

図 9 Nester real-time PCR によるカキ中腸腺からの NoV GII の検出
 COG2F / G2SKR で 1st. PCR を行い、その増幅産物を COG2F / COG2R / RING2-TP を
 用いた real-time PCR で再増幅した。

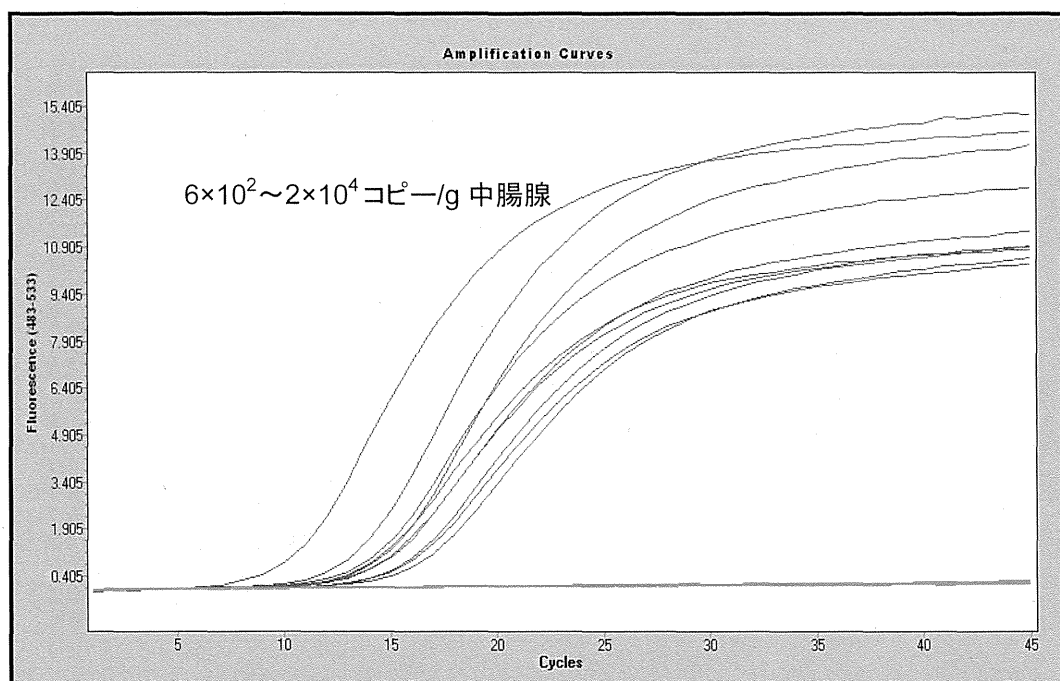


図 10 Nester real-time PCR によるカキ中腸腺からの NoV GI の検出
 COG1F / G1SKR で 1st. PCR を行い、その増幅産物を COG1F / COG1R / RING1-TP を
 用いた real-time PCR で再増幅した。

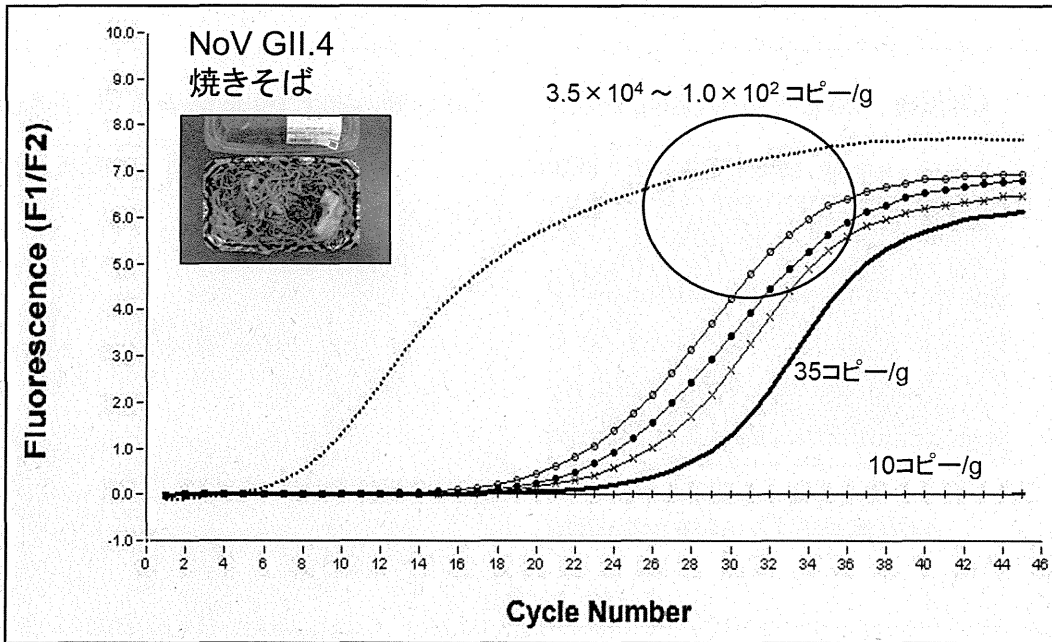


図 11 パントラ法と Nester real-time PCR による焼きそばからの NoV GII の検出(平成 23 年度報告書・図 7 より再掲)

様々な濃度で汚染させた焼きそばからパントラ法でウイルス RNA を抽出し、cDNA 合成の後、COG2F / G2SKR で 1st. PCR を行い、その増幅産物を COG2F / COG2R / RING2-TP を用いた real-time PCR で再増幅した。

