2019. To the right, there is a colorful illustration of a family and a call to action to sign up for a newsletter to receive Norovirus concentration information via email. A sign-up form with fields for Email (required) and Name (optional) is provided at the bottom right.

3

Laboratoire de Microbiologie, Ifremer
(フランス海洋開発研究所 微生物学研究室)

研究室の業務内容

- 1) フランス国内で発生した海産物が原因と疑われる食中毒事例の病原微生物検査
- 2) 二枚貝（主にマガキ）試料のウイルス検査方法の開発
研究室で開発されたノロウイルスのリアルタイムPCRアッセイ（2005年）は、ISO 15216-1に採用されている
- 3) カキへのノロウイルス蓄積メカニズムの解明
カキ消化組織（中腸腺）上のA型類似糖鎖にノロウイルスが特異的に結合することを発見（2006年）
- 4) 下水処理プロセスにおけるウイルスの除去メカニズムの解明
- 5) フランス国内におけるノロウイルス検査の精度管理（2015年から）

4

発表内容

1. イントロダクション

(1) フランスにおけるカキの養殖方法と課題

(2) カキのノロウイルス検査方法の流れ

2. 精度管理

(1) 測定値と真値

(2) 内部精度管理と外部精度管理

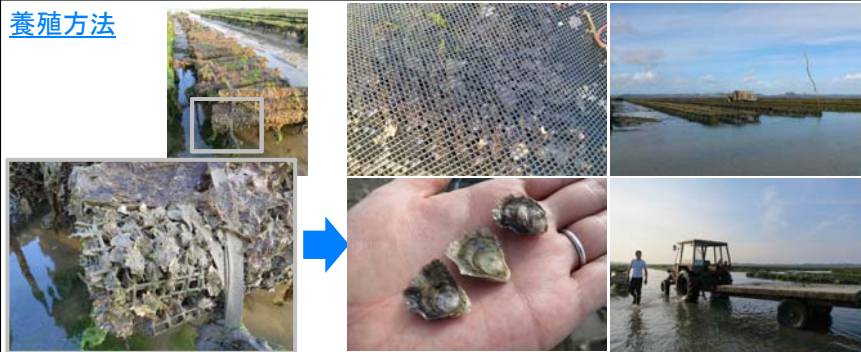
(3) EUおよびフランス国内での外部精度管理の実施例

3. まとめ

5

1. イントロダクション

(1) フランスにおけるカキの養殖方法と課題

養殖方法

プラスチックネットを束ねたものに稚貝が付着

成育段階に合わせてメッシュが粗いネットに移す

出荷まで3～4年間



6

(1) フランスにおけるカキの養殖方法と課題

課題 1 毎年食中毒を出してしまう産地（リゾート地）がある

- 豪雨に伴う未処理下水の養殖海域への流入
- ラグーン沿いの別荘等からの未処理下水の流入

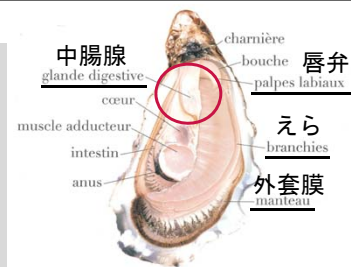
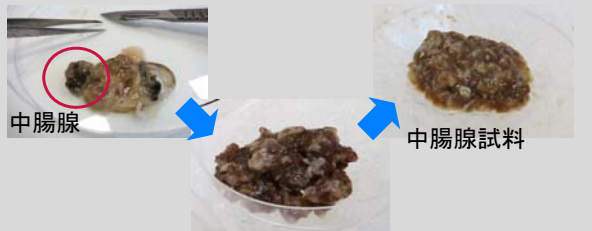
課題 2 ブランド産地への転地

