

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）

平成 27 年度総括研究報告書

## 地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出および リスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化と 技術開発に関する研究

研究代表者 小田切孝人 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・  
センター長

### 研究要旨

改正感染症法が平成 28 年から施行されることから、法的に病原体サーベイランスおよび核酸（PCR）検査精度管理の強化が義務付けられる。これにより、全国地方衛生研究所（地衛研）におけるインフルエンザ検査期間と収集検体数が規定され、通年でのインフルエンザサーベイランス体制を維持すること、および PCR 検査の精度管理の外部評価試験の定期的な実施が必要となる。本研究班では、法の施行に先立ち、PCR 検査の外部精度管理試験（External Quality Assessment, EQA）をコア・サポート地衛研 - 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（感染研）との連携体制を基盤に実施してきた。全国規模での EQA の実施は 3 回目を迎え、試験パネルの内容も充実させ、本年度はその最終年度にあたる。これにより PCR 検査精度は全国的に格段に向上し、当初の目標どおり全国レベルで検査の「質」の確保が達成されつつある。また、これと並行して全国共通で採用可能な手順書、教育訓練記録書などのひな形を作成し、文書整備を進めた。これら検査精度管理の組織的な実施成功例は、改正感染症法の施行における模範となっている。一方、PCR 検査体制整備を追いかける形で進められたウイルス分離体制の強化への取り組みは、第 2 回目のアンケート調査でより現実的な対応の段階に入っている。ウイルス分離効率の悪い地衛研を特定して、要望に応じて現地研修を実施し改善策を講じた。一方、ウイルス遺伝子情報の計算科学によるウイルスリスク評価およびウイルス変化予測への取り組みは、大規模計算の実施基盤を強化することにより、リスク予測の精度が格段に向上することが見込める。これは、WHO 世界インフルエンザ監視対応ネットワークが H28 年度から本格的に開始するウイルス変化予測を利用したワクチン株の選定法の改良プロジェクトの先導的な役割を成し、本研究からの成果は国際貢献にとっても期待されている。

## A . 研究組織

研究代表者：

小田切孝人 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 センター長

研究分担者：

皆川洋子 愛知県衛生研究所 所長

影山 努 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 室長

今井正樹 東京大学医科学研究所 准教授

佐藤裕徳 国立感染症研究所病原体ゲノム解析研究センター 室長

## B . 研究目的

本研究班では、新型インフルエンザ発生に備えて地衛研 感染研の連携をスムーズにすること、また、季節性インフルエンザ株サーベイランスおよび PCR 検査の強化と改善を効果的に実施する体制の整備をすることを目標にして進められてきた。本研究班における 2 期 6 年間にこれらの試みは、H28 年 4 月に施行される改正感染症法により、法的にもバックアップされインフルエンザ対策のさらなる強化につながる。本研究ではコア・サポート地衛研 - 感染研共同研究体制を基軸に進めてきた PCR 検査 EQA およびウイルス分離体制の整備と改善を継続的に行い、並行して必要な文書整備を進め、全国地衛研が一律に対応できるように支援する。

一方、新型インフルエンザの発生時には、原因ウイルスの入手には数ヵ月という長い時間がかかり、入手を待っていると初動対応の遅れにより、流行拡大や健康被害の増大につながる。近年では、新型インフルエンザウイルス発生当事国は、速やかに遺伝子情報を開示することが紳士協定として履

行されていることから、ウイルスが入手できなくても遺伝子情報をもとにリスク評価を行うことは可能である。そのため、計算科学を用いたウイルスのリスク評価や変化予測をより短時間で高い精度で行うことが求められ始めている。これは、新型インフルエンザのみならず、季節性インフルエンザワクチンの検索や選定においても、強力な支援ツールとなることから、H28 年度から WHO は国際連携プロジェクトを本格的に立ち上げ、ワクチン株選定法の改良に取り組む予定である。本研究班のこれまでの取り組みは、これを先取りした対応であり、本研究からの成果は WHO から期待されている。

本研究は厚生労働省の健康行政の実施に直結しているが、創薬や研究開発を追求した新研究支援機構が発足したことから、予算の削減により当初の本研究班の規模を維持できなくなり、3 つの分担研究を削減せざるを得なかった。中軸となる研究目的はかろうじて維持しているが、改正感染症法の履行を着実に支援するためには、このような行政施策に直結する研究への予算措置が今後の課題である。

## C . 研究方法

1. 平成 28 年 4 月以降、感染症法に基づき季節性インフルエンザまたは鳥インフルエンザ検査を実施するにあたり、文書整備を進めた。
2. 全国の地方衛生研究所を対象に第 3 回 PCR 検査 EQA を実施。全国 74 カ所の地方衛生研究所に対して、2015 年 7 月に「EQA2015 実施要項」(添付資料 1)および参加登録票の配布。試験パネルを配布した。
3. 全国 80 カ所の地衛研を対象にウイル

ス分離・培養の実施状況に関する第2回アンケート調査を実施。

4. HA タンパク質をモデル分子とした MD simulation の実施。インフルエンザ研究センター - 人獣共通感染症リサーチセンター（北海道大学） - 病原体ゲノム解析研究センターの3者が連携した疫学・計算科学の統合環境の整備を進めた。

## D . 研究結果

1. 検査、教育訓練等の手順書などの文書整備を進めるため、書式のひな形を作成し、全国地衛研に参考資料として提示した。

2. 全国 73 カ所の地方衛生研究所を対象にして第3回 EQA を実施した。このために配布した文書は、「第3回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施結果について」、「精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」、「トラブルシューティング時のフローチャート」、「EQA2015 の結果およびアンケートの集計」である。

3. ウイルス分離培養技術の精度向上を目指して、全国 80 カ所の地衛研を対象に第2回アンケート調査を実施し、77 カ所（46 都道府県、31 政令指定都市、中核市・特別区）から回答が得られた。

分離効率に関しては、75%以上の高い効率で分離している研究機関が 68 機関の半数（34 機関）を占めた。一方、前回の調査から改善の見られていない地衛研が特定された。これらの機関から研修の要望があった2機関において、それぞれの機関で実地研修を行った。その結果、2機関に共通していたことは、前任者からの引継ぎがうまく行っていなかったこと、また担当者に経験者がいなかったことが挙げられた。

4. MD simulation の実施における環境整備 MD simulation の実施のために対象分子とその変異情報を国立感染症研究所インフル

エンザ研究センター第一室から随時入手できる体制を整備した。MD の高速計算を可能とする高性能サーバの確保のために、北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターのバイオインフォマティクス部門と共同研究体制を構築し、当該施設が所有するスーパーコンピュータを使用して MD simulation を実施し、成果を共有することが可能となった。

## E . 考察

改正感染症法の平成 28 年度施行を目指して、PCR 検査 EQA を全国規模で3回実施した。これにより、全国的なインフルエンザ PCR 検査の「質」の向上が確保された。インフルエンザウイルス検査の EQA は地衛研組織に定着すると思われるが、担当者の世代交代においても息長くこの体制を維持するためには、今回の法改正が強力な後ろ盾となる。今後、EQA 企画機関と実施機関双方の負担軽減策も模索する必要があり、試験パネル配布や評価成績の集計など外部機関への委託を検討すべきかも知れない。

また、EQA の実施記録や次世代の後継者に技術を継承するためには、記録文書の整備と保管、引継ぎ体制の整備も継続的に進める必要があり、本研究班から提示した書式のひな形を有効活用して、全国一律に整備を進めてもらいたい。

株サーベイランスの根幹は原因ウイルスの分離回収を効率よく実施できる環境整備と担当者の質の向上、教育訓練が不可欠である。PCR 検査精度の整備には遅れたが、これも2回にわたるアンケート調査で実態把握と教育訓練の必要な機関を特定し、現地対応で解決へ向けた方策を講じた。大半の地衛研は 50%以上の分離効率を維持しており、諸外国に比べて高いレベルと精度を維持していると思われる。今後は、定期的

に感染研と情報交換をしてウイルスの性状変化に適正に対処できる技術の維持に努めたい。

疫学情報とリンクさせた遺伝子配列情報から MD simulation を実施し、ウイルス変化予測およびリスク評価を実施してきたが、より取扱量と分析結果を得るまでの時間短縮のためにスーパーコンピュータを駆使した環境整備に着手した。WHO はワクチン株選定にこのシュミレーション法を本格的に導入することを決め、H28 年度から動き出す。本研究からの成果は、それを先取りしており、WHO および国内のワクチン株選定法の改良に貢献していきたい。

## F . 結論

・コア・サポート地衛研 - 感染研共同研究体制第 2 期の最終年度を迎えて、今後の存続が期待されている。その可否は厚生労働行政に直結する研究への予算配分次第である。

・全国地衛研を対象とした EQA が 3 度実施され、PCR 検査技術の大幅な改善と均てん化が達成された。

・EQA の定着に伴ってそれらに必要な文書整備がすすめられた。

・ウイルス分離・培養環境整備と問題解決のための第 2 回アンケート調査を実施した。要望に応じて、実地研修を実施し、改善への策を講じた。

・MD simulation の実施の高速化への環境整備として、北大との共同研究体制を構築し、WHO ワクチン株選定会議への貢献を視野に準備を進めた。

## G . 研究発表

### 1 . 論文発表

1) Tadaki Suzuki, Akira Kawaguchi, Akira Ainaia, Shin-ichi Tamura, Ryo Ito,

Pretty Multihartina, Vivi Setiawaty, Krisna Nur Andriana Pangesti, Takato Odagiri, Masato Tashiro, and Hideki Hasegawa Relationship of the quaternary structure of human secretory IgA to neutralization of influenza virus. PNAS (2015 May) www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1503885112

2) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M, and the Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of a large outbreak of influenza A(H1N1)pdm09 virus cross-resistant to oseltamivir and peramivir in the 2103-14 influenza season in Japan. Antimicrob Agents Chemother. 2015 May;59(5):2607-17. doi: 10.1128/AAC.04836-14. Epub 2015 Feb 17.

3) Sakai K, Sekizuka T, Ami Y, Nakajima N, Kitazawa M, Sato Y, Nakajima K, Anraku M, Kubota T, Komase K, Takehara K, Hasegawa H, Odagiri T, Tashiro M, Kuroda M, Takeda M. A Mutant H3N2 Influenza Virus Uses an Alternative Activation Mechanism in Tmprss2 Knockout Mice by Loss of an Oligosaccharide in the Hemagglutinin Stalk Region. J Virol. 2015 May 1;89(9):5154-8. doi: 10.1128/JVI.00124-15. Epub 2015 Feb 11.

4) Bedford T, Riley S, Barr IG, Broor S, Chadha M, Cox NJ, Daniels RS, Gunasekaran CP, Hurt AC, Kelso A, Klimov A, Lewis NS, Li X, McCauley JW, Odagiri T, Potdar V, Rambaut A, Shu Y, Skepner E, Smith DJ, Suchard MA, Tashiro M, Wang D, Xu X, Lemey P, Russell CA Global circulation patterns of seasonal influenza viruses vary with antigenic dr

ift Nature. 2015 Jul 9;523(7559):217-20. doi: 10.1038/nature14460

5) Ainai A, Hasegawa H, Obuchi M, Odagiri T, Ujike M, Shirakura M, Nobusawa E, Tashiro M, Asanuma H Host Adaptation and the Alteration of Viral Properties of the First Influenza A/H1N1pdm09 Virus Isolated in Japan PLoS One. 2015 Jun 16;10(6):e0130208. doi: 10.1371/journal.pone.0130208.

6) Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India, March 2015. Jpn J Infect Dis. 2016 Jan 21;69(1):83-6. doi: 10.7883/yoken.JJID.2015.460

7) Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Neya S, Hoshino T Structural and computational study on inhibitory compounds for endonuclease activity of influenza virus polymerase. Bioorg Med Chem. 2015 Sep 1;23(17):5466-75. doi: 10.1016/j.bmc.2015.07.0

8) Takayama I, Hieu NT, Shirakura M, Nakauchi M, Fujisaki S, Takahashi H, Nagata S, Long NT, Odagiri T, Tashiro M, Kageyama T. Novel Reassortant Avian Influenza A(H5N1) Virus in Human, Southern Vietnam, 2014. Emerg Infect Dis. 2016 Mar;22(3). doi: 10.3201/eid2203.151360

## 2. 学会発表

1) Shinji Watanabe, Kazuya Nakamura, Seiichi Fujisaki, Masayuki Shirakura,

Emi Takashita, Noriko Kishida, Tomoko Kuwahara, Aya Sato, Ogawa Rie, Hiromi Sugawara, Miki Akimoto, Hideka Miura, Takato Odagiri, The Influenza Surveillance Group of Japan Characterizations of circulating influenza viruses in the 2014/2015 season and vaccine viruses selected for the 2015/16 season 第63回日本ウイルス学会 2015年11月 福岡

2) E Takashita, S Fujisaki, N Gabriele, Y Furuta, Y Kawaoka, M Tashiro, T Odagiri. Antiviral susceptibility of influenza viruses isolated from patients pre- and post-administration of favipiravir. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

3) C Kawakami, E Takashita, S Fujisaki, M Saikusa, S Usuku, T Odagiri, K Mitamura. Genetic analysis of influenza B viruses isolated during the five seasons in Yokohama. 第63回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

4) 高下恵美、小川理恵、藤崎誠一郎、中村一哉、白倉雅之、岸田典子、桑原朋子、菅原裕美、佐藤彩、三浦秀佳、秋元未来、渡邊真治、小田切孝人 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況 第47回日本小児感染症学会、福島、2015

5) C Kawakami, K Shimizu, S Usuku, K Mitamura, E Takashita, S Fujisaki, T Odagiri. Gene Analysis of Influenza B Viruses in Yokohama during the Past 5 Seasons. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015

6) E Takashita, M Kiso, S Fujisaki, M Yokoyama, K Nakamura, M Shirakura, H S

ato, T Odagiri, Y Kawaoka and M Tashiro. Characterization of a Large Cluster of Influenza A(H1N1)pdm09 Virus Cross-Resistant to Oseltamivir and Peramivir during the 2013/2014 Influenza Season in Japan. The 4th isirv Antiviral Group Conference, Texas, USA, 2015

7) 高下恵美, 小川理恵, 藤崎誠一郎, 中村一哉, 白倉雅之, 岸田典子, 桑原朋子, 菅原裕美, 佐藤彩, 三浦秀佳, 秋元未来, 渡邊真治, 小田切孝人. 2014/15 シーズンにおける日本国内の抗インフルエンザ薬耐性ウイルス検出状況. 第 47 回日本小児感染症学会. 2015 年 10 月. 福島.

8) Yasushi Suzuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Eri Nobusawa Development of a high-growth PR8 master virus for influenza vaccine production in cell culture systems. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

9) Akira Ainai, Shinji Saito, Tadaki Suzuki, Norihiro Harada, Shin-ichi Tamura, Yoshikazu Yuki, Takato Odagiri, Masato Tashiro, Haruko Takeyama, Hideo Tsukada, Hiroshi Kiyono, Hideki Hasegawa Impact of a nasal mucoadhesive excipient on enhancement of immune responses induced by intranasal vaccination against influenza. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、福岡、2015

10) 相内章、鈴木忠樹、池田千将、寺内芳彦、齊藤慎二、田村慎一、小田切孝人、田代真人、長谷川秀樹 経鼻インフルエンザワクチン接種直前の鼻腔洗浄が誘導される抗体応答に与える影響 第 19 回日本ワクチン学会、犬山、2015

11) 島崎典子、原田勇一、落合雅樹、板村

繁之、小田切孝人 4 価インフルエンザ HA ワクチン B 型 2 系統 HA 抗原量を適正に測定するための一元放射免疫拡散試験法の評価及び実施手順の確立 第 19 回日本ワクチン学会、犬山、2015

## H . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

無し

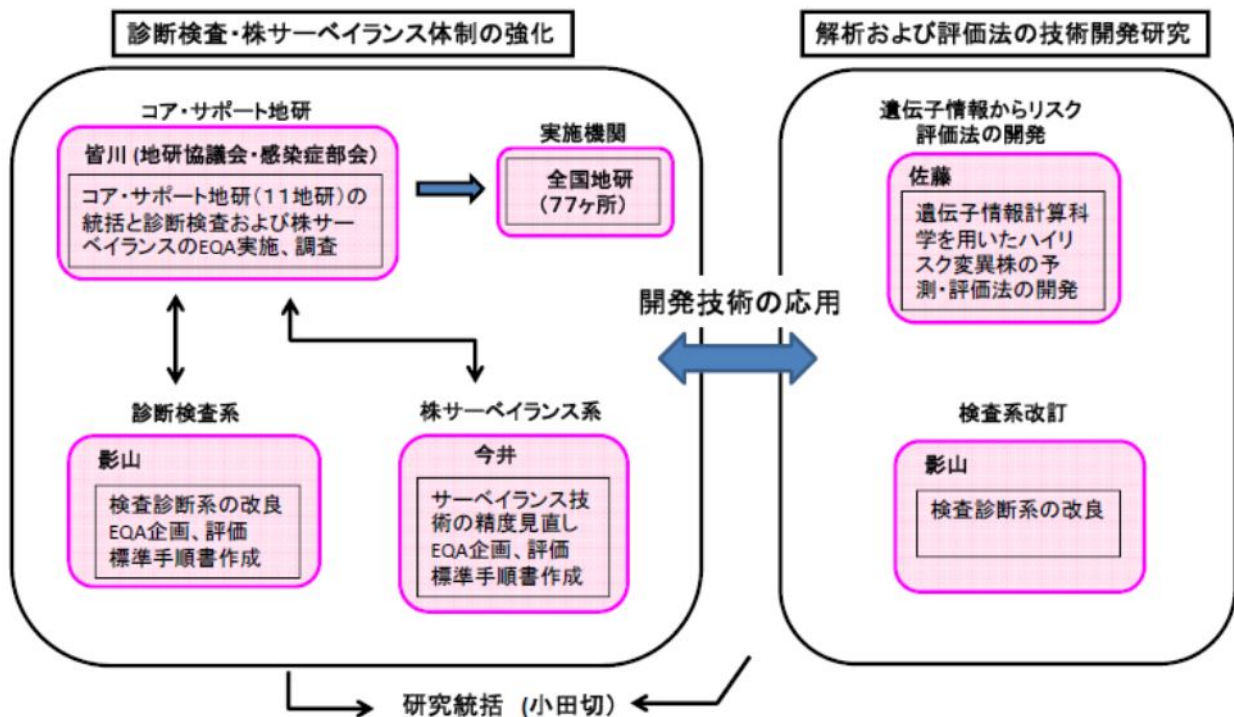
2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

## 研究項目の概要と役割分担および相互関連



本研究は精度管理された診断検査・株サーベイランス体制を構築するために、基礎研究チームで研究開発した技術を導入し、コア・サポート地衛研で試験的实施、問題点の修正、改善等による標準化を行い、全国展開する。また基礎研究では新型ウイルスの出現の際に、遺伝子解析およびウイルス性状解析からヒトへのリスク、パンデミックリスクの評価系の開発を目指す。





## 1. 分担研究報告書



## インフルエンザウイルス検査研究体制における地方衛生研究所間 及び国立感染症研究所との連携強化に関する研究

研究分担者 皆川洋子 愛知県衛生研究所・所長

### 研究協力者

高橋雅輝	岩手県環境保健研究センター（コア地衛研）
長島真美、秋場哲哉、貞升健志	東京都健康安全研究センター（コア地衛研）
森川佐依子、廣井 聡、加瀬哲男	大阪府立公衆衛生研究所（コア地衛研）
山下育孝、四宮博人*	愛媛県立衛生環境研究所（コア地衛研）
芦塚由紀、千々和勝己	福岡県保健環境研究所（コア地衛研）
駒込理佳、三好正浩、長野秀樹	北海道立衛生研究所（サポート地衛研）
川上千春	横浜市衛生研究所（サポート地衛研）
小淵正次、滝澤剛則	富山県衛生研究所（サポート地衛研）
三好龍也	堺市衛生研究所（サポート地衛研）
喜屋武向子、久場由真仁	沖縄県衛生環境研究所（サポート地衛研）
安井善宏	愛知県衛生研究所（コア地衛研）

\* 地方衛生研究所全国協議会 感染症対策部会長

### 研究要旨

平成 28 年 4 月の感染症法改正に伴い、五類定点把握疾患の季節性インフルエンザ及び二類感染症の鳥インフルエンザの病原体検査は、質の確保が求められることとなった。検査の「質」確保のために新たに必要となる検査関連書式等について検討し、ひな形等を作成した。血球凝集性の低下等流行ウイルス株の変化に対するウイルスサーベイランス上の対応や、影山分担研究者による遺伝子検出外部精度管理の設問等実施要領や、高下博士による抗インフルエンザ薬感受性監視株数の確保について、感染研に現場の立場で協力した。各研究協力者はインフルエンザウイルス動向に関する迅速な情報提供及び関連調査研究に努め、研究会・学会発表や雑誌等への論文投稿を積極的に行った。

### A. 研究目的

2010 年に地方衛生研究所全国協議会（地全協）感染症対策部会と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の理解のもと、コア・サポート地衛研体制として感染研-地研ネットワークが可視化され、

ウイルスサーベイランス並びにパンデミック対応に加え、ヒトにおける鳥インフルエンザ疑い事例の遺伝子検査に対応している。平成 28 年 4 月 1 日に施行される改正感染症法においては、他の病原体に先行する形で季節性インフルエンザウイルスの病原体情

報収集が定められ、病原体検査のなかでもインフルエンザウイルス検査の「質」の確保が急務となったため、インフルエンザウイルス検査を実施している地衛研が準備すべき書式案等を作成した。

## B . 研究方法

地方衛生研究所全国協議会(地全協)感染症対策部会と連携し、地全協 6 支部に各 1 機関のレファレンスセンター(コア地衛研)小計 6 機関、及び助言者(サポート地衛研) 5 機関 合計 11 機関が研究協力者として参画した。

(1)検査精度維持向上：感染症法改正(H28 年 4 月施行)に伴って季節性インフルエンザをはじめとする病原体検査の「質の確保」を図る目的で、各地衛研において作成が必要な書式ひな形案等を作成した。

(2) 影山分担研究者(感染研)によるウイルス遺伝子検出試験における外部精度管理、渡邊室長(同)によるインフルエンザウイルス株サーベイランスに関するアンケート調査が現場の実情を反映した実効性の高いものとなるよう、設問のチェック等や結果解析に際して協力した。

(3)H1pdm09 インフルエンザ H275Y マーカーサーベイランス等抗ウイルス剤感受性サーベイランス体制の維持に寄与した。

(倫理面への配慮) 該当しない。本研究においては、個々の患者検体及び患者情報の使用はない。

## C . 研究結果

平成 27 年度は平成 28 年 4 月に施行される感染症法改正に伴い新たに必要となる検査関連書式等について検討し、ひな形等を作成して報告書に添付するとともに、全国の地衛研に情報提供した。(別添 1 遺伝子

検査のための汚染防止要領(ひな形案)別添 2 検査部門及び信頼性確保部門の組織図(ひな形例示)別添 3 教育訓練研修計画及び記録票(ひな形例示)別添 4 簡易版機器保守管理及び作業日誌(ひな形例示)を参照)

## D . 考察

本研究に期待される主な効果は

(1)わが国においてヒトが感染するインフルエンザウイルスの重大な(例：抗原性、薬剤耐性)変異の迅速・正確な把握の前提となる、感染研-地衛研間のインフルエンザ連携検査研究体制、ウイルス株サーベイランス体制の維持強化。