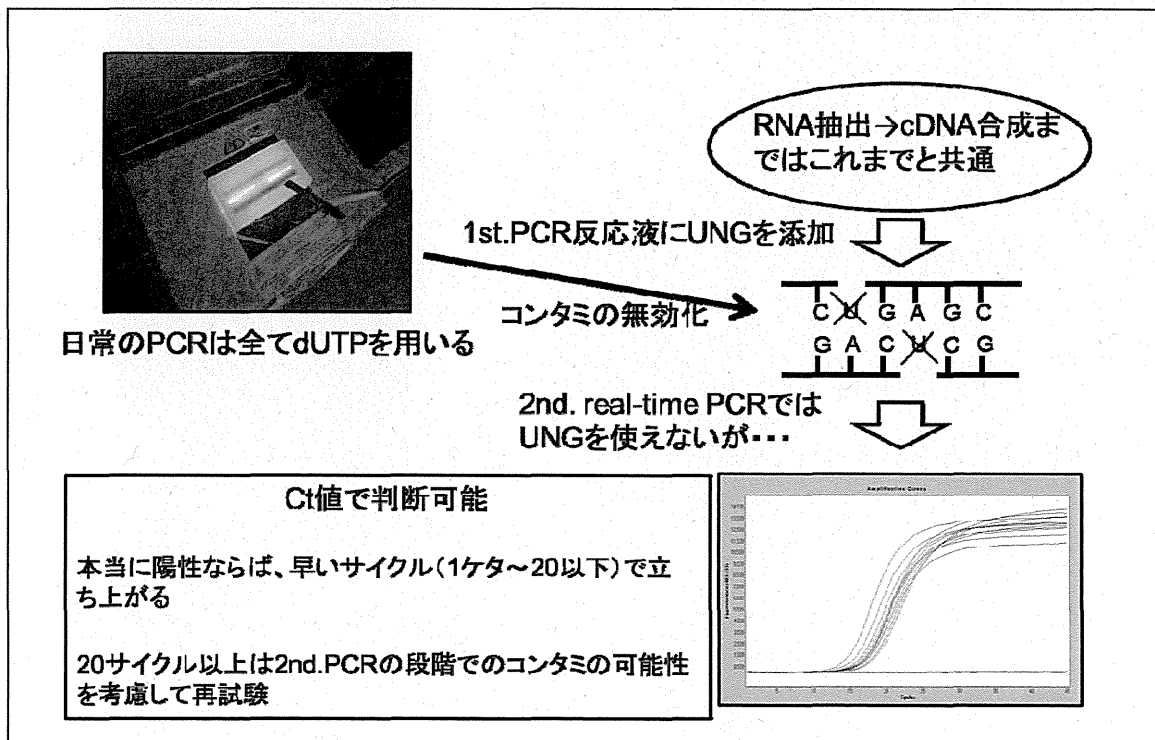


図 12 dUTP / UNG を用いた偽陽性対策

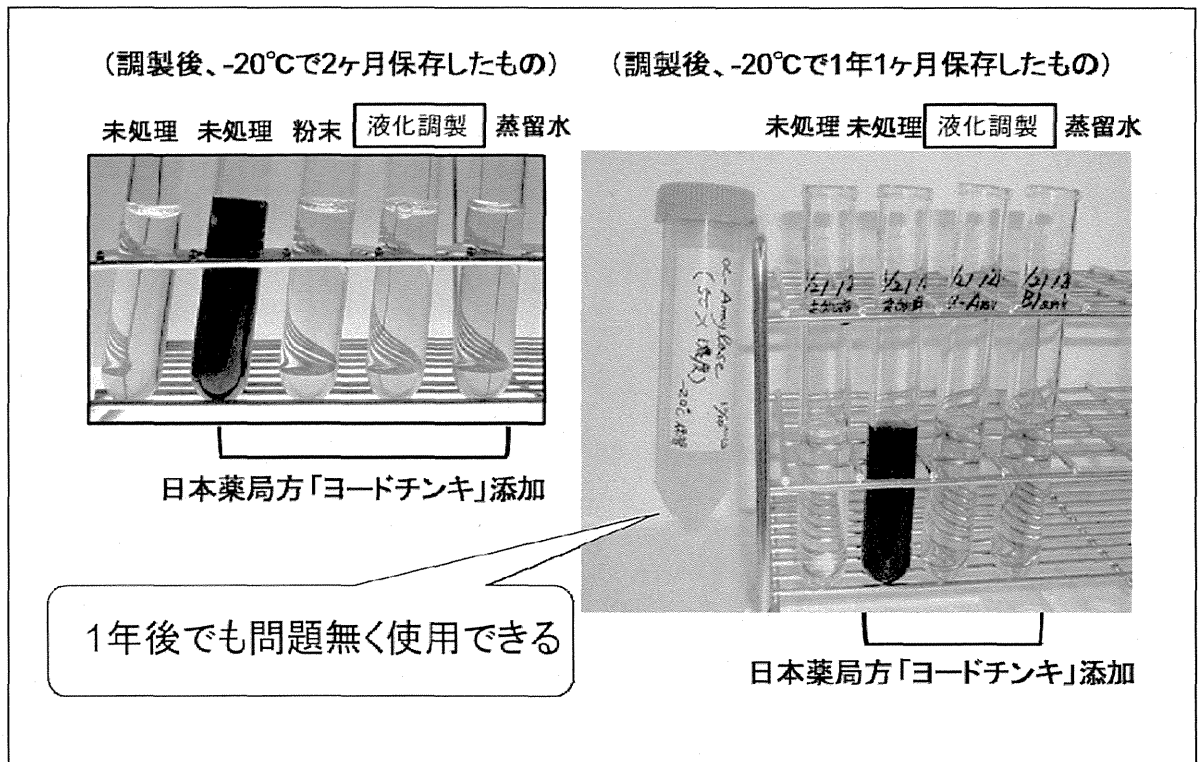


図 13 平成 25 年度研究事業で検討した、 α -Amylase の液化調製法について
調製後、1 年経過後も問題なく使用できることが確認された。

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

研究分担報告

富山県におけるノロウイルス・サポウイルス検出状況 及び胃腸炎集団発生事例の次世代シーケンサーによる解析の試み

研究分担者	滝澤 剛則	富山県衛生研究所
研究協力者	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
研究協力者	名古屋 真弓	富山県衛生研究所
研究協力者	嶋 一世	富山県衛生研究所
研究協力者	長谷川 澄代	富山県衛生研究所

研究要旨

富山県におけるノロウイルス (NoV)、サポウイルス (SaV) の浸淫状況を調査するため、感染性胃腸炎患者、下水流入水、岩ガキからウイルスを検出した。患者からは NoV GII/4、GII/3、SaV GII.1 などが検出された。下水流入水からは、NoV GII/4、GI/8、SaV GII.1 などが検出された。岩ガキからは NoV GII/6 が検出され、SaV は検出されなかった。2014 年の NoV は例年と同様に NoV GII.4 が主体であり、Sydney 2012 亜型が主流であった。NoV 陽性検体より次世代シーケンサーを用いたメタゲノム解析を試みたところ、一部の検体ではダイレクトシーケンス法で得られた NoV 遺伝子型に加えて、異なる遺伝子型のリードも検出された。

A. 研究目的

2014 年の 1 年間に、胃腸炎患者や下水流入水からノロウイルス (NoV)・サポウイルス (SaV) を検出し、患者での流行型、不顕性感染を含めた地域の流行状況を把握した。さらに、岩ガキからも NoV、SaV の検出を試みた。これにより、2014 年のウイルス流行状況を把握するとともに、岩ガキによるウイルス性食中毒のリスクを推測することを目的とした。