- 他の養殖海域で汚染されたカキがブランドカキとして流通
- 汚染度の高いカキからブランドカキへの汚染（交叉汚染）

7

(2) カキのノロウイルス検査方法の流れ

1. 解剖による中腸腺の取り出し



2. 中腸腺試料からのウイルスRNA抽出

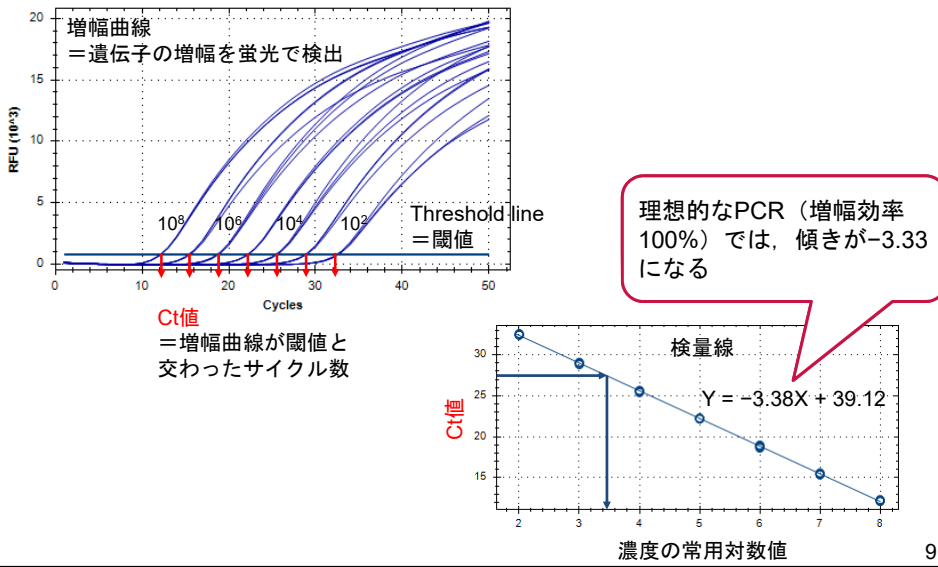
- 1) (破碎)
- 2) 酵素処理
- 3) 遠心分離によりウイルスが含まれる上清を回収
- 4) 上清からキットを用いてウイルスRNAを抽出

3. 逆転写反応・リアルタイムPCRによる遺伝子検出

8

(2) カキのノロウイルス検査方法の流れ

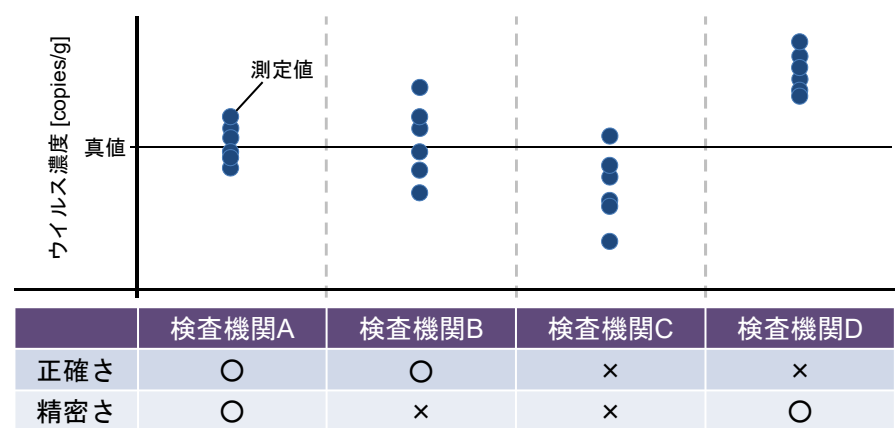
リアルタイムPCR法によるウイルス遺伝子の定量検出



2. 精度管理

(1) 測定値と真値

例：4つの検査機関において同じ試料を繰り返し測定した結果



*正確さ：真値に近いか 精密さ：ばらつきが小さいか

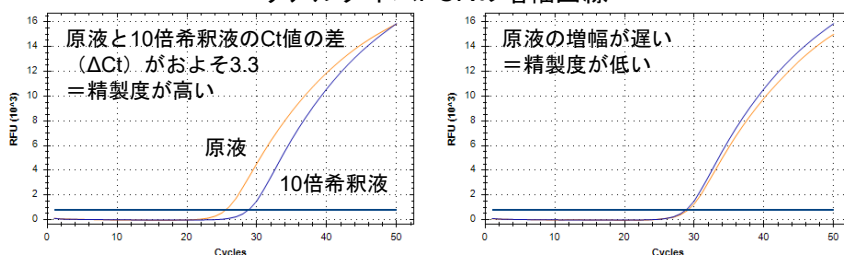
検査機関Cにおいて測定値がばらついて小さくなったり、検査機関Dにおいて測定値が高くなった要因は？

(1) 測定値と真値

測定値がばらついて小さくなる要因の一つ

RNA抽出過程で取り除き切れなかった試料由来の酵素反応阻害物質により、逆転写反応やPCRの効率が低下し、Ct値が大きくなる

リアルタイムPCRの増幅曲線



【対策】

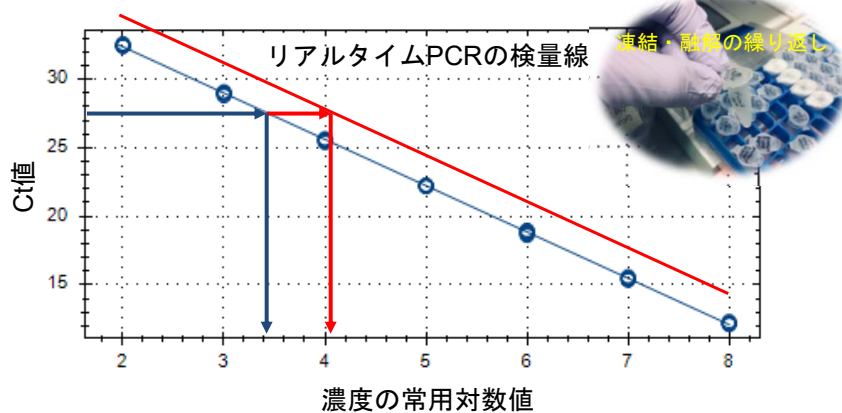
- プロセスコントロールウイルスを中腸腺試料に添加し、RNA抽出・逆転写反応・リアルタイムPCRの回収率を把握する
- 抽出RNA原液とその10倍希釈液を逆転写反応・リアルタイムPCRに供し、 ΔCt が検量線の傾きの絶対値 ± 0.5 の範囲内か確認する（阻害が確認された場合には、10倍希釈液の測定値を採用する）