(2)上記連携体制のなかで地衛研が実施する、季節性及び鳥インフルエンザウイルス検査全般における検査精度の維持向上。

(3)わが国で流行しているインフルエンザウイルスにおける薬剤感受性変異まん延状況の把握、抗原変異の迅速な探知。

の 3 点に集約される。

27 年度は希望する全地衛研を対象とする EQA 実施に協力するとともに、28 年度に施行される法令改正対応に必要な文書書式等を検討し、一部ひな形等を準備した。今回の法改正において特に検体提出制度が適用されるインフルエンザウイルスサーベイランスの国内均てん化の一環として、地衛研が実施する検査の質の確保には、当該分担研究のようなネットワークの確保と維持が不可欠である。

## E . 結論

感染症法改正に伴い、平成 28 年度より季節性インフルエンザの病原体サーベイランスは、他の病原体に先駆ける形で検査体制が強化され、全国の指定提出機関より流行期には週 1 検体、非流行期にも月 1 検体が

提出され、分離株等の病原体情報は、広く国民に還元されることとなる。一定の正確性が担保された有益な情報が速やかに還元されるためには、ウイルス検査における質の確保がこれまで以上に重要となる。

全国の地衛研が分離したウイルス株を用いて行われるインフルエンザウイルスサーベイランス及び関連する抗インフルエンザ剤感受性監視のレベル維持向上には、感染研-地研ネットワークを活用した不断の情報交換が不可欠であり、外部精度管理の効率的実施にもつながる。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

1) 中村一哉、岸田典子、藤崎誠一郎、白倉雅之、高下恵美、桑原朋子、佐藤彩、秋元未来、三浦秀佳、小川理恵、菅原裕美、渡邊真治、小田切孝人、地方衛生研究所インフルエンザ株サーベイランスグループ  
2014/15 シーズンのインフルエンザ分離株の解析

病原微生物検出情報 36(11) 202-207 2015

2) 高橋雅輝、岩淵香織 佐藤直人、五日市恵里、齋藤幸一 感染症発生動向調査事業における病原体検出状況(平成 26 年度) - インフルエンザ 2013/2014 シーズン及び 2014/2015 シーズン -

岩手県環境保健研究センター年報 第 14 号 平成 26 年度(2014) 95-103 2016

3) 芦塚由紀、吉富秀亮、中村麻子、濱崎光宏、堀川和美、世良暢之

福岡県における 2014/15 シーズンのインフルエンザウイルス検出状況 福岡県保健環境研究所年報第 42 号 69-73 2016

4) 安井善宏、尾内彩乃、小林慎一、山下照夫、皆川洋子、土屋啓三、深瀬文昭、有賀みはる、片岡泉、糟谷慶一、片岡博喜

2015/16 シーズン初めに保育園集団かぜか

ら分離された AH1pdm09 亜型インフルエンザウイルス 愛知県

病原微生物検出情報 36(11)224-225 2015

5) 安井善宏

インフルエンザウイルスの動向と疫学

The Medical & Test Journal 1331 6 2015

6) 駒込理佳、三好正浩、長野秀樹、岡野素彦

北海道におけるインフルエンザウイルスの流行状況 2014/15 シーズン 北海道

立衛生研究所報 65 印刷中 2015

7) 川上千春、小澤広規、百木智子、七種美和子、宇宿秀三、森田昌弘、水野哲宏

横浜市におけるインフルエンザの流行(2014 年 9 月~2015 年 5 月)

横浜市衛生研究所報 54 55-62 2016

8) 久場由真仁・喜屋武向子・新垣絵理・高良武俊・加藤峰史・岡野祥

沖縄県における 2014/15 シーズンのインフルエンザ流行の特徴

沖縄県衛生環境研究所 所報 49 号 77-80 2016

### 2 . 学会発表

1) Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Ozawa H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K, Takashita E, Fujisaki S, Odagiri T  
Genetic Analysis of Influenza B Viruses isolated during the Five Seasons in Yokohama, Japan

The 4th isirv-AVG Conference Austin Texas USA 2015 年 6 月

2) 高橋雅輝、佐藤直人、小野泰司

岩手県内で流行した A 香港型インフルエンザウイルスの HA 遺伝子解析

日本獣医公衆衛生学会平成 27 年度東北地区学会 盛岡市 2015 年 10 月

3) 高橋雅輝

呼吸器ウイルスサーベイランス - インフ

ルエンザウイルスとかぜウイルス -  
平成 27 年度第 2 回感染症検査ネットワーク  
研修会 盛岡市 2016 年 1 月  
4) 高橋雅輝、佐藤直人、岩渕香織、五日市  
恵里、小野泰司  
岩手県における呼吸器ウイルスサーベイラ  
ンス - インフルエンザウイルスとその他の  
呼吸器ウイルス -  
平成 27 年度 岩手県保健福祉環境行政セ  
ミナー 盛岡市 2016 年 2 月  
5) 尾内彩乃、安井善宏、中村範子、廣瀬絵  
美、安達啓一、伊藤雅、小林慎一、山下照  
夫、皆川洋子  
2014/15 シーズンに流行したインフルエン  
ザ A 香港型 (AH3) のウイルス性状解析 愛  
知県公衆衛生研究会 東浦町 2016 年 1 月  
6) 川上 千春、清水耕平、小澤広規、百木  
智子、七種美和子、宇宿秀三、笹尾忠由  
高下恵美、藤崎誠一郎、小田切孝人  
過去 5 シーズンに分離された B 型インフル  
エンザウイルスの遺伝子解析  
第 30 回関東甲信静支部ウイルス研究部会  
埼玉 2015 年 7 月  
7) 川上千春、七種美和子、豊澤隆弘、高下  
恵美  
横浜市における過去 5 シーズンの B 型イン  
フルエンザウイルスの遺伝子解析  
第 47 回日本小児感染症学会 福島 2015  
年 10 月  
8) Kawakami C, Momoki T, Saikusa M, Ozawa  
H, Shimizu K, Usuku S, Mitamura K,  
Takashita E, Fujisaki S, Odagiri T  
Genetic Analysis of Influenza B Viruses  
isolated during the Five Seasons in  
Yokohama  
第 63 回日本ウイルス学会 福岡 2015 年  
11 月  
9) 川上 千春  
インフルエンザの動向について

第 5 回関東甲信静支部公衆衛生情報研究部  
会 横浜 2015 年 12 月  
10) Watanabe S, Nakamura K, Fujisaki S,  
Shirakura M, Takashita E, Kishida N,  
Kuwahara T, Sato A, Ogawa R, Sugawara H,  
Akimoto M, Miura H, Odagiri T, The  
Influenza Surveillance Group of Japan  
Characterizations of circulating  
influenza viruses in the 2014/2015  
season and vaccine viruses selected for  
the 2015/16 season.  
第 63 回日本ウイルス学会 福岡 2015 年  
11 月  
11) 皆川洋子  
V-09 インフルエンザレファレンスセンタ  
ー (コア地衛研) (東海北陸ブロック)  
平成 27 年度地方衛生研究所全国協議会東  
海・北陸支部微生物部会 名古屋 2016 年  
3 月

## G . 知的財産権の出願・登録状況

なし。

**別添 1 遺伝子検査のための汚染防止要領 (ひな形案)**

2016年3月1日 衛生研究所

1 目的

遺伝子検査における交差汚染防止。

「検査施設における病原体等検査の業務管理要領(平成27年11月17日付健感発1117第2号)」(以下「検査要領」という。)5(2)参照

2 適用範囲

検査要領を適用する遺伝子検査。

3 事項別方策等

3-1 遺伝子検査室の構造

- ・核酸抽出作業を行う室と遺伝子増幅産物の検出作業を行う室が明確に区分されていること。
- ・上記2室の空調は各々独立しているか、遺伝子増幅産物の検出作業を行う室から核酸抽出作業や試薬の調製を行う場所へ空気が流れない構造となっていること。
- ・試薬の調製を行う場所が他と区分されていること。
- ・実験台等は、UV照射並びに次亜塩素酸を使用する定期的洗浄に耐える構造であること。
- ・作業毎に扉等に触れなくても手洗い設備にアクセス可能な配置が望ましい。

3-2 作業動線の注意点

- ・作業動線は、検体受入 核酸抽出・試薬調製 遺伝子増幅 増幅産物検出 の流れに沿ったものとし、逆流させない配置とする。
- ・核酸抽出作業、試薬の調製作業、及び遺伝子増幅産物の検出作業を行う際には、各作業毎に必ず手袋を替える。
- ・試薬調製作業を行う場所には、増幅産物や鋳型(検体から抽出した核酸及び陽性コントロール)を持ち込まない。
- ・一連の検査において上記作業の流れを遡ってはならない。複数の検査が重なって同時進行する事態となった場合、増幅産物検出を行った者が他の作業に従事することは極力避ける。止むを得ない場合は、十分な手洗い(可能であれば靴の履き替え、専用実験着の使用)等キャリアオーバー対策を実施する。

3-3 機器の扱い

ア 安全キャビネットあるいはクリーンベンチの使用

- ・試薬調製に際しては、安全キャビネットあるいはクリーンベンチを使用することが望ましい。
- ・汚染防止のため、流量が保たれているか定期的に点検する。
- ・核酸取扱い後の安全キャビネットあるいはクリーンベンチ内で、やむを得ず試薬調製を行う場合は、十分な時間紫外線を照射する。

## 別添1 遺伝子検査のための汚染防止要領

### イ 遠心分離器

- ・キャリーオーバー防止のため、検体若しくは増幅産物の処理に用いる機器及び部品については、定期的に内部を掃除する。薄めた次亜塩素酸（金属表面等次亜塩素酸の使用が適当でない場合は水）を含んだペーパータオルで清拭後乾拭きする。

### ウ 専用の微量分注器

- ・ピペット等微量分注器は、核酸抽出作業、試薬の調製作業、及び遺伝子増幅産物の検出作業毎にそれぞれ専用とする。
- ・陽性対照を扱う分注器は他の試薬調製用とは別にすることが望ましい。
- ・遺伝子増幅産物の検出に用いる分注器は必ず専用とする。

## 3 - 4 試薬消耗品の管理

### ア 試薬の調整時の分注

- ・希釈したプライマー及び陽性コントロールは小さなチューブに分注して保存し、現在使用中のチューブに印を付し、使用開始年月日をチューブ本体等に記録するとともに、原則として使用開始したものから使い切る。
- ・プライマー、試薬等の分注にあたっては、各操作毎に液量に応じた微量分注器を選択する。
- ・溶液の入ったチューブ類のふたを開くときには、内ふた等に触れないように、また飛沫が発生しないように注意する。開く直前に軽く遠心するとよい。
- ・遺伝子増幅反応液マスターミックスは1反応毎に必ず使い切りとする。
- ・反応チューブへの陽性コントロールの添加は、可能であれば試薬調製とは別の場所で行うことが望ましい。

### イ 使い捨て消耗品の事項

- ・ピPETTING操作に伴って発生するエアロゾルによるコンタミネーションを防ぐため、フィルター付き当エアロゾル防止チップを用いることが望ましい。
- ・0.2 ml チューブは、DNase 及びRNase フリー製品またはオートクレーブ滅菌したものをを用いる。

### ウ 使い捨て手袋の使用

- ・キャリーオーバー並びに手の汚れや汗などによるコンタミネーション等を防止する目的で、作業中は使い捨て手袋を着用する。
- ・上記観点から、手袋はパウダーフリーかつ各検査員の手には適合する大きさの製品を用いることが望ましい。
- ・手袋は、汚染が疑われる時や作業室や作業場所を移るたびに交換することが望ましい。

### エ その他

試薬及びピPETチップ等器具の使用前滅菌にオートクレーブを用いる場合は、廃棄物



## 別添 1 遺伝子検査のための汚染防止要領

等の滅菌に用いている機器は使わない。

### 3 - 5 陰性コントロール、陽性コントロールの事項

- ・反応毎に必ず陰性コントロールと陽性コントロールを置き、コンタミネーション等が疑われる場合は考えられる原因に対処のうえ再検査を実施する。
- ・試薬の調製を行う場所への陽性コントロールの持ち込みは、制限する。

### 3 - 6 非特異反応への対処法

- ・臨床検体の PCR 若しくは RT-PCR 法を行う場合、しばしば鋳型の濃度や不純物等に起因する非特異反応が問題となる。陽性コントロールと似通ったサイズの増幅産物が得られたが判断に迷う場合は、判定前にシーケンス法による塩基配列の決定等を行うことも考慮する。

### 3 - 7 検体の取り違い防止

- ・検体受付時に、できれば複数の担当者立ち会いの上でナンバリングを実施する。
- ・反応チューブやウェルは、上記ナンバリングの順番を入れ替えることなく並べる等して入れ替わりを予防する。
- ・検査結果報告に際しては、最低限ダブルチェックを行う。

### 3 - 8 研修

検査部門管理者は、信頼性確保部門管理者及び検査区分責任者と協議の上、検査員に対して遺伝子検査業務従事前及び定期的に、本要領に記載されたコンタミネーション防止策を含む事項について研修を受けさせる。

### 3 - 9 その他注意事項

- ・実験台等の掃除：キャリアオーバー防止の観点から、次亜塩素酸を使用して実験台等の定期的洗浄を行う。検査室は定期的に掃除する。
- ・遺伝子検査室に用いない人の出入りは制限する。
- ・遺伝子増幅産物の検出作業を行う室に保管した資材は、増幅産物非取扱い区域に移動しないよう制限する。
- ・核酸抽出作業前の検体取扱いに際しては、バイオセーフティにも十分留意すること。
- ・オートクレーブでは増幅産物等 DNA を完全に分解することはできないので、廃棄物等はオートクレーブ済であっても試薬の調製を行う場所には持ち込まない。

## 4 実施時期

本要領は、平成 28 年 4 月 1 日から施行する。

## 文献等

農林水産消費安全技術センター：遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル第 3 版 VI コン

別添 1 遺伝子検査のための汚染防止要領

タミネーション防止編（平成 24 年 9 月 24 日）

経済産業省：遺伝子検査ビジネス実施事業者の遵守事項（平成 25 年）

[http://www.meti.go.jp/policy/mono\\_info\\_service/mono/bio/zyunshu.pdf](http://www.meti.go.jp/policy/mono_info_service/mono/bio/zyunshu.pdf)

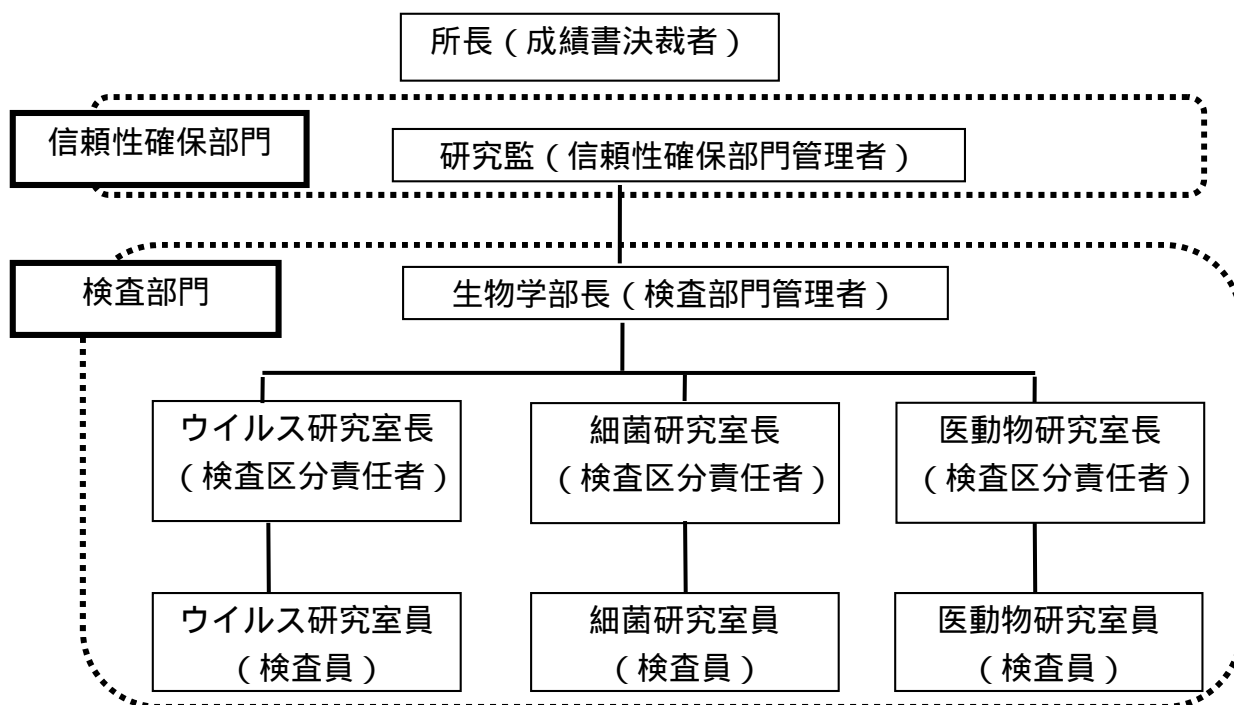
一般財団法人医療関連サービス振興会：医療関連サービスマーク制度 調査内容衛生検査所業務（2015 年 11 月 25 日）

国立感染症研究所ウイルス第三部：RT-PCR 法による SARS コロナウイルス遺伝子の検出

<http://idsc.nih.go.jp/disease/sars/update99-PCR.html> (2003 年 10 月 24 日更新)

## 別添2

検査部門及び信頼性確保部門の組織図及び担当者（平成28年4月1日現在）



各部門の管理者の権限及び責任

部門		権限及び責任	職名	氏名
信頼性確保部門	信頼性確保部門管理者	検査要領3(5) 文書に基づく精度管理 検査要領3(5) 逸脱が生じた場合の評価及び必要な措置 検査要領3(5) 標準作業書の写しの保存その他信頼性確保に必要な業務 検査要領15 内部監査の実施及び記録の作成 検査要領15(3) 是正処置内容の確認及び記録 検査要領16 不適合業務対応及び是正処置等の記録	研究監	
	(代理者)	検査要領17 精度管理結果のとりまとめ及び記録 検査要領18 外部精度管理調査への定期的参加計画作成及び精度管理結果、必要な是正処置等の確認及び記録 検査要領19 研修等の機会の確保		
検査部門	検査部門管理者	検査要領3(2) 検査区分責任者及び検査員の職務分掌 文書の作成・保存 検査要領3(2) ~ に掲げられた業務 検査要領15(2) 是正処置内容の報告 検査要領18 外部精度管理調査の結果に基づく是正処置の実施及び信頼性確保部門管理者への報告	生物学部長	
	(代理者)	検査要領19 研修等の実施計画の策定	室長	
	検査区分責任者（ウイルス研究室）	検査要領3(3) ~ に掲げられた業務	ウイルス研究室長	
	検査区分責任者（細菌研究室）	検査要領3(3) ~ に掲げられた業務	細菌研究室長	
	検査区分責任者（医動物研究室）	検査要領3(3) ~ に掲げられた業務	医動物研究室長	

別添3 教育訓練研修計画及び記録票 (2016年4月～2020年3月)

教育訓練研修計画及び記録票 ( 年 月～ 年 月)

対象者氏名 \_\_\_\_\_

病原体等取扱経験			教育訓練・研修計画				
年 月～年 月	職名等	内容	年 月	訓練・研修内容	検査区分 責任者	検査部門 管理者	信頼性確 保部門管 理者

教育訓練・研修記録					報告復命 ( 除く)	検査区分 責任者	検査部門 管理者	信頼性確 保部門管 理者
年月日	研修等の 種類	研修名等	研修等項目					

教育訓練(OJT、検査法等) 内部研修参加 外部研修参加 学会研究会参加 その他 についてあてはまる番号を記述する。  
参考:「検査施設における病原体等検査の業務管理要領(平成27年11月17日付健感発1117第2号)」19 教育訓練及び研修

教育訓練研修計画及び記録票 (2016年4月～2020年3月)

対象者氏名 \_\_\_\_\_

個人毎に、着任時及び「実施計画を定期的にする」とあるので5年程度を目安に更新

病原体等取扱経験			教育訓練・研修計画				
年 月～年 月	職名等	内容	年 月	訓練・研修内容	検査区分 責任者	検査部門 管理者	信頼性確 保部門管 理者
1995年4月～1998年3月	大学院生	着任前職歴・学歴を含む 感染性ウイルス取扱い実験を含む研究	2016年4月～12月	ウイルス検査法初任者OJT			
1998年4月～2016年3月	大学教員	感染性ウイルス取扱いを含む研究及び教育	2016年12月1日	エンテロウイルス精度管理結果に基づく研修受講			
2016年4月～現在	微生物部長	ウイルス・細菌の調査研究・精度管理					

着任時(若しくは更新策定時)の計画を中心に記載  
次年度以降は記録があれば良いのでは??