また、食中毒調査において、患者と従業員、食品、環境等から検出されたウイ

ルスの遺伝子型が一致せず、それらとの因果関係が不明な事例がみられる。これは、現在行っているダイレクトシーケンスでは主要な遺伝子型しか検出できないためと考えられる。そこで、昨年度に引き続き、そのような検体を材料に次世代シーケンサー (NGS) を用いて遺伝子を解析することで、少数の遺伝子型も検出し、感染源や感染経路を特定することを目的とした。

B. 研究方法

1. 2014年の患者検体

富山県において2014年1月から12月に発生した食中毒、感染性胃腸炎（集団発生例及び小児散发例）から得られた糞便を用いた。検体採取は管轄の厚生センター、保健所が行った。

糞便検体の10%乳剤上清から、厚生労働省通知（食安監発1105001号）に基づきRNAを抽出し、DNase処理、逆転写反応及びPCRを行った。NoVの検出には、リアルタイムPCRを用い、PCRには、ORF1/ORF2ジャンクション領域を対象としたプライマー1421f/G1-SKR及び1364f/G1-SKR（GI用）、1421f/NV2oR及び1364f/G2-SKR（GII用）（Nakamura et al., Jpn. J. Infect. Dis., 62: 394-398, 2009）を用いたnested PCRを行った。SaVの検出には、カプシド領域を対象としたプライマーSV-F11/SV-R1及びSV-F2/SV-R2によるnested-PCR（Okada et al., Arch. Virol., 147: 1445-1451, 2002）を用いた。PCR産物から、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。NoVの型別判定にはカプシド領域を対象としたG1-SKF/G1-SKR、G2-SKF/G2-SKRの部分を用いて、片山らの分類方法（国立感染症研究所, IDWR 感染症発生動向調査週報, 6(11), 14-19, 2004）により行った。

2. 下水流入水

県西部に位置する下水処理場において、2014年1月から12月の毎月1回下水流入水1リットルを採取した。

下水流入水を3,000rpmで30分遠心して得られた上清に、最終濃度0.05Mになるように塩化マグネシウムを添加し、0.5規定の塩酸を用いてpH3.5に調整した。

この液を陰電荷膜にろ過吸着させた後、陰電荷膜を3% beef extract液10mlに浸漬し、Vortex処理により吸着分子を溶出した。溶出液を再度遠心後、回収される上清を100倍濃縮下水検体とした。また、2014年1月から4月採水分については、PEG沈殿法により250倍濃縮下水検体も調整した。濃縮下水検体から、ヒト検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応、PCRを行った。

3. 岩ガキ

2014年4月から6月までの計5回、富山県の3漁港（魚津、新湊、氷見）で採取した岩ガキ51個を用いた。

岩ガキは中腸腺を取り出したあと、同一ロット3個分を1検体としてPBS(-)にて10%乳剤にした。 α -アミラーゼを加えて37°C1時間消化したのち、遠心上清を12%PEG6000及び5.8%NaClにて凝集させ遠心した。0.5% Zwittergent加PBS(-)にて沈殿を再浮遊させ、濃縮カキ検体とした。

濃縮カキ検体から、ヒト検体と同様にRNA抽出、DNase処理、逆転写反応を行った。NoVの検出には、リアルタイムPCRとコンベンショナルPCRを用いた。コンベンショナルPCRは、ポリメラーゼ領域3'末端からカプシド領域を対象としたプライマーCOG1F/G1-SKR及びG1-SKF/G1-SKR（GI用）、COG2F/G2-SKR及びG2-SKF/G2-SKR（GII用）を用いてSemi-nested PCRを行った。SaVの検出は、ヒト検体と同様に行った。

4. NGSによる遺伝子検査法の検討

富山県において2010年度から2012年度にかけて発生したNoVによる胃腸炎集

団発生事例のうち、複数の遺伝子型の重複感染が疑われる4事例を対象とした(表5)。各事例1~3検体、計8検体の10%便検体よりキャリアフリーの抽出液を用いてRNA抽出を行い、ScriptSeq v2RNA-Seq Library Preparation kit(Epicentre)を用いてRNA-Seqライブラリを作製した後、NGS(MiSeq Reagent Kit Micro(300 cycle))(Illumina)により塩基配列を解読した(paired-end、120 cycles)。

解読結果は、国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センターのMePICソフト(Takeuchi, F., et al. Jpn. J. Infect. Dis., 2014, 67:62)によりヒト遺伝子配列を除いてmegablast解析を行った。MePICにより分類された塩基配列はMEGAN4(Universität Tübingen)により閲覧を行った。NoV遺伝子型の分類は、megablast解析により得られた基準配列を元にNorovirus Genotyping Tool(<http://www.rivm.nl/mpf/norovirus/typingtool>)により行い、得られた新統一命名法の遺伝子型から片山らの分類方法の遺伝子型に変換を行った。

(倫理面への配慮)

「網羅的遺伝子解析法を用いた食中毒事例の原因ウイルス解析」(受付番号3)として、平成25年度富山県衛生研究所倫理審査委員会の承認を得た。

C. 研究結果

1. 患者からのNoV、SaV検出状況

ウイルス性感染性胃腸炎及び食中毒等の集団発生は9事例あり、うち食中毒事例は2事例であった(表1)。事例数とし

ては2013年の14事例、2012年の29事例と比較して少なかった。9事例全てからNoVが検出された。

小児散発例は、25例中8例からNoV、5例からSaVが検出された。(表2)

2. 患者、下水流入水、岩ガキから検出されたNoV及びSaVの遺伝子型

集団発生の患者から検出されたウイルスは全てNoV GII/4であった(表1)。散発例の患者からはNoV GII/3、GII/4、GII/13、SaV GII.1、GII.3が(表2)、下水流入水からは、NoV GI/8、GII/4、SaV GII.1などが検出された(表3)。岩ガキは1検体からNoV GII/6が検出されたが、SaVは検出されなかった(表4)。

3. 検出されたNoV及びSaVの比較

得られたNoV及びSaVの塩基配列を用いた系統樹を図1~3に示す。NoV GII/4の亜型は、解析が行えた株のうち2006b亜型が検出された9月発生の集団事例1事例を除いてすべてSydney2012亜型(Sydney/NSW0514/2012/AU)であり、下水と患者検体より100%塩基配列が一致する株も得られた。1月に集団発生2事例及び小児散発例1症例から検出された株は、Norovirus Genotyping ToolではSydney2012亜型に分類されるものの、他のSydney2012亜型の株とは異なるクラスターを形成していた。SaVについては、小児散発例と下水から検出されたGII.1は異なるクラスターを形成した。

