

遺伝子検出法のバリデーシヨンの進め方について

クリプトスポリジウム検出法として、遺伝子検出法が妥当か検証するために、複数の分析機関によって検査を実施し、その結果を本委員会で評価していくことが適当である。その評価の過程で、検査を実施する立場から検査実施手順において考慮すべき事項が明らかになることも期待できる。

バリデーシヨンの実施については、既に検出法として位置づけられている顕微鏡検出法と遺伝子検出法を平行実施することが妥当である。ところが、濃縮と精製に係る操作から遺伝子検出まで実施する場合、濃縮と精製に関する評価が含まれることになり、遺伝子検出法の評価に集中できない。また、河川水中に含まれるクリプトスポリジウム等を検出対象とすると、個数が少なく正確に試料を分割できない、あるいは全くない場合には評価が成立しない恐れが考えられることから、河川水試料濃縮物から検査した際の実用性も評価したい。そこで以下の評価方法を提案する。

検査の手順は、まず精製水等にクリプトスポリジウム等を添加したものを試料とし、顕微鏡検出法あるいは遺伝子検出法により検出作業を実施する。次いで、河川水を濃縮し磁気ビーズ法操作後の試料へクリプトスポリジウム等を添加し試験する。個別の分析機関における検査方法は以下のとおりとし、濃縮試料を替えて複数回実施する。

- 1) 20L 程度の河川水等を濃縮
- 2) 濃縮試料を 2 分割し磁気ビーズ法を実施
- 3) UV 照射オーシスト、シストをそれぞれに添加 (各 10 から 100 個程度)
- 4) 顕微鏡検査、遺伝子検査を実施
- 5) 結果を照合

分析機関の検査結果について収集し、精度、感度や再現性等に関する評価を本委員会において行う。

なお、評価の実施にあたり留意点は以下のとおり。

1. 添加なしの試料も実施し、陰性対象とする。(疑陽性が無いことを確認)
2. 磁気ビーズ法後の河川濃縮物に夾雑物が多く含まれると遺伝子増幅反応を阻害する恐れがあるため、磁気ビーズ法に際しては洗浄操作を徹底する。(疑陰性を排除する)
3. その一方で、サンプルに不純物が含まれる場合の感度・精度(偽陽性、偽陰性の有無)を確認する。(安定性が失われたり疑陰性が生じたりすることを示し、洗浄操作を徹底するという結論を得る)
4. 機器・試薬によって結果に差が生じないことを確認する。(2社の検討試薬を使って、いずれも同様の結果が得られることを示す。その際、反応に使用する機器を多少代えて同様の結果が得られることを示す)
5. 試料の保存性、例えば2週間程度の保存が可能か確認する。(冷凍保存すれば試料は長期保存に耐えて、後日に再反応できることを示す)

なお、これまでに検証した結果の一部は厚労科研松井班に報告、ならびに猪又ら論文があり、それぞれ資料2-1の別添2及び別添3の通りである。今後、協力の得られた公的検査機関及び20条登録検査機関において、以下の流れでバリデーションを進めていく。

① 遺伝子検出法の評価

- ✓ 遺伝子検出法の経験を有した検査機関によるバリデーション実施と評価を行う。必要に応じて、上記方法の改良及び検証を実施。
- ✓ 妥当な方法が固まった後、分析マニュアル案の作成。

② 未経験検査機関におけるバリデーションの実施

- ✓ ①にて作成した分析マニュアル案に基づき、遺伝子検出法未経験の検査機関においてバリデーション実施とその評価を行う。必要に応じて、方法の改良及び検証を実施。
- ✓ 分析マニュアルの改定案を作成。

③ 分析プロトコル改定案について、本検討会で審議いただく。