教育訓練・研修記録					報告復命 ( 除く)	検査区分 責任者	検査部門 管理者	信頼性確 保部門管 理者
年月日	研修等の 種類	研修名等	研修等項目					
2016年4月1日～12月28日		ウイルス検査法OJT	インフルエンザ検体業務全般(受入、分離、遺伝子検査等)					
2016年12月1日		エンテロウイルス精度管理結果に基づく研修	地全協精度管理結果に基づくフィードバック研修(国立感染症研究所村山庁舎)		復命書回覧			
2017年4月3日		病原体等取扱いに関する教育訓練	感染症法に基づく取扱い者に対する定期教育訓練(年1回実施)					

教育訓練(OJT、検査法等) 内部研修参加 外部研修参加 学会研究会参加 その他 についてあてはまる番号を記述する。  
参考:「検査施設における病原体等検査の業務管理要領(平成27年11月17日付健感発1117第2号)」19 教育訓練及び研修



別添4 簡易版機器保守管理及び作業日誌

検査機器保守管理作業日誌

検査部門管理者	検査区分責任者
印	印

ウイルス検査用機械器具、共通機械器具（チェックリスト参照）

日付	年月日	年月日	年月日	年月日	年月日	年月日	年月日	備考
作業担当者								
点検開始時刻								
点検終了時刻								
特に附記する事	20XX年 月 日 から 月 日 まで 異常なし							
事故記録及び 処 理 記 録								
申し送り事項								
そ の 他								

## 地方衛生研究所で実施するインフルエンザウイルス検査の 質確保に関する研究

研究分担者 皆川洋子 愛知県衛生研究所・所長

研究協力者

安井善宏、小林慎一、山下照夫

愛知県衛生研究所

### 研究要旨

地方衛生研究所が実施する感染症法に基づくインフルエンザウイルス検査の質確保に資する目的で、必要な標準作業書等を調査し、一部について書式ひな形案を作成した。

### A．研究目的

改正感染症法の全面施行に伴い、病原体検査を担当している地方衛生研究所（地衛研）等が、インフルエンザウイルス検査の質を確保する目的で新たに準備若しくは既存様式を見直し整備が望ましい書式等を検討する。

### B．研究方法

平成 28 年 4 月以降、感染症法に基づき季節性インフルエンザ若しくは鳥インフルエンザ検査を実施するにあたり、作成が望ましいと思われる書式等（表参照）のうち、平成 28 年 2 月までに国立感染症研究所等若しくは他地衛研からひな形案等の例示に気づかなかった書式について、ひな形案を作成した。

（倫理面への配慮）該当しない。本研究においては、患者検体及び患者情報の使用はない。

### C．研究結果

以下の書式ひな形案を作成した。 イン

フルエンザウイルス検査(赤血球凝集(HA)反応及び赤血球凝集抑制(HI)反応を用いた型・亜型同定)検査実施標準作業書(別添 A1 及び書式)、 文書及び記録の管理に関する手順書(別添 A2)、 教育訓練手順書(別添 A3)、 不適合業務及び是正処置手順書(別添 A4)、 検査結果発行手順書(別添 A5)。

### D．考察

病原体検査について質を確保するために必要と考えられる書式案を作成した。新たに文書作成や管理を行うにあたり発生する業務量が過大になると検査の正確性等にも悪影響を及ぼしかねず、作成する文書等は必要最低限にとどめる必要がある。今後病原体検査指針等の改訂や法令改正等への対応にあたっては新規文書の追加のみならず、既成文書の必要の検証等を定期的実施して不要となった文書や記載を削除する取り組みを続けることも必要と考えられた。

## E . 結論

作成した書式案については、地方衛生研究所全国協議会等を通じて関係者に情報提供を図り活用するとともに、今後法令改正等に伴う見直しを続ける必要がある。

## G . 知的財産権の出願・登録状況

なし。

## F . 研究発表

### 1 . 論文発表

なし。

### 2 . 学会発表

なし。

表 文書リスト（検査標準作業書 = **要領別添 5** 参照 を除く）

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（平成 27 年厚生労働省令第 147 号）	確認できたひな形等
イ 組織内の各部門の権限、責任及び相互関係等について記載した文書	報告書参照
ロ 文書の管理について記載した文書	別添 A2
ハ 記録の管理について記載した文書	別添 A2
ニ 教育訓練について記載した文書	別添 A3
ホ 不適合業務及び是正措置等について記載した文書	別添 A4
ヘ 内部監査の方法を記載した文書	要領参照
ト 検査の精度管理の方法を記載した文書	要領参照
チ 内部監査及び検査の精度管理の結果に基づき講じた是正措置について記載した文書	要領参照
リ 検査結果の発行の方法を記載した文書	別添 A5
ヌ 遺伝子検査における汚染防止について記載した文書	要領参照
ル その他検査の業務及び精度管理の確保に関する事項	（非該当）
検査施設における病原体等検査の業務管理要領（平成 27 年 11 月 17 日通知）	
遺伝子検査のための汚染防止要領	報告書参照
国や他自治体等への検体の運搬に係る実施要領	（ - ）
機械器具保守管理標準作業書	<b>要領別添 1</b>
試薬等管理標準作業書	<b>要領別添 2</b>
培養細胞管理標準作業書	<b>要領別添 3</b>
検体取扱標準作業書	<b>要領別添 4</b>
検査の信頼性確保試験標準作業書	要領別添 6
	<b>佐多班報告書</b>



## 検査実施標準作業書

管理番号 V-FLU-HAHI-v1

試験品の種類 インフルエンザウイルス分離株等

検査項目 インフルエンザウイルス検査  
(赤血球凝集(HA)反応及び赤血球凝集抑制(HI)反応を用いた型・亜型同定)

検査法出典 インフルエンザ診断マニュアル第3版等  
(平成26年9月 国立感染症研究所監修)

施行年月日 2016年3月X日

改訂年月日 2016年 月 日

作成者 ウイルス研究室

承認者 生物学部長  
(検査部門管理者)

失効年月日 20XX年 月 日

〇〇〇衛生研究所  
生物学部ウイルス研究室

標準作業書改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
2016年 月 日	新規作成		

## 1. 検査の項目

インフルエンザウイルスの HA・HI 法による型・亜型同定検査

## 2. 試験品の種類

インフルエンザウイルス分離株、分離検査に供した細胞培養上清等

## 3. 検査法

### 出典

インフルエンザ診断マニュアル第 3 版(平成 26 年 9 月 国立感染症研究所監修)

### 原理

赤血球凝集(HA)反応及び赤血球凝集抑制(HI)反応を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型同定及び抗原性解析

## 4. 作業環境

BSL2 かつ管理区域内。

安全キャビネットが設置されていること。

## 5. 検査に使用する試薬等

### 5.1. 試薬（保存血は冷蔵保存、その他は室温保存）

NaCl (Sigma-Aldrich、28-2270) 同等品

KCl (和光純薬、163-0345) 同等品

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (関東化学、37243-00) 同等品

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (関東化学、32379-00) 同等品

アルセバー氏液

ニワトリ保存血（自家製）同等品

ガチョウ保存血（自家製）同等品

モルモット保存血（日本バイオテスト研究所、016-0302）同等品

### 5.1.1 試薬調製法

#### 5.1.1.1 PBS(-)

NaCl	8.0g
KCl	0.2g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (無水)	1.15g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2g

再蒸留水（若しくは同等の水）にて 1L に調製後、オートクレーブ滅菌。室温保存。

#### 5.1.1.2 赤血球浮遊液（0.5%ニワトリ赤血球浮遊液、0.5%ガチョウ赤血球浮遊液、0.75%モルモット赤血球浮遊液）（用時調製）

保存血液を 1.5mL サンプルチューブに取り、PBS(-)にて 2 度洗浄（5,000rpm 2min）。

15mL 又は 50mL チューブを用いて、PBS(-)にて赤血球を至適濃度(v/v)に調整する。

## 5.2. 標準品

インフルエンザウイルス同定キット（国立感染症研究所より配布）

HI 用抗血清

HI 用対照抗原

## 6. 検査に使用する機械器具

### 6.1. 機器・器具

微量高速遠心機（日立、himac CT15E）同等品

微量高速遠心機（Eppendorf, 5417C）同等品

プレート振とう機（TOMY, MP-040）同等品

オートクレーブ（TOMY, BS-245）同等品

12 連ピペット（HIGH TECH LAB, HT5122）同等品

8 連ピペット（HIGH TECH LAB, HT5126）同等品

マイクロピペット 10  $\mu$ L, 20  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 200  $\mu$ L, 1000  $\mu$ L（ギルソン、MS-P10, MS-P20, MS-P100, MS-P200, MS-P1000）同等品

### 6.2. 器材

96 well plate (U 底)（Nunc 268152）同等品

96 well plate (V 底)（Nunc 249570）同等品

滅菌済みフィルターチップ（ワトソン、1272-207CS, 126-20S, 126-100S, 1272-801CS, 124-1000S）同等品

血球用チップ（Molecular BioProducts, 2069G）

50 mL 遠心管（BD, 352070）同等品

1.5 mL サンプルチューブ（ワトソン、131-515-C）同等品

オートクレーブバッグ（AS ONE）同等品

## 7. 検査操作上の注意点

HA 及び HI 試験にて同定困難な場合は、コンベンショナル RT-PCR 法等にて同定を行う。

初代若しくは継代数の低いウイルス分離株を用いる。初代において 1mL 以上の分離上清が得られない場合あるいは HA 価が低値の場合は継代培養をする。

ニワトリ及びガチョウ赤血球は U 底、モルモット赤血球は V 底プレートを使用する。

4HA/25 $\mu$ L 希釈液が作成できない株は、低 HA 価とみなす。

HI 試験に使用する血球種は、HA 価に基づいて分離株ごとに 3 種～1 種を選択する。

2014/15 シーズンにおいては、A 型に対してはモルモット、B 型にはニワトリが多く用いられた。

一連の HA・HI 試験は、同一種の血球で行う必要がある。

抗血清は、使用前に RDE 処理及び血球による吸収等による非特異的血球凝集阻害物質及び非特異的血球凝集物質の除去を行う等して、非特異的血球凝集阻害物質及び非特異的血球凝集物質が除去されていることを確認する。

## 8. 検査の手順

8.1. 様式例 A1-1 の記載に従って実施する。

### 8.1. 型・亜型（系統）決定

4 種類の抗血清の中で、有意な凝集抑制がみられた抗血清の型・亜型（B 型の場合は系統）を分離株の型・亜型（系統）と判定する。また同時に試験を行った標準抗原の HI 価と比較し、その抗原性を解析する。

## 9. 検査に関する記録の作成要領及び保管方法

### 9.1. 検査に関する記録

病原体検査指針に基づいて記載する。

検査結果を検査記録書（様式例 A1-1 及び A1-2 参照）に記載する。

### 9.2. 記録の保管

それぞれの記録は適切な場所に保存する。

## 10. 検査を実施するために必要な資格

病原体取扱研修を受講した者。部門管理者が許可した者。

別添 A1 インフルエンザ作業手順書 (書式)

作業名		文書番号	改訂番号	記録書発行日	
ウイルス同定型別検査 (HA, HI法)				2016/3/1	
検査開始日	検査終了日	文書作成者・作業者			確認者
.	.				
1	1	0.8	1.6	1.6	1.6
			2.75	2.75	2.35
					2

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果
2 ・ H A 試験 及 び H I 試験 ( 第 一 P 2 実 験 室 )	<p>2-1. 赤血球浮遊液調整</p> <p>0.5%ニワトリ 採血日 _____</p> <p>0.5%ガチョウ 採血日 _____</p> <p>0.75%モルモット 採血日 _____</p> <p>1.5mLエッペンドルフチューブに保存血を500<math>\mu</math>L以内入れ、PBS(-)にて2倍希釈。 5,000rpm 2 min 遠心。 上清を捨て、5,000 rpm 2 min 遠心。 上清及び白血球(遠心後血餅上部に集まる)部分を捨てる。 15mL又は50mLチューブを用いて、PBS(-)にて上記濃度(v/v)となるよう赤血球を希釈。</p> <p>2-2. HA試験(ウイルス培養液を扱う操作は安全キャビネット内で行う)</p> <p>PBS(-)25<math>\mu</math>Lを96 wellプレート2~12列の全てのwellへ入れる。 1列のA~H wellへウイルス培養上清50<math>\mu</math>Lを入れる。 8連ピペットを用いて2倍希釈系列を作成する。 PBS(-)25<math>\mu</math>Lを全てのwellへ入れる。 赤血球浮遊液50<math>\mu</math>Lを全てのwellに入れる。 4 にてニワトリ、ガチョウは45分、モルモットは90分反応させる。</p> <p>各wellの赤血球凝集判定結果に基づき、HA価を決定する。 HI試験実施可否の判定 ・ニワトリ、ガチョウ、モルモット赤血球の何れにおいてもHA価8&lt;の場合:HI試験による型・亜型決定は不可能。他の手法を実施する。</p> <p>2-3. HI試験</p> <p>PBS(-)25<math>\mu</math>Lを96 wellプレート2~12列のA~H wellへ入れる。 1列のA~H wellへ各抗血清50<math>\mu</math>Lを入れる。 8連ピペットを用いて2倍希釈系列を作成する。 4HA/25<math>\mu</math>Lに希釈したウイルス培養上清25<math>\mu</math>Lを対応する行の1~12列のwellへ入れ、 室温15分反応 赤血球50<math>\mu</math>Lを全てのwellに入れる。 4 にてニワトリ、ガチョウは45分、モルモットは90分反応させる。</p>

別添 A1 インフルエンザ作業手順書 (サンプルシート・記入例)

作業名	文書番号	改訂番号	記録書発行日
ウイルス同定型別検査 (HA, HI法)			2016/3/1

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果
--------	----------------

3 ・ 型 別 同 定 サ ン プ ル シ ー ト  (  /  )	3. HAサンプルシート(#HA- )												赤血球:ニワトリ(U穴) ガチョウ(U穴) モルモット(V穴)											
	検体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	判定										
	希釈																							
	A																							
	B																							
	C																							
	D																							
	E																							
	F																							
	G																							
	H																							
	HIサンプルシート(#HI- )																							
	Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12											
	列																							
	希釈																							
A																								
B																								
C																								
D																								
E																								
F																								
G																								
H																								

別添 A1 インフルエンザ作業手順書 (サンプルシート・記入例)

作業名	文書番号	改訂番号	記録書発行日
ウイルス分離同定検査 (HA, HI法)			2015/9/4

区分・作業室	作業条件・方法および実施結果
--------	----------------

3 ・ 型 別 同 定 サ ン プ ル シ ー ト  ( 1 / 1  )	3. HAサンプルシート(#HA-1)												赤血球:ニワトリ(U穴) -ガキョウ(U穴) -モルモット(V穴)											
	検体	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	判定										
	希釈	2	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	4096											
	A t001																							
	B t002																							
	C t100																							
	D t101																							
	E 対照抗原																							
	F																							
	G																							
	H																							
	HIサンプルシート(#HI-1)																							
	Well	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12											
	列	t001	t001	t001	t002	t002	t002	t100	t100	t100	t101	t101	t101											
	希釈	10	20	40	10	20	40	10	20	40	10	20	40											
A H1pdm																								
B H3																								
C B山形																								
D Bvic																								
E																								
F																								
G																								
H																								



## 文書及び記録の管理に関する手順書（ひな形例示）

管理番号 XXXX

項目 ウイルス検査に関する文書及び記録の管理

適用 検査要領を適用する検査のうちウイルス研究室で実施するもの。

施行年月日 2016 年 月 日

改訂年月日 20 年 月 日

作成者 衛生研究所生物学部ウイルス研究室

承認者  
(検査部門管理者)

失効年月日 平成 年 月 日

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年 月 日	新規作成		

## 1 目的

この手順書は、適用範囲の業務に関連する文書及び記録を適切に管理することを目的とする。

平成 27 年 9 月 28 日公布厚生労働省令第百四十七号第 7 条の三第二項の八口及び八を参照。

## 2 適用範囲

病原体等検査の業務管理要領が適用される検査のうち、ウイルス研究室で実施するもの。

## 3 責任者と役割

( 1 ) 所長は、衛生研究所（食品監視・検査センターを除く）で使用する手順書及び様式の制定、改訂、廃止について承認を行う。また、検査結果通知書等の承認を行う。

( 2 ) 信頼性確保部門管理者は、検査記録等の承認を行う。

( 3 ) 検査部門管理者は、作成された手順書等の内容を照査する。また、手順書等の作成、改訂、廃止等が必要と判断した場合は、検査区分責任者に手順書等の作成、改訂、廃止等を指示する。

( 4 ) 検査部門管理者は、手順書及び様式の管理台帳を作成し、原本管理及び配布管理を行う。

( 5 ) 検査区分責任者若しくは検査区分責任者の指示を受けた文書作成担当者は、手順書等の作成、改訂等を行う。

## 4 手順書及び様式管理台帳の作成

検査部門管理者は、管理対象となる全ての文書が明確に把握できるように、検査区分ごとに手順書及び様式管理台帳を作成する。管理台帳には、対象となる手順書等を制定・改訂ごとに文書番号、文書名、施行日等を記載し、配布管理及び保管期限の管理を行う。

## 5 手順書及び様式の管理

### 5.1 手順書及び様式の照査

検査区分責任者が手順書の内容を確認する。検査部門管理者は、手順書等の情報が正確であるか、変更の際は変更事項が妥当であるか、手順書の運用が他の業務等に重大な影響を与えないか等を判断し、当該手順書について信頼性確保部門管理者を含めた者の確認を受けた上で、承認者として手順書該当箇所に氏名を記入する。

### 5.2 手順書及び様式の承認

所長は、手順書の情報が正確であること等について信頼性確保部門管理者を含む他の者の確認を受けたこと、手順書の運用を遂行するにあたり組織に支障がないこと等を確認した後、当該手順書等を決裁する。また必要に応じて、関係職員等に対して教育訓練の機会を確保する。

### 5.3 制定及び改訂の通知、教育

## 別添 A2 文書及び記録の管理に関する手順書

検査区分責任者は、手順書及び様式が制定又は改訂された場合、検査員等関係する者に随時制定又は改訂した旨を連絡し、教育訓練に関する手順に基づき、手順書及び様式の内容及び関連事項について教育を実施する。

### 5.4. 手順書の見直し

検査区分責任者若しくは検査区分責任者から指名された者は、手順書の内容が適切であるかについて、定期的に見直しを行う。その際、手順書に紐づく様式についても必要に応じて見直しを行う。

### 5.5. 手順書の回収

検査部門管理者は、手順書の改訂に際して旧文書原本を回収する。

### 5.6. 手順書及び様式原本の保管

原本は、検査部門ごと（必要及び実状に応じて検査区分ごと）に書庫等（実情に応じて適切な場所を指定する）に保管する。

## 6. 記録及びその他の文書の管理

### 6.1. 検査結果通知書等の管理

検査結果通知書等については、起案に係る文書とともに適切に保管する。

### 6.2. 検査に係る記録、関連資料等の管理（検体個票、検査の生データ、記録等の管理）

個人情報等が含まれることもあるので、取扱いには十分注意する。

入手した文書類は、検査結果通知書とともに適切に保管する。

## 7. 保管期間

手順書及び様式原本については、使用されなくなった日から5年間保管する。

検査結果通知書、教育訓練に係る文書及び記録、その他の記録については、5年間保管する。

保管した文書については、保管期間満了後1年を経過するまで廃棄しない。

## 教育訓練手順書（ひな形例示）

管理番号 XXXX

項目 ウイルス検査に関する教育訓練

適用 検査要領を適用する検査のうちウイルス研究室で実施するもの。

施行年月日 2016 年 月 日

改訂年月日 20 年 月 日

作成者 衛生研究所生物学部ウイルス研究室

承認者  
（検査部門管理者）

失効年月日 平成 年 月 日

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年 月 日	新規作成		

## 1 目的

本手順書でいう教育訓練は、適用範囲に定める業務に従事する検査員が検査を実施する上で必要な知識、技能及び問題解決力を修得し、業務に十分反映し遂行することにより、適切な検査の遂行を図ることを目的に行われる。本手順書において、上述した教育訓練及び関連する研修等（内部研修、外部研修、学会研究会参加等を含む）を計画的かつ適切に実施・評価するために必要な手順を定める。（平成 27 年 9 月 28 日公布厚生労働省令第百四十七号第 7 条の三第二項の八二を参照。）

## 2 適用範囲

病原体等検査の業務管理要領が適用される検査のうち、ウイルス研究室で実施するもの。

## 3 責任者と役割

（1）所長は、衛生研究所（食品監視・検査センターを除く）の職員に対して行われる教育訓練の実施計画及び「教育訓練研修計画及び記録票」を承認する。

（2）信頼性確保部門管理者は、教育訓練の責任者として新入職員若しくは転入検査員全員について個人別に教育訓練実施計画を作成するとともに、年度ごとに区分責任者及び検査員全員について「教育訓練研修計画及び記録票」の記載内容を確認する。

（3）検査部門管理者は、信頼性確保部門管理者を補佐し、「教育訓練研修計画及び記録票」の記載内容を確認するとともに、検査員に研修等の機会を与える。

（4）新入職員若しくは転入検査員を受け入れた検査区分責任者は、教育訓練責任者として自ら若しくは当該教育訓練の内容に精通した検査員を担当者として指名し、「教育訓練研修計画及び記録票」の作成・保管及び当該教育訓練の内容に精通した者として教育訓練を行う。また当該区分の検査員全員について年度ごとに「教育訓練研修計画及び記録票」に追記等管理を行う。

## 4 手順

### 4.1 教育訓練研修計画の立案

（1）信頼性確保部門管理者は、新入職員若しくは転入検査員を受け入れる都度、検査部門管理者及び検査区分責任者に「教育訓練研修計画及び記録票」における「病原体等取扱経験」を確認させ、教育訓練責任者の要否を判断する。

（2）信頼性確保部門管理者は、年度ごとに区分責任者及び検査員全員について「教育訓練研修計画及び記録票」の記載に基づき研修計画を確認する。

（3）休職等から復帰した職員については、区分責任者が本人希望を聴取のうえ検査部門管理者と相談して導入教育訓練等を計画し、信頼性確保部門管理者の承認を得る。

### 4.2 教育訓練の実施・評価

#### （1）導入教育訓練の実施

1）検査部門管理者は、全ての新入職員若しくは転入職員に対して、管理区域において検査業務に従事させる前に、感染症法に基づく病原体管理等に関する教育訓練を必ず受講さ

せる。

2) 検査区分責任者は教育訓練責任者として、全ての新入職員及び転入職員に対して、当該教育訓練の内容に精通した検査員を教育訓練担当者に指名する等して、十分な On-the-Job Training (OJT)の機会を担保する。

3) 検査部門管理者及び検査区分責任者は、検査員に対して担当業務の各手順書等の内容を周知する。

#### (2) 導入教育訓練の評価

1) 検査区分責任者は、新入職員若しくは転入職員に対する OJT 等の進捗状況を随時把握し、緊急検査単独担当の可否及び開始時期等について該当する教育訓練担当者及び検査部門管理者と確認する。

#### (3) 継続教育訓練

1) 手順書教育：手順書及び様式の新規作成若しくは改訂の施行前（やむを得ない場合は改訂後できるだけ早期）に、検査員全員を対象に、文書作成担当者若しくは検査区分責任者が教育を実施する。

2) 研修参加等：検査区分責任者及び検査部門管理者は、検査員が適切な研修や学会研究会参加等の機会が得られるよう情報収集及び提供に努める。また内部研修及び外部研修に参加した職員による報告会や復命等の手段により、組織内にその内容の共有化を図る。

3) その他：検査区分責任者及び検査部門管理者は、外部精度管理や内部精度管理の結果について随時、不適合業務等が発生した場合は速やかに、関係検査員等に対して情報提供を行うとともに、不適合業務の再発防止に必要な教育訓練等を実施する。

(4) 信頼性確保部門管理者は、検査部門管理者及び検査区分責任者等とともに、検査員に対して必要な研修受講や学会研究会参加等の機会提供に努める。

## 5 記録の保管

本手順に係る記録類は、「文書及び記録の管理に関する手順」に従って保管する。



## 不適合業務及び是正処置手順書（ひな形例示）

管理番号        XXXX

項目    不適合業務発生時における是正処置等の手順

適用    検査要領を適用する検査のうちウイルス研究室で実施するもの。

施行年月日    2016 年    月    日

改訂年月日    20 年    月    日

作成者        衛生研究所生物学部ウイルス研究室

承認者  
（検査部門管理者）

失効年月日    平成    年    月    日

改訂履歴

改訂年月日	改訂理由	作成者	承認者
平成 27 年 月 日	新規作成		

## 1 目的

本手順書において、検査業務に不適合が発生した場合の措置に必要な手順を定める。(平成 27 年 9 月 28 日公布厚生労働省令第百四十七号第 7 条の三第二項の八ホを参照。)

## 2 定義

(1) 「不適合」とは、定められた手順からの意図しないかつ検査目的に適合しない乖離のうち、再検査等によっても解決されなかった事象を指す。

(2) 「是正処置」とは、不適合の再発防止の目的で、不適合又は望ましくない状況の原因を除去するための処置を、「予防処置」とは起こり得る不適合または他の望ましくない起こり得る状況の原因を除去するための措置を指す。

## 3 適用範囲

病原体等検査の業務管理要領が適用される検査のうち、ウイルス研究室で実施するものにおいて発生した不適合業務に適用する。

ただし、以下のケースは除く。

- (1) 停電等を原因とする機器等の緊急停止に伴って発生した不適合。
- (2) 断水等、上記以外の不測の緊急事態に伴って発生した不適合。
- (3) 標準作業書等に記載されていない種類の検体等を用いた検査。
- (4) 受付時若しくは受付後保管中に、当該検査の実施には適切でない状態にあった検体等を用いた検査。