4. 便検体のNGSによる遺伝子解析

NoVが検出された便乳剤8検体について、NGSによる遺伝子解析を行った(表6)。全体のリード数は10,782~416,950(平均195,117)であった。NoVの配列は5~2,318

リードであり、MePIC による megablast 解析を行ったリード数の 0.03~2.69%、ウイルスのリード数の 1.5~98%であった。ダイレクトシーケンスによる遺伝子型別を行えた 7 検体で、ダイレクトシーケンス法と NGS で検出された主要な遺伝子型が一致した。しかしながら、検体 6 では、ダイレクトシーケンスと NGS の主要な遺伝子型がそれぞれ GII.17(新統一命名法による)、GII/3 と異なっていた。事例別に見ると、事例 1 の検体 1 と 2 は NGS により複数の遺伝子型が得られ、NoV 以外に SaV とアイチウイルス (AiV) も検出された。特に、検体 1 では AiV のリード数がウイルスのリード数の 98%を占めていた。事例 2 では、検体 3 からは GII/4、検体 4 からは GII/12 とそれぞれ異なる遺伝子型のみが検出された。事例 3 からは、GI/13 のみが検出された。事例 4 の 3 検体からは共通して GII/4 が検出されたが、それ以外の遺伝子型も検出された。

D. 考察

1 月から 5 月にかけて NoV GII/4 が小児散発例、集団事例、下水から検出されており、この時期に NoV GII/4 が流行していたと考えられた。2013 年に引き続き Sydney2012 亜型が中心であったものの、それ以外の亜型も 1 例検出されたため、他の亜型も少数ながら存在していると考えられた。小児散発例においては、NoV GII/3 と SaV GII.1 が 11 月から 12 月にかけて流行していたと考えられた。

下水流入水と患者から同時期に NoV GII/4 が検出されていることから、下水流

入水中のウイルスは患者発生の傾向を反映していると考えられた。その一方、NoV GI も下水流入水から高頻度に検出されたが、患者からは検出されなかったことから、下水流入水からの検出は不顕性感染の遺伝子型も反映していると思われた。2012/13 シーズンに下水から高頻度に検出された NoV GI/4 は、2014 年における検出頻度が低かった。一方、2013 年では 11 月と 12 月のみ検出された GI/8 が、2014 年では 1 月から 6 月にかけて検出されており、2013/14 シーズンには NoV GI/8 が NoV GI の流行の中心であったと考えられた。

岩ガキから検出された NoV GII/6 は、下水や患者からは検出されなかったものの、2012 年及び 2013 年に県内の胃腸炎集団事例から検出されており、また、他県では 2014 年に多く報告されていることから、引き続き岩ガキの生食にはリスクが伴うことを留意する必要があると考えられた。

SaV については、2013 年に患者から多く検出された GI.1 及び GI.2 が、下水からしか検出されなかったのに対し、2013 年には患者と下水から検出されなかった GII.1 が両者から検出された。このことから、2014 年は GI.1 及び GI.2 は不顕性感染が多く、GII.1 が患者発生の中心であったと考えられた。系統樹解析により、患者から検出された GII.1 株は、下水検出株とは異なる 1 つのクラスターを形成しており、GII.1 の一部の系統が事例を起こしている可能性が考えられた。

NGS によるメタゲノム解析を行った結果、全ての検体から NoV 遺伝子のリード

が得られたものの、全体のリード数に占める NoV のリード数は数%未満と少なかった。そのため、解析の際には全体のリード数を十分に確保する必要があると考えられた。

事例別に見ると、事例 1 では 2 検体とも複数の NoV の遺伝子型が得られた。また、2 検体とも SaV と AiV の配列が検出されており、特に検体 1 では AiV がウイルスのリードの大半を占めていた。これは、本事例が生ガキの喫食を原因としており、カキに含まれる複数のウイルスへの暴露を反映していると考えられる。AiV については他の事例からも検出されており、胃腸炎との関連について慎重に検討する必要がある。

事例 2 は NoV GII/4 が原因とされた事例である。今回 NGS で従業員の解析を行った結果、1 名からは患者と共通の GII/4 のみ、もう 1 名からは GII/13 のみが検出された。そのため、後者はこの集団発生には関与していない可能性が考えられた。

事例 3 は患者から検出された GII/13 の配列にバリエーションが認められた事例だが、NGS による解析で得られた NoV のリード数が少なかったため、検体中の配列のバリエーションまでは検討できなかった。

事例 4 は、異なる遺伝子型が患者から検出され、原因ウイルスの同定が困難であった事例である。NGS による解析では、GII/4 が共通に検出されたが、異なる遺伝子型も各患者から検出されており、さらに多くの患者や患者利用施設の従業員について解析が必要と考えられた。

今回 NGS の解析により得られた NoV の

リード数は、megablast 解析により得られた全リード数の 0.03~2.69%と少ないため、NGS により得られる総リード数が少ないと、少数の遺伝子型を見逃す可能性がある。また、今回の NGS のリード長は 120b 以下と短いため、ウイルスが ORF1/ORF2 junction 等で組み換えを起こしている場合は、PCR と異なる遺伝子型と判定する可能性も考えられる。このことが、ダイレクトシーケンスによる遺伝子型別と NGS による解析で多数を占める遺伝子型が一致しない原因である可能性も考えられる。

NGS を用いて 1 検体からより多くのリード数を解読し、十分な長さのコンティグを得ることや、PCR 産物を解析すること等を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

2014 年のノロウイルス流行型は例年と同様に GII/4 であり、その亜型は Sydney2012 が主流であった。NoV GI/8 は不顕性感染が多かったと考えられた。

NoV 陽性検体より抽出した RNA より NGS を用いた遺伝子解析を試みたところ、ダイレクトシーケンス法で得られた遺伝子型と一致する場合と、異なる遺伝子型のリードも得られる場合があった。感染経路を同定するためには、より多くの検体から検出される遺伝子型を事例内で比較検討することが必要と考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・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

表 1. 集団発生事例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2014年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GII/4	2		3	1	1				1			1	9

(数値：事例数)

表 2. 小児散発例からのノロウイルス及びサポウイルス検出状況

ウイルス		2014年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GII/3	1										2	1	4
	GII/4	1	1			1								3
	GII/13			1										1
SaV	GII.1							1				1	2	4
	GII.3										1			1

(数値：検体数)