11

(1) 測定値と真値

測定値が高くなる要因の一つ

陽性コントロールとして用いるプラスミドDNAの分解により、検量線の切片が大きくなり、測定値が高くなってしまふ



【対策】

陽性コントロールのCt値を記録・共有し、分解に気がつける体制にする

12

(2) 内部精度管理と外部精度管理

内部精度管理

- = 検査機関内において標準品、試薬や装置の使用条件を管理すること
- ✓ カキのノロウイルス検査では、プロセスコントロールウイルスを中腸腺試料に添加し、RNA抽出・逆転写反応・リアルタイムPCRの試薬の反応*や装置の動作を確認する
- ✓ リアルタイムPCRの検量線作成に用いる陽性コントロール（プラスミドDNAや人工合成オリゴ）のCt値をモニタリングし、毎回同一の測定結果が得られているか評価し、陽性コントロールの保存状態、および試薬や装置の反応条件を管理する

*外部精度管理を実施する際に、試薬の選択を検査機関に委ねる場合には、試薬や反応条件（濃度、温度、時間等）も内部精度管理の対象となる。

外部精度管理

- = 検査機関間の測定値を比較することで、測定値の確からしさと機関によるばらつき（機関内のばらつきも含む）を把握すること

13

(3) EUおよびフランス国内での外部精度管理の実施例（2015年）

EUでの実施体制

- 英国のCefas（環境・漁業・水産科学センター）が事務局を勤める European Union Reference Laboratory (EURL, <https://euricefas.org>) が主導
- 各国のリファレンス機関*が参画

*National reference lab.

フランス国内での実施体制

- Ifremerが主導
- 10～20の検査機関（民間も含む）が参画
- 参画機関にIfremerから
 - ・ ノロウイルス汚染カキ試料（殻付き、高濃度と低～中濃度の2種類）
 - ・ ノロウイルス汚染中腸腺試料（解剖を除いたRNA抽出以降の操作の精度を検証）
 - ・ プロセスコントロールウイルス（メンゴウイルス）を送付



<https://euricefas.org/network.aspx>

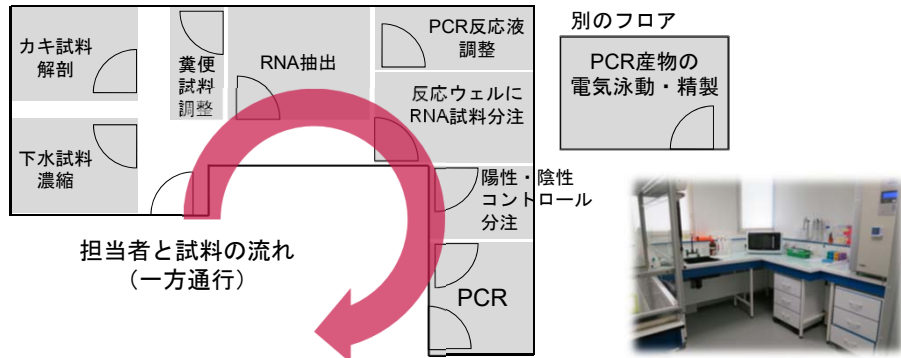
14

(3) EUおよびフランス国内での外部精度管理の実施例（2015年）

精度マネジメント (quality management)

施設の設備（検査室間や検査室内のレイアウト）や機器、担当者の人数と役割分担、教育等を含めた検査の信頼性に影響するすべての要因について、Ifremerの検査に対する取り組みの状況を参画した検査機関担当者にラボツアーとプレゼンテーションによって紹介

検査室間のレイアウト例



まとめ

カキのノロウイルス検査では、

- 1) どの程度中腸腺をトリミングするか
- 2) 中腸腺からのウイルス回収で遠心分離後の上清をどの程度採取するか
- 3) リアルタイムRT-PCRにおける阻害の影響をどのように評価し濃度を計算するか



など、担当者の手技や知識が測定結果に影響するため、プロセスコントロールウイルスを用いて測定値の正確さや精密さを確保することが重要である。

同時に、施設の設備や担当者の教育等を含めた検査の信頼性に影響するすべての要因について管理すること（精度マネジメント）が求められる。