## 4 責任者と役割

(1) 信頼性確保部門管理者は、不適合業務について次の事項を明らかにし、その結果を「不適合連絡書」等に記録する。

- 1) 不適合業務発生時の責任者、業務再開を判断する責任者等
- 2) 不適合業務が特定された場合の処置(緊急処置として検査部門管理者への報告、業務の中止、検査結果等の発行保留等に加えて、是正処置への移行プロセスも含む。)
- 3) 記録時点における、不適合業務の重大さの評価

(2) 信頼性確保部門管理者は、是正処置等について、次の事項を明らかにし、その結果を「不適合業務の是正及び予防措置報告書」等に記録する。

- 1) 不適合業務の原因を除去し再発を防止するための適当な是正処置を実施する方法
- 2) 是正処置の効果を確認する方法
- 3) 是正処置に係る記録の方法
- 4) 起こりうる不適合が発生することを防止するため、その原因の除去等を行う予防処置の実施に関する事項

(3) 不適合業務が発生した部署の検査区分責任者及び検査部門管理者は、関係者と協力して不適合業務発生時の状況を把握し、信頼性確保部門管理者が担当する処置等の確実な遂行に努める。

## 5 不適合発生連絡、処置及び報告

### (1) 連絡・応急処置

1) 発見者は必要に応じ、作業の中断又は応急処置をするとともに、検査区分責任者などに連絡する。

2) 当該検査区分責任者などは、応急処置の内容を確認するとともに、必要な措置を行う。

### (2) 「不適合連絡書」の発行

1) 発生部署の検査区分責任者は、担当者等の協力を得て様式 1 に示す「不適合連絡書」に件名、発生日、設備、試薬又は試験検査手順名と発生原因、応急処置状況など必要事項を記入する。

2) 発生部署の検査部門管理者は、検査区分責任者と合議のうえ検査業務への影響についてレベル 1, 2, 3 の自己評価を行い、結果を「不適合連絡書」に記入する。検査結果への影響が有る、あるいは不明の場合は、直ちに信頼性確保部門責任者（若しくは予め指定された者）に連絡する。

3) 発生部署の検査部門管理者は、「不適合連絡書」を作成し、信頼性確保部門管理者に報告する。

### (3) 不適合業務に対するレベル評価・意見・指示・承認

1) 信頼性確保部門管理者は、当該不適合業務の検査業務への影響レベルを再評価する。

2) 信頼性確保部門管理者は、検査結果への影響とそのリスクを評価し、それに基づき意見、指示を与える。いずれのランクの事象に関しても、不適合業務発生時の応急措置、再発防止を目的とした発生および本質的な原因調査、是正処置、起こり得る不適合の除去等を目的とした予防処置を行うことを原則とする。

3) 信頼性確保部門管理者は、レベル評価の根拠を示すとともに、必要に応じて会議の招集を行う。

以下にレベル 1 ~ 3 に相当する不適合内容と対応を例示する。

レベル 1 : 重大な検査の質の不良の恐れまたは進展する可能性が大きい不適合事象、または影響の大きさが不明の場合。

原則として直ちに会議の招集を行い、応急措置および是正処置の方針と計画等を取り決める。再発防止の是正処置として必要な変更等の検討を行うとともに予防処置を計画する。

レベル 2 : 手順、規格上の不適合で、検査結果への影響の大きさが明らかな場合。

原則として、応急措置が妥当と判断された場合は、特に会議を要しないが、「不適合連絡書」など文書での確認・指示で、処置を進める。応急措置に問題がある場合は会議の招集を行い、是正処置の方針と計画を取り決める。再発防止の是正処置として手順、規格等の変更が必要な場合は、会議を招集し、変更内容を取り決めるとともに予防処置について検討する。

レベル 3 : 手順、規格上の不適合で、検査結果への影響が軽微な場合

## 別添 A4 不適合業務及び是正処置手順書

原則として、応急措置が妥当と判断された場合は、特に会議を要しない。「不適合連絡書」など文書での確認・指示で処置を進めることができるものとする。応急措置に問題がある場合は会議の招集を行い、再発防止のための是正処置の方針と計画を取り決めるとともに予防処置について検討する。

レベル：不適合の原因が一過性であり、検査結果への影響がないか、あるいは、極めて軽微と判断できる場合は、原則、再発防止を目的とした是正処置として教育・訓練を行う。

4) 「不適合連絡書」の作成者、検査区分責任者及び検査部門管理者は、意見、指示、処置内容等の確認を行い、指示事項への対応および異常、不適合事象発生時の応急措置、本質的な原因調査、再発防止の是正処置、水平展開を目的とした予防処置を行う。

5) 信頼性確保部門管理者は、「不適合連絡書」を管理し、必要に応じて写しを関係責任者に配布する。また、指示内容や処置が完了しているかを定期的に確認する。

### (4) 「不適合業務の是正及び予防処置報告書」への記録

1) 信頼性確保部門管理者は、様式 2 に示す「不適合業務の是正及び予防処置報告書」を作成し、以下の処置を実施する。

会議での指示事項あるいは「不適合連絡書」での指示事項に対する処置。

本質原因の調査。

是正処置：意見・指示事項に対する処置などの再発防止策や発生原因が人の作業に起因することが明確である場合の関係者への教育、訓練を実施する。

予防処置：起こり得る不適合、他の望ましくない状況の発生を除去するなどの恒久的な措置を実施する。この中で設備、文書等の変更が必要と判断した場合は、検査部門管理者及び検査区分責任者に指示する。

### (5) 「不適合業務の是正及び予防処置報告書」の確認、承認

1) 本質的な原因調査、是正処置が完了したら、当該検査区分責任者は検査部門管理者及び信頼性確保部門管理者の確認、及び所長の承認を得る。

2) 予防処置が完了したら、当該検査区分責任者は検査部門管理者及び信頼性確保部門管理者の確認、及び所長の承認を得る。

### (6) 信頼性確保部門管理者の関与

1) 信頼性確保部門管理者は発生した全ての不適合業務を把握するとともに、「不適合連絡書」での指示、処置、「不適合業務の是正及び予防措置報告書」での是正処置、予防処置内容を確認し、確実に処置が実行されていることを確認する。

## 6 記録の保管

(1) 信頼性確保部門管理者は、「不適合連絡書」および「不適合業務の是正及び予防措置報告書」に記録する。

(2) 本手順に係る記録類は、「文書及び記録の管理に関する手順」に従って保管する。

別添 A4 不適合業務及び是正処置手順書

様式 1

不適合業務管理番号	
-----------	--

**不適合連絡書**

報告年月日	年 月 日	発生（発見）年月日	年 月 日
不適合業務の概要			
応急措置			
不適合業務の発生原因			
不適合業務の自己評価 (I, II, III, IV)	左記のとおり評価し、 軽微な不適合であるため検査に対する措置を行いましたので、報告します。 検査に対する是正処置案等を作成しましたので、承認願います。		
	判断の理由		
不適合業務の是正処置案等 (必要に応じて別紙を添付)			
上記のとおり不適合業務を発見し、評価しましたので報告します。			
印			発見者
印			検査区分責任者
印			検査部門管理者

信頼性確保部門 確認	年 月 日	信頼性確保部門管理者	印
検査区分責任者の評価、措置等について 妥当と認める。 再検討を指示する。 以下の追加条件を求める。			

別添 A4 不適合業務及び是正処置手順書

様式 - 2

不適合業務管理番号	
-----------	--

**不適合業務の是正及び予防処置報告書**

報告年月日	年 月 日	検査区分責任者	印
上記の不適合に関し、次のとおり是正及び予防処置を実施しましたので確認願います。			
是正処置内容			
予防処置内容			
結果及び評価	是正処置		
	予防処置		
検査部門管理者		信頼性確保部門管理者	
確認	/ /	/ /	完了承認 継続（長期評価） 継続（追加調査指示）
コメント			

## 検査結果書発行手順書（ひな形例示）

管理番号 XXXX

項目 検査結果書発行の手順

適用 検査要領を適用する検査のうちウイルス研究室で実施するもの。

施行年月日 2016 年 月 日

改訂年月日 20 年 月 日

作成者 衛生研究所生物学部ウイルス研究室

承認者  
（検査部門管理者）

失効年月日 平成 年 月 日





## 1 目的

本手順書において、検査結果書の発行に必要な手順を定める。(平成 27 年 9 月 28 日公布「厚生労働省令第百四十七号」第 7 条の三第二項の八リ及び平成 27 年 11 月 17 日通知「検査施設における病原体等検査の業務管理要領」11(3)を参照。)

## 2 適用範囲

病原体等検査の業務管理要領が適用される検査のうち、ウイルス研究室で実施するもの。

## 3 責任者と役割

(1) 所長は、衛生研究所から発行される検査結果通知書を承認・決裁する。

(2) 信頼性確保部門管理者及び検査部門管理者は、検査結果通知書の記載内容等を確認する。

(3) 検査区分責任者は、検査員が作成若しくは確認した検査結果通知書について、検体に関する帳簿や検査手順書等を参照のうえ、検査の記録及び記載内容等を確認する。

## 4 手順

### 4.1 検査結果の判定

検査結果は担当者がまず確認を行う。検査個票等に記載された渡航歴等の情報との大きな矛盾がないか等の観点から検査区分責任者、検査部門管理者及び関係者とともに検査結果の妥当性を吟味し、結果に疑問が生じた場合は再検査等を考慮する。矛盾がない場合や、再検査でも同じ結果が得られた場合には、検査を終了する。

### 4.2 検査結果通知書の作成及び決裁

検査結果通知書は、原則として検体送付書に記された全ての検体の最終検査結果が確定次第、検査区分責任者の指示を受けた検査員(若しくは検査区分責任者)が起案する。起案にあたっては検体受付簿等関連文書を確認する等して正確性を担保する。検査結果通知書の承認は、原則として関係した検査員、検査区分責任者、検査部門管理者及び信頼性確保部門管理者より得るが、不在等の場合は後関に代えることができる。

検査結果の通知は上記のとおり所長決裁を得た後に行うが、所長からの指示があれば、電話連絡等による一部検査結果の仮報告・中間報告を信頼性確保部門管理者、検査部門管理者または検査区分責任者が代行できる。

### 4.3 検査結果通知書への記載事項

検査結果通知書には、次の事項を記載する。

検査依頼及び検体採取年月日

検体の種類

検査項目

検査の実施方法

検査の結果

## 別添 A5 検査結果発行手順書

検査結果通知書の発行年月日及び文書番号

### 4.4. 報告

所長からの指示があれば、仮報告・中間報告を信頼性確保部門管理者、部門管理者または区分責任者が代行できる。検査結果通知書の依頼者等への送付事務は、 県の文書管理手続きに従って実施する。

## 5 記録の保管

検査結果通知書及び関連書類は、「文書及び記録の管理に関する手順」に従って保管する。



## インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法) 全国地衛研外部精度管理(EQA)実施結果について

分担研究者：影山 努 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 室長

研究協力者：高山 郁代 同上 主任研究官

中内 美名 同上 主任研究官

### 研究要旨

新型インフルエンザの発生時に、診断および感染拡大防止策を実施するため、全国の地方衛生研究所においては、新型インフルエンザに対する核酸検査の実施が求められている。平成 28 年度には改正感染症法の施行に伴う省令改正により、検査の精度管理の定期的実施および精度管理に関する外部調査の定期的受検など、精度管理への取り組みが大きく変わる事となる。本研究では、昨年度に引き続き、地方衛生研究所が行うリアルタイム RT-PCR 法によるインフルエンザウイルスの核酸検出検査の精度向上を目的とした外部精度管理(EQA)評価を、全国 73 カ所の地方衛生研究所を対象に実施した。

### A . 研究目的

平成 26 年 11 月に改正感染症法が成立し、平成 28 年 4 月からは省令改正により検体検査の質の向上を図るため、感染症に関する情報の収集体制の強化等が実施される予定で、法に基づいた国家戦略として、全国の地方衛生研究所(74 カ所)や検疫所(16 カ所)では、新型インフルエンザ発生時に診断検査を的確に実施できる態勢を維持するなど、新型インフルエンザ発生時の感染拡大防止のための永続的対応が必要不可欠な状況となった。

H5N1 亜型 高病原性鳥インフルエンザウイルスは 2003 年以降、ヨーロッパ、中東、アフリカ、アジア地域で流行し、高い死亡率を伴ったヒトへの感染例も各地で報告されており、2016 年 1 月までに 16 カ国 846 人の感染者および 449 人の死者が確認され

ている。日本では、最近では 2014 年から 2015 年の間、このウイルスを由来とする H5N8 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスが野鳥および家禽で流行した。幸いにも世界ではこの亜型のウイルスによるヒト感染例は報告されていない。

さらに 2014 年 4 月には中国で H5N6 亜型高病原性鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が初めて報告され、2016 年 2 月現在、10 例の感染者がいずれも中国で報告されている。

また、2013 年 3 月には低病原性の H7N9 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が中国において世界で初めて報告され、2016 年 2 月までにマレーシア、台湾、カナダでの輸入感染例を含め 724 人の感染者が確認されている。また、2013 年 11 月には H10N8 亜型の鳥インフルエンザウイルス

のヒト感染例が同じく中国で、2013年6月には H6N1 亜型の鳥インフルエンザウイルスのヒト感染例が台湾で初めて報告された。

このように、海外では H5N1、H5N6、H7N7 亜型などの高病原性鳥インフルエンザウイルス、H7N9、H10N8、H6N1、H9N2 亜型などの鳥インフルエンザウイルス、H1N1、H1N2、H3N2 亜型のブタインフルエンザウイルスなど、動物インフルエンザウイルスのヒトへの感染例が頻繁に報告されており、これらウイルスの遺伝子変異や遺伝子再構成により、容易にヒトからヒトへ感染するようになった新型インフルエンザウイルスの出現が危惧されている。我が国においても、新型インフルエンザ発生時における早期検査体制の構築のため、平時の間に地方衛生研究所にてインフルエンザ核酸診断検査を正確に行える環境を構築しておく事が重要である。

本研究では、その検査態勢づくりの一環として、昨年度に引き続き、本年度は全国 73 カ所の地方衛生研究所が行っているリアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの核酸検出検査について、検査精度向上を目的とした外部精度管理(EQA)評価を行い、トラブルシューティングによる検査精度の向上を図った。

## B . 研究方法

全国 74 カ所の地方衛生研究所に対して、2015年7月27日に「EQA2015実施要項」(添付資料1)および参加登録票を配布した。次に本EQAへの参加を表明した73カ所の地方衛生研究所に対して、2014年8月24日～28日にかけて、パネル検体(RNA抽出が不要な1検体とRNA抽出が必要な5検体)を送付した。常温輸送でも劣化する事がないように、送付したパネル検体は抽出核酸の乾燥品である。今回も、H5およびH7亜

型の鳥インフルエンザが流行している地域へ渡航歴がある患者検体が含まれるという前提で、地方衛生研究所の方法に従って、リアルタイム RT-PCR 法による A 型インフルエンザウイルスの亜型診断検査を行うように依頼した。また、「パネル検体受領書」、「パネル検体の保存 溶解方法」、「結果記入ファイル(検査試薬等に関するアンケート調査付き)」も同時に配布した。

各地方衛生研究所での検査結果は結果記入ファイルに記入して送付してもらい、それと引き替えに「パネル検体の内容(正解)」を送付した。同時に送付してもらった、結果報告時アンケートとともに結果集計と解析を行い、季節性の A 型インフルエンザおよび高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)、鳥インフルエンザ(A/H7N9)診断検査の検査精度向上のためのEQA評価を行った。

## C . 研究結果

全国 73 カ所の地方衛生研究所で行った検査結果およびアンケートを集計し、「1. 第3回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施結果について(添付資料2)」、「2. 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」(添付資料3)、「3. トラブルシューティング時のフローチャート」(添付資料4)、「5. EQA2015の結果およびアンケートの集計」(添付資料5)を本EQA評価に参加した全国73カ所の地方衛生研究所に送付した。また、各所へは解析結果およびトラブルシューティング等のアドバイスを個別に記入した「4. 解析結果 2015\_(地衛研名)」(添付資料6)を送付した。

## D . 考察

これまでに国立感染症研究所が示している「高病原性鳥インフルエンザ診断マニユ

アル」および「鳥インフルエンザ A(H7N9) ウイルス検出マニュアル」に記載の Type A(M 遺伝子)、H5 および H7 検出用のプライマー配列およびプローブ配列、試薬、反応条件は、感染研の環境で一定の検出感度・特異性を担保しているが、各地方衛生研究所が使用している検出装置や試薬類は同一ではなく、検出装置のメンテナンス状況や試薬類の保管状況あるいは検査手技や検査手順の違いなどにより環境が大きく異なるため、検査結果も異なる可能性がある。そのため、各施設で行う検査結果の正確性、安定性評価などについては精度管理を行って、確認する事が重要であった。

リアルタイム RT-PCR 法を用いた H5 および H7 検出検査は、検出装置、プライマー・プローブ、試薬、陽性コントロール、検査手技や検査手順に問題があると、正確な検査が行えなくなる可能性があるが、今回の EQA では、ほぼ全ての地方衛生研究所がほぼ全てのパネル検体に対して、正確に亜型の同定が行っていた(添付書類5 ページ1表を参照)。今回の EQA では配布パネルのうち RNA 抽出が不要な 1 検体は、RNA 量がどの施設でも同じ濃度になるため、Ct 値を指標にすると、間接的に検査精度の比較を行う事が可能となる。また、RNA 抽出が必要な 5 検体については、RNA 抽出が不要な 1 検体の Ct 値と比較することで、RNA 抽出の効率について比較することが可能となる。これら Ct 値の比較により、既に配布済みの H5 および H7 検出用陽性コントロールの劣化や A 型・H1pdm09、H3、H5、H7 亜型検出用のプライマーもしくはプローブの劣化、あるいは測定機器の整備が十分ではなく、検出精度が良くないところがあることも判明した。ただし、今回の EQA 評価では、最も RNA 濃度の薄いパネル検体 C(H3 亜型)で 8 コピー/ $\mu\text{L}$  である。5  $\mu\text{L}$  をテンプレ

ートに用いた場合、リアルタイム RT-PCR の検出限界と考えられている 5 コピー/反応よりも 8 倍濃い濃度であるため、RNA 抽出方法や検出方法に問題がなければ十分に検出が可能な濃度であるはずである。しかし最も RNA 濃度が低い、この検体 C に関しては正答数が 69/73(95%)となった。RNA 抽出効率の違いにより検出感が悪くなってしまった事も考えられるため、特に検体 C が検出できない所では、トラブルシューティングにより精度感度を向上させる事が必要である。RNA 抽出にやや問題がある所もあったが、H5 と H7 亜型に関していえば、ほぼ全ての地方衛生研究所で検出が可能であり、平成 26 年度の EQA 評価に比べると、検査精度が向上した事は明らかである。

## E . 結論

H5 と H7 亜型の検出に関していえば、ほぼ全ての地方衛生研究所で検出できており、RNA 抽出にやや問題があった所もあるが、前年度の EQA 評価に比べると、検査精度が向上した事は明らかである。

新型インフルエンザウイルスが出現した直後は、まだ検査系が構築されていない可能性が高く、除外診断(例えば Type A 陽性、H1pdm 陰性、H3 陰性の場合、新型インフルエンザが疑われる)が検査の中心になる可能性があり、H5、H7 亜型の同定も大事ではあるが、日頃ウイルスサーベイランスで行っている季節性インフルエンザウイルスを含む亜型同定検査が正確に行えることが特に重要と考えられ、継続的な EQA を実施する事が精度管理においては有用である。

また、日頃の検査において検査精度が維持されていなければ、新型インフルエンザが発生した際にも、精度の高い検査が行えず陽性例の見逃しや偽陽性例など誤った結果を出す可能性が非常に高くなるため、新

型インフルエンザ発生時の感染拡大防止を行うための初動対応を確実にし、各地方衛生研究所において精度の高い検査体制を常に維持するためにも、今後も EQA 評価の実施は重要であると考えられる。

今回、地方衛生研究所自らがトラブルシューティングを行えるように、トラブルシューティングを実施するためのフローチャート(添付資料 3)および精度管理と問題時のトラブルシューティング(添付書類 4)を作成した。これらが地方衛生研究所において、今後、検査の精度管理に役立つことを願う。

## **F . 研究発表**

### 1.論文発表

なし

### 2. 学会発表

国内会議

なし

国外会議

なし

## **G . 知的財産権の出願・登録状況**

### 1 . 特許取得

該当なし

### 2 . 実用新案登録

該当なし

### 3 . その他

該当なし



(添付資料1)

## インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)

### 第 3 回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施について

平成 26 年度に引き続き、本年度も「インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)」について全国の地方衛生研究所を対象に外部精度管理(EQA)を実施いたします。昨年度は、感染研より配布するパネル(RNA 抽出が不要な 6 検体)に対する A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査を行っていただき、高病原性鳥インフルエンザ(A/H5N1)および鳥インフルエンザ(A/H7N9)診断検査の実施体制の確認と各診断検査の精度向上を目的とした EQA を実施いたしました。本年度は感染研より配布するパネル(RNA 抽出が不要な 1 検体および RNA 抽出が必要な 5 検体)に対する A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査が EQA の評価対象となります。

本 EQA に参加する場合は、参加登録票に必要事項をご記入の上、電子メールにてご送付いただきますようお願いいたします(参加登録の締切は平成 27 年 8 月 7 日 17:00)。

本 EQA は平成 27 年度 厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)「地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究」(主任研究者 小田切孝人)により行います。

(添付資料1)

## インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法)

### 第3回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施要項

#### 1. EQA2015 実施スケジュール

- ・参加登録票の送付:平成 27 年 7 月 27 日
- ・参加登録の締切:平成 27 年 8 月 7 日 17:00
- ・パネル検体発送および結果記入ファイル送付予定:平成 27 年 8 月 24 日～28 日
- ・測定期間:パネル検体到着日～平成 27 年 10 月 16 日
- ・結果報告およびアンケートの締切:平成 27 年 10 月 16 日
- ・集計報告:平成 27 年 12 月頃より順次
- ・EQA 事後アンケートの実施

#### 2. EQA2015 への参加について

今回行う EQA2015 に参加される場合は、平成 27 年 7 月 27 日に送付する「参加登録票」(入力時間は 5 分程度)に入力の上、ファイル名を「参加登録票\_地衛研名」に変更して平成 27 年 8 月 7 日 17:00 までに電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2015 参加」とご記入下さい。(不参加の場合は「参加登録票」の送付の必要はありません。)

件名:(地衛研名)EQA2015 参加

宛先:[eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

#### 3. EQA2015 の内容

##### 3-1. パネル検体

EQA で使用するパネルは以下に示す通りです。

本年は感染研より配布した RNA 抽出が不要な 1 検体と RNA 抽出が必要な 5 検体(平成 27 年 8 月 24 日～平成 27 年 8 月 28 日に発送予定)

**\*本年は核酸抽出済みの乾燥品 1 検体と不活化したウイルスの乾燥品 5 検体を配布します。核酸抽出済みの乾燥品は 500μL の滅菌蒸留水に溶解して、そのままリアルタイム RT-PCR に使用して下さい。不活化したウイルスの乾燥品 5 検体は 500μL の滅菌蒸留水に溶解して、RNA 抽出を行った後、リアルタイム RT-PCR に使用して下さい。**