表 3. 下水流入水におけるノロウイルス及びサポウイルス検出状況

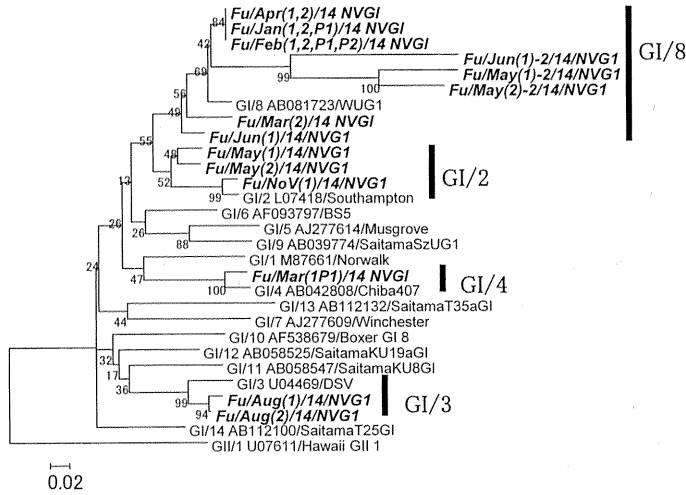
ウイルス		2014年												計
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
NoV	GI/2													2
	GI/3													1
	GI/4													1
	GI/8													6
	GII/4													7
SaV	GI.1													1
	GI.2													2
	GII.1													3

ウイルスが検出された月を灰色で示した。

表 4. 岩ガキにおけるノロウイルス検出状況

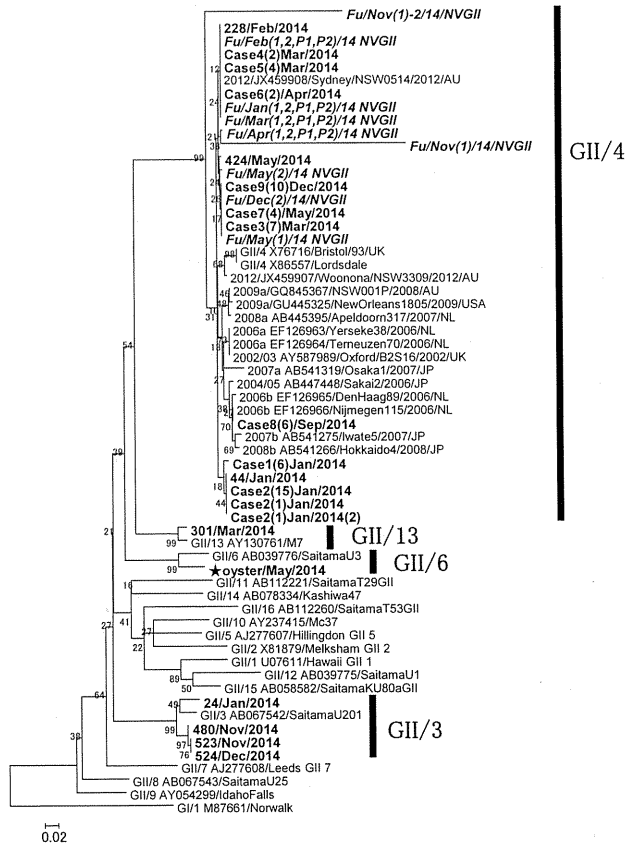
	採取時期		検体数	陽性数	検出ウイルス
	月	旬			
2014年	4月	中旬	2	0	NoV GII/6
	4月	下旬	1	0	
	5月	上旬	2	0	
	5月	中旬	2	1	
	5月	下旬	4	0	
	6月	上旬	4	0	
	6月	下旬	2	0	
	計			17	

図 1. ノロウイルス GI の系統樹



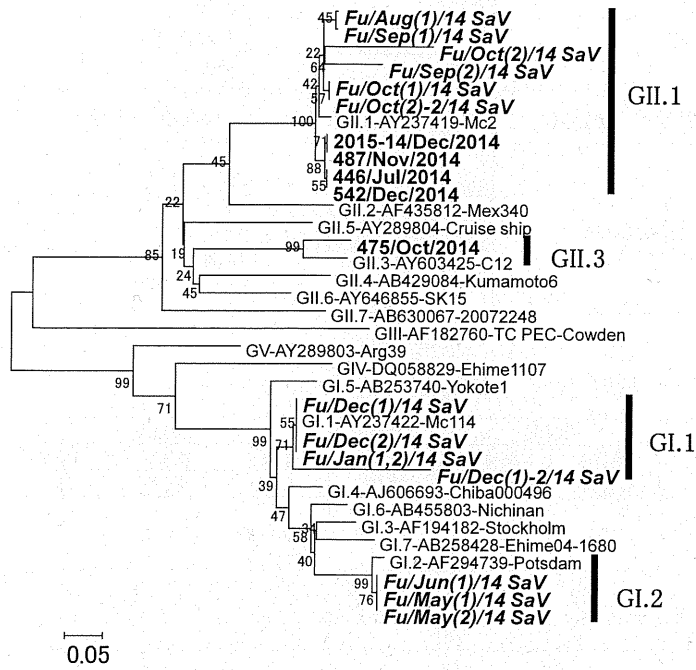
太字のうち斜体は下水流入水から検出されたウイルスを示す。
 その他は参考株（型別 accession no./株名）を示す。

図 2. ノロウイルス GII の系統樹



太字のうち斜体は下水流入水から、★印の付いたものは岩ガキから、それ以外は患者から検出されたウイルスを示す。その他は参考株（型別 accession no./株名）を示す。

図 3. サポウイルスの系統樹



株名については図 1、2 と同じ。参考株については（型別-accession no.-株名）で示す。

表5. メタゲノム解析を行った胃腸炎集団事例の概要

	事例1	事例2	事例3	事例4
発生時期	2011年2月	2012年2月	2012年4月	2013年2月
感染源	食品(生ガキ喫食)	食品	食品	不明
ウイルス検出検体数	6(患者6)	13(患者11、従業員2)	17(患者14、従業員3)	4(従業員1、患者3)
ダイレクトシーケンス検出ウイルス	NoV GI/11 1名 NoV GII/13 3名 NoV GII型不明 1名 SaV GI/2 1名	NoV GII/4 従業員1名はGII/4 1名はGII/13	NoV GII/13 患者の一部よりメジャー配列と異なる配列の株を検出	NoV GII/11 1名 NoV GII/4 1名 NoV GII/4+GI/6 1名 従業員はリアルタイムPCRのみ陽性