##### 3-2. 解析対象について

今回行う EQA2015 では、**A 型インフルエンザウイルスのリアルタイム RT-PCR 法による亜型診断検査**が外部精度管理の評価対象となります。

##### 3-3. 外部精度管理の評価について

今回は、**H5 および H7 亜型の鳥インフルエンザが流行している地域に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提**で、各地衛研の方法に従って、検体からの RNA 抽出を行い(核酸抽出済み検体

(添付資料1)

の RNA 抽出は不要)、リアルタイム RT-PCR 法による A 型インフルエンザウイルスの亜型診断検査を行って下さい。

外部精度管理の評価は、総合判定シートに記入された結果に基づいて行います。トラブルシューティングが必要と考えられるケースでは、リアルタイム RT-PCR 法による Ct (Cp)値を基に解析を行います。各所でリアルタイム RT-PCR 法以外の方法(コンベンショナル RT-PCR 法、LAMP 法、シーケンス法など)で行った場合も、正しい診断結果が得られているかどうかの確認を行いますので、結果詳細をご報告いただきますようお願いいたします。

なお、EQA2015 のパネル検体には B 型インフルエンザウイルスは含まれていませんので、今回行う各所の診断検査から B 型インフルエンザウイルスの診断検査を除外していただいても構いません。

#### 3-4. 測定方法

- 1) パネル検体到着後、各チューブのスピンダウンを行ってから 500 $\mu$ L の滅菌蒸留水を加えます。30 秒間のボルテックス、続いて 10 回の転倒混和を行って、サンプルを完全に溶解します。(パネル検体は滅菌蒸留水による溶解の有無にかかわらず、到着後は-80 $^{\circ}$ Cにて保管して下さい。)
- 2) 各地衛研の方法に従って、検体からの RNA 抽出を行い、亜型診断検査を行って下さい。**ただし核酸抽出済の 1 検体については RNA 抽出を行わないで下さい。**先述しましたが、今回は H5 および H7 亜型の鳥インフルエンザが流行している地域に渡航歴のある患者の検体が含まれるという前提で検査を行って下さい。
- 3) 検査の際は、以下の点に留意して下さい。
  - ・必ずしも 6 検体を同時に検査する必要はありませんが、何回かに分けて検査を行う場合は、検査毎に必ず核酸抽出不要の検体も同時に検査して下さい。
- 4) リアルタイム RT-PCR 法にて、Ct (Cp)値の測定を行って下さい。  
もし、リアルタイム RT-PCR 法以外の方法(コンベンショナル RT-PCR 法等)で行った検査結果があれば、その結果もご送付下さい。
- 5) 測定した Ct (Cp) 値(小数第 1 位まで算出)を、結果記入ファイル(Excel ファイル)の「結果記入シート」に入力して下さい(入力法は「結果記入シート\_入力例」シートを参考にして下さい)。
- 6) また、各地衛研で行っている試験方法や使用キット等については、「アンケート入力シート」に入力して下さい。
- 7) 全ての検査終了後、各パネル検体の亜型判定結果を「総合判定シート」に入力してください。
- 8) 入力後の結果記入ファイル名を「結果入力\_地衛研名」に変更して下さい

(備考) 機器を複数台所有している場合でも、全ての機器で検査を行う必要はありません。もし複数台で検査を行う場合、あるいは再検査や複数回に分けて検査を行うなど、検査を 2 回以上行った場合は、「結果記入シート」の特記事項にその旨を明記したうえで、「結果記入シート」をコピーして増やして、結果入力を行って下さい。

#### 4. EQA2015 の結果の送付方法

全ての入力が終わりましたら各ファイルを電子メールに添付して、下記へお送り下さい。なお、電子メールの「件名」には、「(地衛研名)EQA2015 結果」とご記入下さい。

件名:(地衛研名)EQA2015 結果

(添付資料1)

宛先:[eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

5. EQA 事後アンケートの実施について

本 EQA の実施後に、EQA の改善等を目的とした事後アンケート調査を行いますので、ご協力をお願いいたします。

ご質問等は下記にお問い合わせ下さい。

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第 2 室

E-mail : [eqa\\_influenza@nih.go.jp](mailto:eqa_influenza@nih.go.jp)

電話:042-561-0771 (代表)

(042-848-7166 直通)

担当:影山/高山/中内

(添付資料2)

### インフルエンザウイルス核酸検出検査(リアルタイム RT-PCR 法) 第 3 回全国地衛研外部精度管理(EQA2015)実施結果について

この度は、本 EQA にご参加いただきましてありがとうございます。

来年度からは改正感染症法の施行に伴う省令改正により、検査の精度管理の定期的実施および精度管理に関する外部調査の定期的受検など、精度管理への取り組みが大きく変わることになります。リアルタイム RT-PCR 法を用いた A 型インフルエンザウイルスの型・亜型診断検査につきましては、これまで EQA を実施した際に配布した資料や、今回配布しますリアルタイム PCR トラブルシューティングのためのフローチャートなども参考にいただき、貴所における PCR 検査全般の内部精度管理に役立てていただければ幸いです。

国立感染症研究所が示した「高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第 3 版)および「鳥インフルエンザ A(H7N9)ウイルス検出マニュアル(第 2 版)」に記載の Type A(M 遺伝子)、H5 および H7 検出用のプライマー配列およびプローブ配列、試薬、反応条件については、弊所の環境にて一定の検出感度・特異性を担保しています(「インフルエンザ診断マニュアル(第 2, 3 版)」に記載の H1pdm および H3 検出系も同様です)。しかし、各地衛研で使用している検出装置のメンテナンス状況や試薬類の保管状況あるいは検査手技や検査手順などの検査環境はそれぞれ異なるため、各所の検査結果の正確性や安定性を評価し、検査に対する信頼性を高めるためには、内部精度管理だけでなく、外部精度管理による検査の精度評価も重要になります。

リアルタイム RT-PCR 法を用いたインフルエンザウイルスの型・亜型診断検査は、検出装置、プライマー・プローブ、試薬、陽性コントロール、検査手技や検査手順のうち、どれか一つにでも問題があると正確な検査が行えなくなる可能性が高くなります。今回の EQA では、RNA 抽出が不要な 1 検体と RNA 抽出が必要な 5 検体を配布し、お送りいただいた検査結果(RNA 抽出が不要な 1 検体を指標にした Ct 値および総合判定)を元にして、検体からの RNA 抽出およびリアルタイム RT-PCR 法を用いた A 型インフルエンザウイルスの型・亜型診断検査の精度を評価しました。精度の高い検査が行えたのか、行えなかったとすればどこに問題があるのか、本 EQA ではその原因を特定できた場合は報告し(特定できない場合は原因を推定)、トラブルシューティングの実施により検査精度の維持・向上を図っていただく事を目的としています。

別添の「2. 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて(PDF ファイル)」に、検出装置、試薬(プライマー・プローブを含む)、陽性コントロール、検査手技、検査手順に着目して問題があった場合のトラブルシューティングに

(添付資料2)

ついて解説しましたので、まずはご一読下さい。また、トラブルシューティングをどのような流れで行うとよいか、インフルエンザウイルス研究センターでの考え方や実際の実施方法を別添の「3. トラブルシューティング時のフローチャート(PDF ファイル)」に参考までにまとめました。

また、各所より送付いただきました検査結果および総合判定結果を解析し、「4. 解析結果 2015\_地衛研名(Excel ファイル)」に<総合判定結果へのコメント>、<パネル検体の結果へのコメント>および<トラブルシューティングについて>を記載しましたので、貴所における検査精度管理の参考にしていただければ幸いです。なお、今回配布したパネル検体は全て、RNA 抽出および各リアルタイム RT-PCR 検査系に問題がなければ必ず検出できる RNA 濃度となっています。今回、これらが 1 つでも検出できなかった場合は、コメントおよび添付資料を参考にトラブルシューティングを行っていただく事をお勧めします。

最後に、各所におけるインフルエンザ診断検査の実施体制の確認のため、ご回答いただいた結果報告時アンケートの結果を集計し、別添の「5. EQA2015 の結果およびアンケートの集計(PDF ファイル)」にまとめました。中には感染研マニュアル記載以外の試薬を使用して検査を実施している所もありますが、先述したように、感染研マニュアル記載の反応試薬、反応条件は高感度かつ特異的に検出できるように全検出系で最適化されています。感染研マニュアル記載以外の反応試薬、反応条件で検査を行った場合に検出感度や特異性が低下する事がありましたので、他の反応試薬を使用する際は、事前に検出感度や特異性について検証し、反応条件等を最適化して検査を実施していただく事をお勧めします。また、RNA 抽出キットについても同様に、他の RNA 抽出キットを使用される場合は、必ずそのキットの検証(抽出効率の評価)を行った上で検査を実施していただく事をお勧めします(キットによってはウイルス RNA が高濃度の場合には RNA 抽出効率に問題がなくても、ウイルス RNA が低濃度の場合に、RNA 抽出効率が極端に悪くなる場合があることを確認しています)。

本 EQA はこれまで厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)「地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出およびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の強化と技術開発に関する研究」の一環で実施してきましたが、本年度は研究期間の最終年にあたり、本研究班での EQA 実施は今回が最後となります。来年度以降の EQA 実施については未定です。もし EQA を実施したとしても、今回のように各所毎に詳細なコメントは行わない予定です。今後はこれまでに配布した資料を参考にいただき、貴所の検査精度管理にお役立て頂けると幸いです。

本 EQA に関してご不明な点やご意見などがございましたら、下記にお問い合わせ

(添付資料2)

わせ下さいますようお願いいたします。また、トラブルシューティングを行う際に必要な比較検討用プローブ、プライマーですが、少量であればインフルエンザウイルス研究センターで使用しているものと同じものを配布する事が可能です。ご希望の際は下記にお問い合わせ下さいますようお願いいたします。

2016年2月29日

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第2室  
E-mail : eqa\_influenza@nih.go.jp  
電話 : 042-561-0771 (代表)  
(042-848-7166 直通)  
担当 : 影山/高山/中内

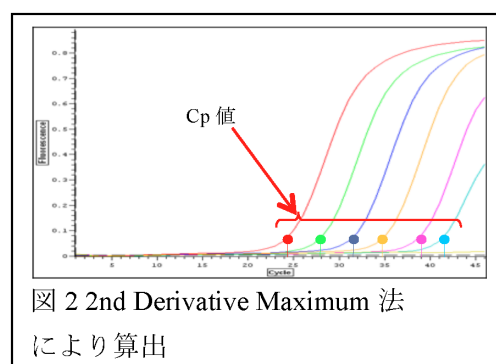
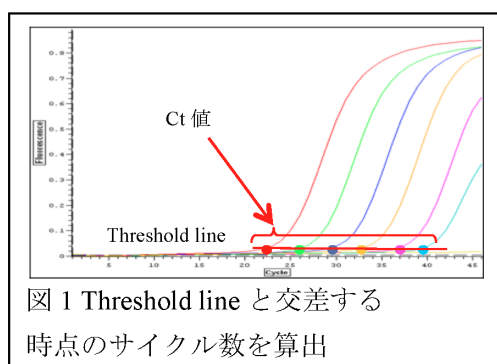
(添付資料 3)

## 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて

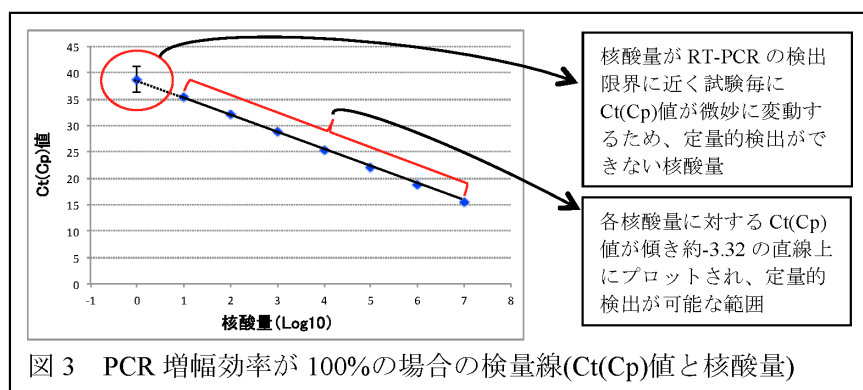
### 精度管理について

#### 1. 定量的 RT-PCR における Ct(Cp)値について

リアルタイム PCR 反応においてサンプルからの蛍光シグナルが閾値(Threshold Line)と交差する時点のサイクル数を一般的に Ct 値(Threshold Cycle)と呼びます。Threshold Line は PCR の指数増幅期的増幅期に設定したラインで、ベースラインの蛍光値に対して統計的に有意な増加が見られる場所に設定して、Ct 値を算出します(図 1)。また一部の機器においては他の解析方法を用いていることもあります。その 1 つに、サンプルからの蛍光シグナルの増幅曲線が急勾配の上昇に切り替わる点(増幅曲線の二次導関数の最大値、すなわち変曲点)のサイクル数を Cp(Crossing point)値等として算出(2nd Derivative Maximum 法)する解析方法があり、本方法の場合、Threshold Line は存在しません(図 2)。



リアルタイム RT-PCR 法において反応試薬、プライマー、プローブ、機器、手技に問題がない場合、増幅シグナルはシグモイドカーブを描き、核酸量(Log10)との間には相関性が見られ、PCR 増幅効率が 100%(1 サイクルで 2 倍に増幅)の場合は、理論上傾き約-3.32(10 倍増幅に理論上 3.32 サイクル必要： $2^{3.32} \approx 10$ )の直線上に Ct(Cp)値がプロットされます(図 3)。



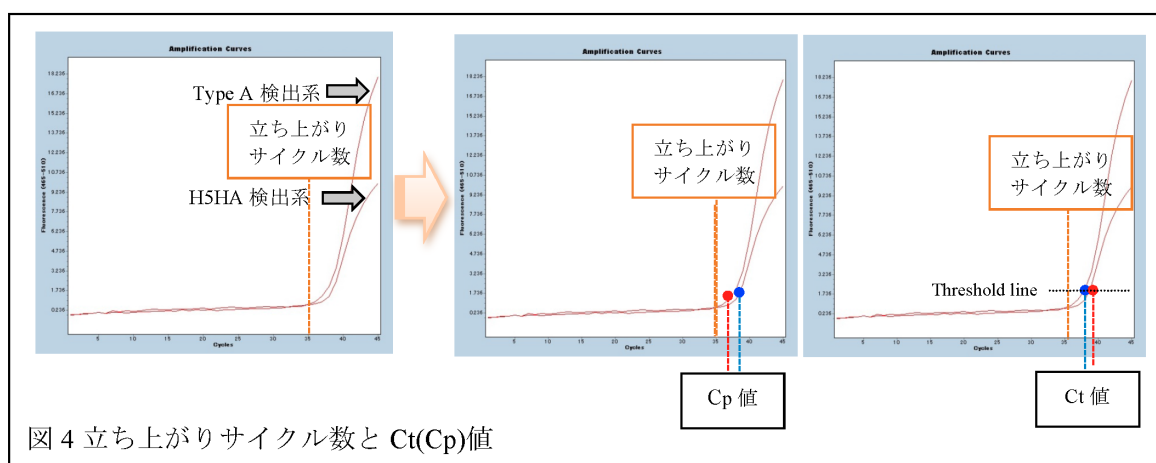


### (添付資料 3)

#### 2.インフルエンザウイルス遺伝子の検出系について

インフルエンザウイルス遺伝子検出系(TypeA(M 遺伝子)および H5, H7, H1pdm, H3 の各 HA 遺伝子)の PCR 増幅効率は 100%に近く、各標的となる遺伝子のコピー数が同じ場合、シグナルの立ち上がりサイクル数がほとんど同じになるよう設計しているため、検査が問題なく行われた場合、どの検出系もコピー数が同じであればシグナルの立ち上がりサイクル数はほぼ同じになるはずですが、 $Ct(Cp)$ 値は、それぞれの検出系間で若干乖離します。これはシグモイドカーブの形(曲線の変曲点)が各検出系によりそれぞれ異なるため、シグナルの立ち上がりサイクル数が同じであっても、計算により算出された  $Ct(Cp)$ 値は異なるためです。図 4 は同濃度の核酸量に対する Type A と H5 検出系の波形です。Type A と H5 の立ち上がりサイクル数はほぼ同じですが、 $Ct(Cp)$ 値は少し乖離しています。

従って、結果解析を行う際は  $Ct(Cp)$ 値の確認だけではなく、シグナルの立ち上がりサイクル数とシグモイドカーブの形を確認する事も重要となります。



#### 3.検出系に何らかの問題がある場合

H5およびH7陽性コントロール(識別マーカー入り)に含まれる Type A (M 遺伝子)および各 HA 遺伝子のコピー数は、同濃度になるように調製して各所に配布しています。検査が問題なく行われた場合、陽性コントロールの  $10^3$  希釈液までの Type A 検出系と HA(H5 もしくは H7)検出系の立ち上がりのサイクル数はほぼ同じサイクル数となるはずですが、なお、Roche LightCycler480 システムの場合では、第 2 項に記載した理由により、 $Cp$  値は正常な場合でも Type A と HA 検出系で 0.5~1.5 程度乖離します(どちらも概ね Type A の方が  $Cp$  値は大きくなります)。

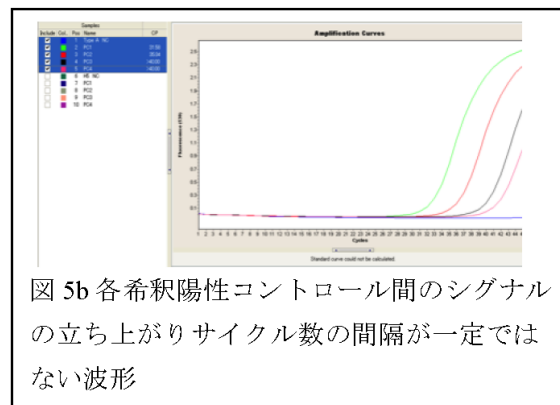
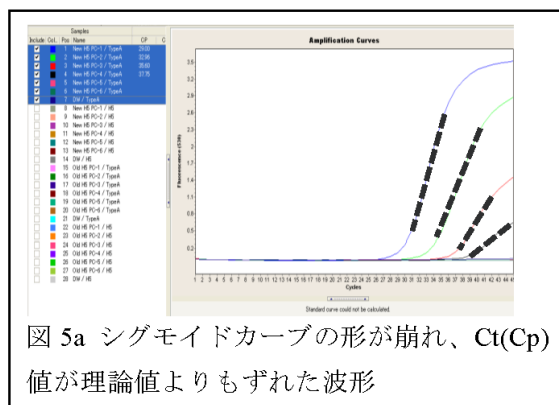
ただし、10 倍階段希釈を行った陽性コントロールに対する  $Ct(Cp)$ 値の間隔は、検出系間で差はほとんど無く、検出系ごとで等間隔となり、効率よく PCR 増幅反応が進んだ場合は、概ね 3.2~3.5 の範囲内(100%の効率の場合は 3.32)となります(図 3 参照)。

プライマー・プローブが劣化している、あるいは試薬調製または陽性コントロールの希釈系列が正確でない、など何らかの問題がある場合は、シグモイドカーブの形が大きく崩れて対数

(添付資料 3)

増幅期の傾きがそれぞれ異なる(図 5a)、各陽性コントロール希釈液間の立ち上がりサイクル数の間隔(Ct(Cp)値も同様)が一定ではなくなる(図 5b)(図 3 で概説したように検出限界付近濃度の場合には当てはまりません)、などの現象が見られるようになります。

他にも、試薬調製時の混合が不十分で反応試薬が均一ではない、陽性コントロールや反応試薬を反応槽に添加する際の分取・注入量が不正確だったなど、検査手技に不備がある場合もこれらの現象が見られる場合があります。



従って、同一希釈濃度の陽性コントロールに対して、Type A と H5 もしくは H7 検出系の間で、シグナルの立ち上がりサイクル数を比較した際に、これらが大きく乖離する場合は、乖離した方の検出系に何らかの問題(手技に不備がなければ、プライマーあるいはプローブに問題がある可能性が高い)が生じている可能性を考えます。また、シグモイドカーブの形が以前の結果と異なる場合も、同様に何らかの問題がその検査で起きている可能性があります。

#### 4. 精度管理について

リアルタイム RT-PCR 法を用いた検出系において、常に高い検査精度を維持するためには、例えば階段希釈した陽性コントロールに対する Ct(Cp)値やシグモイドカーブを確認し、毎回同じ精度で検査が行えているかどうか以前の結果と比較して確認するなどの精度管理を継続的に行う事が重要となります。検出系に何らかの問題が生じている場合、こうした精度管理により原因を明らかにできる場合がありますので、直ちにトラブルシューティングを行う事で、検査精度を維持する事が可能となります。

#### 問題があった場合の予想される原因とトラブルシューティングの方法

A. 波形が全体的に汚い。再現性が低い(検査毎に、また作業員により異なる結果が出る、波形が乱れ Ct(Cp)値がばらつく場合)

原因 1: 機器、解析方法問題がある

#### トラブルシューティングの方法

リアルタイム RT-PCR に使用する機器は定期的なメンテナンスやキャリブレーションが必要

(添付資料3)

です。まずは機器のメンテナンス状況を確認し、必要であれば機器のメンテナンスやキャリブレーションの実施を検討して下さい。また解析方法に問題が無いか、特にベースラインが低すぎないか確認し、必要であれば解析方法を検査毎に統一し検査を行うことをお勧めします。

#### **原因 2： 試薬調整方法（検査手技や微量ピペッターなどの不備）に問題がある**

リアルタイム RT-PCR 法では、微量ピペッターやマイクロチューブを用いて、

- 1)反応試薬の調製(各試薬の分取・分注および混合)
- 2)陽性コントロール希釈液の作製(分取・分注および混合)
- 3)反応試薬、サンプル、陽性(陰性)コントロールの反応槽への分取・分注

の作業を行います。これらの作業を行う際に、微量ピペッターの操作およびマイクロチューブの取り扱いが適切でないと、最終的には、反応試薬組成、サンプルもしくは陽性(陰性)コントロールの濃度が反応槽毎に異なる事となり、また、検査毎にもこれらの濃度がばらつく事となるため、再現性のない正確性に欠けた検査になる可能性が高くなります。

微量ピペッターは、一般的により少ない量を分取・分注する方が分取・分注量の誤差が大きくなります。例えば、検査時に毎回、高濃度のプライマーやプローブを極少量だけ分取し、希釈して反応試薬を調製する場合や、共通の反応試薬をまとめて作製せずに、極少量の酵素を各反応槽に分注する場合などでは、分取・分注量に大きな誤差が生じやすくなり、全く同じサンプルであっても、検査毎に Ct(Cp)値が大きく変動するなど、再現性が取れずに正確さに欠けた検査になる可能性があります。また、プライマー/プローブミックスをあらかじめ作製していない場合には、同様に極少量のプライマーやプローブを分取することになることから、最終的に反応試薬に対するプライマー、プローブ濃度が検査毎に微妙にばらつく事となり、同じサンプルであっても検査結果が異なってしまう場合があります。

施設によっては複数のリアルタイム PCR 機器を使用し、同じサンプルであったとしても各機器で異なる Ct(Cp)値が得られる場合があります。しかし同一機器では同じ Threshold Line を設定し解析すれば、同じサンプルであれば毎回ほぼ同じ Ct(Cp)値が得られます。また異なる機器間でも、同じサンプルであれば大きく異なる結果になることはありません。

#### **トラブルシューティングの方法**

- プライマー/プローブミックスはあらかじめ作製して小分け分注にて冷凍保管(必ず自動霜取り機能のないフリーザーを使用して下さい。できれば-70度以下での保存を推奨します)し、検査時は小分け分注した分を使い切りで使用する。
- 試薬調製時は、たとえ少ないサンプル数でも、反応槽毎に調製するのではなく、共通の反応試薬をまとめて作製する事で、特に酵素などの必要量が微量な試薬の分取・分注時の誤差による検査結果のばらつきを少なくすることができます。
- リアルタイム RT-PCR などの遺伝子検査で、常に精度の高い検査を行うための、最低限留意すべき点を以下に記します。

(添付資料3)

- ✓ 各作業者が正確な量を分取・分注できるように微量ピペッターの操作や特性について習熟する
- ✓ マイクロチューブは容量がとても小さく、内容物が混ざりにくいという特徴を理解するなど、マイクロチューブの取り扱いに習熟する
- ✓ 分取・分注量が正確ではない微量ピペッターを使用した際も、同様に正確性に欠けた検査になるので、微量ピペッターの精度を保つため定期的に点検する
- ✓ 各人が検査精度の維持・向上に努めようという意識を持つ
- ✓ 作業手順が統一されておらず、同じ作業であっても各人で手順が異なり使用する微量ピペッターが異なる場合などは、標準業務(作業)手順書の作成、作業毎に専用の微量ピペッター、マイクロチップ、マイクロチューブ等を用意するなどして、作業手順および機材等の統一・共用化を図る

常に正確な検査が行えているか、検査毎の検査精度を確認する手段の一つに、陽性コントロールの増幅シグナルの波形や検出限界が毎回の検査で変化がないかどうかを確認するという方法があります。検査手技や微量ピペッターなどの不備によっても、陽性コントロールの増幅シグナルの波形や検出限界は変化します。原因が複数考えられると、検査精度管理が難しくなります。まずは検査手技の習熟と検査精度に関する意識向上に努める事が重要となります。

B. 全ての検出系が遅れる。(全体的に感度が悪い)

原因：反応試薬、RNA 抽出試薬等に問題がある

Ct(Cp)値が過去の結果よりかなり大きい、全ての陽性コントロールの結果が $10^3$ 希釈液まで陽性とならない、などの場合は反応試薬の劣化が疑われます。また、全ての陽性コントロールの結果では $10^3$ 希釈液まで陽性となるにも関わらず、RNA抽出した検体のCt(Cp)値が大きい又は検出できない傾向がある、などの場合はRNA抽出試薬等に問題があると考えられます。その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 凍結保存が必要な試薬類の凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(特に冷凍保存が必要な試薬類は、自動霜取り機能の付いた冷凍庫に保管した場合、-20度よりも高い温度で保管した場合、あるいは開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受ける場合は特に劣化しやすい)
- 3) 品質保証期限を過ぎた試薬を使用している

**トラブルシューティングの方法**

まずは試薬類が品質保証期限内であることを確認して下さい。保証期限内であっても劣化や問題があると疑われる場合は、新しい試薬を購入して古い試薬と比較検討し、原因究明を行うことをお勧めします。

- 反応試薬に問題があると考えられる場合、1種類の検出系に対して、新しく購入した試薬の分注品と使用中の分注品の両方を並べて比較検討を行い、それで改善された場合は反応試薬の劣化を疑い、古い試薬の分注品を破棄し新たな反応試薬を使用します。

(添付資料 3)

- 反応試薬を新しくしても改善が見られない場合、プライマー、プローブの劣化による検出系の問題や、陽性コントロールの劣化が疑われるので、C 項、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。
- RNA 抽出試薬に問題があると考えられる場合、1 種類の検出系に対して、新旧の試薬で抽出をしたサンプルを並べて比較検討を行い、それで改善された場合は RNA 抽出試薬の劣化を疑い、古い RNA 抽出試薬を破棄し新たな RNA 抽出試薬を使用します。

新たに保管する反応試薬類が劣化しないように対策を講じて下さい(例：凍結融解の繰り返しを避けるため試薬類を小分け分注する、自動霜取り機能がなくできるだけ開閉の回数が少ない冷凍庫で保管する、など)。反応試薬や RNA 抽出試薬に問題が生じた場合、鋳型となるウイルス遺伝子量の少ない検体などでは全く検出出来なくなる場合もあるので、全体的に Ct(Cp)値が過去の結果よりかなり大きくなった時には、直ちにトラブルシューティングを行うことをお勧めします。

C. 特定の陽性コントロールの結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない、もしくは、Ct 値が過去の結果よりかなり大きい。

原因：特定の陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある

このようなケースでは、 $10^3$  希釈液まで陽性とならない陽性コントロールの劣化が疑われ、その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) 陽性コントロールのワーキングストック凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(陽性コントロールは RNA のため、マスターストック、ワーキングストック共に -70 度以下で保存することをお勧めします。また濃い濃度で保存し、あらかじめ作製した希釈系列を保存することはお勧めしません。-20 度で長期保管した場合や、自動霜取り機能の付いた冷凍庫に保管した場合、あるいは開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受ける場合は特に劣化しやすい)
- 3) 陽性コントロールのワーキングストックを作製する際の希釈作製が不正確

また、特定の陽性コントロールの特定の検出系の結果が  $10^3$  希釈液まで陽性とならない場合は、その検出系のプライマー、プローブの劣化も疑われるため、D 項を参考にトラブルシューティングを行って下さい。

**トラブルシューティングの方法**

- 劣化が疑われる陽性コントロールをマスターストックから希釈し直します。新旧両方の陽性コントロールを並べて比較検討を行い、それで改善された場合はワーキングストックの劣化を疑い、古いものは破棄し、新たに作製したワーキングストックへ更新します。
- ワーキングストックを更新しても改善が見られない場合は、マスターストックの劣化が疑われるので、陽性コントロールの更新を検討して下さい。H5 および H7 陽性コントロールの再分与については、感染研までご連絡下さい。

なお、比較検討に用いる際の反応試薬は、使用期限が有効かつ適正な条件で保管管理された

(添付資料3)

ものを使用して下さい。また、新たに保管する陽性コントロールのワーキングストック、マスターストックが劣化しないように、対策を講じて下さい(例：-70度以下で保管する、凍結融解を繰り返さないように小分け分注を行い使い切りにする、など)。

D. 特定の検出系が全体的に乖離する。(遅れる)

**原因 1：特定の検出系のプライマー、プローブに問題がある**

このようなケースではシグナルの立ち上がりサイクル数が遅れた検出系(Ct(Cp)値も同様に大きく乖離)に何らかの問題がある場合がほとんどであり、その原因として次の可能性が考えられます。

- 1) プライマー、プローブのワーキングストックの凍結融解の繰り返しによる劣化
- 2) 長期保管による経年劣化(4度で長期保管した場合や、自動霜取り機能の付いた冷凍庫に保管した場合、-20度よりも高い温度で保管した場合、あるいは開閉による冷凍庫内の温度変化の影響を受ける場合は特に劣化しやすい)
- 3) プライマー・プローブミックスのワーキングストックを作製する際の希釈作製が不正確

**トラブルシューティングの方法**

マスターストックのプライマー、プローブもしくは新たに合成したプライマー、プローブを用いて新旧のプライマー、プローブの性能を比較するなどして原因究明を行い、問題が認められた場合はそのプライマー/プローブを変更します。基本方針として TypeA 検出系を基準検出系として各亜型の検出系に問題がないか確認を行うため、TypeA 検出系に問題がある場合は、最初に TypeA 検出系のトラブルシューティングを行って下さい。問題のない TypeA 検出系を基準に各亜型の検出系のトラブルシューティングを実施して下さい。

- まずはプライマーのみ新しいものを用意し、新旧のプライマーを使用した検出系を並べて比較検討を行い、それで改善された場合はプライマーの劣化を疑い新たなプライマーへ変更します。
- プライマーを変更しても少しの改善しか見られなかったあるいは全く改善されなかった場合は、今度はプローブのみ新しいものを用意し、新旧のプローブを使用した検出系を並べて比較検討を行います。それで改善された場合はプローブの劣化を疑い新たなプローブに変更します。
- プライマー、プローブの両方の劣化が疑われる場合は、両方とも新しいものに変更して比較検討を行い、それで改善された場合は両方を変更します。

なお、比較検討に用いる際の反応試薬は、使用期限が有効かつ適正な条件で保管管理されたものを使用して下さい。また、新たに保管するプライマー、プローブが劣化しないように、対策を講じて下さい(例：-70度以下で保管する、凍結融解を繰り返さないように小分け分注を行い使い切りにする、自動霜取り機能がなくできるだけ開閉の回数が少ない冷凍庫で保管する、など)。劣化が進むと鋳型となるウイルス遺伝子量の少ない検体などでは全く検出出来なくなる場合もあるので、Ct(Ct)値に乖離が見られるようになった時には直ちにトラブルシューティングを

(添付資料 3)

行うことをお勧めします。

#### **原因 2：ウイルスが変異した**

まれにウイルスが変異し、TypeA 検出系と HA 検出系の Ct(Cp)値が乖離する場合があります。これは乖離した検出系のターゲット核酸に変異が入っているためであると考えられます。ウイルスの変異が疑われる場合には、検出系の更新を検討する必要がありますので、感染研にご一報いただくと幸いです。

E. 特定の検出系で、 $10^1\sim 10^3$  希釈陽性コントロールの結果が等間隔に立ち上がっていない。

**原因：試薬類の調整方法、陽性コントロールや検出系のプライマー、プローブ等に問題がある。**

A 項を参照し陽性コントロールの希釈方法や試薬調製方法に問題が無いか、C 項を参照し陽性コントロールに問題がないか、D 項を参照し検出系のプライマー、プローブに問題がないか、等を確認し適切なトラブルシューティングを行って下さい。

F. TypeA 検出系と複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られる

**原因 1：陽性コントロールがコンタミしている**

このようなケースでは検査の操作の何れかの段階で陽性コントロールが反応試薬もしくは検体にコンタミしてしまった可能性が考えられます。たとえば検体処理用安全キャビネット内で陽性コントロール作製を行い、検体添加用安全キャビネット内で陽性コントロールの添加を行うなど、陽性コントロールを扱う操作を、検体を扱うエリアと同じエリアで行うと、陽性コントロールの検体へのコンタミネーションの危険性は増大します。

#### **トラブルシューティングの方法**

- 各エリアを次亜塩素酸で拭きあげて下さい。またその時に汚染が拡大しないよう留意し、エリア毎に使い捨て紙タオルを用いるなど個別に清掃して下さい。
- 汚染したと考えられる微量ピペッターを交換もしくは清掃（製品に添付の取扱説明書をご参照のうえ、可能な範囲内で内部の部品を含め次亜塩素酸で清掃後、蒸留水で十分すすぎ、清浄な環境下で乾燥させる）して下さい。オートクレーブは使用しないで下さい（オートクレーブを使用しても核酸を取り除く事はできません。核酸が蒸気とともに拡散し、他のものも汚染する可能性があります）。
- 上記の対策を講じてもコンタミネーションが続く場合、RNA 抽出試薬を新しいものにする、反応試薬を新しいものにする、プライマー、プローブをマスターストックから作り直す、の順で試薬類を新しいものにかえ、古い試薬類は廃棄して下さい。
- 全ての作業をキャビネット内で行う必要性は無いため、エリアが限られる場合は陽性コントロールの調製・添加は、実験台の上で行うなどし、また、エリアを分けられない場合は、次回以降の検査へ影響しないよう、1 回ごとの検査後にクリーンアップするなどして下さい。一人で検査を行う場合は、反応試薬調製後、プレートへ分注した後、検体から RNA 精製を行

(添付資料 3)

い、反応液への検体添加を行い、最後に陽性コントロール調製および添加を行った方が、陽性コントロールによるコンタミネーションの危険性は低減します。一度コンタミネーションが起きてしまうと、エリアの清浄化や微量ピペッターの交換や清掃、試薬類の総入れかえなど、多大な労力と経済的な負担がかかるため、日頃から十分注意して検査を行って下さい。

原因 2：検体によるクロスコンタミネーションが起きている。

原因 1 の陽性コントロールのコンタミネーション以外にも、RNA 抽出時あるいは抽出した RNA を反応試薬に添加する際に、検体間でクロスコンタミネーションが起きてしまった可能性も考えられます。

他の検体では複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られない場合などは、検体間のクロスコンタミネーションの可能性が低いと考えられます。その場合は、対象検体のみを再度 RNA 抽出から行い、再検査(他の検体と同時に検査しない)を行って、同じ結果が得られるかどうか確認する事をお勧めします。

原因 3：重複感染例の患者からの検体である

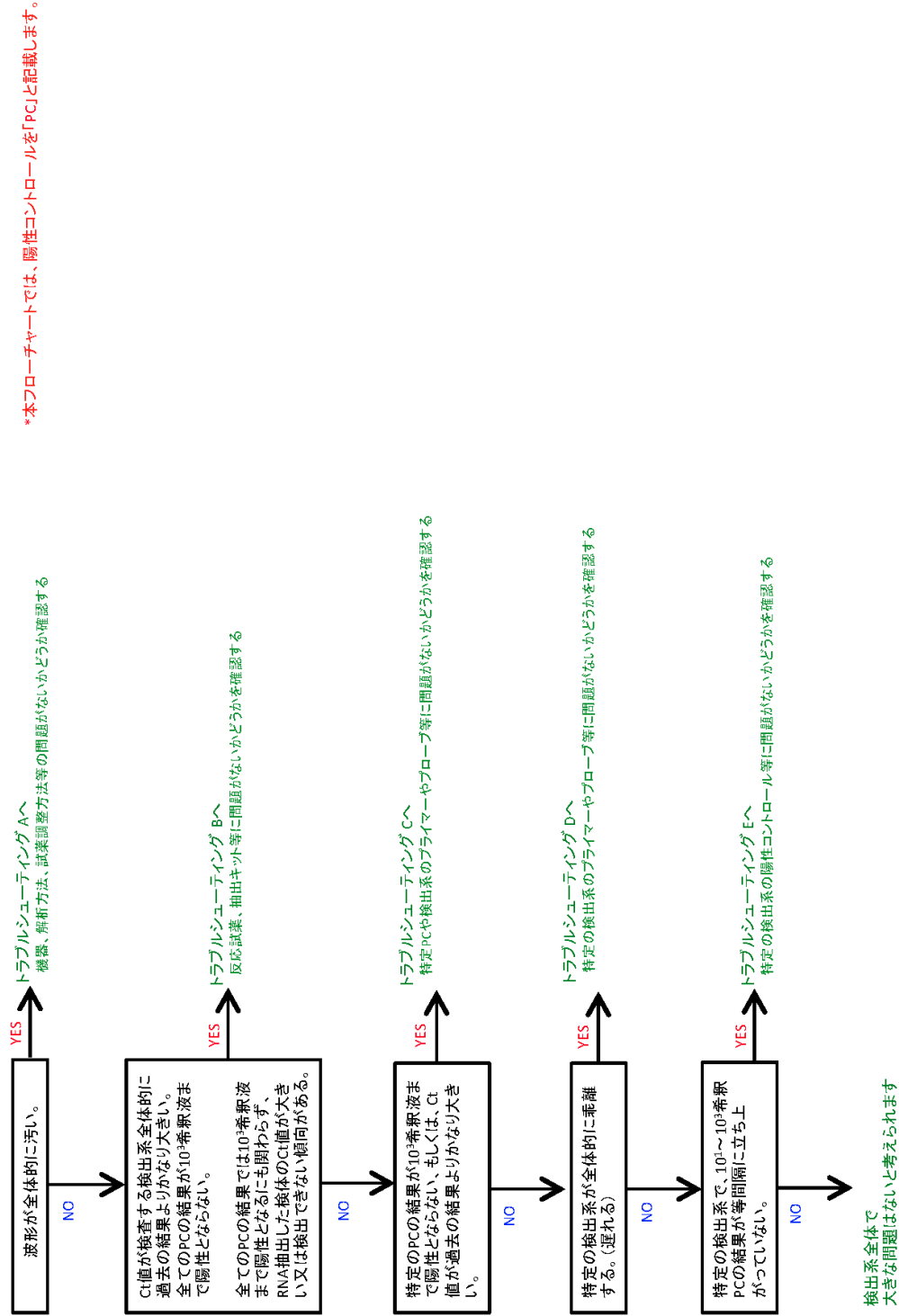
複数の型・亜型のインフルエンザウイルスが同時に感染している重複感染例の患者からの検体である場合、TypeA 検出系と複数の HA 検出系でシグナルの立ち上がりが見られることがあります。先述したコンタミネーションによる誤った結果ではないことを見極めた上で、重複感染の可能性について考慮するようにして下さい。



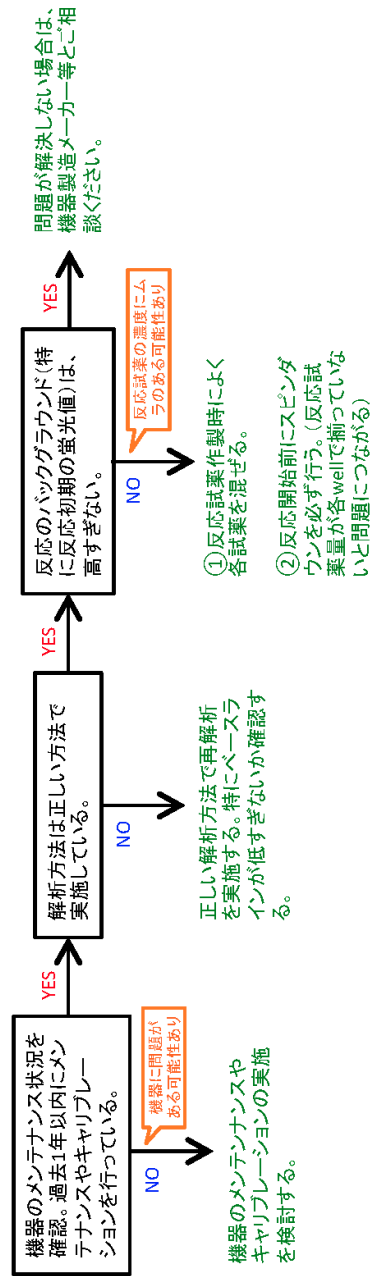
(添付資料4)

\* 問題は、何度と同じように発生していますか？まず、過去の検査結果を見直し、問題点が再見されていることをご確認ください。再見されている場合は、本フローチャートにしたがって、適切なトラブルシューティングを行ってください。

\* 問題が再見されない場合(再現性が低い場合や検査毎・作業者毎に異なる結果が出る場合)は、試薬調製方法やコンタミネーションが発生している可能性も考えられます。別添の「2. 精度管理と問題時のトラブルシューティングについて」を参照のうえ、適切なトラブルシューティングを行ってください。



(添付資料4)  
 トラブルシミュレーション A

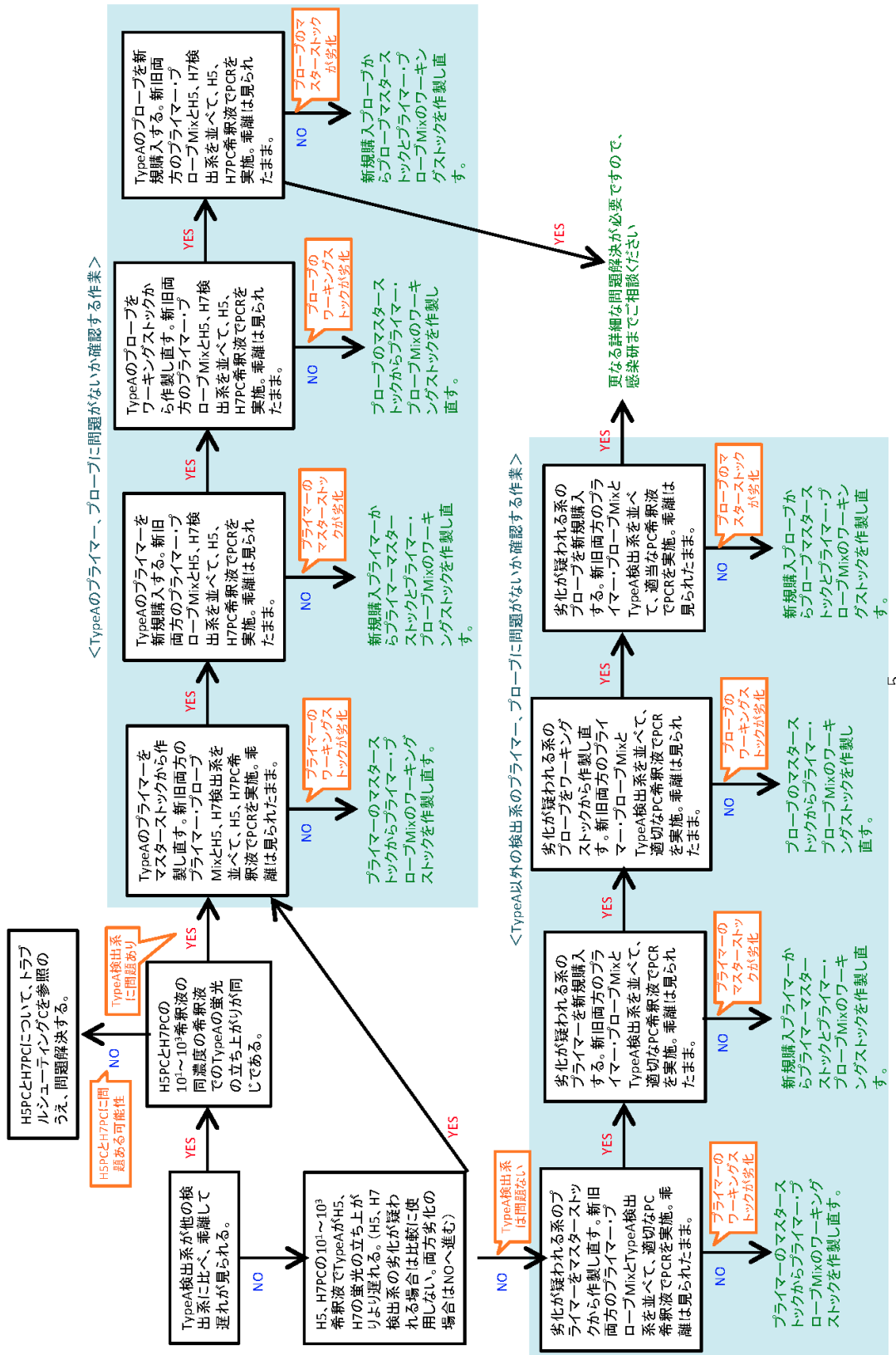






(添付資料4)  
**トラブルシューティングD**

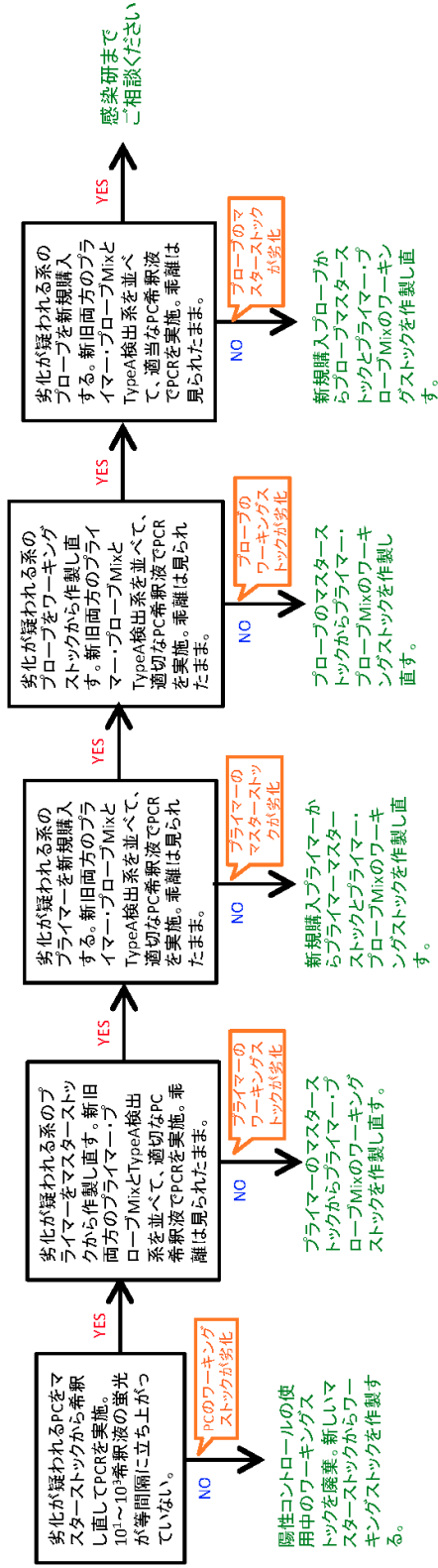
\* TypeAを基準検出系として各重型の検出系に問題がないか確認を行うため、TypeA検出系に問題がある場合は、最初にTypeA検出系のトラブルシューティングを行ってください。  
 TypeA以外の系に問題が見られる場合は、問題のないTypeA検出系を基準にトラブルシューティングを実施してください。