表6. メタゲノム解析により検体より検出された胃腸炎ウイルスのリード数

	事例1		事例2		事例3	事例4			
	検体1	検体2	検体3	検体4	検体5	検体6	検体7	検体8	
患者・従業員	患者	患者	従業員	従業員	患者	患者	患者	患者	
ダイレクトシーケンスによるNoV型別	GII/13	GII型不明(混合配列)	GII/4	GII/12	GII/13	GII.17(新統一命名法による)	GII/4	GI/6 GII/4	
総リード数	416,950	187,772	269,202	11,940	10,782	472,134	134,680	57,474	
MegaBLAST解析リード数	272,894	93,291	202,603	8,852	4,618	186,357	86,159	24,544	
ウイルスリード数	36,115	416	507	28	12	286	2,361	102	
NoV	536	316	58	26	5	133	2318	89	
遺伝子型	GI/6							10	
	GII/1					2			
	GII/2		38						
	GII/3		20				76		
	GII/4			57			10	2316	79
	GII/6	15							
	GII/7		33						
	GII/8		27						
	GII/9		1						
	GII/10							2	
	GII/12				26				
	GII/13	465	124			5			
	GII/14	36	16						
GII.17						2			
GII/該当なし(新統一命名法ではGII.20)		6							
GII型不明		5	1						
SaV	28	5							
AiV	35,440	5	13		2	22	6	2	

ダイレクトシーケンスにより検出された NoV 遺伝子型を灰色で示した。

平成 26 年度厚生労働科学研究費補助金(食品の安全確保推進研究事業)

「食品中の病原ウイルスの検出法に関する研究」

研究分担報告

ウイルスの食品検査の精度管理

研究分担者	渡辺 卓穂	一般財団法人食品薬品安全センター
研究協力者	野田 衛	国立医薬品食品衛生研究所
	上間 匡	国立医薬品食品衛生研究所
	吉澄 志磨	北海道立衛生研究所
	筒井 理華	青森県環境保健センター
	斎藤 博之	秋田県健康環境センター
	秋野 和華子	秋田県健康環境センター
	植木 洋	宮城県保健環境センター
	木村 俊介	宮城県保健環境センター
	田村 務	新潟県保健環境科学研究所
	青木 順子	新潟県保健環境科学研究所
	稲崎 倫子	富山県衛生研究所
	森 功次	東京都健康安全研究センター
	宗村 佳子	東京都健康安全研究センター
	永野 美由紀	東京都健康安全研究センター
	木本 佳那	東京都健康安全研究センター
	入谷 展弘	大阪市立環境科学研究所
	三好 龍也	堺市衛生研究所
	飯塚 節子	島根県保健環境科学研究所
	山下 育孝	愛媛県立衛生環境研究所
	溝田 文美	愛媛県立衛生環境研究所
	原田 誠也	熊本県保健環境科学研究所
	吉岡 健太	熊本県保健環境科学研究所

研究要旨

国内で食品のノロウイルス検査を実施している 12 機関を対象として、共通試料を配布することにより外部精度管理を行った。陽性試料 4 種（高濃度 2 種、低濃度 2 種）、陰性試料 1 種および標準 cDNA 溶液を調査試料として配布し、定量検査を各検査機関にて実施した後、回収した結果について解析を行った。なお、検査方法は指定した共通の方法とした。また、検量線作成に使用する

cDNA 溶液についても各機関で通常使用している cDNA 溶液と共通で配布した cDNA 溶液の 2 種とした。その結果、陰性試料については一部のデータを除いて全ての検査機関で正しい結果を報告した。これに対して陽性試料については検量線作成時の cDNA 溶液の種類間で低濃度試料の換算量の平均に有意差が認められた。これらの変動については試料により程度の差はあるが、配布 cDNA で検量線を作成し測定したほうが機関 cDNA で測定した結果に比べすべての試料で低い傾向が認められた。これは検量線作成に使用する cDNA 溶液の定量値は配布の方が機関で使用されている定量値よりも高いということが推察された。また、配布 cDNA は機関 cDNA より濃度のばらつきが少ないことが確認された。今回、測定法を共通化した、測定するまでの前処理工程が多いことや、その処理方法、試薬もさらに規定することで検査結果のばらつきが少なくなるものと思われた。

A. 研究目的

食品検査はその食品の安全性を担保するためのひとつの手段であるが、この検査結果をもって市場への流通の可否を判定することになることから、その結果の妥当性を明確にする必要がある。また、検査結果はどの検査機関で実施しても同等の検査結果が得られることが求められる。そのためにも結果の信頼性を確保する必要があり、食品検査については平成 9 年度より GLP が導入された。また、国際的な試験所認定でもある ISO/IEC17025 では定期的な技能試験への参加が求められている。現状において、一般的な微生物検査については国内においても技能試験が実施されているが、ノロウイルス検査については国内では導入されていない。また、これまでの検討結果からノロウイルス検査は比較的検査機関間のばらつきが大きいことが経験則から得られていることから、今後の外部精度管理の実施においてその評価方法を含めて決定することが必要となる。そのため、本研究では、

共通試料を用いた外部精度管理を行うことにより、各機関での検査精度の実状を把握することに加え、その結果から考察される検査方法および検量線の測定値に及ぼす影響について検討することとした。

B. 研究方法

1. 調査試料

調査試料は糞便乳剤 5 種、標準 cDNA の合計 6 種とした。糞便乳剤の検体-1 は陰性、検体-2 および検体-3 が陽性(高濃度)、検体-4 および検体-5 (低濃度) とし、これらの事前測定結果は以下のとおりであった。検体-2: $6.77 \times 10^3 \pm 3.61 \times 10^2$ コピー、検体-3: $7.50 \times 10^2 \pm 5.16 \times 10^1$ コピー、検体-4: $6.76 \times 10^1 \pm 8.11 \times 10^0$ コピー、検体-5: $7.71 \times 10^0 \pm 5.03 \times 10^0$ コピー (いずれも実測値)。

2. 外部精度管理の実施

協力機関である 12 機関を対象として、2014 年 9 月 1 日に国立医薬品食品衛生研究所より調査試料の発送し、結果報告期限を 2014 年 10 月 17 日とした。なお、検

査方法については、あらかじめ指定した共通の検査方法 (QIAamp Viral RNA Mini キットを用いた RNA の抽出、DNase 処理、逆転写反応およびリアルタイム PCR の実施) (以下、方法 B とする) とした。また、検量線作成に使用する標準 cDNA 溶液については、通常の検査で各検査機関が使用している cDNA 溶液 (以下、機関 DNA とする)、共通で配布した cDNA 溶液 (以下、配布 DNA とする) の 2 種とした。すなわち、各検査機関は各調査試料について、2 種の検量線で定量を行った。各検査機関から結果を回収し、得られた結果について統計解析を行った。なお、統計解析および作図は JMP を使用した。2 種の検量線間の平均値の群間比較は Tukey-Kramer の HSD 検定により行い、 $p < 0.05$ のとき有意差ありとした。