(添付資料4)

トラプルシユテーイング E

\*トラプルシユテーイング前に、PCの希釈の手順がきちんと行われていることを確認する。各希釈液は、15秒ボルテックス + 10回転倒混和を行い、よく攪拌する。また、希釈液作製時は10倍濃い溶液を50μL以上持ち込んで希釈(50μL + 450μLなど)を行うと、より誤差の少ない分取・分注を行うことができる。



(添付資料5)

## EQA2015 の結果およびアンケートの集計

今回の EQA の結果を下記にまとめました。また、EQA に参加された 73 地衛研からの結果記入ファイルに記載いただいたアンケート内容を集計し、下記にまとめました。なお、一部の項目についてはコメントを記載しましたので、今後の検査実施体制の整備や検査精度の向上のための参考資料としてご活用いただければ幸いです。

### 1. 今回の EQA の結果まとめ (地衛研数で集計)

今回の EQA では、RNA 抽出が必要な検体 A(H1pdm)、B(H7)と RNA 抽出が不要な検体 F(H5)および F(陰性検体)については、全ての地衛研で正確に診断が行われていました。一方、RNA 抽出が必要な検体 C(H3)および D(H5)については、一部の地衛研で正確に診断できていませんでした。特に検体中の RNA 濃度が低い検体 C(H3)については、効率の良い RNA 抽出が行えずに検出できなかった、あるいは H3 検出系の検出感度が低下して検出できなかった、などが考えられます。

なお、亜型同定方法に関しては、リアルタイム RT-PCR 法のみで全亜型を決定した地衛研が最も多く、いくつかの地衛研ではコンベンショナル RT-PCR 法を併用(使用)して亜型同定を行っていました。

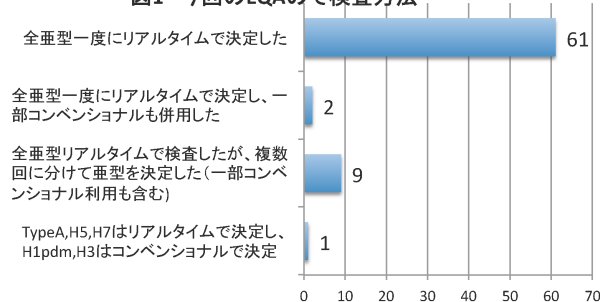
表1 今回のEQAの正答率

パネル検体	亜型	濃度* (copies/ $\mu$ L)	RNA抽出	正答数**
A	H1N1pdm09	80	必要	73/73 (100%)
B	H7N7	80		73/73 (100%)
C	H3N2	8		69/73 (95%)
D	H5N2	200		72/73 (99%)
E	Negative			73/73 (100%)
F	H5N1	80	不要	73/73 (100%)

\*各検体の濃度は、500 $\mu$ Lの水で溶解後のおよその濃度です。

\*\*正答数については、各パネル検体に対して、各所で記入された「総合判定結果」シートの結果を集計した

図1 今回のEQAでの検査方法



### 2. 各検出系の反応組成、反応条件について

#### 2-1. TypeA(M 遺伝子)検出系について

表2 TypeA検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
感染研マニュアル(インフルエンザ診断マニュアル(第3版)等)	71
感染研マニュアルから一部変更	2

(添付資料5)

2-2. H1pdm 検出系について

表3 H1pdm検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	70
感染研マニュアルから一部変更	2
実施せず	1

2-3. H3 検出系について

表4 H3検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	69
感染研マニュアルから一部変更	3
実施せず	1

2-4. H5 検出系について

表5 H5検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	71
感染研マニュアルから一部変更	2

2-5. H7 検出系について

表6 H7検出系 記載マニュアル

記載マニュアル	地衛研数
鳥インフルエンザA(H7N9)ウイルス検出マニュアル	71
感染研マニュアルから一部変更	2

2-6. その他の記載内容について

表7 その他検出系 記載マニュアル

検出系	記載マニュアル	地衛研数
H1N2連型	インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	10
N1	高病原性鳥インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	2
TypeB	インフルエンザ診断マニュアル(第3版)	1

<コメント>

いくつかの地衛研で感染研マニュアル記載以外の試薬を使用して検査を実施している所がありました。感染研マニュアル記載の反応試薬、反応条件は高感度かつ特異的に検出できるように全検出系で最適化されています。感染研マニュアルに記載以外の反応試薬、反応条件で検査を行うと検出感度や特異性が低下する場合がありますので、反応試薬や反応条件を変更する際は、事前に検出感度や特異性について検証を行い、反応条件等を最適化した上で検査を実施するようにして下さい。



(添付資料5)

3. RNA 抽出キットについて

表8 各所でのRNA抽出

RNA抽出キット名	地衛研数	1回の抽出に使用する検体量	1回の抽出での溶出量
QIAamp Viral RNA Mini Kit (QIAGEN)	65	140 $\mu$ L 64地衛研	60 $\mu$ L前後 65地衛研
		138 $\mu$ L 1地衛研	
High Pure Viral RNA Kit (Roche)	6	200 $\mu$ L 6地衛研	50 $\mu$ L 6地衛研
RNeasy Mini Kit (QIAGEN)	1	200 $\mu$ L 1地衛研	100 $\mu$ L 1地衛研
MagDEA viral DNA/RNA 200 (Precision System Science)	1	200 $\mu$ L 1地衛研	50 $\mu$ L 1地衛研

<コメント>

RNA 抽出キットについては、QIAamp Viral RNA Mini Kit を使用している地衛研が大多数でしたが、それ以外のキット(自動抽出装置を含む)を使用している地衛研もいくつかありました。抽出効率はキットにより異なることがあります。ウイルス RNA が高濃度の場合は RNA 抽出効率に問題がなくても、ウイルス RNA が低濃度の場合に、RNA 抽出効率が極端に悪くなるものもあります。反応試薬と同様、RNA 抽出キットについても感染研マニュアルに記載のキット以外を使用する場合は、そのキットの検証(抽出効率の評価)を行った上で検査に使用するかどうか、事前に検討していただく事をお勧めします。

(添付資料6)

<報告して下さった総合判定結果>

検体名	A	B	C	D	E	F
総合判定結果	A/H1pdm	A/H7	A/H3	A/H5	陰性(検出限界以下)	A/H5
その他の場合						
備考	conv PCR法での結果、A/H1 pdm	conv PCR法での結果、A/H7	conv PCR法での結果、A/H3	conv PCR法での結果、A/H5	conv PCR法での結果、陰性	conv PCR法での結果、A/H5

<総合判定結果へのコメント>

全てのパネル検体について、正しく判定できていました。

<報告して下さったパネル検体の結果>

パネル	RNA抽出必要なパネル				抽出不要パネル	
	検体A	検体B	検体C	検体D	検体E	検体F
パネルの型別	H1N1pdm09	H7N7	H3N2	H5N2	H5N1	H5N1
copies/μL *	80	80	8	200	80	80
デー1	31.1	32.1	35.5	30.5	32.5	32.5
デー2	32.2	32.7	38.0	31.9	32.7	32.7
Type A	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Type B	0.0	32.4	35.0	30.9	31.8	31.8

\* 各検体の濃度は、500 μLの水で溶解後のおおよその濃度

<トラブルシューティングについて>

- 現時点で大きな問題は見受けられませんでしたので、トラブルシューティングの必要はありません。
- 現時点で見られた問題について、別添資料に従ってトラブルシューティングを行うことをおすすめいたします。
- 現時点で見られた問題について、下記の方法に従って、トラブルシューティングを行うことをおすすめいたします。  
方法：( )
- 現時点で問題は見られるものの、すぐにトラブルシューティングを行う必要はなさそうです。今後、検査結果を注視してください。

<パネル検体の結果へのコメント>

1回目の検査で、検体CのH3の Ct値が陽性コントロールよりも高く出ているため、再検査を実施されていますが、増幅曲線がきれいに確認できていた場合は、陰性として問題ありません。もし、再検査を実施する場合には、この検体は検出限界付近の濃度であると考えられるため、反応液中の検体濃度を上げて実施することをおすすめします。

1回目の検査でH5およびH7検出系でスタンダードカーブを引けなかったため、再検査を実施していますが、これらの検査に使用している陽性コントロールは、検出限界付近の濃度の点も含むため、必ずしも全ての点が直線に乗るとは限りませんが、陽性コントロールで検出するべき希釈液で陰性となっていれば、検査の検出感度は担保できていると考えられます。今回、直線に乗らなかった理由としては、陽性コントロールの劣化や希釈液作製時の手技に起因する部分がある可能性もありますので、トラブルシューティングの必要性についてご検討ください。

## 地方自治体との連携による新型インフルエンザ等の早期検出 およびリスク評価のための診断検査、株サーベイランス体制の 強化に関する研究

研究分担者 今井 正樹 東京大学医科学研究所・准教授

研究協力者 渡邊 真治 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  
第 1 室長

### 研究要旨

地方衛生研究所（地衛研）のインフルエンザウイルス分離検査体制の現状と問題点を把握するための第 1 回目のアンケート調査から 2 年が経過し、また季節性 H3N2 亜型インフルエンザウイルスの性状変化（赤血球凝集活性の低いウイルスの出現や細胞変性効果[CPE]の確認困難なケースの増加）を鑑み、現在のウイルス分離検査環境を把握するため、第 2 回目のアンケート調査を実施した。全国 80 ヶ所の地衛研を対象に行い、77 ヶ所から回答が得られた。そのうち培養細胞を用いてウイルス分離している地衛研は 68 ヶ所であった。予想通り H3N2 亜型ウイルスに関してはウイルス分離・検査に関する意見が多数寄せられ、分離・同定の難しさが明らかとなった。しかしながら全体としてのウイルス分離効率については、第 1 回目のアンケート調査と同様、ウイルス分離を実施している地衛研の半数の機関で高い分離効率を有していた。一方で同様に分離効率の改善が見られていない研究機関も特定された。これらの機関から研修の要望のあった地衛研を対象に実地研修を行い、問題点を確認し、改善策を助言した。

### A . 研究目的

インフルエンザウイルス株サーベイランスにおける変異ウイルスの出現の把握や新型ウイルスのヒトに対する病原体としてのリスク評価のためには、ウイルスの性状を解明する必要があり、そのためには分離ウイルスが不可欠である。日本においては、地方衛生研究所（地衛研）が、インフルエンザ様疾患患者から採取された臨床検体からのウイルス分離の中心的役割を担っている。したがって、サーベイランス体制を維

持、さらに強化するためには、一定期間ごとに地衛研におけるウイルス分離検査体制の現状を調査し、問題点を把握し改善することが重要である。そこで、2 年前の第 1 回目のアンケート調査に引き続き、ウイルス分離検査環境の現状を把握することを目的に第 2 回目のアンケート調査を実施した。

### B . 研究方法

全国 80 ヶ所の地衛研を対象にアンケート調査を実施した(添付資料 1 の「アンケート

ト調査用紙」を参照)。各地衛研におけるインフルエンザウイルスの分離効率について質問した。

平成 27 年 6 月 22 日付けで地方衛生研究所長に調査票を郵送し、平成 27 年 8 月 31 日締め切りで返信を依頼した。また、調査票はメーリングリストで直接インフルエンザ担当者宛ても送付された。

(倫理面への配慮)

該当なし

## C . 研究結果および考察

### 1) 第 2 回アンケート調査

全国 80 ヲ所の地衛研を対象に行い、77 ヲ所(46 都道府県、31 政令指定都市、中核市・特別区)から回答が得られた(回答内容の詳細については、添付資料 2 を参照)。

77 機関のうち、培養細胞を用いたウイルス分離を実施している地衛研は 68 機関であった。これらの機関に対し 2014/15 シーズン(平成 26 年 10 月 1 日から平成 27 年 5 月 31 日の間に採取された臨床検体の中でウイルス分離検査結果が確定したものを対象)におけるインフルエンザウイルス分離に関する質問を行った。

68 機関中 67 機関(うち 1 機関は B 型ウイルスに対してのみ)は細胞変性効果(CPE)を確認後、ウイルスの型・亜型を同定しており、そのうち 61 機関については、CPE が確認されなかった場合には盲継代を実施していた。

分離されたウイルスの型/亜型同定法に関しては「HI 試験」と「遺伝子検査(リアルタイム RT-PCR、Conventional RT-PCR など)」を併用している機関が最も多く 43 機関(63%)であった。続いて「HI 試験のみ」(14 機関、20.5%)、「遺伝子検査(のみ)」(10 機関、15%)であった。1 機関(1.5%)については型によって方法を変えていた。「HI

試験」と「遺伝子検査」を併用する機関が最多であった背景には、もともとそのような方法を採用していた地衛研もあったが、H3N2 亜型ウイルスの性状変化(赤血球凝集活性の低いウイルスの出現)に伴い、「遺伝子検査」も採用した地衛研が増えたことが挙げられる。また「HI 試験のみ」と回答した機関でも、培養上清中の HA 価が低い場合には「遺伝子検査」を採用している、あるいは採用予定であると回答している機関があった。

分離効率に関しては、75%以上の高い効率で分離している研究機関が 68 機関の半数(34 機関)を占めた。残りの半数は、50~74%(25 機関:36.8%)、25~49%(2 機関:2.9%)、または 25%未満(7 機関:10.3%)の効率でウイルスを分離していた。50%以上の効率で分離していた機関は前回のアンケート調査より増えており、理由は不明であるが改善が認められた。一方で分離効率が 50%未満の機関の中には、技術的な面も考えられたが、検体の中には簡易キットで使用した綿棒をそのまま輸送培地に入れて持ち込まれるケースや遺伝子検査で陰性のものも少なからずあり、医療機関での採材法の問題点を指摘する声も寄せられた。しかしながら、前回の調査から改善がみられていない地衛研もあり、これらの機関に対しては分離効率改善の手立てを講じる必要がある。

### (2) 実地研修

今回のアンケート調査において、前回の調査から改善の見られていない地衛研が特定された。これらの機関から研修の要望があった 2 機関において、それぞれの機関で実地研修を行った。

A 機関:3 人でウイルス分離を担当しているとのことであった。現在使われている手法

の説明を受けながら、実際の細胞培養を実施してもらった。手技的には大きな問題点は見られなかったが、細胞そのものの形態や状態が悪く、それがウイルス分離効率に大きく影響していると考えられた。その際培地の組成を確認したが、冷蔵保存すべき溶液を室温保存していたことが判明した。培養細胞の培地の確認の際に、臨床検体輸送培地についても確認したところ、臨床検体輸送培地については pH が調整されていないことが判明した。これらの不備の原因のひとつには、担当者の引継ぎがうまく行っていないことが挙げられた。改善策を助言することで対応した。A 機関においては、A 機関での実地研修だけでなく、この研修の確認という意味で感染研でも研修を行った。

B 機関：ほぼ 1 人で担当しているとのことであった。現在使われている手法の説明を受けながら、実際の細胞培養を実施してもらった。細胞の形態や状態が特に悪いという印象ではなかったが、前任者からの引継ぎがうまく行っていないようで、細胞培養のポイント（日々の細胞の観察や定期的な継代など）を理解していないようであった。また、インフルエンザウイルスの CPE についてもよく理解していなかった。これについては、実地研修することが出来なかったため、対応策を助言した。

2 機関ともに共通していたことは、前任者からの引継ぎがうまく行っていなかったこと、また経験者がいなかったことが挙げられる。これらの点は前回のアンケート調査でも多くの機関から寄せられた点である。現在は高い分離効率を維持している地衛研は半数あるが、これらの地衛研においても同じ状況になる可能性がある。そのようになれば、地衛研組織の弱体化が進行し、近

い将来日本の株サーベイランスシステムが機能しなくなる可能性がある。その結果、毎年の流行株から適切なワクチン製造株を選択することが困難になり、さらには、新型ウイルスや薬剤耐性ウイルスの発生や国内侵入を迅速に検知できなくなる事態に直面するかもしれない。実験室担当者の実験室診断に関する知識や技術レベルを向上させ、一定水準に保つには、定期的な講習会・技術研修会の開催が不可欠であり、それを実行するには、国からの強力な支援措置が必要である。

## D . 結論

第 2 回目のアンケート調査からも前回調査同様、高い分離効率でウイルス分離が実施されており、また多くの機関で引継代が実施されるなど、ウイルス分離に対する取り組みがよく分かり、サーベイランスとして機能していると考えられた。一方で、分離効率の改善されていない機関が浮き彫りになり、これらの機関については早急に対応策が必要である。全国的なサーベイランスの状況を把握するために、今回同様、定期的なアンケート調査は不可欠である。

## E . 研究発表

### 1 . 論文発表

Takashita E, Fujisaki S, Shirakura M, Nakamura K, Kishida N, Kuwahara T, Ohmiya S, Sato K, Ito H, Chiba F, Nishimura H, Shindo S, Watanabe S, Odagiri T; Influenza Virus Surveillance Group of Japan. Characterization of an A(H1N1)pdm09 virus imported from India, March 2015. *Jpn J Infect Dis in press*, 2015.

Zhao D, Fukuyama S, Yamada S, Lopes TJ, Maemura T, Katsura H, Ozawa M, Watanabe S, Neumann G, Kawaoka Y. *Molecular*

determinants of virulence and stability of a reporter-expressing H5N1 Influenza A virus. J Virol 89:11337-11346, 2015

Shoemaker JE, Fukuyama S, Einfeld AJ, Zhao D, Kawakami E, Sakabe S, Maemura T, Gorai T, Katsura H, Muramoto Y, Watanabe S, Watanabe T, Fuji K, Matsuoka Y, Kitano H, Kawaoka Y. An ultrasensitive mechanism regulates influenza virus-induced inflammation. PLoS Pathog 11:e1004856, 2015.

Fukuyama S, Katsura H, Zhao D, Ando T, Shoemaker JE, Ishikawa I, Yamada S, Neumann G, Watanabe S, Kitano H, Kawaoka Y. Multi-spectral fluorescent reporter influenza viruses (Color-flu) as powerful tools for in vivo studies. Nat Commun 6:6600, 2015.

Ping J, Lopes T.J.S, Nidom CA, Ghedin E, Macken CA, Fitch A, Imai M, Maher EA, Neumann G, Kawaoka Y. Development of high-yield influenza A virus vaccine viruses. Nat Commun 6:8148, 2015.

Hanson A, Imai M, Hatta M, McBride R, Imai H, Taft A, Zhong G, Watanabe T, Suzuki Y, Neumann G, Paulson JC, Kawaoka Y. Identification of Stabilizing Mutations in an H5 HA Influenza Virus Protein. J Virol (in press), 2015.

## 2 . 学会発表

なし

## F . 知的財産権の出願・登録状況

なし

【アンケート調査票の記入方法】

回答は、該当する番号を で囲んでください。

調査票は、Faxまたはe-mailにて、下記返送先に平成27年8月31日(月)までにご返送ください。ご不明な点やご質問がありましたら、下記問い合わせ先にご連絡をお願い致します。

またお手数をお掛けいたしますが、ご回答していただいた方のお名前、ご所属、ご職名、電話番号、e-mailアドレスを記入していただけますと幸いに存じます。

調査票の返送先：

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第一室

Fax: 042-561-6149

e-mail: sw@nih.go.jp

調査票の問い合わせ先：

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第一室

渡邊真治

TEL: 042-561-0771 (代)

e-mail: sw@nih.go.jp

回答された方のご連絡先：

お名前

ご所属

ご職名

電話番号

e-mail

添付資料 1 H27 年度アンケート調査票

問 1 遺伝子検査法（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを検出している。

(1) はい (2) いいえ

問 2 培養細胞を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを分離している。

(1) はい (2) いいえ

(問 2 で「(2) いいえ」を選択された方は、ここでアンケートは終了です。ご協力ありがとうございました。)

問 3- 1 ウイルス分離をする際、細胞変性効果（CPE）の有無を確認後、ウイルスの型・亜型同定を行っている。

(1) はい (2) いいえ

(問 3- 1 で「(2) いいえ」を選択された方は、問 4- 1 へお進みください。)

問 3- 2 ウイルス分離検査でCPEが確認されなかった場合、盲継代を実施している。

(1) はい (2) いいえ

問 4- 1 分離されたインフルエンザウイルスの亜型/型同定法について、該当する番号に お付けください。

- (1) HI 試験のみで亜型/型を同定している。
- (2) 遺伝子検査（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）のみで亜型/型を同定している。
- (3) 「HI 試験」と「遺伝子検査」の両方で亜型/型を同定している。

問 4- 2 問 4- 1 で「1」を選択された方は、次の設問へのご回答をお願い致します。

CPEは確認できるが、培養上清中のHA活性が陰性あるいは低かった場合（4HA/25  $\mu$  l 未満）どのようにしてウイルスの亜型/型を同定していますか？

問 4- 3 問 4- 1 で「2」を選択された方は、次の設問について、該当する項目に お付けください。

- (1) CPE の有無に関わらず、全ての検体の培養上清について遺伝子検査を実施している。
- (2) CPE が確認された検体の培養上清のみを対象に遺伝子検査を実施している。



問 4- 4 問 4- 1 で「3」を選択された方は、次の設問について、該当する項目にお付けください。

- (1) 培養上清中の HA 活性が陰性あるいは低かった (4HA/25  $\mu$ l 未満) ことから、HI 試験ができないので、遺伝子検査を行っている。
- (2) 初めに HI 試験で亜型/型を同定し、その後遺伝子検査でも確認している。
- (3) 初めに遺伝子検査で亜型/型を同定し、その後 HI 試験でも確認している。
- (4) その他 (記載をお願い致します。)

問 5- 1 インフルエンザウイルスの分離を試みた臨床検体の中で、ウイルスが分離された割合 (ウイルス分離数<sup>§</sup>の臨床検体数に対する比率) はどのくらいですか? 2014/15 シーズン(平成 26 年 10 月 1 日から平成 27 年 5 月 31 日の間に採取された臨床検体の中でウイルス分離検査の結果が確定したもの)における割合について、できる限り正確にお答えください (例: 75%)。ただし、以下の 4 種類の検体は除いて計算してください。

インフルエンザ迅速診断で使用された調整液、うがい液、抗インフルエンザ薬投与患者の検体 CPE は確認されなかったが、遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体

(<sup>§</sup>ここでいう分離数とは、臨床検体を接種して CPE が確認された培養細胞の上清中に含まれるウイルスが HI 試験/遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体数をいいます。)

問 5- 2 問 5- 1 で割合が 50% 未満と回答された方は、次の設問で該当する項目がありましたら お付けください。

- (1) 平成 25 年度から平成 27 年度の間に検査担当者が交代した。
- (2) ウイルス含量が少ない臨床検体\*が多かった。

\*リアルタイム RT-PCR の Ct 値などを目安に、大まかなウイルス含量を確認した臨床検体

添付資料1 H27年度アンケート調査票

- (3) その他、分離効率が低い理由について、何か心当たりがありましたらお書きください。

その他、ウイルス分離に関しまして、ご質問等ございましたら、ご自由にお書きください。

ご協力ありがとうございました。

## 添付資料2

「インフルエンザウイルスの分離培養検査に関する追跡調査」結果のまとめ

### アンケートの調査対象・回答率

対象：80の地方衛生研究所（47都道府県、33指定都市・中核市・特別区）

回答機関：77の地方衛生研究所（46都道府県、31指定都市・中核市・特別区）

### 問1 遺伝子検査法（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを検出している。

はい：67機関（87%）

いいえ：10機関（13%）

### 問2 培養細胞を用いて、臨床検体からインフルエンザウイルスを分離している。

はい：68機関（88%）

いいえ：9機関（12%）

### 問3-1 ウイルス分離をする際、細胞変性効果（CPE）の有無を確認後、ウイルスの型・亜型同定を行っている。

ウイルス培養実施 68機関中

はい：66機関（97%）

いいえ：1機関（1.5%）

はい（B型）いいえ（H3亜型）：1機関（1.5%）

### 問3-2 ウイルス分離検査でCPEが確認されなかった場合、盲継代を実施している。

CPE確認実施 66機関中

はい：61機関（92%）

いいえ：5機関（8%）

### 問4-1 分離されたインフルエンザウイルスの亜型/型同定法について、該当する番号に お付けください。

ウイルス培養実施 68機関中

(1)HI試験のみ：14機関（20.5%）

(2)遺伝子検査（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCRなど）のみ：10機関（15%）

(3)「HI試験」と「遺伝子検査」の両方：43機関（63%）

（その他）HI試験（B型）HIおよび遺伝子検査（H3亜型）：1機関（1.5%）

### 問4-2 問4-1で「1」（HI試験のみ）を選択した機関 14機関中

**CPEは確認できるが、培養上清中のHA活性が陰性あるいは低かった場合（4HA/25 $\mu$ l 未満）、どのようにしてウイルスの亜型/型を同定していますか？**

- ✓ 今シーズンは継代を繰り返して（最大6代）CPEが確認できた株は全て8HA以上となったが、継代してもHA活性が低い場合は遺伝子検査で亜型を同定しなければならなくなる場合もありえる。
- ✓ ウイルス分離と同時に臨床検体からの遺伝子検査も実施しており、その際に亜型同定も行っている。
- ✓ 臨床検体のConventional RT-PCRを実施することで型別をしているので、CPEが確認出来たが、HA活性が低い場合は、その上清を用いてもう一度PCRを実施はしていない。その場合、型別はPCRの結果を用い、ウイルス分離は（-）として報告している。
- ✓ CPEが確認できた検体について、接種量を変更しDIについての検証を実施する。CPEが確認できた場合、HA活性を再度確認する。それでも、HA活性が陰性あるいは低かった場合、Real Time PCRにてウイルスの亜型/型を同定している。
- ✓ 殆どの検体が4HA/25 $\mu$ l 以上であり、HI試験が可能であった。場合にもよりますが、万が一、4HA/25 $\mu$ l 未満だった場合、リアルタイムRT-PCRを考慮する。
- ✓ 培養上清を再度培養細胞へ接種することをHA活性があがるまで行う（今のところ継代によりHA価が上昇している）。
- ✓ 臨床検体からリアルタイムRT-PCRを用いて亜型/型を同定している。
- ✓ HA活性が高くなるよう継代を行い（おおよそ2代）2014/15シーズンについてはCPEが確認されたものはすべてHI試験にて同定できた。
- ✓ 遺伝子検査を併用し同定を行う。
- ✓ ウイルス培養液を希釈して4代まで継代をしている。継代しても活性が上がらない場合は、型別不能とし、NESIDへはダミー入力をしている。
- ✓ 培養上清のリアルタイムRT-PCRを実施。
- ✓ 継代し、再度HAを行う。
- ✓ CPEが確認できた場合、培養上清中のHA活性が低いためにHI試験が実施できなかった事例はなかった。
- ✓ もしHA活性が低い株が分離された場合はリアルタイムRT-PCRで確認する予定である。

**問4-3 問4-1で「2」（遺伝子検査のみ）を選択した機関 10機関中**

- (1) CPEの有無に関わらず、全ての検体の培養上清：2機関（20%）
- (2) CPEが確認された検体の培養上清のみ：8機関（80%）

**問4-4 問4-1で「3」（「HI試験」と「遺伝子検査」の両方）を選択した機関 43機関中**

- (1) 培養上清中のHA活性が陰性あるいは低かった（4HA/25 $\mu$ l 未満）ことから、HI試験ができないので、遺伝子検査：21機関
- (2) 初めにHI試験で亜型/型を同定し、その後遺伝子検査：1機関
- (3) 初めに遺伝子検査で亜型/型を同定し、その後HI試験：11機関
- (4) その他：9機関

(3)+(4) : 1機関

その他

- ✓ 流行期は基本的にHI試験のみで亜型/型を確定。HA価が低い場合には、もう1～2代は継代を続け、それでHA価が上がればHI試験に進む。HA価が変わらない場合は、培養上清について遺伝子検査を実施し同定する。流行期以外の検体については、培養を行わずに遺伝子検査のみで亜型/型を同定する場合もある。
- ✓ 初めにCPEが確認された検体の培養上清のみを対象に遺伝子検査を実施し、その後各亜型/型から数株を選択してHI試験を実施している。
- ✓ CPEを確認後、HI試験で亜型/型を同定。HA活性が陰性あるいは低かった場合、遺伝子検査を行い同定。
- ✓ 臨床検体を遺伝子検査後、分離培養しています（基本はHI試験で、遺伝子検査は補助的）。
- ✓ CPE(+)の検体については、培養上清のHA 4であればHI試験で亜型/型を同定し、4以下であった場合は、先に行った臨床検体の遺伝子検査の結果をもって分離同定としている（培養上清に対する遺伝子検査は行っていない）。
- ✓ 基本はHI試験にて同定。分離株のHA活性が低い場合、培養上清を継代することでほとんどの株はHA値が確保できる。まれに、継代してもHA活性が低いままの株については、培養上清よりRNAを抽出後、遺伝子検査の実施。
- ✓ 基本はHI試験、HA活性が低い場合は培養上清にて遺伝子検査実施。細胞障害等で培養検査不能の場合も遺伝子検査を実施。
- ✓ インフルエンザシーズン当初は細胞培養と遺伝子検査を併用実施。細胞の状態が良好になれば、培養細胞のみ。インフルエンザ様疾患の検体で培養細胞が陰性の場合、遺伝子検査を実施しウイルスの有無を確認。2014/2015シーズンにはMDCK細胞でCPE陽性；HA価の上昇がなくHI試験が困難な検体が3例認められ、細胞上清を50倍希釈しリアルタイムPCRでウイルスの亜型/型を同定。
- ✓ HI試験に用いるモルモット血球を流行期に月1回購入している。保健所に約1週間で検査結果を求められるので、モルモット血球が無い場合は遺伝子検査（リアルタイムRT-PCR、Conventional RT-PCR）で同定し、後に全てHI試験を実施。

**問5-1 インフルエンザウイルスの分離を試みた臨床検体の中で、ウイルスが分離された割合（ウイルス分離数<sup>a</sup>の臨床検体数に対する比率）はどのくらいですか？2014/15シーズン（平成26年10月1日から平成27年5月31日の間に採取された臨床検体の中でウイルス分離検査の結果が確定したもの）における割合について、できる限り正確にお答えください（例：75%）。ただし、以下の4種類の検体は除いて計算してください。**

**インフルエンザ迅速診断で使用された調整液、うがい液、抗インフルエンザ薬投与患者の検体 CPEは確認されなかったが、遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体**

**（\$ここでいう分離数とは、臨床検体を接種してCPEが確認された培養細胞の上清中に含まれるウイルスがHI試験/遺伝子検査によりインフルエンザウイルスと同定された検体数をいいます。）**

## 添付資料 2

ウイルス分離実施68機関中、

25%未満：7機関（10.3%）

25%以上 - 50%未満：2機関（2.9%）

50%以上 - 75%未満：25機関（36.8%）

75%以上：34機関（50.0%）

### **問5-2 問5-1で割合が50%未満と回答された方は、次の設問で該当する項目がありましたら おお付けください。**

分離率が50%未満と回答した9機関中、

(1)平成25年度から平成27年度の間検査担当者が交代した。：1機関（11%）

(2)ウイルス含量が少ない臨床検体\*が多かった。：1機関（11%）

\*リアルタイムRT-PCRのCt値などを目安に、大まかなウイルス含量を確認した臨床検体  
(3)その他、分離効率が低い理由について、何か心当たりがありましたらお書きください。3機関（33%）

(1)+(2)：2機関（22%）

(1)+(3)：1機関（11%）

回答なし：1機関（11%）

- ✓ ウイルス分離を試みて培養陰性となった14検体のうち、13検体はリアルタイムRT-PCRにてインフルエンザウイルスが同定された（臨床検体の結果）。その多くはCT値が28～32で検出されたが、ウイルス含有量が多いと考えられるCT値22の検体でもウイルス分離ができていない。ちなみに、うがい液を用いウイルス分離可能であった検体でCT値は28であった。また、昨年度、インフルエンザ病原体定点の変更があったが、ウイルス分離数の割合に大きな違いは認められなかった。よって、検体の採取方法というより、ウイルス含量及び、当所における培養法や培養細胞株等にウイルス分離効率の低い原因があるのではないかと考えている。
- ✓ 過去には、診断名「インフルエンザ」（疑い含む）の患者の元検体（咽頭ぬぐい液）全てについてリアルタイムRT-PCRを実施したが、いずれのシーズンも約半数の検体でインフルエンザ遺伝子が検出されず。2014/2015シーズンについては、元検体のリアルタイムRT-PCRは未実施だが、医療機関における迅速キットの検査結果が陰性であった患者の検体も少なからずあり、過去の結果も勘案すると、ウイルス分離が可能な状態でない検体が多く含まれていた可能性がある。
- ✓ 盲継代を実施していない。
- ✓ 培地組成・培養温度等に問題があり、培養条件が不適切だった。
- ✓ MDCK細胞を変えたため分離率が悪かった。
- ✓ 今年度は、3代継代してもCPEがでないインフルエンザ検体（特にAH3）が多かった。
- ✓ 病院から搬入された咽頭拭い液の検体に、インフルエンザ簡易キットで使用した綿棒をそのまま輸送培地に入れて持ち込まれた検体が多かった。
- ✓ 通常は分離培養によりCPEの有無を確認した後、CPEが確認された症例については培養細胞の上清を用いてHI試験による型別を実施し、HAが低い場合にはリアルタイム

## 添付資料 2

RT-PCR法による型別同定を実施している。しかし、2014/15シーズンではCPEが確認されない症例が多かったため、シーズン途中からは検体からの分離培養と遺伝子検査を同時に実施していた。CPEが確認できた症例のうち、HI試験で同定できた症例を除いては上清からのリアルタイムRT-PCRによる型別同定を実施していないことが、分離率が低かった原因の一つと考えられる。なお、CPEが確認されたがHAがみられなかった症例が多かったことについては、ウイルス分離に使用している細胞において、2014/15シーズンに流行していたAH3型の増殖があまり良くなかった可能性が考えられる。

- ✓ 疾病名がインフルエンザで搬入されたすべての検体について分離検査を実施しているため（インフルエンザウイルスが陰性の検体についても、分離検査を実施している）。

## その他、ウイルス分離に関しまして、ご質問等ございましたら、ご自由にお書きください。

（原文そのまま）

- ✓ H3亜型に関しては、年々MDCK細胞でのウイルス分離では継代を重ねないとHA活性が上昇しにくくなっている印象がありますが、何か良い改善法はないのでしょうか。例えばシアロ糖鎖をコーティングしたラテックス粒子で、より低濃度のウイルスでも凝集反応が観察できるような測定系を構築するなどといったようなものです。
- ✓ HA価低値であったため継代したところ、（培養上清を希釈して使用しても）HA価そのものが消失してしまった検体が数検体あった。
- ✓ 継代してもHA活性が上がらないときの改善方法をご教示下さい。
- ✓ インフルエンザウイルスの盲継代は何代まで実施すればよいのか、また、同様に、CPEは確認できるが、HA活性が低い場合の継代に関してもどのようにしたらよいのか、ご教示頂きたい。
- ✓ 当所では、継代する際に回収した培養液をそのまま接種していますが、やはり凍結融解を行ったほうが分離効率はいいのでしょうか。
- ✓ 分離検査を左右する要因として、ウイルス輸送培地や採取検体種（例えば喀痰は細菌やカビ等コンタミが多く、不適と考えています）、採取時期、輸送までの温度や時間等も考慮すべきです。特に輸送培地は重要で、横浜市衛研はオリジナルの培地を定点、保健所、病院に配布しています。
- ✓ ある地研から分離できないとの相談を受けた時、分離までの保存がマイナス20度だったことがあり、変更したところバリバリ分離できたそうです。
- ✓ 来年度4月からの感染症法改正により、発生動向調査における検査法のSOP作成が必要となるが、当所において、季節性インフルエンザのウイルス分離割合が低いことから、統一した検査法についての研修を実施してほしい。
- ✓ 今後、発生動向調査における精度管理も検討していく中で、国からのMDCK細胞の再分与はあるのか。
- ✓ 使用している培養液の組成や盲継代を何代続けているか等、ウイルス分離効率の高い施設と当所の違いがどこにあるのかを知りたい。そのためにも、培養法における基礎的な研修も行ってほしい。

## 添付資料 2

- ✓ ウイルス分離陰性であった検体を遺伝子検査に用いる場合、当所では臨床検体を使用しているが、培養上清を使用した方がよいか。
- ✓ 当センターでは、搬入された臨床検体のすべてについて最初にリアルタイムPCRを行っています。結果、型が確認された検体のうち週3検体を目安にウイルス分離培養を行っています。リアルタイムPCRの結果より、Ct値が早い(20前後から30位まで)検体の中から、型・医療機関に偏りがないように検体を選び、ウイルス分離培養へ進めています。ウイルス分離培養液から、リアルタイムPCRによる型の確認は行っていません。
- ✓ 昨年度、ウイルス分離率が例年よりも低かったため貴所からMDCK細胞を分与していただきましたが、当所の細胞株よりも増殖が悪く、分離率も低い結果となりました。マイコプラズマチェックはされていますか。また、これまでに何種類かMDCK細胞を使用してきましたが、貴所の細胞株は形態学的にみてかなりヘテロな気がします。
- ✓ 臨床検体からウイルス分離を行う場合に、盲継代を続ける妥当な継代数はありますか。
- ✓ A香港型ウイルスをMDCK細胞で分離する場合、CPEが十分認められる分離株(HA価が認められない場合)の継代培養は変異の導入が起こる可能性があるため、不必要と考えられますか。
- ✓ ウイルス分離検査でCPEが確認されない場合、盲継代を実施しますが、一般的に何代ぐらい継代するものでしょうか。
- ✓ 使用培地についてですが、現在マニュアルに掲載されているDMEMはMDCK細胞がうまく培養できなかったので使用していません。イーグル培地にて培養しています。支障なく培養できていますが、今後マニュアルに従ってDMEMに変えていった方がよいのかご教授していただけたらありがたいです。よろしく願いいたします。
- ✓ 全体としてはAH3亜型の分離率が低くなって来ていると感じています。
- ✓ 当所では、感染研マニュアル(インフルエンザ診断マニュアル第3版)とは異なる検査フローで試験を実施しているため、本アンケートの設問が当所の内容にそぐわない。
- ✓ 当センターでは、ウイルス分離にかかる負担を軽減するため、臨床検体全数について、リアルタイムRT-PCRによるインフルエンザウイルス遺伝子検出を実施し、リアルタイムRT-PCR陽性検体のみMDCK細胞に接種している。しかしながら、シーズン中にはインフルエンザ検体が集中して搬入されるので、基本的に全例MDCK細胞に接種し、後にリアルタイムRT-PCR陰性とわかった検体については、CPEが確認されない限り、盲継代は実施していない。今シーズン、リアルタイムRT-PCRでFlu(+)であったが、ウイルス分離陰性の6検体については、MDCK細胞で3継代での陰性であるが、いずれもA/H3亜型であり、臨床検体のリアルタイムRT-PCRでCt値が比較的高い、もしくは、検体の採取日から当センターへの搬入日までに時間が経過している等、検体の条件が比較的悪いものであった。
- ✓ 年度により、MDCK細胞にインフルエンザ検体を接種し培養しても1週間でCPEが出るときもあれば、3代継代してもまったくCPEがでないのは、どうしてなのかがわかりません。添加するトリプシンの濃度1%に関係しているのか。また、MDCK細胞の性質により、分離率が異なるのか、冷凍保存する場合の細胞凍結方法により、細胞の性質が変わるのか、メジウムの作成に伴うPH等により異なるのか、不明です。



## 遺伝子情報計算科学を基にハイリスク変異株の予測・評価法の開発

研究分担者：佐藤裕徳（国立感染症研究所 病原体ゲノム解析研究センター・室長）

研究協力者：横山勝（国立感染症研究所・同上・主任研究官）、伊藤公人（北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンター・バイオインフォマティクス部門・教授）

### 研究要旨

本年度は、インフルエンザウイルスのリスク予測の精度向上に必要な大規模計算の実施基盤を強化した。北大・人獣共通感染症リサーチセンターとの共同研究を通じて、同センターのスーパーコンピュータを使用して、国立感染症研究所で分子動力学計算を実施し、情報を共有する体制を整えた。この連携基盤を用いて A(H3N2) ウイルスの粒子上の HA タンパク質を近似する糖鎖付加型 HA 三量体分子の分子動力学シミュレーションを実施し、溶液中の動的構造データを 1 万通り収集した。これにより、リスク予測の精度向上に利用可能な情報と技術の基盤強化が着実に進んだ。

### A. 研究目的

2013 年にノーベル化学賞を受賞した分子動力学法（MD simulation）を用いれば、実験解析では困難な情報を入手できる。例えば、溶液中のタンパク質構造の揺らぎの情報を原子レベルで得ることができる。タンパク質の動的振る舞いは、分子の相互作用と機能発現に重要な働きをすることがわかっている。

MD simulation を取り入れれば、変異によるタンパク質相互作用表面の物性変化をより詳細に解明できる。この情報は、ウイルスの受容体指向性、薬剤感受性、抗原性・抗体感受性等の予測精度向上に役立つ。そこで本年度は、MD simulation の活用基盤を強化した。

### B. 研究方法

HA タンパク質をモデル分子として MD simulation を実施することにより、A. イン

フルエンザ研究センター、B. 人獣共通感染症リサーチセンター、C. 病原体ゲノム解析研究センターの 3 者が連携する疫学・計算科学の統合環境を構築する。

### C. 研究結果

#### （1）分子疫学情報入手体制整備：

MD simulation の効果的な実施には、対象分子とその変異情報の入手が不可欠である。解析すべき分子・変異の選別を適切に行う為に、国立感染症研究所・インフルエンザ研究センター・第一室との共同研究体制を整えた。これにより、国内と海外の株サーベイランスの最新情報を両研究部門で共有する体制が整った。

#### （2）MD simulation の実施環境整備：

MD simulation の実施には高性能コンピュータの存在が不可欠である。MD の高速計算を可能とする高性能サーバは、高額で容易に購入できない。これまでに病原体ゲノ

ム解析研究センターに整備したサーバは、通常は種々の病原体分子の構造解析研究業務に使用しているため、要事に使用できる保証が無い。この問題を解消するために、スーパーコンピュータとMD simulationの実施環境をもつ北海道大学・人獣共通感染症リサーチセンターのバイオインフォマティクス部門（伊藤教授）との共同研究体制を構築した。これにより、病原体ゲノム解析研究センターにおいて、人獣共通感染症リサーチセンターの所有するスーパーコンピュータを使用してMD simulationを実施し、成果を共有することが可能となった。

### （3）北大・感染研の連携体制整備：

HA タンパク質をモデル分子として MD simulationを開始することにより、病原体ゲノム解析研究センターをハブとして感染研と北大がつながり、インフルエンザウイルスの疫学・構造科学情報を共有し、インフルエンザ対策を進める体制を整えた。

### （倫理面への配慮）

該当無し。本研究は、計算機を用いた解析であり、遺伝子組換え生物等を用いる実験、並びに動物実験は行わなかった。

## D．考察

新型ウイルスや未報告の変異ウイルスが海外で発生した場合、ウイルスの迅速入手は不可能である。本研究では、ウイルスの遺伝子情報から抽出できるタンパク質構造情報を利用して、ウイルスのリスク評価を行う方法を考案し、これに必要な計算科学基盤を整備した。当該年度は、特にMD simulationの実施環境の整備に重点をおいた。その結果、病原体ゲノム解析研究センター・インフルエンザ研究センター・北大バイオインフォマティクス部門の3者連携

体制が生まれた。共同でMD simulationを実施し、インフルエンザウイルスの疫学・構造科学情報を共有してインフルエンザ対策を進める体制を整えた。これにより、ウイルスの迅速入手は不可能な状況下でのリスク管理を論理的に進める為の連携・技術基盤が生まれた。

今後は、これまでに病原体ゲノム解析研究センターに整備した種々の *in silico* 解析技術（分子モデリング、変異導入解析など）とMDの技術を組み合わせることで、変異株のリスク評価やリスク変異の予測精度向上を図る。

## E．結論

本研究により、MD simulationの実施環境と連携体制の整備が進んだ。これにより、粒子上のHAタンパク質の動的特性と活性発現、並びに変異に伴う物性・活性変化を解明し、リスクの予測精度を向上するための技術基盤が強化された。

## F．研究発表

### 1．論文発表

(1) Takashita E, Kiso M, Fujisaki S, Yokoyama M, Nakamura K, Shirakura M, Sato H, Odagiri T, Kawaoka Y, Tashiro M. Characterization of a large cluster of influenza A(H1N1)pdm09 viruses cross-resistant to oseltamivir and peramivir during the 2013-2014 influenza season in Japan. *Antimicrob Agents Chemother.* (2015) 59:2607-2017.

### 2．学会発表

なし

## G．知的財産権の出願・登録状況

なし