(倫理面への配慮)

本研究では、特定の研究対象者は存在せず、倫理面への配慮は不要である。

C. 研究結果

1. 外部精度管理結果

12 機関より回収した結果から基本統計量を求め、これを表 1 および表 2 に示した。このときの有効データ数は 12 機関とした。なお、解析は実数と対数変換値の 2 種により行い、それぞれ実測値と糞便乳剤 1mL あたりの換算量を算出した。実数で基本統計量を算出したところ、いずれの糞便乳剤試料においても変動係数が大きくばらつきが大きいことから、外部精度管理での評価を行うことは困難であると今年度も判断した。これに対して対数換算値を解析に用いることにより、高濃

度の変動係数は、昨年度と同様にほとんどの試料で 0.1 程度となり、結果の評価を行うことが可能であるものと判断された。一方、低濃度の変動係数は検体-4 では高濃度と同様に 0.1 程度となったが、さらに低濃度の検体-5 では変動係数が大きくなった。

2. 検量線作成用 cDNA 溶液の影響

昨年度は方法によるばらつきが大きいことがわかり、今年度は共通の検査法 B を用い、各検査機関で検量線作成用に使っている cDNA と配布した共通の cDNA について比較を行った。昨年度は対数換算値を採用することにより結果の評価を行うことは可能であると判断し、今年度も同様に対数換算値の比較を行った。まず実測値において、各報告値の分布を確認したところ、糞便乳剤の高濃度の検体-2、検体-3 および低濃度の検体-4、検体-5 において、配布 DNA の検量線を用いた測定値は機関 DNA の測定値より低い傾向が認められた (図 1、図 2)。この傾向は、昨年度の結果より顕著であった。一方、標準 cDNA についても同様な傾向が認められた (図 3)。これらの結果は、実測値と 1mL あたりの換算量のいずれにおいても同様な傾向が認められ、図 5 に示すように検体-4 においては、配布 DNA で測定した方が機関 DNA で測定した値よりも有意に低かった。また、標準 cDNA 溶液の測定値において、機関 DNA のほうが配布 DNA よりもデータ分布のばらつきは大きかった (図 3)。これは、昨年度と同様な傾向が認められた。しかし、この傾向は糞便乳剤試料では認められなかったのも同様であった (図 1、図 2、図 4、図 5)。図 7

にそれぞれの検量線 DNA で測定した全調査試料の測定値をプロットしたものを示す。実測値および換算量ともに上述したように $y=x$ より下に測定値があることより機関 DNA を用いて定量した方が高めの値となっていることが確認された。

3. 検量線の作成状況の比較

標準 cDNA 溶液という基材の影響がない試料において、検量線作成に使用する cDNA 溶液の種類により結果が異なったことから、機関 DNA と配布 DNA の測定結果をプロットした。各濃度の Ct 値を確認したところ、いずれの濃度においても高い相関が認められた (図 8)。しかし、これを各標準 cDNA 溶液で作成した検量線を用いて濃度換算することにより、機関 DNA と配布 DNA 間で大きいところでは $1.5\log$ 程度の差異が認められた (図 8)。また、参加機関毎の機関 DNA と配布 DNA の Ct 値を比較したものを図 9 に示す。コピー数が多いほど Ct 値は低くなることから負の検量線となる。機関 DNA は配布 DNA に比べばらつきは大きいことが確認された。また、配布 DNA の方が機関 DNA より Ct 値が低いことも確認された。

4. 外部精度管理の評価方法の検討

本研究の最終的な目的は外部精度管理を実施することである。そのためにも得られた結果について各参加機関の評価を行う必要がある。そこで、今回得られた結果を用いて評価方法を検討することとした。今年度は、前年度と同様に 3 回の繰り返し測定を実施していることから、測定値とばらつきの両者を評価するため、 \bar{X} -R 管理図を用いることとした。このとき R 管理図における管理限界線は JIS

に記載の係数表を用いて算出した値とした。各測定値を並べて観察すると、明らかに小さい値あるいは大きい値となる機関は限られていた。同様に R 管理図においても設定した管理限界線を超える機関はごく一部に限られていた (図 10~14)。

D. 考察

本研究では、糞便試料および標準 cDNA 溶液を配布することにより、外部精度管理を実施した。今年度は、糞便試料として高濃度試料 2 種と低濃度試料 2 種を用いて変動要因と考えられる検量線作成用 cDNA の影響について検討したところ、低濃度試料の換算量で平均値に有意差が認められた。すなわち、配布 DNA で定量した方が機関 DNA で定量した測定値より低い結果が認められた。しかし、他の試料については有意な差は認められなかったが、全体的に同様の傾向が認められた。これは、昨年度の高濃度糞便試料の結果と比べその差は大きい傾向であった。一方で、低濃度の糞便試料においても同様の傾向が認められた。ただし、これらのデータには、計算ミス、入力ミスの可能性の高いものも含まれていることから、外れ値をトリミングすることと n 数を増やすことでより精度管理を行う上での問題点が明らかになると思われる。また、測定値のばらつきについては、外部精度管理参加者からの聞き取りによって、前処理工程の違いや試薬の影響、さらには試験日、試験者の違いに大きく左右されることが示唆された。

検量線の作成状況について解析を行った。その結果、昨年度は cDNA の種類間で

Ct 値としては大きく変わらないが、濃度換算を行ったときに、機関 DNA のほうが配布 DNA よりも濃度が低い機関がいくつか認められたが、今年度はそれぞれの DNA の Ct 値を比較することで明らかに配布 DNA の Ct 値は機関 DNA の Ct 値より低くばらつきも少ないことが確認された。すなわち、配布 DNA を用いることで定量検査結果に対する影響も少なくなることが考えられた。

さらに、外部精度管理を実施するためには評価方法を決定する必要があるが、ここでは Xbar-R 管理図を使用して解析を行った。3 回測定を行った際の機関内のばらつきは通常の R 管理図における管理限界線を採用することで問題ないと考えられた。これは昨年度の結果と同様であった。一方、Xbar 管理図では並列でデータを観察した際に大きく外れたデータの出現頻度もそれほど高くないことから、対数変換値での z -スコア=2 または 3 の値を管理限界線と設定して、この範囲を超えた場合に異常値と見なすことが妥当であるとも考えられる。これは昨年度は高濃度のみの検討となったが、今年度は低濃度についても検討した結果、高濃度と同様な傾向が認められたことから妥当性はあると考えられる。今後さらに詳細に検討することで、Xbar 管理図の管理限界線の設定の妥当性が明確になると思われた。

E. 結論

糞便試料を用いたノロウイルス検査の外部精度管理を 12 機関を対象に実施した。検査方法を共通法、検量線作成用 cDNA を 2 種の 2 条件について 6 試料につき実施したところ、各機関で使用している検量線作成用 cDNA 溶液の濃度表示にばらつきがあり、配布 DNA に比べ濃度が低いことがわかった。一方、外部精度管理を実施するうえでの評価方法についても検討したところ、昨年度と同様に得られた測定値の対数変換値を用いて Xbar-R 管理図を採用することにより、評価ができるものと考えられた。なお、Xbar 管理図における管理限界線については、さらにデータを集積したうえで判断する必要があるものと考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・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

表1 ノロウイルス検査の外部精度管理結果（実測値での解析）

実測値		実数値での解析	対数値での解析
検体-2	機関DNA	$1.272 \times 10^4 \pm 3.473 \times 10^4$	3.342 ± 0.708
	配布DNA	$3.106 \times 10^3 \pm 7.945 \times 10^3$	2.959 ± 0.547
検体-3	機関DNA	$7.969 \times 10^2 \pm 1.888 \times 10^3$	2.328 ± 0.596
	配布DNA	$2.217 \times 10^2 \pm 4.976 \times 10^2$	1.921 ± 0.490
検体-4	機関DNA	$6.203 \times 10^1 \pm 1.210 \times 10^2$	1.301 ± 0.596
	配布DNA	$2.326 \times 10^1 \pm 5.421 \times 10^1$	0.857 ± 0.488
検体-5	機関DNA	$1.078 \times 10^1 \pm 2.421 \times 10^1$	0.438 ± 0.617
	配布DNA	$4.258 \times 10^0 \pm 1.175 \times 10^1$	0.025 ± 0.478
標準cDNA	機関DNA	$8.173 \times 10^5 \pm 2.013 \times 10^6$	5.375 ± 0.574
	配布DNA	$1.511 \times 10^5 \pm 2.100 \times 10^5$	5.032 ± 0.283

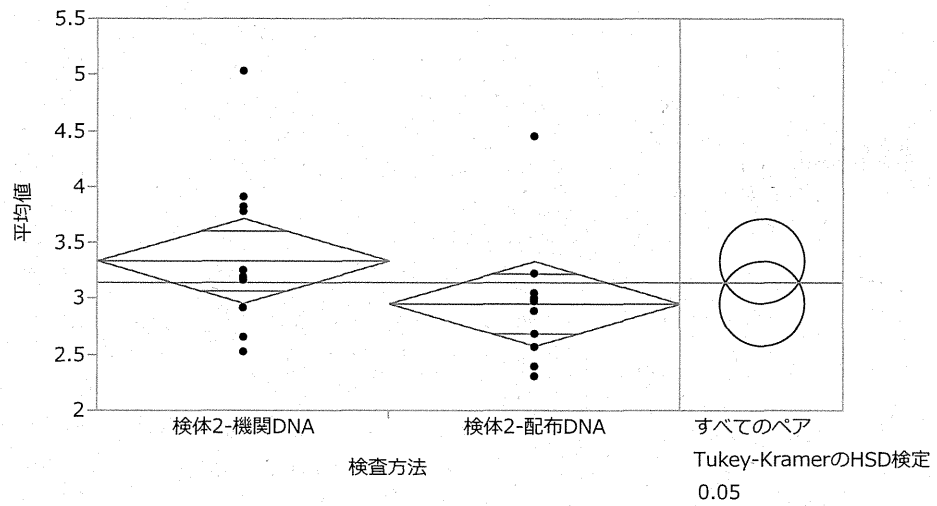
単位：コピー

表2 ノロウイルス検査の外部精度管理結果（換算量での解析）

換算量		実数値での解析	対数値での解析
検体-2	機関DNA	$1.537 \times 10^7 \pm 4.163 \times 10^7$	6.479 ± 0.652
	配布DNA	$3.772 \times 10^6 \pm 9.517 \times 10^6$	5.966 ± 0.681
検体-3	機関DNA	$9.671 \times 10^5 \pm 2.261 \times 10^6$	5.466 ± 0.532
	配布DNA	$2.736 \times 10^5 \pm 5.943 \times 10^5$	5.059 ± 0.446
検体-4	機関DNA	$7.565 \times 10^4 \pm 1.447 \times 10^5$	4.439 ± 0.543
	配布DNA	$2.869 \times 10^4 \pm 6.476 \times 10^4$	3.994 ± 0.456
検体-5	機関DNA	$1.305 \times 10^4 \pm 2.901 \times 10^4$	3.225 ± 0.917
	配布DNA	$5.179 \times 10^3 \pm 1.408 \times 10^4$	2.812 ± 0.742
標準cDNA	機関DNA	$1.058 \times 10^9 \pm 2.520 \times 10^9$	8.422 ± 0.678
	配布DNA	$1.929 \times 10^8 \pm 2.731 \times 10^8$	8.069 ± 0.398

単位：コピー/mL

検体-2



検体-3

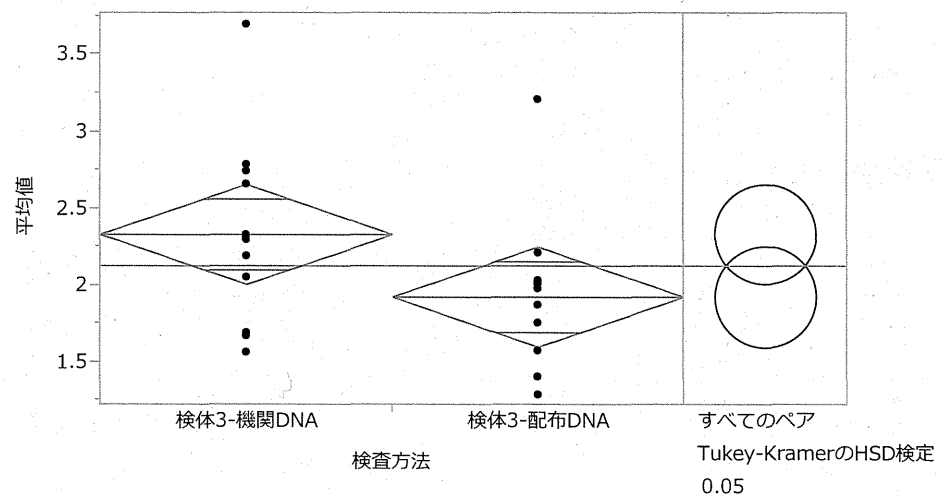


図1 検体-2、検体-3における検量線ごとのデータ分布（実測値）